



UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ

INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

**IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES DE
QUIMIORRESISTENCIA E INVASIVIDAD PARA LA MEJORA DEL
TRATAMIENTO DEL CÁNCER COLORRECTAL**

ELENA TRISTANTE BARRENECHEA

TESIS DOCTORAL

JUNIO 2015



Los doctores **M^a Isabel Martínez-Lacaci Fortuny**, Investigadora de la Unidad AECC de Investigación Traslacional en Cáncer del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca y profesora asociada del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Miguel Hernández de Elche; y **Carlos De Torre Minguela**, Investigador del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca

CERTIFICAN que el trabajo de investigación titulado **“IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES DE QUIMIORRESISTENCIA E INVASIVIDAD EN CÁNCER COLORRECTAL”**, que conduce a la obtención del grado de Doctora, ha sido realizado bajo su dirección por **Elena Tristante Barrenechea** en la Unidad AECC de Investigación Traslacional en Cáncer del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia.

Para que conste y surta los efectos oportunos, firman el presente certificado en Murcia

Los Directores de la Tesis:

Fdo: Dra. **M^a Isabel Martínez-Lacaci Fortuny**

Fdo: Dr. **Carlos De Torre Minguela**



D. 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 **“IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES DE QUIMIORRESISTENCIA E INVASIVIDAD PARA LA MEJORA DEL TRATAMIENTO DEL CÁNCER COLORRECTAL”**,, presentada por doña **Elena Tristante Barrenechea**.

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

El Director del Instituto de Biología Molecular y Celular:

Fdo.: Prof. Antonio Ferrer Montiel

*Mucha gente pequeña en lugares pequeños,
haciendo cosas pequeñas, puede cambiar el mundo.*

Eduardo Galeano (1940-2015). Escritor uruguayo.

AGRADECIMIENTOS

Es complicado entender la importancia de los agradecimientos de una tesis doctoral hasta que no la has terminado. Es en ese momento cuando comprendes lo mucho que tienes que agradecer a la gente que te rodea.

Gracias a los directores de mi tesis. A la Doctora Isabel Martínez-Lacaci, co-directora de esta tesis, que desde el principio confió en mí para realizar este trabajo y que durante estos años ha sido un gran apoyo. Al Doctor Carlos De Torre, co-director de esta tesis, mi *knowledge source*, ejemplo de dedicación y constancia. Sin vosotros no lo habría conseguido. Gracias a ambos por el respeto a mis ideas y sugerencias, que me han hecho madurar como investigadora.

Dado que el seguimiento de los pacientes afectados por cáncer colorrectal es multidisciplinar, me gustaría agradecer a los servicios del Hospital que han podido hacer que se lleve a cabo este trabajo. Al Servicio de Cirugía Digestiva, en concreto al Doctor Fernando Carballo, Jefe del Servicio de Aparato Digestivo, por ser la conexión entre lo básico y lo clínico. Al Doctor Juan Luján, que gracias a sus operaciones recibimos las muestras de los pacientes. A los demás profesionales que colaboran en operaciones y en la recogida de muestras. Al Doctor Pablo Carbonell, del Servicio de Bioquímica y Genética clínica del hospital, por llevar a cabo el análisis de mutaciones de todas las muestras.

A todos mis chicos del Biobanco. Encarni, porque tu risa, oída a metros de distancia, me alegraba a cualquier hora del día. Agustín, gracias por escucharme y aconsejarme en todos los momentos. Gracias a Sergio, Lorena, Belén, Charo y Teresa, su trabajo y esfuerzo han facilitado la recogida de muestras.

Gracias a mis compis del laboratorio, Leti y Mar, por haberme acompañado en esta travesía y haber hecho del lugar de trabajo un sitio de compañerismo y amistad.

A mis compis del “laboratorio de al lado” Agus, Toñi, Ángel, Caty, Ania, ¿qué habría sido de mí sin un *break* a tiempo? A todos, gracias por derrochar simpatía y cariño allá por donde vais.

Gracias a Lucía y Sofía, por ayudarme en una de las partes de este trabajo. El tiempo que estuvimos juntas, aunque breve, me demostró lo grandes que sois.

Gracias a los anatomopatólogos del Hospital, en concreto al Doctor Carlos Manuel Martínez, por haber realizado las preparaciones y el contaje celular. A Miriam, por haber llevado a cabo las inmunotinciones de los pacientes.

Al Servicio de Registro, gracias por darme acceso a las historias clínicas de los pacientes, y a los doctores Gema Marín y Miguel Marín del Servicio de Oncología, por ayudarme a la hora de interpretarlas.

A los pacientes, que sin su consentimiento no podría haber realizado este trabajo. Personas anónimas que hacen que la investigación pueda llevarse a cabo. Miles de gracias.

Gracias al Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria (IMIB), por acogerme durante el transcurso de este trabajo.

Esta tesis doctoral ha sido fruto de años de investigación. Además del respaldo científico y profesional, se ha realizado gracias al apoyo que me ofrecen las personas que aprecio y valoro, sin el cual no tendría la fuerza y energía para crecer como persona y como profesional de la biología.

Por ello quería agradecer esta tesis a mi familia. A mis padres, sin vosotros no estaría aquí, gracias por apoyarme en todas las decisiones que he tomado a lo largo de la vida, hayan sido buenas o malas, y especialmente por enseñarme a luchar por lo que quiero. A mi hermano, por todos los momentos que vivimos en nuestra infancia y porque los sigamos viviendo. Siempre seremos las cuatro familias.

A todos los Tristante y los Barrenechea, a mis abues, mis tíos y primos porque formamos una gran familia y nuestras reuniones siempre alegran en los buenos y malos momentos.

Gracias a Mati, Raquel e Isa, por todos los momentos que hemos vivido juntas y por todos lo que vendrán. Somos un puzle de cuatro piezas inseparables. Las que siempre han tenido un consejo que darme, y han estado ahí en millones de ratos. Sois una parte muy importante de mi vida, lo habéis sido antes y durante la tesis y lo seréis siempre.

A Laura, la persona que comenzó siendo una compañera de laboratorio y ha llegado a ser una gran amiga, sin todos sus consejos y su cariño habría sido imposible conseguir este gran reto.

A todos mis biólogos y demás amantes de la biología. Mar, Cris, Ana Pagán, Eli, Ana Tapia, Ana Pozo, María Nicolás, María “de Bullas”, Juanma, Tano, Félix, porque aunque pase el tiempo y algunos estéis en la distancia, seguimos buscando un hueco para vernos y echarnos unas risas. Gracias por todas las quedadas bioguiles tan míticas y tan reconfortantes.

A mis queridos “compis de la carrera” Agus, Rubén, Crysso, Esther, Cristina, personas con las que he compartido muchos momentos de estudio y cada vez más momentos de diversión.

A Rodri, la persona con la que compartiré el resto de mi vida, la persona que me hace mirar el lado más optimista de la vida. Haces que cada día sea mejor persona. Miles de gracias.

ÍNDICE

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	21
ÍNDICE DE TABLAS	27
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	29
RESUMEN	35
INTRODUCCIÓN	39
1. CÁNCER COLORRECTAL	39
1.1 EPIDEMIOLOGÍA	39
1.2 ETIOLOGÍA	40
1.3 FACTORES DE RIESGO	43
2. VÍAS DE TUMOROGÉNESIS	46
2.1 VÍA SUPRESORA O VÍA DE INESTABILIDAD CROMOSÓMICA	46
2.2 VÍA MUTADORA O INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES	49
2.3 VÍA SERRADA O FENOTIPO METILADOR	50
3. DIAGNÓSTICO DEL CCR	52
3.1 DETECCIÓN DEL CCR	52
3.2 CIRUGÍA PARA EL CÁNCER COLORRECTAL	53
3.3 FASES DEL CÁNCER DEL COLORRECTAL	54
3.4 PROPAGACIÓN DEL CÁNCER COLORRECTAL	58
3.5 METÁSTASIS DEL CCR	59
4. MARCADORES PRONÓSTICOS	62
4.1 MARCADORES HISTOPATOLÓGICOS	62
4.2 MARCADORES MOLECULARES	67
5. TRATAMIENTOS	74

5.1	TRATAMIENTO ADYUVANTE	74
5.2	TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD METASTÁSICA.....	77
6.	MECANISMO DE ACCIÓN DE 5-FLUOROURACILO	79
7.	MECANISMO DE ACCIÓN DE IRINOTECAN	80
8.	MECANISMO DE ACCIÓN DE OXALIPLATINO	81
9.	MECANISMOS CELULARES DE SEÑALIZACIÓN DE DAÑO EN EL ADN	82
9.1	VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DEL DAÑO EN EL ADN	82
	HIPÓTESIS.....	93
	OBJETIVOS.....	95
	MATERIALES Y MÉTODOS.....	99
1.	LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER COLORRECTAL.....	99
2.	CULTIVOS PRIMARIOS DE CÁNCER COLORRECTAL	99
3.	ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR DEPENDIENTE DE ANCLAJE.....	101
4.	ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR INDEPENDIENTE DE ANCLAJE	102
5.	OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE PROTEÍNAS	103
6.	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS: Método de Bradford.....	104
7.	WESTERN BLOT	104
7.1	PREPARACIÓN DE MUESTRAS	104
7.2	PREPARACIÓN DE LOS GELES DE POLIACRILAMIDA.....	105
7.3	ELECTROFORESIS	106
7.4	TRANSFERENCIA.....	107
7.5	BLOQUEO	108
7.6	INCUBACIÓN CON ANTICUERPOS	108

7.7	DETECCIÓN	110
7.8	ELIMINACIÓN DE ANTICUERPOS DE LAS MEMBRANAS DE PVDF	110
7.9	DENSITOMETRÍA.....	111
8.	ESTUDIO DE LAS FASES DEL CICLO CELULAR.....	111
9.	ESTUDIO DE LOS NIVELES DE FOSFORILACIÓN DE LA HISTONA H2A.X.....	112
10.	INMUNOPRECIPITACIÓN	113
11.	ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DE P53 EN LÍNEAS CELULARES	115
11.1	VECTORES.....	115
11.2	TRANFECCIÓN POR LIPOSOMAS CATIONICOS	116
11.3	LISIS CELULAR PASIVA	117
11.4	LECTURA DE LA EXPRESIÓN DE LUCIFERASA.....	118
12.	ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL.....	119
12.1	PREPARACIÓN DE LA MUESTRA Y MARCAJE CON FLUORESCENCIA	119
12.2	ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL.....	120
12.3	IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS PRESENTES MEDIANTE LC-MS/MS	121
13.	ENSAYO DE MIGRACIÓN E INVASIÓN CELULAR	122
14.	INMUNOFLUORESCENCIA	124
15.	INMUNOHISTOQUÍMICA.....	124
16.	ESTUDIO CLÍNICO-PATOLÓGICO DE PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL.....	125
17.	ESTADÍSTICA.....	126
	RESULTADOS	131
1.	ESTUDIO DEL EFECTO DE FÁRMACOS UTILIZADOS EN CLÍNICA EN EL CRECIMIENTO DE LÍNEAS CELULARES Y CULTIVOS PRIMARIOS DE CÁNCER DE COLON.....	131

1.1	EFFECTOS DEL FÁRMACO 5-FLUOROURACILO.....	131
1.2	EFFECTOS DEL FÁRMACO CAPECITABINA	135
1.3	EFFECTOS DEL FÁRMACO IRINOTECAN.....	137
1.4	EFFECTOS DEL FÁRMACO SN-38	140
1.5	EFFECTOS DEL FÁRMACO OXALIPLATINO	142
2.	ANÁLISIS DE LOS MECANISMOS DE DETECCIÓN Y SEÑALIZACIÓN DEL DAÑO EN EL ADN	147
2.1	NIVELES DE EXPRESIÓN DEL COMPLEJO MRN	147
2.2	NIVELES DE FOSFORILACIÓN (SERINA 139) DE LA HISTONA H2A.X TRAS EL TRATAMIENTO CON OXALIPLATINO.....	149
2.3	EFFECTOS DE OXALIPLATINO EN LAS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN DEL DAÑO EN EL ADN	151
2.4	EFFECTOS DE OXALIPLATINO EN EL CICLO CELULAR.....	155
2.5	EFFECTO DE OXALIPLATINO EN APOPTOSIS CELULAR	158
2.6	BÚSQUEDA DE QUINASAS ACTIVADORAS DE LAS PROTEÍNAS CHK1 Y CHK2	159
3.	ANÁLISIS DE MUTACIONES SOMÁTICAS DE LAS LÍNEAS CELULARES Y CULTIVOS PRIMARIOS DE CÁNCER COLORRECTAL	162
4.	ANÁLISIS DE LAS MUTACIONES DE <i>TP53</i> DE LAS LÍNEAS CELULARES Y CULTIVOS PRIMARIOS DE CÁNCER COLORRECTAL	164
4.1	NIVELES DE ACTIVIDAD DE P53 EN LÍNEAS CELULARES DE CCR.....	165
4.2	RELACIÓN ENTRE TP53 Y EL TRATAMIENTO CON OXALIPLATINO	167
5.	COMPARACIÓN DEL PROTEOMA DE LAS LÍNEAS CELULARES SENSIBLES Y RESISTENTES A OXALIPLATINO.....	168
5.1	ESTUDIO DE LA PROTEÍNA KU80	171

5.2	ESTUDIO DE LA PROTEÍNA ANEXINA A2.....	171
5.3	ESTUDIO DE MIGRACIÓN E INVASIÓN CELULAR	173
5.4	NIVELES DE FOSFORILACIÓN DE LA PROTEÍNA ANEXINA A2	176
5.5	LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA ANEXINA A2	176
5.6	EFFECTO DE OXALIPLATINO EN LA LOCALIZACIÓN CELULAR DE ANEXINA A2.....	179
6.	ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE EL PATRÓN DE ANEXINA A2 Y LA PRESENCIA DE METÁSTASIS EN GÁNGLIOS LINFÁTICOS DE PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL	180
6.1	CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE LOS PACIENTES	180
6.2	ANÁLISIS DE LA LOCALIZACIÓN CELULAR DE ANEXINA A2 EN CORTES HISTOLÓGICOS DE PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL.....	183
6.3	ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE EL PATRÓN DE ANEXINA A2 Y LA PRESENCIA DE METÁSTASIS EN LOS GANGLIOS LINFÁTICOS DE PACIENTES AFECTADOS POR CÁNCER COLORRECTAL	186
	DISCUSIÓN.....	193
	EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE COLON FRENTE A FÁRMACOS UTILIZADOS EN LA CLÍNICA.....	193
	CAPACIDAD DE SEÑALIZACIÓN Y REPARACIÓN DE DAÑO AL ADN FRENTE A OXALIPLATINO	198
	VALORACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LA SENSIBILIDAD A OXALIPLATINO DE MUTACIONES SOMÁTICAS ASOCIADAS A CARCINOGENÉNESIS.....	210
	ANÁLISIS DE LA PROTEÍNA ANEXINA A2 Y SU PAPEL EN LA INVASIVIDAD Y LA METÁSTASIS EN CÁNCER COLORRECTAL	212
	CONCLUSIONES	223
	BIBLIOGRAFÍA.....	229
	PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DERIVADA DE LA TESIS DOCTORAL	251
	PUBLICACIONES.....	251

COMUNICACIONES CIENTÍFICAS A CONGRESOS..... 252

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. A. Vía canónica Wnt- β -catenina. B. Activación de la vía de señalización por la unión del ligando WNT (20).....	42
Figura 2. Modelo de progresión tumoral propuesto por Fearon y Volgestein	49
Figura 3. Representación de las fases del cáncer colorrectal (57).....	57
Figura 4. Esquema representativo del fenómeno metastásico.. ..	60
Figura 5. Mecanismo de promoción de la metástasis en el sistema de activación del plasminógeno.....	61
Figura 6. Esquema de la anatomía del intestino grueso (76).....	62
Figura 7. Esquema de la histología del intestino grueso (8).	63
Figura 8. Ruta de señalización a través del receptor tirosín quinasa.....	70
Figura 9. Estructura de p53.....	73
Figura 10. Mecanismo de acción de 5-Fluorouracilo.	80
Figura 11. Estructura del fármaco Oxaliplatino y formación de enlaces en la cadena de ADN..	81
Figura 12. Activación del complejo proteico MRN y la proteína ATM.....	84
Figura 13. Activación de la proteína ATR	85
Figura 14. Amplificación de la señalización del daño a través de Chk1 y Chk2	88
Figura 15. Procedimiento para la recogida y procesamiento de las muestras de cáncer colorrectal.	101
Figura 16. Representación del ensayo de proliferación celular independiente de anclaje	103
Figura 17. Desnaturalización de proteínas mediante SDS.. ..	105
Figura 18. Electroforesis en gel de poliacrilamida.	107
Figura 19. Sándwich de transferencia.....	107

Figura 20. Reacción quimioluminiscente.	110
Figura 21. Perfiles de ciclo celular obtenidos mediante citometría de flujo por marcaje del ADN con yoduro de propidio.....	112
Figura 22. Esquema de la inmunoprecipitación de proteínas.....	114
Figura 23. Vectores empleados en el ensayo de la medida de actividad de p53	116
Figura 24. Proceso de transfección y tratamiento de las células de cáncer colorrectal.....	118
Figura 25. Lectura de la actividad luciferasa.	119
Figura 26. Esquema de los pocillos con el inserto de membrana o matrigel.	123
Figura 27. Proliferación de líneas celulares establecidas de cáncer colorrectal tratadas con 5-Fluorouracilo.	132
Figura 28. Proliferación de cultivos primarios de cáncer colorrectal tratados con 50 μ M de 5-Fluorouracilo.	133
Figura 29. Efecto de 5-Fluorouracilo sobre la proliferación independiente de anclaje en líneas celulares establecidas de cáncer colorrectal.	134
Figura 30. Crecimiento independiente de anclaje de cultivos primarios.....	134
Figura 31. Efecto de 5-Fluorouracilo sobre la proliferación independiente de anclaje en HCUVA-CC-1 y CC-34.	135
Figura 32. Proliferación de líneas celulares establecidas de cáncer colorrectal tratadas con Capecitabina.....	136
Figura 33. Proliferación de cultivos primarios de cáncer colorrectal tratados con 50 μ M de Capecitabina.....	136
Figura 34. Proliferación de líneas celulares establecidas de cáncer colorrectal tratadas con Irinotecan.	137
Figura 35. Proliferación de cultivos primarios tratados con 50 μ M de Irinotecan.	138

Figura 36. Efecto de Irinotecan sobre la proliferación independiente de anclaje en líneas celulares establecidas de cáncer colorrectal.	139
Figura 37. Efecto de Irinotecan sobre la proliferación independiente de anclaje en HCUVA-CC-1 y CC-34.	140
Figura 38. Proliferación de líneas celulares establecidas de cáncer colorrectal tratadas con SN-38.....	141
Figura 39. Efecto de SN-38 sobre la proliferación independiente de anclaje en HCUVA-CC-1 y CC-34.	142
Figura 40. Proliferación de líneas celulares establecidas de cáncer colorrectal tratadas con Oxaliplatino.	143
Figura 41. Proliferación de cultivos primarios derivados de pacientes con cáncer colorrectal tratados con Oxaliplatino	144
Figura 42. Efecto de Oxaliplatino sobre la proliferación independiente de anclaje en líneas celulares establecidas de cáncer colorrectal.	145
Figura 43. Efecto de Oxaliplatino sobre la proliferación independiente de anclaje en cultivos primarios.	146
Figura 44. Efecto de Oxaliplatino en HCUVA-CC-1.....	147
Figura 45. Nivel de expresión de las proteínas del complejo MRN (MRE11, Rad50 y NBS1) en líneas celulares establecidas.	148
Figura 46. Nivel de expresión de las proteínas del complejo MRN (MRE11, Rad50 y NBS1) en los cultivos primarios.....	148
Figura 47. Efecto de Oxaliplatino en la fosforilación de la histona H2AX (γ H2AX).	149
Figura 48. Efecto de Oxaliplatino en la fosforilación de la histona H2AX (γ H2AX) en cultivos primarios.	150
Figura 49. Expresión de las proteínas de las vías de señalización del ADN de las líneas celulares SW480 y SW620.	152

Figura 50. Expresión de las proteínas de las vías de señalización del ADN de las líneas celulares HCT 116 y LS 174T.	153
Figura 51. Inducción de p21 tras el tratamiento con Oxaliplatino 10 μ M durante 24 horas....	153
Figura 52. Expresión de las proteínas de las vías de señalización del ADN de las líneas celulares DLD-1 y HCT-15.	154
Figura 53. Análisis del contenido de ADN de las distintas fases del ciclo celular (SubG ₁ , G ₁ , S y G ₂ /M) en las líneas celulares de carcinoma colorrectal.	156
Figura 54. Análisis del contenido de ADN de las distintas fases del ciclo celular (SubG ₁ , G ₁ , S y G ₂ /M) en los cultivos primarios.....	157
Figura 55. Expresión de la proteína PARP-1 en las líneas celulares SW480 y DLD-1.	158
Figura 56. Expresión de la proteína PARP-1 en los cultivos primarios HCUVA-CC-1, CC-3CT y CC-71.....	159
Figura 57. Niveles de expresión de las proteínas DNAPK, mTOR, VRK1 y TTK/Mps1	160
Figura 58. Co-Inmunoprecipitación de Chk1 en la línea celular HCT-15.....	161
Figura 59. Co-Inmunoprecipitación de Chk2 en la línea celular HCT 116.	162
Figura 60. Actividad transcripcional de p53.....	166
Figura 61. Actividad transcripcional de p53 tras el tratamiento con Oxaliplatino.	167
Figura 62. Niveles de expresión de la proteína Ku80.....	171
Figura 63. Tinción representativa del análisis proteómico 2D-DIGE.....	172
Figura 64. Niveles de expresión de la proteína Anexina A2.....	173
Figura 65. Migración e invasión de las líneas celulares resistentes (DLD-1 y HCT-15) y sensibles (HCT 116 y LS 174T) a Oxaliplatino.....	174
Figura 66. Migración e invasión de las líneas celulares SW480 y SW620.	174
Figura 67. Migración e invasión de los cultivos primarios HCUVA-CC-34 y HCUVA-CC-62.....	175

Figura 68. Niveles de expresión de P- Anexina A2 y Anexina A2 en SW480 y SW620.....	176
Figura 69. Detección de Anexina A2 por inmunofluorescencia en las líneas celulares DLD-1, HCT-15, HCT 116 y LS 174T..	177
Figura 70. Detección de Anexina A2 por inmunofluorescencia en las líneas celulares SW480 y SW620.	178
Figura 71. Detección de Anexina A2 por inmunofluorescencia en los cultivos primarios HCUVA-CC-34 y HCUVA-CC-62.	179
Figura 72. Detección de Anexina A2 por inmunofluorescencia en las líneas celulares DLD-1 y SW620 tras el tratamiento con Oxaliplatino.....	180
Figura 73. Localización celular de Anexina A2 en cortes histológicos de cáncer colorrectal....	183
Figura 74. Localización celular de Anexina A2 en cortes histológicos de HCUVA-CC-34.	184
Figura 75. Localización celular de Anexina A2 en cortes histológicos de pacientes con cáncer colorrectal..	185
Figura 76. Representación esquemática de la ruta de señalización del daño en el ADN del primer modelo.	202
Figura 77. Representación esquemática de la ruta de señalización del daño en el ADN del segundo modelo.....	205
Figura 78. Representación esquemática de la ruta de señalización del daño en el ADN del tercer modelo.....	207

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Grados de penetración del tumor primario	55
Tabla 2. Presencia de metástasis en ganglios linfáticos regionales	55
Tabla 3. Metástasis a distancia	56
Tabla 4. Fases de la enfermedad, basados en el Sistema de clasificación TNM.	57
Tabla 5. Correlación entre las fases del cáncer colorrectal y la esperanza de vida a 5 años.	58
Tabla 6. Componentes de los geles de electroforesis y concentraciones de los mismos.	106
Tabla 7. Proteínas detectadas por Western Blot.	109
Tabla 8. Formularios de Anatomía Patológica y de Cirugía/Oncología.	126
Tabla 9. Valores de IC ₅₀ (μM) de inhibición de la proliferación celular causado por 5-Fluorouracilo en líneas celulares establecidas de cáncer colorrectal.	132
Tabla 10. Valores de IC ₅₀ (μM) de inhibición de la proliferación celular causado por Irinotecan en líneas celulares establecidas de cáncer colorrectal.	138
Tabla 11. Valores de IC ₅₀ (nM) de inhibición de la proliferación celular causado por SN-38 en líneas celulares establecidas de cáncer colorrectal.	141
Tabla 12. Valores de IC ₅₀ de inhibición de la proliferación celular por Oxaliplatino en líneas celulares establecidas de cáncer colorrectal.	143
Tabla 13. Análisis de las mutaciones somáticas (<i>KRAS</i> , <i>BRAF</i> y <i>PIK3CA</i>) de las líneas establecidas de cáncer colorrectal.	163
Tabla 14. Análisis de las mutaciones somáticas (<i>KRAS</i> , <i>BRAF</i> y <i>PIK3CA</i>) de los cultivos primarios derivados de pacientes con cáncer colorrectal.	164
Tabla 15. Análisis mutacional del gen <i>TP53</i> de las líneas establecidas de cáncer colorrectal y de varios cultivos primarios estudiados.	165
Tabla 16. Proteínas diferenciales encontradas entre las líneas celulares DLD-1, HCT-15, HCT 116 y LS 174T tras análisis 2D-DIGE.	170

Tabla 17. Datos de sexo y edad de los pacientes afectados por cáncer colorrectal utilizados en este estudio.....	181
Tabla 18. Fase tumoral y clasificación TNM de los pacientes afectados por cáncer colorrectal utilizados en este estudio.....	181
Tabla 19. Localización del tumor en los pacientes afectados por cáncer colorrectal estudiados en este trabajo.	182
Tabla 20. Análisis univariante de relación entre factores histopatológicos y la presencia de metástasis en los nódulos linfáticos.....	187
Tabla 21. Análisis univariante de relación entre factores histopatológicos y el número de células marcadas con Anexina A2.	189

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

5-FU: 5-Fluorouracilo

AACR: *American Association for Cancer Research*. Asociación Americana para la Investigación del Cáncer

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AJCC: *American Joint Committee on Cancer*. Comisión Americana Mixta sobre el Cáncer

ARN: Ácido ribonucleico.

ATCC: *American Type Culture Collection*. Colección americana de cultivos

BSA: *Bovine serum albumin*. Albúmina de suero bovino

CCR: Cáncer colorrectal

CCRM: Cáncer colorrectal metastásico

CDK: *Cyclin-Dependent Kinase*. Quinasa dependiente de ciclina

CHAPS: 3-(cloroamido propil)-dimetilamonio-1-propanosulfato

DIGE: *Differential In Gel Electrophoresis*. Electroforesis diferencial en gel

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*. Medio Eagle modificado por Dulbecco

DDR: *DNA damage response*. Respuesta al daño al ADN

DSB: *Doble strand break*. Rotura de cadena doble

DTT: Ditioneitol

ECL: *Enhanced Chemical Luminescence*. Luminiscencia química potenciada

EDTA: *Ethylenediaminetetraacetic Acid*. Acido Etileno Diamino Tetracético

EEM.: Error estándar de la media

EGF: *Epidermal Growth Factor*. Factor de crecimiento epidérmico

EGFR: *Epidermal Growth Factor Receptor*. Receptor del factor de crecimiento epidérmico

FDA: Food and Drug Administration, Agencia de Alimentos y Medicamentos

FITC: *Fluorescein Isothiocyanate*. Tioisocianato de fluoresceína

HCUVA: Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia

HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HGUE: Hospital General Universitario de Elche

HSP: *Heat Shock Protein*. Proteína de choque térmico

IACR: *International Association of Cancer Registries*. Agencia internacional de investigación en cáncer

IC: Intervalo de confianza

IHQ: Inmunohistoquímica

IP: Ioduro de propidio

ITNZ: Iodonitrotetrazolio

ITS: Insulin-Transferrin-Selenium A

LV: Leucovorina

MOSAIC: *Multicenter International Study of Oxaliplatin/5-Fluorouracil/Leucovorin in the Adjuvant Treatment of Colon Cancer*. Estudio Internacional Multicéntrico de Oxaliplatino/5-fluorouracilo/leucovorina en el tratamiento adyuvante del cáncer de colon

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio.

NSABP: *National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project*. Proyecto C-07 Nacional de Cirugía Adyuvante en el Cáncer de mama e intestinal

OMS: Organización Mundial de la Salud

OXA: Oxaliplatino

PARP-1: Poli-ADP-Ribosa Polimerasa 1

PBS: *Phosphate Buffered Saline*. Tampón fosfato salino

PET: *Positron Emission Tomography*. Tomografía por emisión de positrones

PIP₂: Fosfatidil inositol 3,4 difosfato

PIP₃: Fosfatidil inositol 3, 4,5 trifosfato

PSA: Persulfato amónico

PVDF: Polifluoruro de vinilideno

RIC: Rango intercuartílico

ROS: *Reactive Oxygen Species*. Especies Reactivas del Oxígeno

SBF: Suero bovino fetal

SDS: Dodecilsulfato sódico

SDS-PAGE: *Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

SLE: Supervivencia Libre de Enfermedad

SLP: Supervivencia libre de progresión

SG: Supervivencia Global

SSB: *Simple strand break*. Rotura de cadena sencilla

TBS: *Tris Buffered Saline*. Tampón Tris Salino

TEM: Transición Epitelio-Mesénquima

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

TGF α : *Transforming Growth Factor α* . Factor de crecimiento transformante alfa

TNF: *Tumor Necrosis Factor*. Factor de necrosis tumoral

VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*. Factor de crecimiento endotelial vascular

XELOX: capecitabina/Oxaliplatino

RESUMEN

RESUMEN

El cáncer colorrectal es un tipo de cáncer muy prevalente en el mundo. La cirugía junto con la quimioterapia como adyuvante han resultado efectivas en fases de I a III. El uso de quimioterápicos puede fracasar debido a fenómenos de quimiorresistencia. Uno de los objetivos de este trabajo fue investigar la respuesta frente al fármaco quimioterapéutico Oxaliplatino. Para ello se utilizó un panel de líneas celulares de cáncer de colon y tumores de pacientes con cáncer colorrectal extirpados en el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, a partir de los cuales se realizaron cultivos primarios. Como resultado, dichas líneas celulares y cultivos primarios se clasificaron en sensibles y resistentes. Al estudiar la señalización del daño en el ADN, se descubrió que Chk1 y Chk2, proteínas control de dicha señalización, conseguían activarse por una vía distinta de ATR y ATM, respectivamente. Una de las posibles quinasas activadora de Chk1 podría ser VRK1 y además, la proteína Rad51, implicada en la reparación del daño, se activaría en ausencia de la proteína ATR. En el análisis de mutaciones no se pudo demostrar una asociación entre la presencia de mutaciones en *KRAS*, *BRAF* y *PIK3CA* y la respuesta a Oxaliplatino. La mutación p.R273H en el gen *TP53* podría impedir la correcta reparación del daño en el ADN causado por Oxaliplatino, a diferencia de la mutación p.S241F.

Otro de los objetivos planteados fue la realización de un análisis diferencial del proteoma de las líneas celulares sensibles y resistentes a Oxaliplatino por 2D-DIGE y comprobar su capacidad de migración e invasividad. Se encontró que la proteína Anexina A2 estaba sobreexpresada en aquellas células con una mayor capacidad invasiva y migratoria y esta proteína se encontraba localizada en la superficie celular. Curiosamente, también se encontró una tinción membranosa en los nidos tumorales que invaden la lámina muscular en cortes histológicos de pacientes y una asociación significativa entre el número de células teñidas con Anexina A2 en la membrana celular y la presencia de *tumor budding*. Además, se asoció significativamente la presencia de metástasis en los ganglios linfáticos cercanos con el número de células con tinción positiva con Anexina A2 en la membrana celular. Sin embargo, no se encontró relación alguna entre la expresión de Anexina A2 y la capacidad de respuesta a Oxaliplatino.

Con estos resultados se ha conseguido encontrar biomarcadores de quimiorresistencia e invasividad que podrían ser utilizados en la terapia individualizada del cáncer colorrectal.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. CÁNCER COLORRECTAL

Neoplasia es el término utilizado para nombrar a una masa de tejido anormal constituida por células que crecen y se multiplican a un ritmo más acelerado del normal. El cáncer colorrectal (CCR) se define como cualquier tipo de neoplasia que afecte al colon, recto y/o apéndice. Se inicia con el crecimiento descontrolado de las células de la capa mucosa (la capa más interna) en regiones intestinales del colon y recto. Estas células destruyen el tejido *in situ* y pueden llegar a destruir e invadir tejidos adyacentes, o cualquier parte del organismo si pasan al torrente sanguíneo o linfático y derivar en un cáncer colorrectal metastásico (CCRm).

El colon está organizado en compartimentos celulares que componen las denominadas criptas colónicas. Es ampliamente conocido que a partir de las células madre localizadas en la base de las criptas es donde se desarrollan las lesiones adenomatosas (1). La progenie de las células madre migra por las criptas y se divide hasta que alcanza la porción media de las mismas. En ese instante, las células dejan de dividirse y empiezan a diferenciarse en células epiteliales maduras. Cuando las células diferenciadas alcanzan la superficie externa de la cripta, sufren un proceso de muerte por apoptosis y son eliminadas por células estromales o se desprenden hacia el lumen de la cripta. Este camino desde la base de la cripta hasta su ápice dura en torno a 3-6 días (2). Normalmente, la tasa de origen de células epiteliales colónicas iguala a la tasa de pérdida, pero si esta tasa se incrementa se origina un proceso neoplásico.

Los tumores de colon atraviesan por diferentes fases clínicas e histopatológicas, que van desde la formación de las criptas displásicas hasta la de tumores benignos, y carcinomas. Esta progresión es el resultado de una serie de cambios genéticos que implica la inactivación de genes supresores de tumores y la activación de oncogenes (3).

1.1 EPIDEMIOLOGÍA

El cáncer colorrectal (CCR) constituye un importante problema de salud pública en el mundo occidental, debido a su elevada incidencia y mortalidad (4). A nivel global, supone aproximadamente 1.000.000 de nuevos casos anuales, de los cuales 550.000 son hombres y 450.000 mujeres. De los nuevos casos diagnosticados, este tipo de cáncer provoca 600.000 muertes al año siendo el tercer cáncer con mayor mortalidad en el mundo (5). Además el CCR representa el 9,7% de todos los tumores, observándose grandes diferencias entre los países en función de su desarrollo (6).

En cuanto a la incidencia en Europa, se encuentra entre los cinco tipos de cáncer más comunes, siendo el tercero en hombres, tras los tumores de pulmón y próstata, y el segundo en mujeres, tras el cáncer de mama, con un total de 447.000 nuevos casos anuales. Respecto a la mortalidad, provoca 215.000 muertes al año, situándose el segundo en hombres y mujeres, con 113.000 y 102.000 muertes respectivamente (7).

Centrándonos en España, el CCR constituye la segunda neoplasia más común y su incidencia tiene una trayectoria al alza, ya que en 2002 los nuevos casos al año rondaban los 21.000, mientras que la última valoración de 2012 se estimaron 32.240 nuevos casos anuales (8). Siguiendo con datos del año 2012, se estimaron 66 y 35 casos por cada 100.000 habitantes en hombres y mujeres respectivamente; mientras que la mortalidad desciende a 14.700 muertes anuales, 27 y 13 defunciones en hombres y mujeres respectivamente por cada 100.000 individuos (7).

Hoy en día, en España se está llevando a cabo un programa de cribado de la población entre 50 y 69 años en nueve comunidades autónomas mediante el uso de técnicas diagnósticas sencillas y no invasivas. Este sistema pretende detectar individuos sin síntomas con lesiones precancerosas, denominadas pólipos o adenocarcinomas en una fase inicial de la progresión del tumor (9), y conseguir así disminuir la incidencia y mortalidad por CCR. Este cribado se pretende ampliar, marcándose un objetivo de cobertura para el año 2015 del 50% de la población. Con este tipo de proyectos se pretende informar a la población sobre la importancia del CCR en España, así como desarrollar programas de prevención y diagnóstico precoz para conseguir una disminución de la mortalidad (10).

1.2 ETIOLOGÍA

Se estima que aproximadamente entre un 20 y un 40% de los casos de CCR tienen una base genética (hereditaria o agrupación familiar) (11) y aproximadamente el 5% de los casos se asocian a mutaciones hereditarias bien caracterizadas. El resto se consideran casos esporádicos de CCR. Basado en este conocimiento, se realiza la siguiente clasificación:

1.2.1 ESPORÁDICO

El término esporádico se utiliza para diferenciar los cánceres que ocurren en personas que no portan una determinada mutación que les confiera susceptibilidad a desarrollar este tumor, y se considera que abarcan entre un 60 y un 80% de los casos de CCR. Se estima que en torno a un 6% de la población de países occidentales desarrollará CCR a lo largo de la vida. Los

factores de riesgo para la aparición de tumores esporádicos son de tipo ambiental y se deben principalmente al estilo de vida del individuo o a enfermedades previas (12).

1.2.2 HEDERITARIO

1.2.2.1 Síndrome de Lynch

El cáncer colorrectal hereditario no polipósico (CCHNP) o síndrome de Lynch es una enfermedad autosómica dominante causada por mutaciones germinales en un gen de reparación de bases despareadas del ADN (*Mismatch Repair, MMR*); *MLH1* (cromosoma 3p21.3), *MSH2* (cromosoma 2p22-21), *MSH6* (cromosoma 2p16) y *PMS2* (cromosoma 7p22.2).

Es la forma más frecuente de CCR hereditario, apareciendo en el 3% de los casos diagnosticados de CCR. El problema que presenta es la alta heterogeneidad genética, haciendo difícil una identificación clara del individuo enfermo, basada en criterios clínicos y moleculares (11,13–15). Para la detección de la enfermedad se suelen realizar pruebas de inestabilidad de microsatélites (ya que el 90% de estos individuos presentan este fenotipo) y tinción inmunohistoquímica de las cuatro proteínas de reparación implicadas.

Las principales características del síndrome de Lynch son el desarrollo de CCR a una edad temprana (alrededor de los 45 años), una aparición de enfermedad en el colon derecho en más del 70% de los casos y un riesgo elevado de padecer neoplasias extracolónicas, en zonas como endometrio, ovario, tracto urinario, intestino delgado, cerebro, hígado y vesícula biliar (14).

1.2.2.2 Poliposis adenomatosa familiar (PAF)

La PAF es una enfermedad autosómica dominante que se caracteriza por el desarrollo de cientos de miles de adenomas en el colon y recto durante la segunda década de la vida (16). Casi todos los pacientes desarrollarán CCR si no se identifican y se tratan en una etapa temprana, llegando a un riesgo de padecer la enfermedad del 100% a los 40 años de edad. Aun con esto, su incidencia es de menos del 1% de los casos diagnosticados de CCR.

Una variante de esta enfermedad es la poliposis adenomatosa familiar atenuada (PAFA), una forma menos agresiva que se caracteriza por un menor número de adenomas, entre 10 y 99, una edad de inicio de la enfermedad más tardía y un menor riesgo de desarrollar CCR (13,17).

Ambas enfermedades, PAF y PAFA, son autosómicas dominantes y surgen de mutaciones en la línea germinal del gen de la poliposis adenomatosa coli (*APC*), ubicado en el cromosoma 5q21q22 (13,16–18). El gen *APC* es un gen supresor de tumores y la pérdida de su función en las células epiteliales del colon inicia la transformación neoplásica. Concretamente, *APC* actúa a nivel de la vía Wnt, formando parte de un complejo proteico implicado en la degradación de β -catenina. La vía Wnt- β -catenina (también denominada vía canónica) está implicada en procesos de división celular, desarrollo embrionario y morfogénesis. El complejo proteico está formado además, por la glucógeno sintasa quinasa 3 β (GSK-3 β), que junto con la caseína quinasa 1 α median la fosforilación de la β -catenina. En ausencia de proteínas de la vía Wnt y presencia de la proteína APC (sin mutaciones en el gen) (Figura 1A), las β -cateninas citoplasmáticas son degradadas. La ausencia de β -catenina en el núcleo hace que los genes diana de la vía de señalización Wnt no se expresen. En presencia de Wnt, o ausencia de APC (como ocurre en CCR) (figura 1B), los genes diana de β -catenina, entre los que se encuentran *c-Myc*, *c-Jun*, *CCND1*, *PPAR δ* , *FOSL1* o *UTERIN*, genes relacionados con el crecimiento y la proliferación celular (16,19), son activados.

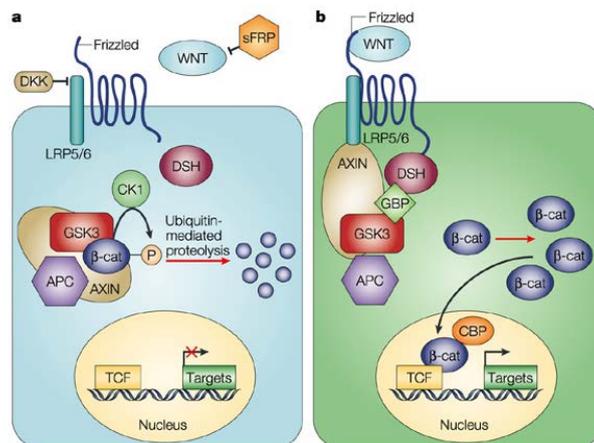


Figura 1. A. Vía canónica Wnt- β -catenina. B. Activación de la vía de señalización por la unión del ligando WNT (20).

1.2.2.3 Poliposis Asociada a MYH (PAM)

La poliposis asociada a MYH es una enfermedad de herencia autosómica recesiva, debida a mutaciones bialélicas del gen *MYH*. Los pacientes con PAM poseen un fenotipo colónico similar al de la PAF atenuada, con edades comprendidas entre los 40 y los 60 años (17,21). La manifestación más común de este síndrome es la presencia de pólipos adenomatosos, aunque también se han citado casos de pólipos serrados. Además, es conocido

que el riesgo de padecer cáncer de ovario, vejiga y piel en las edades medias de 51 a 61 años aumenta significativamente con este tipo de enfermedad (22).

El gen *MYH* está localizado en el cromosoma 1p32.1 y codifica una proteína glicosilasa que forma parte del mecanismo celular de reparación de escisión de bases, actuando en la defensa del daño del ADN por oxidación. El daño oxidativo incorpora una 8-oxoguanina en lugar de la guanina. MYH elimina los residuos de adenina incorporados en oposición a la base 8-oxoguanina debido a una tendencia que presentan estas bases a un emparejamiento erróneo. Si existe mutación en *MYH*, la timidina se incorporará en oposición a la adenina. Consecuentemente, causará un exceso de mutaciones G:C>T:A en genes tales como *APC* y *KRAS* (13,17,18,22).

1.2.2.4 Agregación familiar

El término agregación familiar se utiliza en genética médica para referirse a las enfermedades que aparecen en varios miembros de una familia, pero no se ha determinado la existencia de mutaciones genéticas germinales. Puede ser producto de estilos de vida o exposiciones ambientales compartidas por los miembros de dicha familia.

El CCR con agregación familiar constituye entre un 20 y un 40% de los casos de CCR. Aparece en edades tardías en más miembros de una familia de lo que correspondería por azar. En estudios poblacionales se ha podido comprobar que existe un riesgo dos o tres veces mayor de sufrir cáncer cuando un familiar de primer grado lo ha padecido (23).

1.3 FACTORES DE RIESGO

1.3.1 Sexo y edad

Aunque la enfermedad pueda presentarse a cualquier edad, la probabilidad de padecer CCR aumenta significativamente después de los 50 años de edad. La edad tiene un gran impacto en la incidencia, superior a cualquier otro factor demográfico. La edad promedio de diagnóstico es de 70 años y el 90% de los casos se presenta en personas de más de 50 (24).

El CCR afecta tanto a hombres como a mujeres por igual hasta los 50 años de edad, pero a partir de esa edad la frecuencia en hombres es mayor que en mujeres (7,25).

1.1.1 *Antecedentes familiares de CCR*

Las familias que presentan síndromes hereditarios asociados al CCR (PAF, síndrome de Lynch, etc.) tienen una incidencia elevada de casos de CCR en edades tempranas, que debe controlarse bajo seguimiento por colonoscopias frecuentes (23).

Excluyendo las formas hereditarias de la enfermedad, los individuos cuyos familiares presentan o han presentado episodios de CCR, tienen un riesgo relativo de padecer la enfermedad en torno a un 1,8 respecto al resto de la población (26).

1.1.2 *Enfermedad inflamatoria intestinal (EII)*

Esta enfermedad incluye la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn, y se caracteriza por una inflamación del colon durante un período amplio de tiempo. Las personas que la padecen durante muchos años suelen desarrollar displasia, donde las células en el revestimiento del colon o del recto tienen una apariencia anormal por alteraciones en el proceso de maduración de las mismas. Estas células displásicas pueden acabar provocando una neoplasia con el tiempo, por lo que estos individuos presentarán un mayor riesgo de padecer CCR, que aumentará en función de la malignidad y duración de la enfermedad (27).

En 1925, Crohn describió por primera vez CCR asociado a enfermedad inflamatoria intestinal (EII) y de hecho, el CCR sigue representando del 10% al 15% de las muertes en los pacientes con EII (28). La incidencia de la EII tiene dos picos: entre 15 y 30 años, y entre 50 y 80 años. Debido a este pico de edad más joven, la edad promedio para el desarrollo de CCR asociada a la EII es inferior a la observada en los CCR esporádicos. El pronóstico de los CCR esporádicos y asociado con EII es similar, con una supervivencia a los 5 años de aproximadamente el 50% (27).

1.1.3 *Dieta y hábitos alimenticios*

Existen grandes variaciones a nivel de incidencia mundial del CCR, por lo que la dieta podría tener un impacto importante a la hora de padecer o no la enfermedad. De hecho, en las poblaciones con menor incidencia de CCR el consumo de grasa representa un 10% del aporte calórico total, mientras que en aquellos cuya incidencia es elevada, representa entre el 40-45% de la ingesta calórica diaria (24).

Diversos estudios relacionan las dietas ricas en grasas, carnes rojas y pobres en fibra (fruta, verdura y grano integral) con el desarrollo de CCR. Además, una dieta pobre en ácido

fólico y vitamina B6 se ha asociado con mayor riesgo de padecer esta enfermedad y con una sobreexpresión del gen *TP53* (25). Aunque el papel que tienen los ingredientes de la dieta sigue siendo objeto de investigación.

Además de controlar la dieta, el estilo de vida sedentario, sin realizar ejercicio físico, podría estar en concordancia con un mayor riesgo de padecer CCR. Se demuestra que el ejercicio físico se correlaciona con una disminución en el riesgo tanto de CCR como de cáncer de mama y endometrial. Además de mantener un peso corporal saludable, regula las hormonas sexuales, la insulina y las prostaglandinas y tiene efectos beneficiosos a nivel del sistema inmunológico (29).

1.1.4 *Obesidad*

La obesidad es un problema grave en los países desarrollados que eleva el riesgo de padecer enfermedades crónicas, incluyendo el desarrollo del cáncer (30,31). De hecho, se estima que alrededor del 20% de todos los tumores están causados por un exceso de peso. En un metaanálisis de 13 estudios con 6.546 casos, los resultados indicaron que el aumento de los niveles del índice de masa corporal y el peso corporal se asoció positivamente con el riesgo de padecer CCR (31).

La agencia internacional de investigación en cáncer (IACR) sugiere como tumores comunes relacionados con la obesidad: de endometrio, esofágico, colorrectal, de mama posmenopáusico, de próstata y renal (30).

1.1.5 *Diabetes tipo 2*

Las personas con diabetes tipo 2 (usualmente no dependiente de insulina) tienen un riesgo elevado de padecer CCR. Tanto la diabetes tipo 2 como el CCR comparten algunos de los mismos factores de riesgo, como por ejemplo el exceso de peso. Sin embargo, aun cuando se toman estos factores en consideración, los individuos con diabetes tipo 2 suelen tener un pronóstico menos favorable después del diagnóstico. La resistencia a la insulina parece ser la explicación más factible de la relación entre diabetes tipo 2 y el CCR. Esta resistencia a la insulina se ve compensada por la estimulación de la secreción de insulina pancreática, y esto se traduce comúnmente en la hiperinsulinemia (niveles de insulina circulantes elevados). Los niveles séricos de insulina elevados favorecen el crecimiento más rápido y una mayor agresividad de colon, estimulando los receptores del factor de crecimiento relacionado con la insulina 1 (30,32).

1.1.6 Consumo de alcohol y tabaco

Se sabe que las especies reactivas de oxígeno (ERO) son una causa importante de daño endógeno al ADN. Se conocen al menos un centenar de modificaciones en el ADN causadas por este estrés oxidativo (33).

El tabaquismo es la principal fuente de radicales libres y es un importante contribuyente de estrés oxidativo. Por ello, se piensa que contribuye en un 12% en la incidencia del CCR (34).

El consumo excesivo de alcohol se ha relacionado con un aumento del riesgo de CCR, así como de aumento de la incidencia de tumores en el colon distal. Del mismo modo, los pacientes con dependencia crónica al alcohol también muestran un mayor nivel de biomarcadores de estrés oxidativo. El alcohol se metaboliza a acetaldehído, que es un mutágeno altamente tóxico que provoca mutaciones puntuales. El alcohol se metaboliza por el sistema del citocromo P450 del retículo endoplásmico y lleva a la producción de acetaldehído y de ERO. Dichas ERO pueden directamente causar daño en el ADN y también pueden conducir a un aumento de la peroxidación lipídica con la generación de aldehídos genotóxicos (33).

1.1.7 Antecedentes étnicos

Los judíos con ascendencia en Europa Oriental, llamados judíos Ashkenazi, tienen uno de los mayores riesgos de CCR en comparación con cualquier otro grupo étnico en el mundo. Se han encontrado diversas mutaciones que predisponen a este mayor riesgo de padecer la enfermedad, la más común es la mutación en el gen *APC* p.I1307K, que se presenta en aproximadamente un 6% de los judíos en los Estados Unidos (35). La elevada frecuencia de estas mutaciones es debida a la cultura endogámica de este grupo étnico.

2. VÍAS DE TUMOROGÉNESIS

2.1 VÍA SUPRESORA O VÍA DE INESTABILIDAD CROMOSÓMICA

Entre un 80-85% de los casos esporádicos de CCR y los hereditarios de PAF (con mutaciones a nivel germinal del gen *APC*) están causados por inestabilidad cromosómica (*Chromosomal INstability, CIN*). Ésta se debe principalmente a alteraciones en el cariotipo, con ganancias y pérdidas cromosómicas, así como translocaciones. Las pérdidas alélicas son

relativamente frecuentes, presentando un desequilibrio alélico a nivel de múltiples loci (incluyendo 5q, 8p, 17p, y 18q) (36).

Es un modelo molecular e histológico aparecido en la década de los 90, que propone la progresión del CCR en siete etapas y se debe a mutaciones en genes concretos, principalmente genes supresores de tumores (Figura 2). Los cambios se iniciarían con una mutación o pérdida del gen *APC* (5q21-q22), seguida de mutaciones en *KRAS* (12p12.1) y mutaciones en *TP53* (17p13.1) y *DCC* (18q21.3) (36,37).

2.1.1 Modelo general del desarrollo del CCR de tipo esporádico. Fenotipo CIN.

El desarrollo del CCR se produce en diversas etapas que comienzan con lesiones en la cripta del colon a través de adenomas hasta manifestar el cáncer. Esta secuencia **adenoma-carcinoma** se caracteriza por la acumulación de múltiples mutaciones en genes supresores de tumores y oncogenes que afectan al balance entre la proliferación celular y la apoptosis. Cada uno de estos eventos le confiere a cada una de las células del tumor una ventaja de crecimiento.

Epitelio normal-Epitelio hiperproliferativo. La causa del inicio de esta vía es la pérdida de un gen supresor como es el gen **APC** (*Adenomatous Polyposis Coli*). Se produce una mutación del gen *APC*, que se vuelve inactivo en un 80% de los pacientes. Además se ha observado la aparición de procesos de pérdida de heterocigosidad en la región que codifica este gen (5q21) en al menos un 30% de los tumores (38). Esta proteína trucada es incapaz de unirse a β -catenina, provocando la desregulación de la vía Wnt que regula procesos como crecimiento, apoptosis, diferenciación y motilidad celular (19,20). Los procesos de migración y adhesión celular y la segregación cromosómica también se verían afectados. A partir de esta mutación se genera un pequeño adenoma que crece lentamente (19).

Las mutaciones en este gen pueden suceder en la línea germinal o en las células somáticas. Las mutaciones germinales originan el síndrome de PAF; sin embargo, las mutaciones somáticas en este gen están presentes en la mayoría de los adenomas colorrectales esporádicos.

Epitelio hiperproliferativo-Adenoma temprano. Se producen fenómenos de hipometilación génica e hipermetilación de la región promotora, que contribuyen a la sobreexpresión de inhibidores de oncogenes y genes supresores de tumores respectivamente (37).

Adenoma temprano-Adenoma intermedio. Se caracteriza por la aparición, en un número elevado de casos (aproximadamente entre un 30 a un 45%), de mutaciones activadoras del oncogén **KRAS** (*Kirsten RAt Sarcoma viral oncogene homolog*) en los codones 12, 13 y 61 (12p12.1). KRAS es una proteína de unión a GTP que forma parte de la vía RAF/MEK/ERK. Todas las mutaciones conocidas de KRAS afectan a su dominio de unión a GTP, por lo que esta mutación afecta a la actividad GTPasa de la proteína y como resultado, la ruta RAF/MEK/ERK es activada constitutivamente. La vía de señalización RAF/MEK/ERK se encarga de la transcripción de genes diana implicados en proliferación celular e inhibición de la apoptosis, ocasionado un mayor aumento en el número de células (3,37).

Adenoma intermedio-Adenoma tardío. En esta fase se produce la mutación y pérdida de heterocigosidad de genes codificados en la región del cromosoma 18q, **SMAD2** (*Mothers Against Decapentaplegic homolog2*), **SMAD4** (*Mothers Against Decapentaplegic homolog4*), **DCC** (*Deleted Colon Cancer*). La pérdida de los genes SMAD2 y SMAD4 modifica la actividad de la vía TGF- β que parece jugar un papel doble en la evolución del tumor. Al inicio, actúa como gen supresor de tumores, al inhibir la proliferación e inducir la apoptosis, mientras que en fases más avanzadas potencia el desarrollo tumoral, la invasión y la metástasis, a través de su implicación en los procesos de transformación epitelio-mesénquima (39), de angiogénesis y de evasión de la respuesta inmune. El gen DCC, fue caracterizado como gen supresor de tumores y codifica una proteína transmembrana que participa en la interacción célula-célula o célula-sustrato y está implicada en procesos de proliferación y diferenciación celular, apoptosis y metástasis (40). La inactivación del gen DCC, se sabe que está asociada con tumorigénesis y metástasis en CCR. Además, se ha sugerido un papel importante de DCC en la progresión del tumor, por lo que podría ser un marcador biológico de importancia pronóstica (41).

Adenoma tardío-Adenocarcinoma. El siguiente evento que ocurre de manera muy frecuente (en el 80% de los casos) en la progresión tumoral es la delección del cromosoma 17q, el cual contiene el gen supresor de tumores TP53. Cuando TP53 está activado, juega un papel fundamental en el control de la integridad y estabilidad del genoma y en la respuesta a situaciones de estrés, daño en el DNA, hipoxia o activación de oncogenes, todas ellas importantes durante el desarrollo tumoral (42–44). Además, es capaz de provocar la parada del ciclo celular o activar mecanismos de senescencia y apoptosis que impiden la transformación celular (45). Conforme avanza la enfermedad, la frecuencia de mutación de este gen se incrementa. Como consecuencia de la pérdida de su función, contribuye a la propagación del daño al ADN a las células hijas (3).

Adenocarcinoma-Metástasis. En último lugar, continúan las mutaciones tanto de oncogenes como de genes supresores de tumores en otros cromosomas, dando capacidad migratoria al adenocarcinoma formado, incluso para avanzar pasando al torrente sanguíneo o linfático, donde puede dirigirse a otros órganos para desarrollar nuevos focos de tumor.

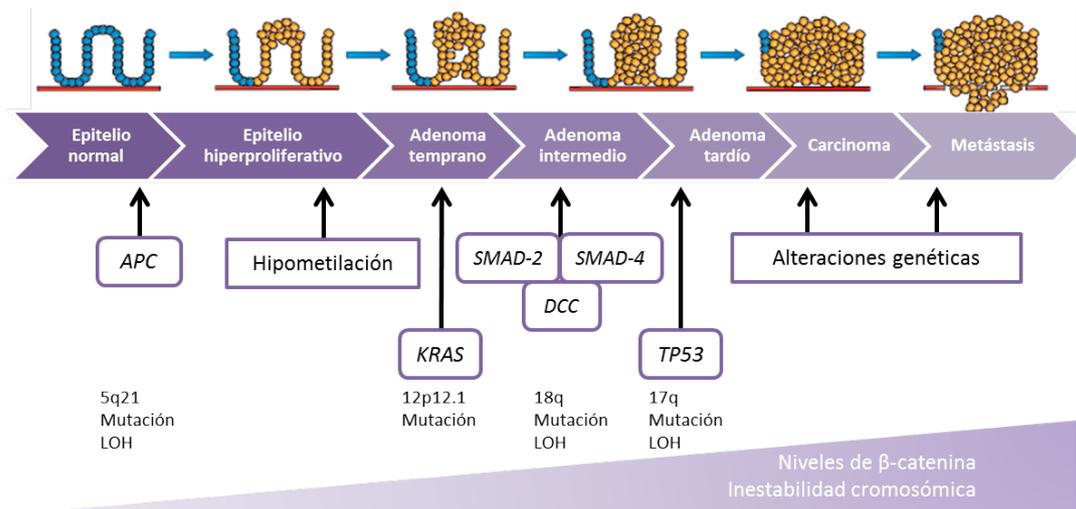


Figura 2. Modelo de progresión tumoral propuesto por Fearon y Vogelstein. Cada alteración histológica está asociada a la aparición de mutaciones que producen la ganancia de funciones necesarias para el desarrollo del cáncer colorrectal (37).

Cabe mencionar que solo una pequeña minoría de los tumores colorrectales que emergen a través de la vía CIN presentan todas las anomalías genéticas mencionadas. Es posible que algunos de estos eventos mutacionales sean sustituidos por otras aberraciones genéticas o epigenéticas. Estas anomalías genéticas podrían darse de forma adicional, alternativa o complementaria a las aberraciones tradicionalmente descritas en la secuencia adenoma-carcinoma (3).

2.2 VÍA MUTADORA O INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES

En paralelo al modelo molecular de progresión tumoral anteriormente descrito, se ha sugerido un modelo diferente de desarrollo del cáncer colorrectal denominado modelo del fenotipo mutador o fenotipo MSI (46).

Los microsatélites son secuencias de repetidas de uno, dos o tres nucleótidos y se encuentran dispersos por todo el genoma. Existen alrededor de 200 microsatélites en el genoma y el patrón de microsatélites para cada individuo es único (47). Dada su naturaleza repetitiva, son susceptibles de errores durante la replicación del ADN, que normalmente son corregidos durante la reparación. Puede ocurrir que este sistema de reparación fracase, y

existan procesos de apareamientos erróneos que conlleven a la acumulación de alteraciones en la longitud de los microsatélites.

Esta vía tiene gran importancia en el desarrollo del CCR; está presente en los casos de síndrome de Lynch y en el 15% de los tumores esporádicos (14), cuyo número de microsatélites difiere del ADN germinal.

En el caso de síndrome de Lynch, las enzimas reparadoras del ADN (MLH1, MSH2 y MSH6) no funcionan correctamente debido a ser portadoras de mutaciones; mientras que en los tumores esporádicos el mecanismo reparador no funciona debido a la hipermetilación de la región promotora del gen *MLH1* (11). Los pacientes cuyos tumores pueden estar asociados a este modelo de progresión tumoral se caracterizan por una baja frecuencia de mutaciones en genes como *TP53*, *APC* y *KRAS*, y de pérdida de heterocigosidad de las regiones cromosómicas 5q, 17p y 18q. Sin embargo, no es la mutación de los genes MMR (*MisMatch Repair*), sino la aparición de mutaciones en genes de interés, lo que lleva al desarrollo tumoral (14,15).

Se conocen alrededor de unos 30 genes afectados por MSI que comprenden numerosas funciones como el crecimiento celular (*TGF β -R-II*, *IGF2-R*), la apoptosis (*BAX*, Caspasa-5), la reparación del DNA (*MSH3*, *MSH6*), la señalización de la vía Wnt (Axin, β -catenina, *TCF4*), etc. Los genes alterados en el desarrollo de tumores MSI, aunque distintos, parecen actuar afectando las mismas vías moleculares que las que se desregulan en los tumores de tipo CIN. Desde un punto de vista clínico-patológico, los tumores desarrollados por la modificación de esta vía se caracterizan, entre otras cosas, por ser mucinosos, estar localizados en colon derecho o tener mejor pronóstico (48).

Debido a la existencia de casos de CCR donde el sistema de reparación está intacto, pero presentan mutaciones en un pequeño número de microsatélites, se diseñó un panel de microsatélites estandarizado. Dicho panel clasifica la MSI en tres grupos. El primero se considera con alta inestabilidad de microsatélites (*MSI-high*) (es decir, la mayoría de los marcadores exponen MSI); un segundo grupo con baja inestabilidad (*MSI-low*) (es decir, sólo una minoría de los marcadores exhiben MSI); y un tercer grupo que carece de la inestabilidad aparente (ninguno de los marcadores expone MSI; *MSS*) (49).

2.3 VÍA SERRADA O FENOTIPO METILADOR

Durante muchos años, ha habido discusión acerca de las particularidades de este síndrome. En la actualidad, y gracias a una mejor caracterización histológica, genética y

epigenética de los pólipos y adenocarcinomas serrados, se ha podido distinguir la vía de carcinogénesis serrada de la vía clásica de carcinogénesis, donde *APC* y *TP53* se ven alterados (50).

Las islas CpG son regiones del ADN que constituyen alrededor de un 40% de los promotores de los genes de mamíferos. Son regiones con gran concentración de pares de citosina y guanina enlazados por fosfatos (de ahí su nombre, CpG). La metilación de los dichos sitios CpG en los promotores de los genes puede inhibir la expresión del gen concreto, inactivándolo. La inactivación mediante este mecanismo de promotores de genes supresores de tumores es importante en el mecanismo de carcinogénesis, denominado fenotipo metilador, y parece no seguir los mecanismos habituales de la secuencia clásica de adenoma-carcinoma (48).

Las alteraciones moleculares distintivas de esta vía serrada son la activación de la ruta de señalización de las MAPK quinasas (por mutación en *BRAF* y *KRAS*), la hipermetilación de regiones promotoras en genes que llevan a su silenciamiento y la presencia de un fenotipo de inestabilidad de microsatélites (9).

Esta vía se denomina **serrada**, debido a las características histológicas del tumor. El epitelio de la cripta intestinal tiene similitud a dientes de sierra, debido a una acumulación de colonocitos en ella, y a una inhibición de la apoptosis. Actualmente, mediante los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) las lesiones serradas se clasifican en tres categorías: pólipo hiperplásico, adenoma serrado sésil y adenoma serrado tradicional, diferenciados básicamente en características histológicas, la distribución más abundante y los porcentajes de mutaciones en *BRAF* y *KRAS* (50).

Aun conociendo las características de este síndrome de poliposis serrada, sigue existiendo una falta de consenso en la clasificación de las lesiones serradas, y debido a esto y a la dificultad para la detección endoscópica de éstas, la prevalencia real de esta vía es desconocida. Aun con ello, parece que se presenta frecuentemente en mujeres y tiene preferencia por una localización a nivel proximal del colon (9,50).

El mecanismo parece iniciarse mediante una mutación que activa el gen *BRAF* (p.V600E), que consecuentemente ocasiona una inhibición de la apoptosis fisiológica en las células epiteliales del colon. A partir de este suceso, las lesiones serradas pueden dar lugar a pólipos hiperplásicos o pólipos serrados sésiles. Estas lesiones son muy propensas a la metilación de islotes CpG de regiones promotoras de múltiples genes, y por tanto, provocaría

un silenciamiento epigenético (inactivación indirecta del gen), siendo en principio aleatorio los genes específicos que se alteran. En el caso de la metilación del promotor de *MLH1*, muy frecuente en estos casos, se originan los CCR esporádicos con inestabilidad de microsatélites. Este evento parece ser tardío, y a partir de él se produce una rápida adición de mutaciones de otros genes, como sucede en el síndrome de Lynch, y por tanto, una progresión tumoral más rápida (50).

El tratamiento de los pacientes afectados por este síndrome debe ser la resección completa de los pólipos cerrados, así como la vigilancia endoscópica.

3. DIAGNÓSTICO DEL CCR

El seguimiento de los pacientes afectados por CCR es multidisciplinar y comienza en la consulta de Atención Primaria. En ella se elabora una historia clínica del paciente, donde se recogerán antecedentes médicos completos para analizar los síntomas y los posibles factores de riesgo, al igual que los antecedentes familiares. Tras la consulta, y si existen síntomas que hagan sospechar de la posible existencia de una lesión en el colon o recto; es dirigido al Servicio de Cirugía Digestiva. Este será el encargado de solicitar una serie de pruebas para determinar el diagnóstico. Posteriormente efectuará una exploración física en la que valorará cuidadosamente el abdomen para tratar de detectar masas u órganos que estén agrandados.

3.1 DETECCIÓN DEL CCR

3.1.1 Análisis de sangre oculta en heces

Con el propósito de hacer un cribado inicial, de bajo coste y poco invasivo, se realiza un examen de sangre oculta en heces. Con mucha frecuencia la toma de muestras se realiza en el domicilio del paciente y posteriormente se analiza en el hospital. Detecta pérdidas de sangre en las heces provenientes del tracto gastrointestinal, lo que puede deberse tanto a la presencia de CCR como a otro tipo de patologías como úlceras o cáncer gástrico. Concretamente, detecta la actividad pseudoperoxidasa del grupo hemo, ya sea como hemoglobina intacta o grupo hemo libre (51).

3.1.2 Pruebas diagnóstico

3.1.2.1 Colonoscopia

Es una prueba de exploración y diagnóstico donde se puede observar la mucosa de todo el colon y el recto mediante una cámara CCD (Charge-Coupled Device, dispositivo de carga acoplada) o una cámara de fibra óptica en un tubo flexible que se pasa a través del ano del paciente. Hoy en día se considera la prueba más estandarizada para la detección del CCR al permitir la visualización del colon, y además, la extirpación de adenomas con potencial de transformarse en células malignas. En la actualidad, se realiza en un hospital con el paciente sedado para evitar las molestias producidas (52).

3.1.2.2 Colonoscopia virtual

También denominada colonoscopia por tomografía computarizada. Descrita en 1994, es un procedimiento que utiliza rayos X con la finalidad de producir una imagen bi y tridimensional del colon desde el recto hasta la parte inferior del intestino delgado, obteniendo mejor sensibilidad para la visualización de pólipos de colon. Esta técnica no permite la extirpación de posibles adenomas y el paciente no requiere sedación para el examen (52).

3.1.2.3 Sigmoidoscopia flexible

Es una técnica mínimamente invasiva que permite el examen del colon sigmoide y el recto, a diferencia de la colonoscopia donde se examina la totalidad del intestino grueso. Los resultados de estudios epidemiológicos sugieren que el uso de la sigmoidoscopia ayudaría a reducir las tasas de incidencia y mortalidad de CCR distal en aproximadamente un 60-80%, dada su baja invasividad (53).

3.1.3 Biopsia

Finalmente, si el médico observa durante la realización de la colonoscopia una lesión sospechosa, procederá a extraer una muestra. El tejido deberá ser analizado por un anatomopatólogo para determinar la presencia de células cancerosas.

3.2 CIRUGÍA PARA EL CÁNCER COLORRECTAL

Tras los procedimientos anteriormente descritos, si hay sospecha de que el paciente padezca CCR, el siguiente paso es el procedimiento quirúrgico.

La cirugía suele ser el principal tratamiento local para el CCR y sus avances han mejorado la supervivencia de los pacientes, especialmente en las primeras fases de la enfermedad. La técnica consiste en la extirpación del segmento del colon en el que se asienta el tumor, así como tramos de tejido sano de más de 5 cm, a cada lado de la lesión como márgenes de seguridad (53).

Las técnicas de resección clásicas que aún siguen vigentes, siempre dependiendo de la localización o asentamiento del tumor, reemplazo vascular y drenaje linfático, son principalmente: hemicolectomía del colon derecho, transverso y colon izquierdo, sigmoidectomía para los tumores localizados en el colon sigmoide y la resección anterior baja para la zona de unión recto-sigma, evitando el sacrificio de la función intestinal por medio de una ostomía (operación quirúrgica donde se practica una apertura de la pared abdominal para dar salida a una víscera al exterior). Posteriormente, al finalizar la resección, se unen los extremos del colon para restablecer la continuidad del tubo digestivo y mantener su función, proceso que se denomina anastomosis (54).

Además de considerar el éxito del procedimiento quirúrgico, se debe tener en cuenta la supervivencia del paciente a largo plazo. La supervivencia a cinco años tras la resección quirúrgica es en la fase I entre el 85 y el 95%, en fase II entre el 60 y el 80% y en fase III disminuye y se estima entre un 30 y un 60% de los pacientes (53).

3.3 FASES DEL CÁNCER DEL COLORRECTAL

El fin último del diagnóstico es una buena caracterización del tumor para poder determinar el tipo de tratamiento más adecuado para el paciente. La caracterización del tumor es la determinación de la fase en la que se encuentra. El sistema de clasificación más frecuentemente utilizado en el cáncer de colon y recto es la clasificación de TNM (55), que se describe a continuación y será la utilizada durante el presente trabajo.

El sistema de clasificación TNM fue desarrollado por la Comisión Americana Mixta sobre el Cáncer (*American Joint Committee in Cancer, AJCC*) y la Unión Internacional contra el cáncer (*International Union Against Cancer, IUAC*) y clasifica al tumor basado en tres variables: el grado de penetración del tumor primario a través de las paredes del intestino (**T**) (Tabla 1), el número de ganglios regionales afectados por el tumor (**N**, *nodes*) (Tabla 2) y la presencia de metástasis distantes (**M**) (Tabla 3), lo que se denomina en conjunto clasificación TNM. En la siguiente tabla queda resumida la clasificación TNM más reciente que ha sido revisada por la AJCC en el año 2010 (56).

TUMOR PRIMARIO (T)	
TX	No se puede evaluar el tumor primario
TO	No existe prueba de tumor primario
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> : intraepitelial o invasión de la lámina propia
T1	El tumor invade la submucosa
T2	El tumor invade la muscular propia
T3	El tumor invade los tejidos pericorrectales a través de la muscularis propia
T3a	Invasión mínima: < 1 mm desde el borde de la muscular propia
T3b	Invasión leve: 1-5 mm desde el borde de la muscular propia
T3c	Invasión moderada: 5-15 mm desde el borde de la muscular propia
T3d	invasión extensa: > 15 mm desde el borde de la muscular propia
T4a	El tumor penetra la superficie del peritoneo visceral
T4b	El tumor invade o se adhiere a otros órganos o estructuras

Tabla 1. Grados de penetración del tumor primario

GÁNGLIOS LINFÁTICOS REGIONALES (GLR) (N)	
NX	No se pueden evaluar los ganglios los GLR
NO	No hay metástasis en los GLR
N1	Metástasis de 1-3 GLR
N1a	Metástasis en 1 GLR
N1b	Metástasis en 2-3 GLR
N1c	Depósitos tumorales en la subserosa, mesenterio o en tejidos pericorrectales sin metástasis en GLR
N2	Metástasis en 4 o más GLR
N2a	Metástasis en 4-6 GLR
N2b	Metástasis en 7 o más GLR

Tabla 2. Presencia de metástasis en ganglios linfáticos regionales

A la hora de realizar el análisis histopatológico se debe especificar el número de ganglios linfáticos regionales examinados, así como el número de ganglios linfáticos regionales que portan metástasis.

METÁSTASIS DISTANTE (M)	
M0	Sin metástasis a distancia
M1	Metástasis a distancia
M1a	Metástasis confinada a un órgano o sitio (por ejemplo, hígado, pulmón, ovario o ganglio no regional)
M1b	Metástasis en más de un órgano o sitio, o en el peritoneo

Tabla 3. Metástasis a distancia

Tras la obtención de los valores TNM, el tumor se clasifica en cuatro fases: 0, I, II, III y IV (Figura 3).

Fase 0 o carcinoma *in situ* (Tis, N0, M0): es la fase más temprana del CCR. Aparecen células anormales en la superficie de la mucosa (capa más interna) de la pared del colon, en ningún caso el tumor la atraviesa (Tis), los ganglios no están afectados (N0) y no existe metástasis a distancia (M0).

Fase I (T1 ó T2, N0, M0): el tumor formado en la mucosa se disemina hacia la submucosa (T1) o incluso a la muscular propia (T2) sin traspasarla. No existe afectación de ganglios linfáticos (N0), ni metástasis a distancia (M0).

Fase II: dentro de esta fase distinguimos tres etapas. En la fase **IIA** el tumor atraviesa la capa muscular hacia la capa serosa; en la **IIB** el tumor penetra y se disemina por la serosa pero sin invadir otros órganos cercanos; en la fase **IIC** el cáncer se disemina a través de la serosa a órganos o estructuras próximas. Durante esta fase sigue sin haber afectación ganglionar (N0) ni metástasis a distancia (M0).

Fase III: durante esta fase, el cáncer ha invadido los órganos más próximos afectando a los ganglios linfáticos en mayor o menor medida. Dicha fase se subdivide en tres subfases (**IIIA, IIIB y IIIC**) basado en el tipo de estructura u órgano invadido (muscularis propia, subserosa, tejidos grasos pericorrectales, peritoneo visceral u otros órganos próximos) y al número de ganglios afectados por el tumor.

Fase IV: el cáncer se ha diseminado afectando a órganos alejados del colon como el hígado, pulmón, ovario y ganglio linfático lejano. Esta fase se subdivide en dos subetapas: en la subfase **IVA** la metástasis está limitada a una zona u órgano concreto, mientras que en la subfase **IVB** existe metástasis en más de un órgano o sitio.

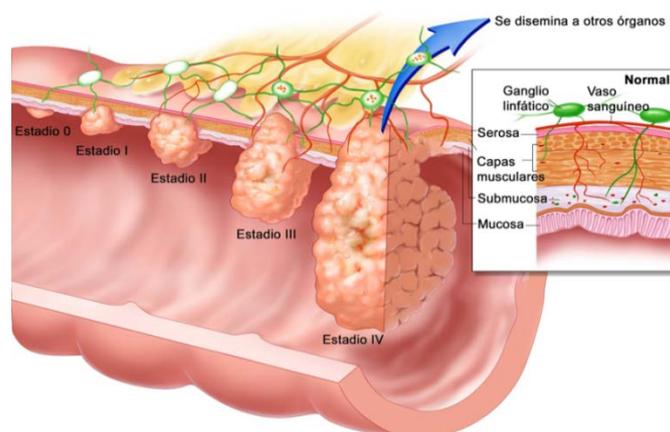


Figura 3. Representación de las fases del cáncer colorrectal (57).

De manera esquemática, las etapas quedan representadas en la tabla (Tabla 4).

ETAPA ANATÓMICA/GRUPOS PRONÓSTICOS			
FASE	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1-2	N1/N1c	M0
	T1	N2a	M0
IIIB	T3-T4a	N1/N1c	M0
	T2-T3	N2a	M0
	T1-T2	N2b	M0
IIIC	T4a	N2a	M0
	T3-T4a	N2b	M0
	T4b	N1-N2	M0
IVA	Cualquier T	Cualquier N	M1a
IVB	Cualquier T	Cualquier N	M1b

Tabla 4. Fases de la enfermedad, basados en el Sistema de clasificación TNM (55).

Se ha determinado la correlación existente entre la fase de la enfermedad y la supervivencia a 5 años (58) (Tabla 5).

FASE	% SUPERVIVENCIA A 5 AÑOS
0 (Tis, T1; N0; M0)	>90
I (T2; N0; M0)	80-85
II T3, T4; N0; M0)	70-75
III (T2; N1-3; M0)	70-75
III (T3; N1-3; M0)	50-65
III (T4; N1-3; M0)	25-45
IV (M1)	<3

Tabla 5. Correlación entre las fases del cáncer colorrectal y la esperanza de vida a 5 años.

3.4 PROPAGACIÓN DEL CÁNCER COLORRECTAL

Tras diagnosticar al paciente de CCR, se realizan diversas pruebas para determinar si las células cancerosas se diseminaron dentro del colon o a otras partes del cuerpo. Durante este proceso se recoge información de la fase en la que se encuentra la enfermedad, para posteriormente poder planificar el tratamiento adecuado.

- **Radiografía torácica.** Dicha prueba tiene como objetivo estudiar el tórax, los pulmones, el corazón, las grandes arterias, las costillas y el diafragma, para descartar una posible afectación por metástasis (59).
- **Ecografía.** Es una prueba indolora, de fácil realización, basada en la emisión de ondas sonoras (ultrasonidos), que rebotan al chocar con las diferentes estructuras a las que llegan y, a través de un ordenador forman una imagen que se visualiza en una pantalla. En el CCR se pueden realizar tanto ecografía abdominal como endorrectal (60).
- **Tomografía Axial Computarizada (TAC).** Es una prueba diagnóstica que, a través del uso de rayos X, permite obtener imágenes radiográficas del interior del organismo. Para una mejor visualización, el paciente debe ingerir o se le inyecta un contraste (61).
- **PET/TC.** La tomografía por emisión de positrones, también llamada diagnóstico por imágenes PET o exploración PET, constituye otro tipo de diagnóstico por imágenes de medicina nuclear. En este estudio se realiza un examen de todo el cuerpo, tras la inyección intravenosa de radiofármacos, emisores de positrones de utilidad médica. El

más importante de ellos es la glucosa marcada con Flúor-18. Las células que presenten altos niveles metabólicos, como en el caso de las células cancerosas, aparecerán como puntos radioactivos detectados por una cámara especial (62,63). Los inconvenientes más importantes son la escasa definición anatómica y la presencia de falsos positivos como procesos de inflamación aguda o infección, y falsos negativos como micrometástasis, tumores poco celulares como los mucinosos o los necróticos y en pacientes con hiperglucemia (63).

Además de estas pruebas se realizan medidas de marcadores tumorales, que son proteínas cuyos niveles de expresión varían en los pacientes que padecen CCR.

- Medida del **Antígeno Carcinoembrionario (CEA en inglés) en sangre**. El CEA es una glicoproteína sérica, descubierta en un principio en el tejido colónico embrionario, que se libera en el torrente sanguíneo tanto por las células cancerosas como por las células sanas. Es una molécula de adhesión intercelular, y promueve la agregación de células de CCR, e incluso facilita una posible metástasis hepática y pulmonar. Además, se ha encontrado sobreexpresado en otros adenocarcinomas como mama y pulmón. Niveles moderados de CEA se han observado en una variedad de enfermedades inflamatorias crónicas y agudas, incluyendo cirrosis alcohólica, colelitiasis, ictericia obstructiva, colangitis, absceso hepático, enfisema, enfermedades bronquitis, úlcera gástrica, gastritis, diverticulitis y diabetes (41,64).

3.5 METÁSTASIS DEL CCR

El CCR comienza como un tumor localizado en la mucosa del tubo digestivo que va creciendo e invadiendo posteriormente las capas más profundas. Cuando este tumor traspasa la pared del intestino puede invadir cualquier órgano, proceso que se denomina **metástasis**.

La metástasis es un proceso clave en la letalidad del cáncer, e implica el escape de células tumorales del tumor primario, accediendo a los vasos linfáticos (diseminación linfática), sanguíneos (diseminación hematógena) y/o a los líquidos intersticiales (diseminación transcelómica), desde donde podrán colonizar y crecer en órganos alejados (8).

Para que las células tumorales se escindan del tumor primario e invadan otros tejidos son necesarios una serie de pasos que se esquematizan en la Figura 4. Este proceso puede dividirse en tres partes: la invasión de la matriz extracelular, la diseminación vascular y finalmente el alojamiento de las células tumorales en otros tejidos u órganos (65).

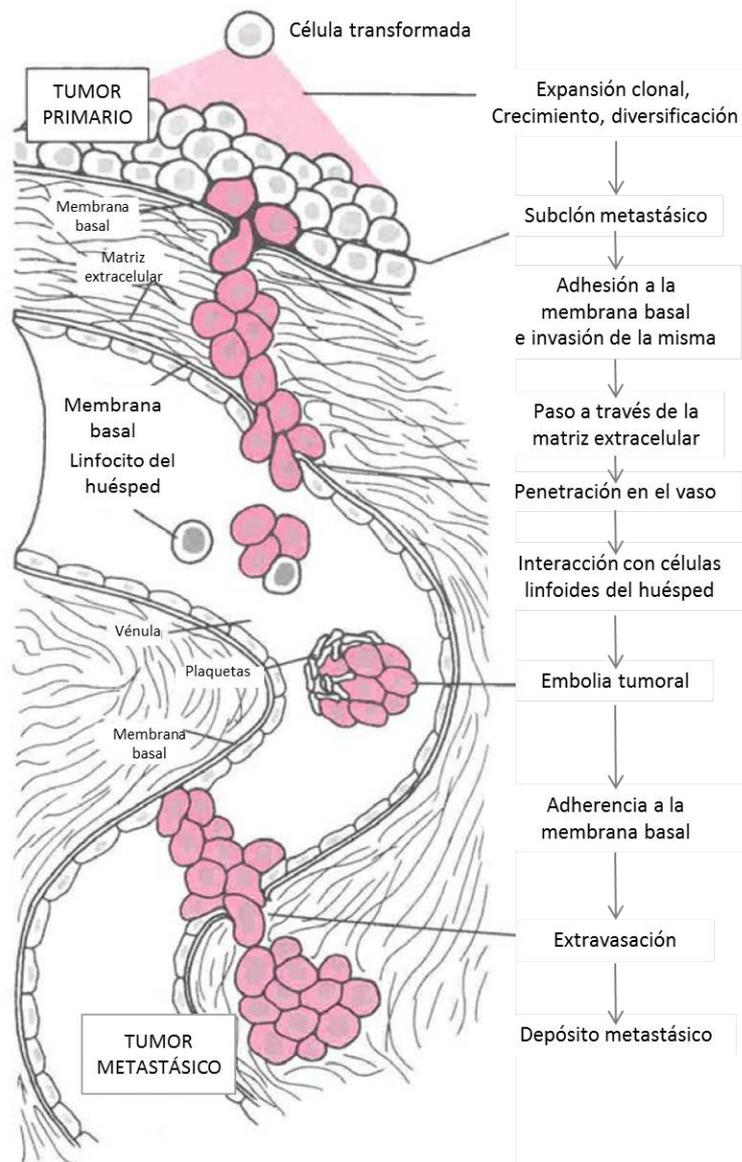


Figura 4. Esquema representativo del fenómeno metastásico. Adaptado de Robbins S: Patología estructural y funcional, 5ª edición).

La invasión de la matriz extracelular requiere que las células se desprendan entre sí, se unan a los componentes de la matriz y los degraden para poder finalmente migrar a otros tejidos adyacentes. Las células sanas se adhieren entre sí y a sus alrededores mediante distintas moléculas de adhesión como las cadherinas. Es sabido que en diversos tumores epiteliales como los adenocarcinomas de colon o mama, existe una baja expresión de dichas cadherinas, lo que facilita el desprendimiento celular (66). Además, las células tumorales expresan receptores de alta afinidad para diversos componentes de la matriz extracelular como laminina, fibronectina, colágeno o vitronectina.

Del mismo modo, dichas células cancerosas generan proteasas que degradan activamente dichos componentes de dicha matriz extracelular, como son serín-proteasas, cisteín-proteasas o metaloproteasas. En procesos tumorales, las metaloproteasas suelen estar sobreexpresadas, lo que conlleva un incremento de su actividad proteolítica (67).

Uno de los sistemas que actúa en la degradación de la matriz extracelular y en la activación de dichas metaloproteasas es el sistema activador del plasminógeno. Dicho sistema está iniciado por un complejo proteico formado por dos monómeros de la proteína Anexina A2 (ANXA2), dos de la proteína p11 y el activador tisular de plasminógeno. Dicho complejo se encarga de la conversión del plasminógeno a plasmina. La plasmina es una serín proteasa cuya función es degradar la fibrina, además de jugar un papel importante en la activación de metaloproteasas y la degradación de la matriz extracelular. La degradación de la fibrina junto con la participación de la plasmina lleva a incrementar la migración celular y la invasión en el proceso canceroso (Figura 5) (68).

La proteína citoesquelética ANXA2 está localizada en la superficie extracelular de las células endoteliales y varios tipos de células tumorales. Múltiples estudios han demostrado que se sobreexpresa en diversos tipos de cáncer como el cáncer de cuello y cabeza (69), cáncer de mama (70,71), de páncreas (72,73) y en contraste se ha visto en osteosarcoma que su expresión está reducida en aquellos con mayor capacidad metastásica (74).



Figura 5. Mecanismo de promoción de la metástasis en el sistema de activación del plasminógeno.

4. MARCADORES PRONÓSTICOS

Dada la relevancia del cáncer colorrectal en nuestra sociedad, se han llevado a cabo multitud de investigaciones cuyo objetivo es descubrir marcadores clínicos, patológicos o moleculares que sean predictivos de dicha enfermedad. Su objetivo ha sido aportar información sobre la evolución del paciente en función de las características del tumor o precisar la respuesta del tumor ante un determinado tratamiento (75). Todo marcador debe poder ser analizado de manera sencilla y mediante técnicas poco invasivas.

4.1 MARCADORES HISTOPATOLÓGICOS

4.1.1 Anatomía del colon y recto

El colon es el último tramo del sistema digestivo. Es un tubo largo y hueco de una longitud aproximada de 1,5 metros, y se extiende desde el final del intestino delgado hasta el ano.

La primera porción del intestino grueso se denomina ciego, y se localiza en la parte inferior derecha del abdomen, donde finaliza el intestino delgado. Desde aquí, el colon asciende hasta llegar a la zona del hígado (**colon ascendente**) y atraviesa el abdomen (**colon transverso**). El colon se dirige posteriormente hacia abajo (**colon descendente**), hasta llegar a una zona denominada sigma que desemboca en el recto. El último tramo del tubo digestivo se denomina **recto** y se sitúa inmediatamente después del **colon sigmoide**. Tras la digestión del alimento, el recto recibe los materiales de desecho, constituyendo las heces. Finalmente las heces fecales salen del cuerpo a través del ano, que se abre al exterior por el esfínter anal (Figura 6).

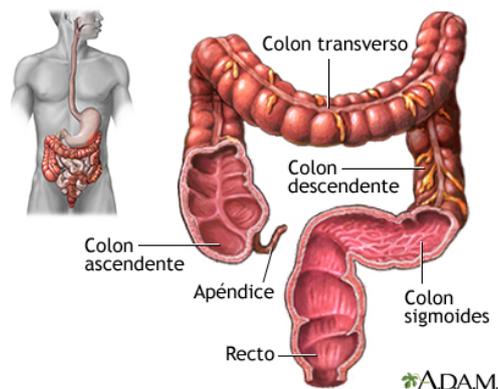


Figura 6. Esquema de la anatomía del intestino grueso (76).

Las zonas de colon ascendente y transversal se encargan de absorber el agua y los minerales ingeridos, mientras que el colon descendente y recto tienen la función de almacenar las materias fecales hasta su expulsión final por el ano.

Al igual que el resto del tracto digestivo, la pared del intestino grueso está formada por cuatro capas: mucosa, submucosa, muscular y serosa, ordenadas de la parte interna a la externa del tubo digestivo. La capa mucosa del intestino grueso tiene mayor espesor que la del intestino delgado, y a lo largo de la superficie de su epitelio aparecen multitud de invaginaciones con forma tubular denominadas criptas de Lieberkühn, las cuales secretan gran cantidad de moco para favorecer el tránsito de los desechos semisólidos no digeridos. Es precisamente sobre estas glándulas productoras de moco donde se producen con mayor frecuencia los tumores de colon. La capa muscular, además, es la encargada de contraerse, ayudando al avance del contenido del tubo digestivo (8) (Figura 7).

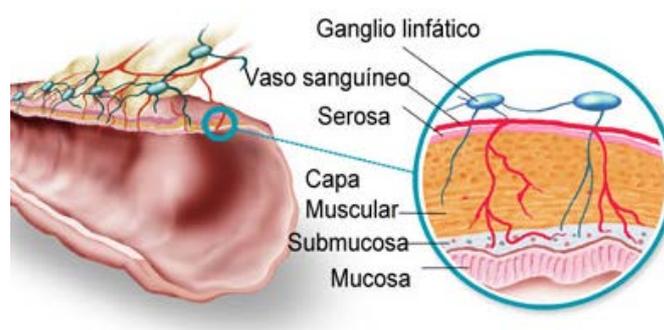


Figura 7. Esquema de la histología del intestino grueso (8).

El examen que realiza el anatomopatólogo de la pieza de resección quirúrgica es de suma importancia para establecer un buen pronóstico de la enfermedad, así como el tratamiento adecuado hacia el paciente. Por ello, este análisis histológico, además de un informe anatomopatológico completo, se deben realizar de manera exhaustiva y sistemática. Dado que el 16% de los pacientes que tienen CCR con una submucosa invadida padecen metástasis de los nódulos linfáticos, es de gran importancia analizar dichos ganglios linfáticos cercanos.

En la metástasis influyen una serie de factores histopatológicos importantes, tales como la profundidad de la invasión, invasión linfática, invasión venosa, diferenciación tumoral, patrón de crecimiento de componentes tumorales intramucosos, disrupción completa de la capa muscular debido a invasión mucosa y *budding* en el borde invasivo del tumor (77). Por

todo ello, además de conocer la fase del tumor, normalmente obtenida por la clasificación TNM, se deben recoger estos datos.

4.1.2 *Grado de diferenciación tumoral*

Es el grado en el que las células cancerosas se asemejan a las células no cancerosas de las que proceden, morfológica y funcionalmente. Indica el grado de diferenciación de la célula tumoral y su participación en la formación de estructuras glandulares, en comparación con el tejido colorrectal normal. Las células cancerosas de grado bajo (tumor bien diferenciado) tienen un aspecto más parecido al de las células sanas y tienden a crecer y diseminarse más lentamente que las células cancerosas de grado alto (escasamente diferenciado o indiferenciado), cuya capacidad de crecimiento es mucho mayor, y se asocia con un peor pronóstico del paciente. Los sistemas de gradación para cada tipo de cáncer son diferentes (58).

4.1.3 *Invasión venosa y linfática*

La invasión de las células tumorales en ganglios o vasos sanguíneos desempeña un papel crucial en el proceso metastásico. La invasión linfática es diagnosticada cuando las células tumorales están presentes en los vasos con un revestimiento endotelial que carecen de capa muscular gruesa. La invasión de los vasos sanguíneos se caracteriza histológicamente por la presencia de células tumorales en vasos con gruesa capa muscular gruesa, o en vasos que contengan los eritrocitos de la sangre (78). Estos parámetros se han convertido en variables importantes de pronóstico en pacientes con CCR, tanto en fases tempranas como avanzadas de la enfermedad (58). De hecho, en un estudio retrospectivo de 381 pacientes con y sin invasión venosa, la tasa de supervivencia a los cinco años fue del 30% y 75%, respectivamente. La invasión venosa intramural, que se limita a los vasos de la capa submucosa y/o muscular, tiene que diferenciarse de invasión de los vasos extramural, que incluye los vasos situados más allá de la muscular propia, es decir, dentro de la pericólica o tejido adiposo perirrectal.

4.1.4 *Invasión perineural*

Es la capacidad de las células tumorales de diseminarse al espacio que rodea a un nervio (perineuro) y su presencia ha sido asociada con mal pronóstico. Constituye un proceso de invasión neoplásica y propagación del cáncer, independientemente de la sangre y los vasos linfáticos (78). Su implicación en CCR ha sido ampliamente investigada. En el año 2009, Liebig y colaboradores, describieron que la tasa de supervivencia libre de enfermedad en 5 años

cuadruplicaba en pacientes sin invasión perineural, frente a aquellos que si la padecían (65% frente a 16%, $P < 0.001$) (79).

4.1.5 *Budding*

Este parámetro histopatológico se conocía en los años 50 como un brote en el borde invasivo del tumor con mayor tasa de crecimiento que el propio tumor. Por ello se denominó “desdiferenciación tumoral” en el borde invasivo y se describió como una parte del tumor que adquiriría habilidad de invadir canales linfáticos y vasculares (80). Histológicamente, se encuentra en una zona del margen invasivo del tumor (78), con estructuras glandulares bien desarrolladas que dan paso a células aisladas o grupos pequeños de células tumorales, pobremente diferenciadas, con largos núcleos y que han perdido las microvellosidades y la membrana basal. A estos grupos aislados de células se les denomina *budding*. Estos brotes tumorales se encuentran dispersos en el estroma del margen del tumor invasivo.

En cuanto al significado clínico, se asocia con otros factores histopatológicos que aportan peor pronóstico como el alto grado de diferenciación tumoral, infiltración del borde tumoral y la presencia de invasión perineural y linfovascular, que como se ha comentado, están relacionadas con metástasis en nódulos linfáticos.

Se han realizado estudios en las diferentes fases del CCR. En la fase I, se ha visto que se asocia con el alto grado de diferenciación tumoral y la invasión linfática. En la fase II, puede ser usado como identificador de alto riesgo, ya que se ha demostrado que la supervivencia de 5 años de fase II con *budding* es peor que la de fase III sin él (81,82). En fase más avanzadas de la enfermedad, III y IV, no se considera un factor muy importante, aunque puede deberse al menor número de estudios realizados (80,83).

Aun así existen controversias a la hora de analizar su presencia, y qué características tiene que tener para ser considerado *budding*. La calificación más utilizada para definir un *budding* es la presencia de un número mayor o igual a 10 grupos celulares compuestos por menos de 5 células tumorales en un área de objetivo 20X (84).

4.1.6 *Afectación ganglionar*

La identificación de las células tumorales en los ganglios linfáticos es esencial para la correcta clasificación de pacientes con CCR, así como para determinar si es apropiado aplicar el tratamiento adyuvante tras la cirugía. Hoy en día, uno de los factores más importantes que se

asocian con un alto riesgo de recurrencia es la afectación de ganglios linfáticos. Por ello, el estudio de un número insuficiente de los ganglios linfáticos puede dar lugar a errores de clasificación del tumor con un impacto significativo en el diagnóstico del paciente.

De hecho, en un estudio con más de 35.000 casos de CCR diagnosticados T3N0M0, la tasa de supervivencia relativa a 5 años varió de 64% si se examinaban 1 o 2 ganglios linfáticos al 86% si por el contrario, se examinaban más de 25 ganglios linfáticos (85).

Otro estudio demostró que la tasa de CCR con metástasis en ganglios linfáticos era superior al aumentar el número de ganglios analizados. Un 31% de los ganglios analizados, al examinar de 1 a 3, poseían metástasis; sin embargo al analizar más de 12 ganglios, la aparición de metástasis aumentaba al 41%, $P<0,001$). Además, la evaluación de 12 o más ganglios linfáticos se asoció con una mejor supervivencia en pacientes sin ganglios afectados ($P<0,001$) (86).

A pesar de multitud de estudios, no hay un acuerdo generalizado acerca del número de ganglios a analizar en la pieza quirúrgica, aunque se recomienda un mínimo de 12 a 15. La Comisión Americana del Cáncer, considera una medida de calidad evaluar 12 ganglios linfáticos en los especímenes (55,58,87). Si el número de ganglios que se encuentra es menor, se recomienda volver a examinar el espécimen con o sin ayuda de técnicas que mejoren la localización de los mismos. El informe de patología debe indicar el número de ganglios examinados y el número de ganglios afectados. Por otra parte, los ganglios linfáticos son más difíciles de encontrar en los pacientes ancianos, obesos y en los que han recibido tratamiento adyuvante (87).

4.1.7 *Depósitos tumorales en grasa (DTs)*

Los DTs son grupos de células tumorales que se encuentran situados en el área de drenaje linfático del tejido adiposo pericólico y/o perirrectal de un tumor primario (lejos del borde de ataque del tumor infiltrante) que no se pueden identificar como nódulos metastásicos en sí (88).

Estos depósitos tumorales pueden representar una diseminación discontinua del tumor primario, invasión venosa con difusión extravascular, o un ganglio linfático totalmente sustituido (87).

Los estudios que investigan el significado clínico de depósitos tumorales en CCR han encontrado que su presencia se asocia a un peor pronóstico y una menor tasa de supervivencia (88,89). Su origen se ha demostrado que es heterogéneo y se han clasificado en dos grupos, por un lado los DT asociados a largas venas o nervios, que pueden representar metástasis “en tránsito” y se asocian con peor diagnóstico, mientras que los DTs asociados a canales linfáticos se asocian con metástasis ganglionar y mejor pronóstico (89).

4.2 MARCADORES MOLECULARES

4.2.1 *Familia del receptor del Factor de Crecimiento Epitelial Humano (EGFR o HER, Human Epithelial Growth Factor receptor)*

La familia de receptores EGFR está compuesta por 4 receptores de unión a dominios tirosín-quinasa (HER 1, 2, 3, 4). Su activación se produce mediante la fosforilación recíproca de los dominios intracelulares, resultante de un proceso de dimerización entre receptores desencadenado por la unión de la molécula ligando a su dominio extracelular (Figura 8).

EGFR o HER1 al fosforilarse, activa otras proteínas intercelulares implicadas en rutas de señalización, como MAPK y PI3K, cuyo objetivo final es el control de la proliferación, apoptosis o angiogénesis entre otros. El gen *EGFR* se encuentra amplificado en el 65-70% de los casos de CCR y está implicado en procesos de tumorigénesis (90,91).

En modelos preclínicos, se comprobó que la inhibición del receptor tenía actividad antitumoral. Este hecho ha motivado el desarrollo de anticuerpos monoclonales destinados al bloqueo del receptor, dos de los cuales, Cetuximab y Panitumumab, han llegado a la práctica clínica. Estos fármacos interfieren con la actividad catalítica del dominio citoplasmático alterando la señalización. Hoy en día se utilizan como agentes únicos o en combinación con quimioterapia, y los resultados han mostrado un perfil de toxicidad aceptable (92).

HER 2 es menos relevante en CCR. Se encuentra amplificado entre el 2 y el 5% de los casos. Dicha sobreexpresión no llega a los niveles necesarios para resultar predictiva de respuesta al tratamiento con Trastuzumab, anticuerpo monoclonal frente a HER 2.

HER 3 se encuentra sobreexpresado en CCR con una frecuencia que varía entre el 36 y el 89%, lo que se ha relacionado con una menor supervivencia global (92).

En modelos preclínicos se ha relacionado la sobreexpresión de HER 2 y 3 con la resistencia al tratamiento con terapias anti-EGFR. De hecho, líneas celulares resistentes a Cetuximab exhiben una amplificación del gen *HER2* (93).

El papel de HER 4 es el menos estudiado en CCR. Su sobreexpresión por IHQ se encuentra en alrededor del 35% de los casos, habiéndose relacionado ésta con la existencia de metástasis ganglionares y con un peor pronóstico (94).

4.2.2 VÍA MAPK y PI3K

4.2.2.1 KRAS

La familia de genes *RAS* codifica proteínas asociadas a la membrana y de unión a guanina. Estas proteínas, entre las que se encuentra *KRAS*, funcionan como interruptores moleculares de las rutas de señalización intracelular y participan en el control de la proliferación celular, diferenciación mediante la transducción de señales extracelulares de mitosis, migración y apoptosis entre otras (91).

Dentro de las alteraciones que se producen en el gen, el 82% se deben a mutaciones en el codon 12, el 17% ocurren en el codon 13, y el 1% restante suceden en el codon 61 o el 146. La sustitución de Glicina por Valina en el codon 12 (p.G12D) produce una activación constitutiva de la proteína y está presente en aproximadamente el 33% de los CCR (95) y se considera un factor de mal pronóstico (90,96).

Destacamos el papel predictivo de las mutaciones en *KRAS* en la respuesta al tratamiento con Cetuximab, anticuerpo en terapia anti-EGFR. Los pacientes portadores de mutaciones en *KRAS* no responden al fármaco (91,97) y la hipótesis más aceptada es que la activación constitutiva de la vía de señalización intracelular tras EGFR haría que los anticuerpos dirigidos contra EGFR no tuviesen efecto (91).

4.2.2.2 BRAF

BRAF, miembro de la familia de quinasas *RAF* (A, B, C-*RAF*), es una serín-treonín quinasa, principal efectora de *KRAS* en la vía de las *MAPK*. Cuando *BRAF* es activada por *KRAS*, ésta interactúa con *CRAF* para activar a *MEK*, que a su vez extiende la señal a la activación de *ERK* que finalmente se translocará al núcleo donde activará genes asociados a proliferación, crecimiento celular y supervivencia. En el CCR, *BRAF* se encuentra constitutivamente activa debido a mutaciones en su estructura primaria entre un 5-15% de los casos (90). La alteración

activadora más frecuente, que tiene lugar en más del 80% de los casos, corresponde a una sustitución de la Valina en su posición 600 por un Ácido Glutámico, p.V600E, provocando una activación de la ruta. Los pacientes con CCR que presentan la mutación p.V600E se ha visto que tienen un peor pronóstico y este fenómeno es mutuamente excluyente con la presencia de mutaciones en *KRAS* en una misma célula (91).

Las mutaciones en *BRAF* constituyen un biomarcador en sí para la terapia con inhibidores de *BRAF*, muy efectivas frente a melanoma, pero que no muestran el mismo resultado en CCR (98). Al igual que ocurría con las mutaciones en *KRAS*, las mutaciones en *BRAF* se utilizan como factores predictivos negativos frente a inhibidores de EGFR como Cetuximab y Panitumumab (90,91).

4.2.2.3 PIK3CA

En la vía PI3K/AKT/mTOR/p70S6K o vía fosfatidilinositol 3-quinasa, PI3K (*Phospholinositide 3-Kinase*) es crucial en numerosos aspectos fisiológicos como ciclo celular, supervivencia, síntesis de proteínas, motilidad y angiogénesis.

La enzima PI3K α , también llamada PIK3CA, es una quinasa lipídica formada por dos subunidades: p85 la parte reguladora y p110 la subunidad catalítica. Esta enzima se activa por receptores con actividad tirosín quinasa, como EGFR, HER2, el factor de crecimiento de insulina (IGFR) o el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) y así como por la activación de *KRAS* (91). Cuando p85 está unida al grupo fosfato del receptor transmembrana, se produce un cambio conformacional sobre p110 que interactúa con moléculas de fosfatidil inositol 3,4 difosfato (PIP₂) convirtiéndolo en el segundo mensajero fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato (PIP₃), que activa a AKT, aumentando la proliferación celular y la supervivencia (99) (Figura 8).

Se han observado mutaciones de *PIK3CA* en multitud de tumores, incluyendo glioblastoma, gástrico, mama, ovario, de pulmón y CCR (100). El gen *PIK3CA*, codifica la subunidad catalítica p110 α de la enzima PIK3CA. Se sabe que más del 80% de las mutaciones detectadas en *PIK3CA* aparecen en dos puntos calientes (zonas definidas dentro del genoma que presentan una elevada frecuencia de mutación), el dominio helicasa del exón 9 (codon 542 y 545) y el dominio quinasa en el exón 20 (codon 1047). Concretamente, en pacientes con CCR metastásico, estas mutaciones son detectadas entre 15-20% de los casos (91).

Existe gran discrepancia sobre el valor predictivo de las mutaciones de *PIK3CA* como biomarcador de respuesta a terapias anti-EGFR, aunque los primeros estudios que se realizaron por Sartore-Bianchi y colaboradores sugieren que estas mutaciones se pueden asociar con una resistencia a inhibidores de EGFR (101).

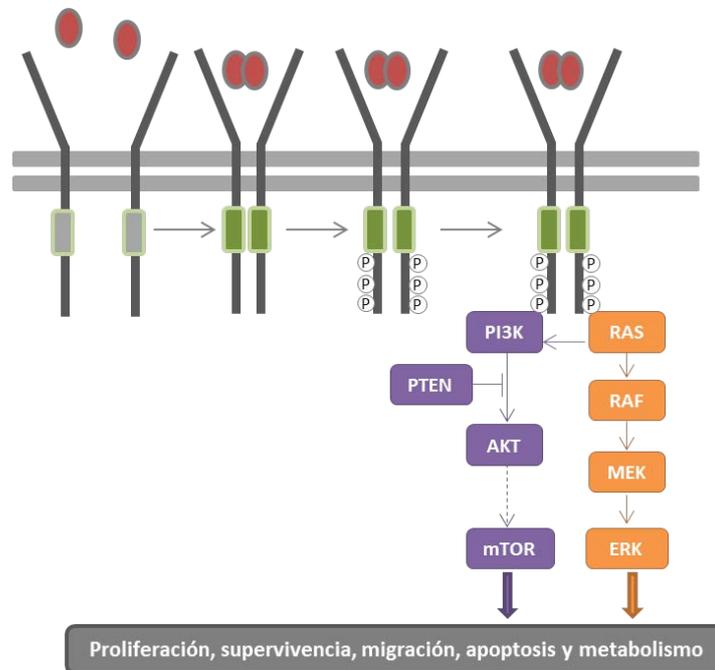


Figura 8. Ruta de señalización a través de receptores tirosín quinasa. Tras la unión de los ligandos extracelulares, el receptor tirosín quinasa se dimeriza y se produce la autofosforilación de los dominios tirosina. A estos residuos fosfato se unirán a proteínas Intracelulares, tales como PI3K y RAS, entre otras.

4.2.3 PROTEINAS IMPLICADAS EN LA REPARACIÓN DEL ADN

4.2.3.1 P53

TP53 es un gen localizado en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13) que codifica un factor de transcripción nuclear compuesto de aproximadamente 20.000 pares de bases, 393 aminoácidos con un peso molecular de 43.700 Dalton y se distribuye en 11 exones (42,43,102,103).

Fue descubierta inicialmente en 1979 como una proteína de unión a un oncogén viral (104), SV-40, por lo que se pensó que era un oncogén en sí. Desde entonces se ha establecido que tiene un papel fundamental como gen supresor de tumores y ha sido comúnmente denominado el “guardián del genoma”. La inactivación de p53 predispone a las células a una transformación maligna en modelos de roedores y en enfermedades clínicas en humanos,

como el síndrome de Li-Fraumeni; este último caracterizado por mutaciones en la línea germinal de p53 (42).

Varios factores en respuesta al daño celular, como daño al ADN, hipoxia, fármacos citotóxicos o radiación entre otros estimulan su expresión. Estas señales son detectadas por una serie de sistemas de reconocimiento (ATM/ATR/DNA-PK/Chk1/Chk2/JNK) que provocan la modificación postraducciona de algunos de los dominios de p53, principalmente el amino terminal y el carboxilo terminal por medio de fosforilación, ubiquitinación, metilación, acetilación y sumolización. En condiciones normales, p53 se encuentra en su forma inactiva a bajas concentraciones, mientras que en situaciones de estrés, se activa y estabiliza (105).

La forma inactiva de la proteína está regulada por varios mecanismos de retroalimentación negativa. En primer lugar por medio de MDM2, una ligasa E3 de ubiquitina que se une a p53 (106,107). La interacción con el dominio N-terminal lleva a modificaciones postraduccionales en el dominio C-terminal que produce el marcaje en p53 para su posterior degradación en el proteosoma (107). La proteína p53 regula además el gen de la Ciclina B, que junto a la fosfatasa PP2A elimina las fosforilaciones de MDM2, aumentando su actividad, y reduciendo por tanto los niveles de p53 (108). p53 también regula la expresión del gen *Wip-1*, que codifica una fosfatasa que inhibe la actividad de p38 quinasa (MAP quinasa). La defosforilación de p38 hace que no fosforile a p53 disminuyendo su actividad. Wip-1 además de defosforilar a p53, también lo hace a ATM, ATR, Chk2 y Chk1 y regula a p21 (109).

En situaciones de estrés, una vez activa, p53 forma un complejo tetramérico con secuencias específicas de ADN de algunos genes implicados en paradas en el ciclo celular, reparación del daño en el ADN, inhibición de la angiogénesis e inducción de la apoptosis. Si se detecta un daño leve, detiene la progresión del ciclo celular para que pueda ser reparado y posteriormente reiniciarlo, modificando la expresión de genes y factores de transcripción, que junto con p53, desencadenarán señales de reparación. La parada en la progresión del ciclo celular estaría relacionada con la inducción de p21, un inhibidor de los complejos ciclina-CDK2 y ciclina-CDK4. En respuesta a agentes que dañan el ADN, p53 induce la síntesis de p21, el cual inactiva los complejos ciclina A/E CDK2 y ciclina D1/D2/D3-CDK4, impidiendo la transición de G₁ a S (110).

Si el daño no consigue ser reparado o dura demasiado tiempo, p53 envía señales de muerte celular programada, señales proapoptóticas (111), disminuyendo la posibilidad de que las células con el daño (mutaciones) sobrevivan y contribuyan a la formación de un posible

tumor. Por esta razón se le denomina coloquialmente como el “guardián del genoma”, ya que actúa como controlador del ciclo celular, iniciador la apoptosis, preservador de la estabilidad genética y como promotor de la diferenciación celular (42,43,102).

En el caso que p53 no sea funcional, por tratarse de una proteína mutada o por estar unida a proteínas virales como LTA del virus SV40, puede permanecer inactiva frente a un daño celular y consecuentemente se produciría una proliferación celular descontrolada (104).

En cuanto a la estructura de la proteína, está formada por 393 aminoácidos agrupados en cuatro dominios funcionales. Esta estructura queda reflejada en la Figura 9.

El dominio aminoterminal, hasta el aminoácido 102, posee actividad transactivadora de genes diana. Interacciona con la ARN polimerasa y aumenta la transcripción.

El dominio de unión al ADN, que comprende los aminoácidos 102-293, es una zona denominada Core, resistente a la acción de enzimas proteolíticas e interacciona con el antígeno mayor del virus SV40. Es la secuencia más conservada, y tiene la función de reconocimiento y unión al ADN (112). La presencia de mutaciones o su interacción con otras proteínas harán que p53 no sea capaz de unirse al ADN y permanezca inactiva. El gran problema de este dominio es que en él se encuentran el 80% de las mutaciones puntuales detectadas en tumores (113). La estructura terciaria, descubierta en 1994, está formada por dos láminas β antiparalelas, dos grandes bucles L2 (aminoácidos 163-195) y L3 (aminoácidos 236-251) y un motivo *loop*-lámina-hélice al final del dominio. Los *loops* de dicha estructura están coordinados por un átomo de zinc, muy importante para la estructura y estabilidad de la molécula, coordinado tetraméricamente por tres cisteínas y una histidina (Cys176, His179, Cys238 y Cys242) (114). Una mutación puntual en los aminoácidos de la estructura del dominio de unión también es importante, ya que podría originar una inestabilidad estructural o incluso el no reconocimiento de la secuencia específica de ADN, si se tratara de los aminoácidos que interaccionan directamente con el ADN, como son las argininas 248 y 273 (113,115). En 2006, se resolvió la estructura cuaternaria de cuatro dominios centrales unidos a una determinada secuencia de ADN formando un tetrámero (116).

El dominio de tetramerización está localizado entre los aminoácidos 320-360 y es responsable de la formación del tetrámero (115). Esta región se une a cada uno de los dominios centrales. Se sabe que mutantes en esta región muestran una proteína citoplasmática, por lo que no puede efectuar sus funciones como factor de transcripción en el núcleo.

El último dominio, carboxilo terminal, se localiza entre los aminoácidos 363-393 y contiene multitud de sitios que son modificados postraduccionalmente ante una señal de estrés (ubiquitinación, sumolización, fosforilación, acetilación y glicosilación). Gracias a su contenido en residuos básicos se une al ADN para regular la actividad del dominio central (117).

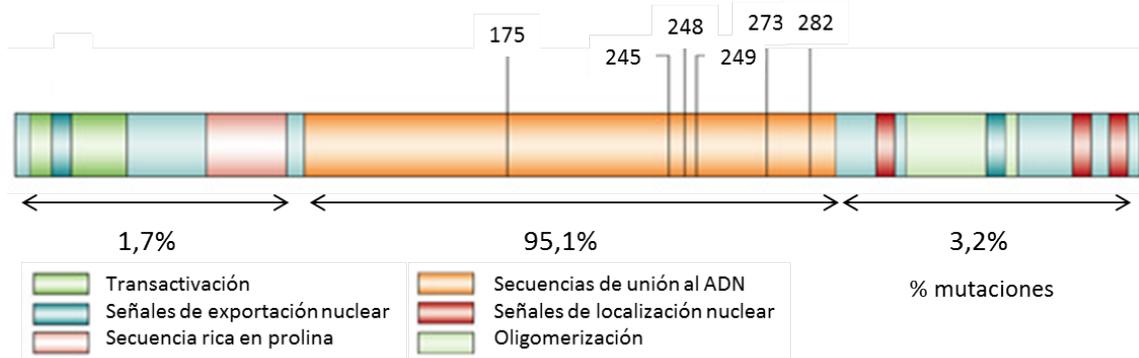


Figura 9. Estructura de p53. Representación esquemática de los dominios de p53, en el que se señalan los aminoácidos más propensos a mutaciones, así como el porcentaje de mutaciones sufrido según el dominio. Adaptada de (107).

TP53 es el gen supresor alterado con mayor frecuencia en neoplasias y está mutado en la mitad de los tumores sólidos conocidos, aunque la frecuencia de mutación difiere según el tipo de cáncer. En cáncer de ovario y CCR se sitúa entre el 40-50% de los casos. Específicamente en CCR, a medida que el tumor avanza desde el punto de vista histológico, la frecuencia de mutación en este gen aumenta. Así, los adenomas presentan una frecuencia de mutación del 4-26%, los adenomas con focos invasivos un 50% y los carcinomas un 50-75% (3,43). Alrededor del 90% de las mutaciones encontradas se encuentran en la región entre los codones 125-300. Concretamente, las mutaciones descubiertas en CCR afectan principalmente a una serie de aminoácidos: 132-142, 151-159, 172-179, 237-249 y 272-286, localizados en la región de unión al ADN (Figura 9). Los residuos mutados afectarán a la habilidad de p53 de unirse a sus secuencias promotoras del ADN (107). En la mayoría de estas mutaciones (87,9%) se produce un cambio en un único nucleótido, provocando la aparición de un codon que codifica un aminoácido diferente. Esto puede generar una proteína incapaz de cumplir su función.

La sobreexpresión de proteína p53 se comporta como un factor pronóstico de riesgo y constituye un factor predictivo negativo de respuesta a la mayoría de los tratamientos. En pacientes sometidos a una resección tumoral curativa, y donde *TP53* se encuentra mutado, la frecuencia de recidiva es mayor y el intervalo libre de enfermedad es menor (118).

4.2.3.2 ERCC1

La proteína de reparación por escisión del grupo de complementación cruzada 1, ERCC1, está implicada en el proceso de reparación por escisión de nucleótidos. Forma un heterodímero con XPF, complejo responsable de la escisión de la hebra dañada (119). Una proteína ERCC1 funcional es esencial para reparar los aductos de ADN formados por fármacos basados en platino y se ha visto que está implicada en la sensibilidad al fármaco *in vitro*. Sin embargo, un nivel de expresión elevado del gen *ERCC1* se correlaciona con una peor supervivencia global tras la terapia basada en 5-FU/Oxaliplatino en pacientes con CCR avanzado, sugiriendo el papel de ERCC1 como determinante de la sensibilidad al tratamiento (120,121).

4.2.3.3 Proteínas del sistema *Mismatch Repair*

La pérdida de expresión de las proteínas MSH2, MLH1, PMS1, PMS2, MSH6, o MLH3, implicadas en la reparación del ADN, y consecuentemente la aparición de inestabilidad de microsatélites, sigue siendo uno de los marcadores moleculares más estudiados en el CCR, analizados por inmunohistoquímica. En casos de CCR esporádico, en los casos donde se encontró más de un 30% de inestabilidad de microsatélites, eran debidos a la inactivación de *MLH1* en el 95% de los casos, y *MLH2* y *MLH6* en porcentajes menores, 5 y <1% respectivamente. Esta alteración molecular da lugar a una enfermedad con mejor pronóstico y un menor beneficio del tratamiento adyuvante con 5-Fluorouracilo en enfermedades con fase II así como un mayor beneficio obtenido del tratamiento con Irinotecan (122).

5. TRATAMIENTOS

Una vez determinada la fase del CCR en la que se encuentre el paciente, el especialista recomienda al paciente el plan de tratamiento más adecuado. Los protocolos existentes en los hospitales, son empleados de forma generalizada y son aplicados en función de la extensión del tumor y de las características y el estado general del paciente.

5.1 TRATAMIENTO ADYUVANTE

El tratamiento adyuvante es un tratamiento sistémico administrado tras la resección del tumor primario con el objetivo de reducir el riesgo de recaída y muerte del paciente. El tipo de tratamiento en cáncer de colon depende principalmente de la fase en la que se encuentra

el tumor, pero también de acuerdo a las características del paciente, como edad o estado funcional.

5.1.1 Tratamiento con radioterapia

La terapia neoadyuvante se ha convertido en el tratamiento estándar para los tumores de recto localmente avanzados en la última década. Los beneficios de la quimiorradiación neoadyuvante incluyen regresión tumoral, descenso de fase y mejor resecabilidad, pero no se ha observado un aumento en la supervivencia global (123)

5.1.2 Fases 0 y I

En los tumores en fase 0 generalmente se realiza una escisión local o una simple polipectomía endoscópica, que es un procedimiento diagnóstico ambulatorio que permite la extracción de pólipos mientras se realiza una endoscopia. Si el tumor está en fase I el tipo de tratamiento estándar consiste en una resección quirúrgica más amplia con anastomosis. Hoy en día, la cirugía en esta fase tiene un buen pronóstico, y no suele recomendarse terapia adyuvante (124).

5.1.3 Fase II

Cuando un tumor es diagnosticado en fase II, el primer paso es realizar una cirugía amplia con anastomosis. La gran incógnita con estos pacientes es si se debe o no suministrar quimioterapia adyuvante, ya que no se sabe con seguridad si es beneficiosa o no para el paciente (125). De hecho, un estudio denominado MOSAIC (*Multicenter International Study of Oxaliplatin/5-Fluorouracil/Leucovorin in the Adjuvant Treatment of Colon Cancer*, Estudio Internacional Multicéntrico de Oxaliplatino/5-Fluorouracilo/Leucovorina en el tratamiento adyuvante del cáncer de colon) realizado en 2006 por Andre y colaboradores con pacientes en fase II, no mostró mejoras en la Supervivencia Libre de Enfermedad (SLE) ni en la Supervivencia Global (SG) al ser tratados con quimioterapia adyuvante (126).

Por el contrario, algunos estudios han demostrado que existe un pequeño beneficio de supervivencia de 1% a 5% al incluir terapias adyuvantes en los pacientes con tumores en fase II de alto riesgo. Dada la diversidad de respuesta, es recomendable determinar el riesgo de recurrencia de los pacientes. Se ha considerado que el grado de penetración de las células tumorales a través de la mucosa es el factor que determina el alto o bajo riesgo, incluyendo a los pacientes en fase IIB en el grupo de alto riesgo. Tal vez el análisis de marcadores

moleculares (como la presencia de inestabilidad de microsatélites y la pérdida de heterocigosidad de los alelos 18q) en combinación con las características histopatológicas de alto riesgo ayudarían a aumentar la especificidad de la clasificación de los pacientes e identificar subgrupos que se beneficiarían de la terapia adyuvante (127).

5.1.4 Fase III

El papel de la terapia adyuvante en la fase III del CCR está bien definido. Durante las últimas décadas los proyectos MOSAIC y NSABP (*National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project*, Proyecto C-07 Nacional de Cirugía Adyuvante en el Cáncer de mama e intestinal) han sido los encargados de diseñar ensayos clínicos a gran escala con la finalidad de mejorar los tratamientos de cáncer de colon y mama (128). De hecho, el primer estudio prospectivo aleatorio para investigar el papel de la quimioterapia adyuvante en el manejo del cáncer de colon resecado con intención curativa, fue realizado en la década de los setenta, y en él se demostró que la quimioterapia adyuvante brindaba un beneficio significativo en la SG y SLE en pacientes con cáncer de colon en fase II y III (129). Esto llevó a la aprobación por parte de la Agencia de Alimentos y Medicamentos (*Food and Drug Administration*, FDA) de varios compuestos utilizados como monoterapia o en combinación.

5.1.4.1 FOLFOX 4 (5-FU/Leucovorina/Oxaliplatino).

5-Fluorouracilo (5-FU) fue el primer fármaco que demostró un beneficio en términos de supervivencia frente a sólo cirugía. En los años 90 se realizaron diversos ensayos clínicos que demostraron que 5-FU asociado a inmunomoduladores como Leucovorina (LV, folato que estabiliza la interacción de 5-FU con la enzima timidilato sintetasa) o Levamisol (derivado sintético del imidazotiazol) conseguía un aumento en la SLE y SG (130). Los resultados del ensayo MOSAIC y NSABP confirmaron posteriormente un beneficio en la SLE con la adición de Oxaliplatino en las terapias de 5-FU/LV (131). De este modo, en el año 2004, la FDA aprueba el uso de 5-FU y Leucovorina (infusión) en combinación con Oxaliplatino (inyección) como terapia adyuvante en pacientes con cáncer de colon en fase III (Eloxatin™, Sanofi-Synthelabo, Inc.). La combinación 5-FU/LV/OXA recibió la denominación de esquema **FOLFOX 4**, y se comprobó que aumentaba la SLE a 5 años y que los pacientes presentan una SG de 6 años. Sin embargo, no se detectan diferencias en la SLE y SG en los pacientes con tumores de colon en fase II (132).

5.1.4.2 Capecitabina

Capecitabina es el profármaco de 5-FU, y su administración se realiza por vía oral. El estudio de Capecitabina como terapia adyuvante comenzó en 1998 en un ensayo clínico denominado X-ACT, que comparaba el uso de Capecitabina con el esquema 5-FU/LV. La administración de Capecitabina se mostró equivalente a la de 5-FU/LV en términos de SLE, observándose una SLE de 3 años, que en otro estudio posterior aumentó a una SLE de 5 años (133). Por ello, la FDA aprueba Capecitabina en el año 2005 como monoterapia adyuvante en pacientes con cáncer de colon en fase III (Xeloda®, Hoffman-La Roche Inc.). Además presenta la ventaja de ser administrada de forma oral, a diferencia de 5-FU que es administrado por vía intravenosa. Este tipo de terapia se recomienda en los pacientes que requieran por algún motivo una terapia basada en fluoropirimidinas exclusivamente.

5.1.4.3 XELOX (Capecitabina/Oxaliplatino)

Hoy en día se considera al esquema FOLFOX 4 como tratamiento estándar para el CCR en fase III; sin embargo, ensayos de seguridad y eficacia en la combinación Capecitabina y Oxaliplatino (XELOX) han demostrado un beneficio en la SLE frente a 5-FU/LV, y menores efectos secundarios (134).

5.1.4.4 Irinotecan

Ha sido aprobado para su uso de forma individual o en combinación con otros compuestos para el tratamiento de cáncer de colon en fase III y metastásico, incluso en recidivas o en algunos tipos de tumores en los que otros tipos de tratamientos no han resultado beneficiosos. Sin embargo, ensayos adyuvantes incorporando Irinotecan en combinación, no mostraron una mejora significativa en la SLE (127).

5.2 TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD METASTÁSICA

En cuanto al tratamiento de la enfermedad diseminada, pacientes en fase IV, se han conseguido importantes avances en los últimos años. En estos casos, hay ocasiones en las que se puede aplicar una resección quirúrgica completa de las metástasis y otras veces no, debido a estados muy avanzados de la enfermedad. Cuando es posible la cirugía, la supervivencia se prolonga significativamente. Hasta la fecha existen varios compuestos y esquemas de combinación de fármacos aprobados por la FDA para su uso en cáncer de colon en fase IV.

Oxaliplatino, en combinación con **5-Fluoruracilo** y **Leucovorina** (FOLFOX 4) es considerado también como régimen de elección en el tratamiento del cáncer colorrectal metastásico.

En los últimos años se han desarrollado nuevos agentes dirigidos a dianas terapéuticas específicas destinados a mejorar la eficacia de los fármacos ya existentes.

5.2.1 *Bevacizumab*

Es un anticuerpo monoclonal que inhibe el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (*vascular endothelial growth factor*, VEGF), evitando la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis). Bevacizumab fue aprobado por la FDA en el año 2004 como primera línea de tratamiento para pacientes con CCRm (Avastin®, Genentech, Inc.). Varios ensayos clínicos en fase II/III han demostrado que la adición de este fármaco a la quimioterapia basada en 5-FU mejoran la SG, supervivencia libre de progresión (SLP) y la tasa de respuesta en comparación con la quimioterapia sola (135,136). En el año 2006, la FDA aprueba el uso de Bevacizumab en combinación FOLFOX 4 como segunda línea de tratamiento del CCRm.

5.2.2 *Cetuximab*

Es un anticuerpo monoclonal que inhibe el receptor del factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal Growth Factor Receptor*, EGFR). Ha ofrecido un beneficio adicional a los pacientes con CCRm mejorando la SG de una media inferior a seis meses a una supervivencia de aproximadamente 24 meses (53). En el año 2004, la FDA aprobó su uso en combinación con **Irinotecan** para el tratamiento de pacientes con CCRm que expresan EGFR (Erbix®[®], Imclone Systems, Inc.). En el año 2007, se aprueba su uso como monoterapia para el tratamiento de pacientes intolerantes o refractarios a las terapias basadas en Irinotecan. Posteriormente, un ensayo clínico en fase III CRYSTAL, demostró que el tratamiento de primera línea con Cetuximab más FOLFIRI (Leucovorina, 5-FU e Irinotecan) reducía el riesgo de progresión del CCRm en comparación con FOLFIRI solo. Además, posteriormente se confirmó que el beneficio de Cetuximab se limitaba a aquellos pacientes con *KRAS* no mutado (137). En julio del 2012, la FDA aprueba su utilización en combinación con FOLFIRI como primera línea de tratamiento de pacientes con CCRm con *KRAS* silvestre.

5.2.3 Panitumumab

Es un anticuerpo monoclonal IgG2 cuya diana es también EGFR. Fue aprobado en el año 2006 (Vectibix™; Amgen, Inc.) para el tratamiento de pacientes con CCRm que expresan EGFR, tras un ensayo donde los pacientes tratados con Panitumumab mejoraban la SLP (138). Recientemente, la combinación de Panitumumab en primera línea con FOLFOX 4 y en segunda línea con FOLFIRI ha demostrado un beneficio de la SLP en pacientes con *KRAS* silvestre (139).

6. MECANISMO DE ACCIÓN DE 5-FLUOROURACILO

5-FU es una fluoropirimidina que pertenece a la familia de los fármacos antimetabolitos, que se ha consolidado como agente quimioterapéutico desde hace 60 años (140). Se ha demostrado su actividad contra una variedad de tumores sólidos, incluyendo cabeza y cuello, mama, próstata, páncreas, hígado, carcinomas del tracto genitourinario y gastrointestinal (140,141).

5-FU es análogo de un sustrato metabólico natural de la célula, la base pirimidínica uracilo, en la que se sustituye un átomo de hidrógeno en la posición 5' del anillo de pirimidina por un átomo de flúor. Capecitabina es el profármaco de 5-FU que se transforma a través de carboxilesterasas del plasma, hígado y el propio tumor en 5-FU.

El fármaco 5-FU se transforma a sus metabolitos activos, 5-fluoroutp (5-FUTP) y 5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-monofosfato (FdUMP). Si el fármaco se administra oralmente, en el caso de Capecitabina, esta se metaboliza en el hígado a 5'-DFUR, que se transformará a 5-FU. 5-FU se transforma en 5-FUTP que se incorpora al ARNm impidiendo su traducción. Además de ello, 5-FU, se convierte en 5-fluorodeoxiuridina (FudR) que, posteriormente, es fosforilada por la timidina quinasa (TK) en FdUMP. FdUMP inhibe a la enzima timidilato sintasa, que cataliza la síntesis del desoxitimidina-5'-monofosfato (dTMP) a partir de 2'-deoxiuridina-5'-monofosfato (dUMP) (122,142). FdUMP actúa compitiendo con el sustrato natural dUMP de la enzima. Esto conlleva una disminución de los niveles de dTMP (timina) y por consiguiente de desoxitimidina-5'-trifosfato (dTTP), necesario para la síntesis de ADN. La incorporación de dUTP en el ADN altera la estabilidad de la hebra, conduciendo a la inhibición de la síntesis del ADN y por tanto, a la inducción de muerte celular (141,142) (Figura 10. Mecanismo de acción de 5-Fluorouracilo.).

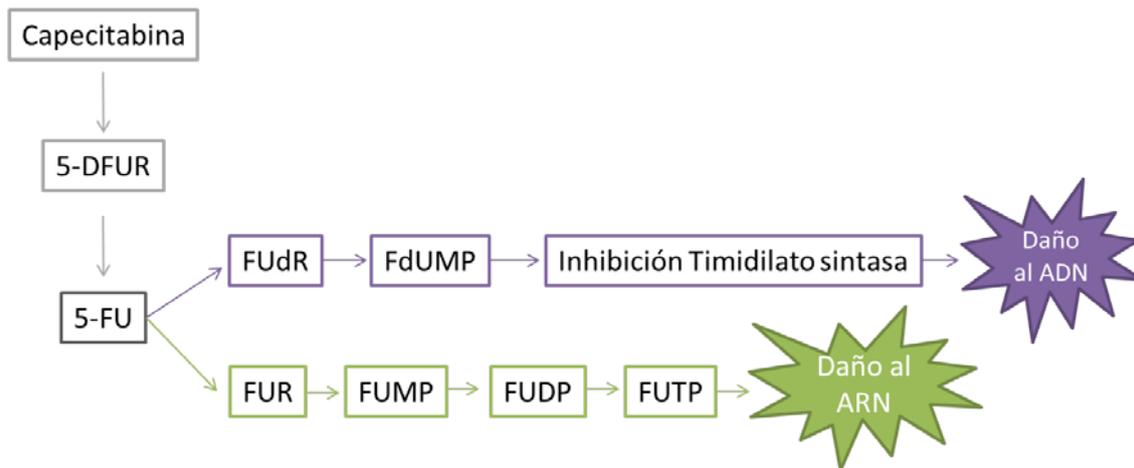


Figura 10. Mecanismo de acción de 5-Fluorouracilo.

7. MECANISMO DE ACCIÓN DE IRINOTECAN

Irinotecan (IRI) fue desarrollado como un derivado hidrosoluble semisintético de la camptotecina, un alcaloide extraído de un árbol de China (*Camptotheca acuminata*). Este extracto poseía actividad antitumoral *in vitro* y en ciertos modelos experimentales (143,144). IRI es un fármaco antineoplásico intravenoso, inhibidor de la topoisomerasa I, enzima necesaria para la separación de la doble cadena del ADN durante los procesos de replicación y transcripción. Esta inhibición conlleva a la muerte celular y es la base de su efecto antineoplásico (145). La topoisomerasa I alivia la tensión de torsión de la doble hélice de ADN durante la replicación y la transcripción. Actúa rompiendo de forma transitoria una de las cadenas de la doble hélice, formándose un complejo ADN- topoisomerasa I, y volviéndola a soldar (143).

Irinotecan es un profármaco que se metaboliza, tanto en el exterior como en el interior celular en su metabolito activo, **SN-38** (7-etil-10-hidroxicamptotecina), a través de las carboxilesterasas CES1 y CES2 (146). IRI y SN-38 pueden ser transportadas al exterior celular a través de las proteínas transportadoras ABC (*ATP-binding cassette*) (144,146). Además, IRI y SN-38 pueden ser inactivados por el citocromo P450 o la uridina difosfato glicosiltransferasa, respectivamente. Si SN-38 se une a su diana, la topoisomerasa, interfiere con la síntesis de ADN y en los procesos de reparación, provocando la muerte celular.

El metabolito SN-38 posee una potencia 1.000 veces mayor en la inhibición de la topoisomerasa I y 2.000 veces mayor desde el punto de vista citotóxico al compararlo con Irinotecan.

8. MECANISMO DE ACCIÓN DE OXALIPLATINO

Oxaliplatino (trans-1-diaminociclohexano oxalato platino II) es un fármaco antineoplásico sintetizado por primera vez en Japón por Y. Kidani y desarrollado posteriormente en Francia durante los años 80 (147). Es un derivado del platino de tercera generación análogo del cisplatino, que contiene un anillo 1,2 diamino-ciclohexano y un grupo oxalato.

Se trata de un compuesto clasificado como agente alquilante y su acción deriva del daño ocasionado en la molécula del ADN, al provocar rotura de las cadenas de ADN y la formación de uniones intra e intercadena mediante enlaces covalentes con los nitrógenos en posición 7 de los anillos imidazol de las guaninas y adeninas. En la Figura 11 queda representada la estructura del fármaco, así como las posibilidades de aductos formados por éste. Pueden darse roturas tanto en la misma hebra como en hebras distintas. Los enlaces intrahebra se forman entre las posiciones N7 de dos guaninas adyacentes (GG) en un 60-65% de los casos, adenina-guaninas adyacentes (AG) en torno al 25-30% de los casos, y guaninas separadas por un nucleótido intermedio (GNG) que suponen un 5-20%; y los enlaces interhebra entre dos guaninas son del 1-3%. De este modo, impide la replicación y transcripción genética. Esta acción se ha comprobado que es más citotóxica que las que se generan por la acción de otros derivados del platino (148).

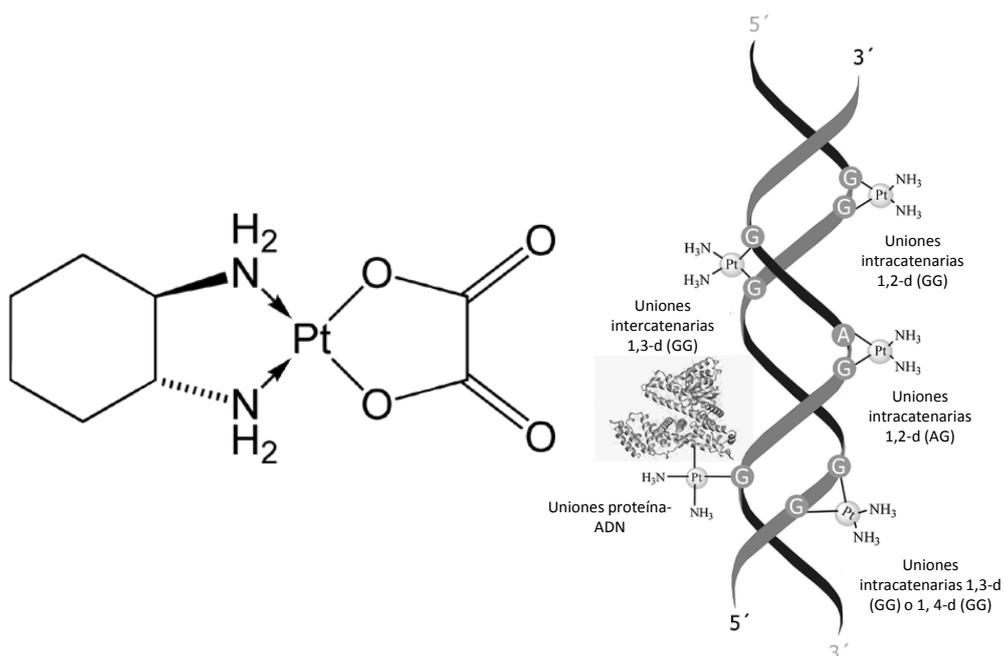


Figura 11. Estructura del fármaco Oxaliplatino y formación de enlaces en la cadena de ADN. Adaptado de Esteban-Fernández y cols. (149).

En Europa, Oxaliplatino fue aprobado por primera vez en 1996 y en EEUU, la FDA lo autorizó en 2002 como tratamiento de primera elección en CCR metastásico, tras demostrar en dos estudios aleatorizados un incremento significativo de la tasa de respuesta (hasta del 50%), así como de la supervivencia libre de enfermedad (de 9 frente 6 meses) en combinación con 5-FU y LV. Fue evaluado *in vitro* e *in vivo*, como agente único y en combinación con 5-FU en varios modelos tumorales como el de mama y colon (131,132).

9. MECANISMOS CELULARES DE SEÑALIZACIÓN DE DAÑO EN EL ADN

Con el fin de preservar la integridad celular y la estructura de la molécula de ADN, y tras daños provocados por irradiación o por agentes como Oxaliplatino (OXA), las células poseen mecanismos capaces de detectar el daño y posteriormente repararlo. En un principio, se activan las vías de señalización de daño en el ADN que se explican a continuación.

9.1 VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DEL DAÑO EN EL ADN

Cuando se produce un daño en la cadena de ADN, como ocurre con el tratamiento quimioterapéutico con OXA, la célula inicia una respuesta coordinada (*DNA damage response*, DDR), cuyo objetivo principal es la reparación de ese daño y el mantenimiento de la integridad genómica, a través de la acción de sensores, transductores y efectores. Además de poner en marcha mecanismos de reparación, se puede detener el ciclo celular, activar programas de transcripción, e incluso desencadenar la muerte celular programada (apoptosis) o la senescencia (150).

Existen diversas proteínas que se movilizan inmediatamente tras el daño en el ADN.

9.1.1 *Iniciación de la señal*

Al inicio del daño en la cadena de ADN, el complejo MRN es activado. Este complejo, formado por las proteínas **MRE11-RAD50-NBS1**, actúa como sensor de daño en la cadena doble (*double strand break*, DSB) (151). El modelo actual propone que cuando se produce DSB, NBS1 es capaz de interaccionar con ATM, quinasa importante en el inicio de la respuesta, a través de su extremo C-terminal y atraerla a los DSB inmediatamente después del daño, gracias a que ATM está en contacto activo con la cromatina (152).

MRE11 es una proteína que se une y repara el ADN por su actividad 3'-5'exo y endonucleasa. Además se une a NBS1 y RAD50, manteniéndolas unidas en la cadena rota de ADN (153). Se ha demostrado que mutaciones en MRE11 están presentes exclusivamente en

aquellas líneas celulares con un sistema de reparación *mismatch* deficiente y dichas mutaciones se han asociado con errores en los puntos de control de la fase S (154).

Aunque el complejo MRN juegue un papel importante, no es suficiente, y requiere la colaboración de múltiples factores. Existen diversos complejos enzimáticos de transducción de la señal que son movilizados inmediatamente en respuesta al daño en el ADN. Los más significativos y estudiados son las quinasas **ATM** (*Ataxia-Telangiectasia Mutated*), **ATR** (*Ataxia Telangiectasia and Rad3-related*) y **DNA-PKcs** (*DNA Protein Kinase catalytic subunit*). Las tres transmiten el mensaje por la vía más clásica de señalización: la fosforilación de proteínas. La transmisión de la señal es debida a modificaciones postraduccionales que activan complejos enzimáticos y promueven interacciones proteína-proteína en una cascada de activaciones.

La familia de las PIKKs (*PI-3-Kinase-Related-Kinases*), por su homología con la fosfatidilinositol-3-quinasa (*Phosphatidylinositol-3-Kinase*, PI3K) está formada por ATM, ATR, DNA-PKcs, mTOR (*Mammalian target of rapamycin*, diana de la rapamicina) y SMG1. Estas proteínas tienen en común un dominio C-terminal fosfatidilinositol-3'-OH del tipo quinasa, lo que hace que actúen como proteínas quinasas (152). Estas proteínas cumplen su función mediante fosforilación de residuos serina y/o treonina, preferencialmente seguidos por un glutámico (sitios [S/T] Q). Son proteínas de pesos moleculares inusualmente altos (entre 300 y 500 kDa), en las que el dominio quinasa está altamente conservado (155).

La proteína **ATM** fue identificada como el producto del gen mutado en la enfermedad genética humana ataxia telangiectasia (156). En las células intactas, se encuentra formando dímeros inactivos que se disocian en monómeros activos tras autofosforilarse en serina 1981, resultado de la aparición de daño por rotura de la doble cadena de ADN. Consecuentemente, ATM se recluta hacia el daño por interacción directa con el dominio C-terminal de la proteína NBS1 (152,155,157).

La activación de ATM se produce en respuesta a rupturas de doble cadena y conlleva la rápida fosforilación de una multitud de proteínas que están implicadas en la reparación del ADN y en otros procesos. Una de éstas es NBS1, que adquiere fosforilaciones dependientes de ATM en dos sitios (serina 278 y serina 343). Entre otros sustratos de ATM, la histona H2A.X, variante de la histona H2A, es considerada uno de los marcadores más tempranos de la señalización tras daños en la cadena doble (158). La histona H2A.X es fosforilada en serina 139 y pasa a denominarse γ H2AX. A través del reclutamiento de factores de reparación al lugar del daño, la fosforilación de la histona H2A.X es amplificada, y tiene como consecuencia la

formación de focos nucleares en los lugares con roturas de doble cadena visibles incluso bajo el microscopio (155,159). Tras este primer paso inicial, una serie de proteínas mediadoras se reclutan a los puntos del ADN dañado. La ubiquitin ligasa RNF8 se une junto con la proteína fosforilada MDC1, y ubiquitina a γ H2AX, facilitando la acumulación de 53BP1 (p53 *binding protein-1*) y BRCA1 en el lugar del daño, siendo ambas proteínas sustratos de ATM en respuesta a DSB del ADN. Todas estas proteínas, junto con γ H2AX, se extienden cientos de kilobases a lo largo de la cromatina, envolviendo el ADN dañado (160,161) (Figura 12).

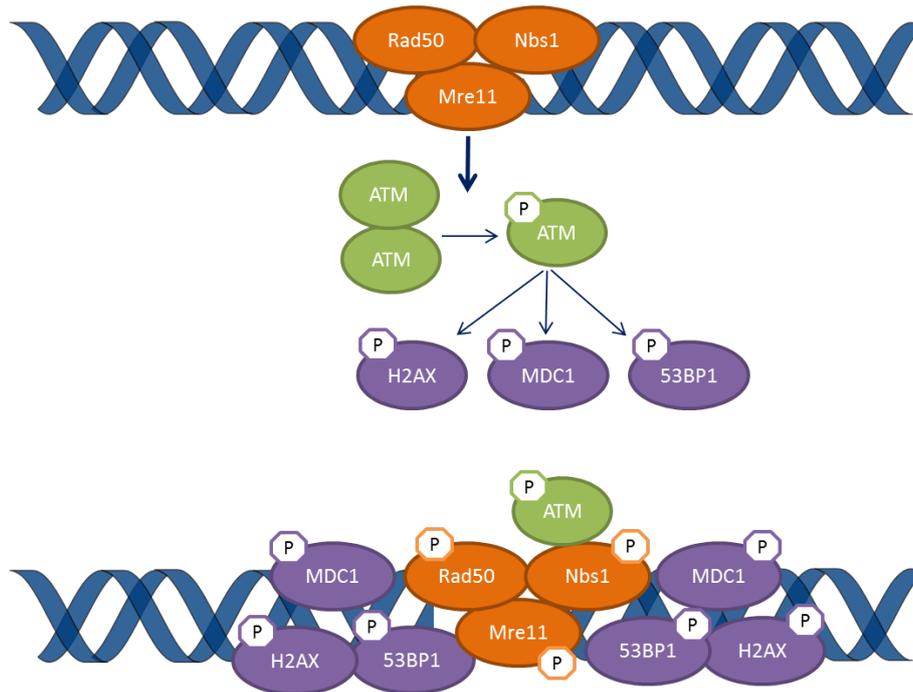


Figura 12. Activación del complejo proteico MRN y la proteína ATM.

La proteína **ATR** actúa principalmente en roturas de una sola hebra. Cuando ocurren, se recubren por la proteína de replicación A (RPA), reclutando a complejos de ATR y ATRIP (proteína que interacciona con ATR). La activación de ATR/ATRIP requiere del complejo proteico Rad17/9-1-1, esencial para la activación de Chk1 mediada por ATR (162) (Figura 13). ATR también responde a daños en el ADN de una sola cadena anormalmente largas. Éstas aparecen como consecuencia de una posible descoordinación entre la maquinaria de replicación y el desenrollamiento en el avance de las horquillas durante la fase S. Así, si las horquillas de replicación se bloquean en respuesta a alteraciones en la cadena, ATR mantiene la estabilidad de los complejos replicativos necesaria para reanudar correctamente la síntesis de ADN (163). Sin embargo, ATR, aunque con una activación más lenta, también lo haría en respuesta a roturas de doble cadena, y posee dianas de fosforilación comunes con ATM, como los supresores de tumores p53 y BRCA1. Con lo cual, la función de ATR en respuesta a DSB

sería cooperar con ATM en el mantenimiento de la fosforilación de los distintos sustratos (164). Esta quinasa también es capaz de fosforilar a H2A.X en respuesta al daño del ADN inducido por UV (165) o al estrés durante la replicación (166).

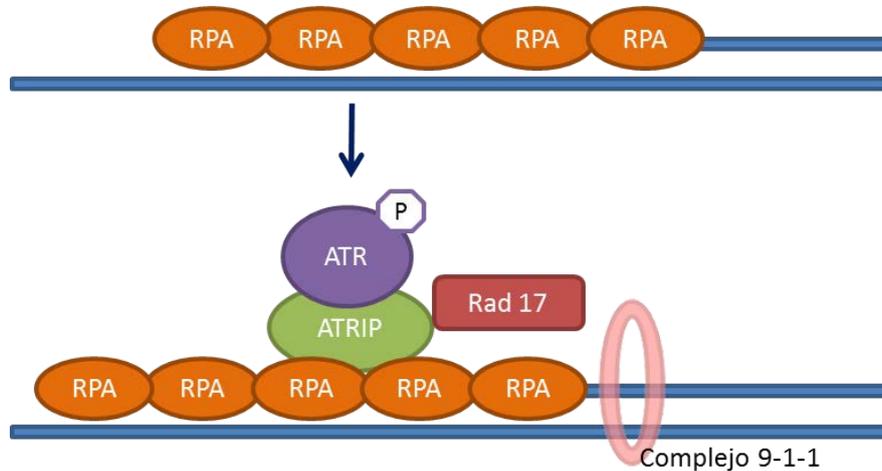


Figura 13. Activación de la proteína ATR

Otra proteína quinasa, **DNAPK**, es un factor importante en la reparación y señalización del daño tras las roturas en la doble hélice. Está compuesta por dos subunidades de unión al ADN (Ku70 y Ku86) y por una subunidad catalítica (DNA-PKcs). Las subunidades Ku70 y Ku80 se unen al ADN fragmentado y posteriormente la subunidad catalítica es activada. Dicha subunidad posee dos sitios de fosforilación, por un lado treonina 2609, fosforilación necesaria para la reparación de las roturas en la cadena doble y para la unión al ADN junto con H2A.X y 53BP1. Por otro lado, la fosforilación en serina 2056 es causada en respuesta a daño en la cadena doble y es mediada por ATM (167–169). Las DNA-PKcs son capaces de fosforilar H2A.X en los nucleosomas durante la fragmentación del ADN en fenómenos de apoptosis (170) y desempeña también un papel en la generación de γ H2AX inducido por radiación ionizante (171). Por otra parte, las DNAPKcs tienen gran importancia en la reparación de las roturas de doble cadena en la vía de reparación NHEJ (*Nonhomologous End-Joining*).

La proteína **SMG1** (*Suppressor with Morphological effect on Genitalia family member*), también pertenece a la familia de las PIKKs. Esta quinasa se ha visto que fosforila a p53 en serina 15 y a su homóloga ATM. Está implicada en mantener la calidad del ARNm, permitiendo la degradación de los transcritos que tienen codones de terminación prematuros (172,173).

Otras quinasas activadas frente a daño en el ADN son VRK1 y TTK/hMPS1.

La familia de quinasas humanas VRK (*Vaccinia-Related Kinases*) está constituida por tres miembros, dos de ellos catalíticamente activos, VRK1 y VRK2, y un tercero, VRK3 sin actividad quinasa debido a sustituciones en aminoácidos clave dentro del dominio quinasa. **VRK1** es una quinasa principalmente nuclear, que fosforila a p53 en treonina 18, impidiendo la interacción con MDM2 y evitando así su degradación (174). Esta activación de p53 promueve a su vez la degradación de VRK1 (175,176). En condiciones de estrés, dicha activación y posterior degradación se alteran, produciéndose un cambio en el balance p53/VRK1 que promovería la activación mantenida de p53. Aunque la proteína VRK1 se expresa de manera ubicua, se ha comprobado que su nivel de expresión es mayor en líneas celulares tumorales que en líneas celulares no tumorales (177). Se le atribuyen funciones de mantenimiento de la arquitectura nuclear y de control de la proliferación y la progresión del ciclo celular.

Su función en la DDR comienza fosforilando a 53BP1 en serina 25 y 29, sustratos también de ATM, y colocalizando con ella en los focos del daño. Se ha comprobado también que VRK1 es necesaria para una total fosforilación de H2A.X en serina 139 y que de hecho, la falta de esta quinasa produce una DDR incompleta, siendo esencial para la completa activación de ATM y Chk2 de manera indirecta, ya que no son dianas de fosforilación de VRK1 (176).

Otra quinasa implicada en la respuesta al daño en el ADN es hMPS1 (*Human Protein Kinase Monopolar Spindle 1*), también conocida como **TTK** y que participan en los puntos de control de la mitosis, concretamente en la estabilización y activación de p53 por fosforilación en treonina 18, contribuyendo a la estabilidad del genoma (178). Su papel en la DDR ha sido estudiado en fibroblastos, donde tras el daño activa Chk2 mediante la fosforilación en treonina 68. En esta situación, TTK se fosforila en treonina 288 por Chk2 (179) y forma focos de daño con γ H2AX. Además, si los niveles de TTK se reducen, se producen fallos en el bloqueo de la fase G₂/M (179,180). Se ha visto que se sobreexpresa específicamente en cáncer de mama triple negativo y que si disminuyen sus niveles de expresión se potencian fenómenos de apoptosis celular (181).

9.1.2 Amplificación de la señal

Existen mecanismos para retrasar el progreso del ciclo celular ante la presencia del daño de ADN. La vía de señalización general conduce a la fosforilación de diversas proteínas cuyo objetivo es desencadenar la activación de punto de control y la detención del ciclo celular, en G₁/S y/o G₂/M. Estos puntos de control del ciclo celular inducen detenciones transitorias, lo que permite suficiente tiempo para la reparación del ADN (157,158).

Concretamente, una vez que ATM es activada tras DSB, efectúa su actividad quinasa fosforilando a la proteína p53 (serina 15) y a aquellas proteínas que interactúan con p53, MDM2 y Chk2. La inducción de p53 dependiente de ATM permite su estabilización, así como la activación de genes diana implicados tanto en la parada del ciclo celular, reparación del daño y/o apoptosis (155).

La idea más aceptada es que tras la activación de ATR y ATM, éstas fosforilan a sus dianas respectivas: Chk1 en serina 317/345 y Chk2 en treonina 68, por daños en cadena sencilla (SSB) o en la doble hélice respectivamente. Sin embargo, se ha demostrado que ambas quinasas pueden ser fosforiladas tanto por ATM como por ATR (157,162). Mientras que la activación Chk2 se limita en gran parte a DSB, Chk1 es activada por una diversidad de estímulos (UV, tensiones de replicación, agentes que dañan el ADN) a través tanto de ATR como de ATM. En general, la activación de Chk1 es iniciada por roturas del ADN en una sola hebra (ssDNA) (162). Con el fin de controlar la señalización y proceder al bloqueo del ciclo celular, ambas quinasas Chk1 y Chk2 fosforilan diversos sustratos de dichas rutas.

Una vez activadas, Chk1 y Chk2 fosforilan y promueven la degradación o el secuestro de efectores, tales como las fosfatasas Cdc25 A, B y C, que activan las quinasas dependientes de ciclina Cdk1, también llamada Cdc2, y Cdk2, a través de la defosforilación de Tirosina 14 y 15 (162). Cuando Cdc25C se fosforila, aporta un sitio de unión para la proteína 14-3-3, que la secuestra quedando atrapada en el citoplasma donde se producirá su degradación por el proteosoma. De este modo, no puede entrar en el núcleo y defosforilar a Cdc2 y activarla. Cdc2 sigue fosforilada y unida a la ciclina B inhibiendo el paso hacia la mitosis y provocando un bloqueo del ciclo en G₂/M (162). La fosforilación de la fosfatasa Cdc25A es una señal de ubiquitinación, con la consecuente disminución en sus niveles de expresión, mediada por Chk1 o Chk2, y tiene como consecuencia el bloqueo en la fase S del ciclo celular, a través del mantenimiento de la unión entre la ciclina E o A con la Cdk2, que es requerida para la síntesis de ADN (157,162) (Figura 14). Las células que tienen mutaciones en esta ruta (*ATM/CHK2/CDC25A/CDK2*) no tienen la capacidad para inhibir la síntesis de ADN (182).

Del mismo modo, Chk2 puede activar a p53 en condiciones de estrés, como en respuesta a agentes que dañan el ADN, fosforilándola en serina 15. La consecuencia de esta activación es la inducción de la síntesis de p21 por parte de p53, entre otros genes respuesta, cuya función es la inactivación de complejos ciclina B/Cdk1, ciclina A/E Cdk2, y ciclina D1/D2/D3-Cdk4, impidiendo la transición de G₁ a S y de G₂ a M (110).

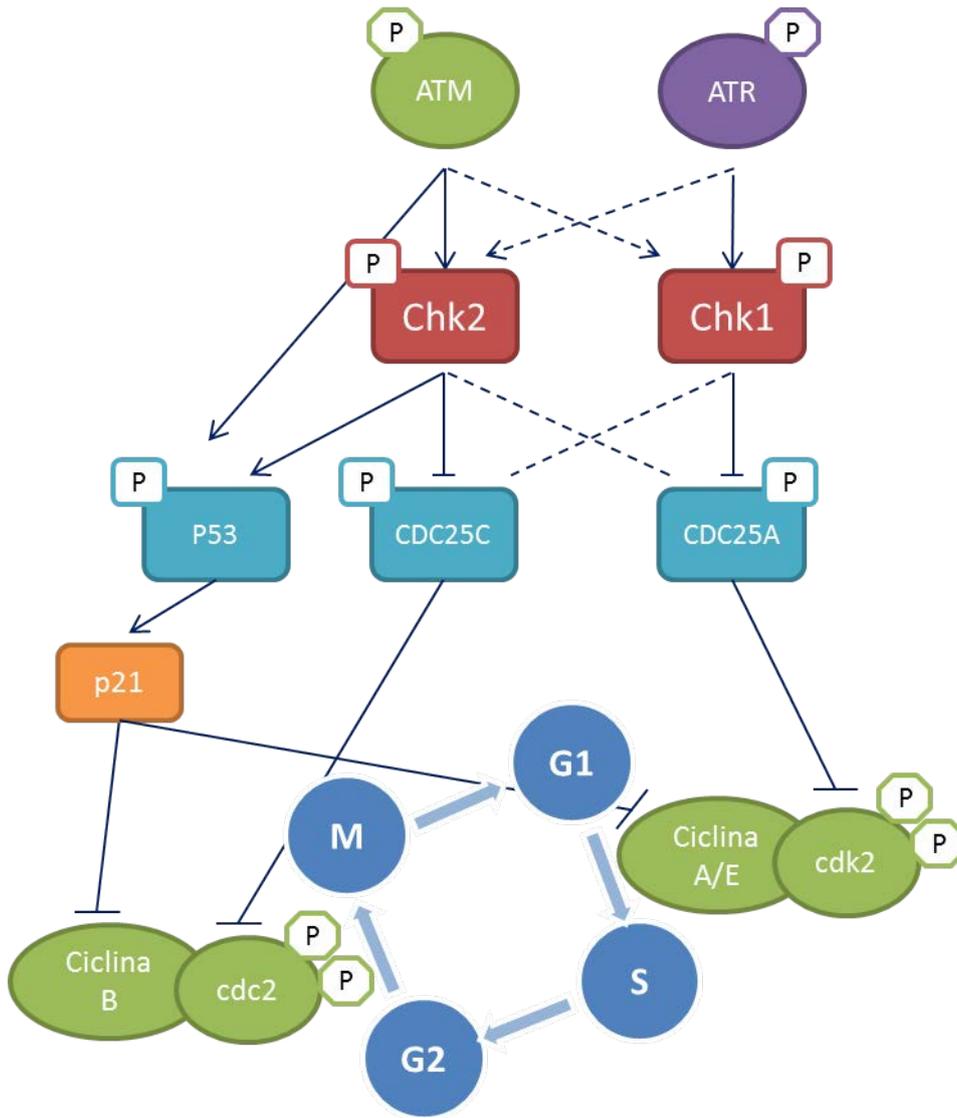


Figura 14. Amplificación de la señalización del daño a través de Chk1 y Chk2

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El cáncer colorrectal (CCR) es uno de los tumores con mayor incidencia y tasa de mortalidad en los países desarrollados. Actualmente los sistemas de clasificación, pronóstico y tratamiento de los pacientes están basados en criterios anatomopatológicos y clínicos, estandarizados para todos los centros hospitalarios. Sin embargo, lamentablemente dichos criterios son incompletos y por tanto se puede producir una evaluación incorrecta del paciente. De este modo, la terapia, aplicada de forma inapropiada, puede provocar que sujetos clasificados en una misma fase evolucionen en la enfermedad o respondan a un tratamiento de manera diferente.

En lo referente al tratamiento quimioterapéutico, la resistencia a fármacos antineoplásicos es un fenómeno común en los pacientes con cáncer, que limita la efectividad de la quimioterapia. A pesar de que muchos tumores responden al inicio del tratamiento, en muchas ocasiones aparece resistencia a la quimioterapia, con mayor predisposición a una futura metástasis (183).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos planteamos la siguiente hipótesis y objetivos concretos para la realización del presente estudio.

HIPÓTESIS

Considerando que pueden existir líneas celulares y cultivos primarios derivados de pacientes resistentes y sensibles a los quimioterápicos utilizados en clínica y que además pueden poseer diferente capacidad migratoria e invasiva, a partir de su estudio se podrán determinar mecanismos moleculares que predispongan o faciliten estas propiedades celulares.

El descubrimiento de dichos mecanismos, podría aplicarse tanto para evitar el desarrollo de resistencia a dichos fármacos, como para identificar nuevos criterios que mejoren la evaluación de los pacientes con CCR. Todo ello, facilitará el diseño de pautas más personalizadas tanto de tratamiento como de protocolo de seguimiento de dichos pacientes.

OBJETIVOS

El objetivo **principal** de esta tesis doctoral es identificar nuevas dianas moleculares implicadas en mecanismos de quimiorresistencia e invasividad, para mejorar el tratamiento de pacientes con cáncer colorrectal y avanzar en la terapia individualizada.

Para ello, se llevan a cabo una serie de **objetivos secundarios**:

- 1) Determinar el grado de sensibilidad de líneas celulares establecidas de cáncer colorrectal y de cultivos primarios derivados de pacientes, frente a los fármacos quimioterapéuticos utilizados en la clínica (5-Fluorouracilo, Capecitabina, Irinotecan y Oxaliplatino) y SN-38, mediante ensayos de proliferación celular.
- 2) Estudiar la capacidad de respuesta frente a daños en la cadena de ADN causados por Oxaliplatino en líneas celulares y cultivos primarios.
- 3) Analizar las mutaciones de los genes *KRAS*, *BRAF* y *PIK3CA* implicados en proliferación y crecimiento celular y de *TP53*, gen implicado en el daño en la cadena de ADN de las líneas celulares y cultivos primarios.
- 4) Realizar un análisis diferencial del proteoma de las líneas celulares sensibles y resistentes a Oxaliplatino.
- 5) Determinar la capacidad de migración e invasividad de las líneas celulares y cultivos primarios.
- 6) Explorar la utilidad clínica de los marcadores moleculares encontrados, empleando muestras provenientes de pacientes con cáncer colorrectal.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER COLORRECTAL

Las líneas celulares de carcinoma colorrectal empleadas para la realización de este trabajo fueron SW620, SW480, HCT 116, LS 174T, HCT-15, Caco-2, DLD-1, HT29, Colo 201, Colo 320 y LoVo. Todas ellas fueron obtenidas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (*American Type Culture Collection, ATCC*, Manassas, VA, EE.UU.). La línea celular tumoral HGUE-C-1 se obtuvo a partir de líquido ascítico de un paciente de 76 años de edad con carcinoma colorrectal y fue establecida por el Dr. Miguel Saceda en la Unidad de Investigación del Hospital General Universitario de Elche (HGUE-C-1).

Estas líneas celulares se mantuvieron en frascos de 25 y 75 cm² (Thermo Scientific, Fisher Scientific, Madrid, España) a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Los medios de cultivo empleados fueron: *Roswell Park Memorial Institute medium* (RPMI 1940) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) para la línea celular DLD-1 y *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (GE Healthcare HyClone™, Europe GmbH, Friburgo, Alemania) para el resto de líneas celulares. Estos medios de cultivo fueron suplementados con L-glutamina (Gibco®, Life Technologies, Grand Island, NY) a una concentración final de 2 mM, 50 U/mL de penicilina (HyClone), 50 µg/ml de estreptomina (HyClone), piruvato sódico (HyClone) a una concentración de 1 mM, tampón HEPES (Thermo Scientific) a una concentración 1 mM y suero bovino fetal (SBF) (Laboratorios PAA GmbH Pasching) en una proporción final del 10%.

2. CULTIVOS PRIMARIOS DE CÁNCER COLORRECTAL

La utilización de los cultivos primarios fue aprobada por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia (HCUVA) el 26 de julio de 2010.

Los cultivos primarios fueron derivados de tumores sólidos de pacientes afectados por CCR, procedentes de cualquier zona afectada del intestino grueso: ciego, colon ascendente, transversal, descendente, sigma o recto.

Para su obtención, se contó con la colaboración de distintos Servicios del HCUVA. El circuito de recogida de muestras comenzó en la consulta de los pacientes, donde se solicitó un consentimiento informado para la utilización de sus muestras para fines científicos. Tras la operación, la pieza quirúrgica extraída se introdujo en el sistema de alto vacío (*Tissue Safe*,

Milestone), donde se monitoriza la temperatura durante su traslado y se conserva a 4°C, para ser enviada al Servicio de Anatomía Patológica. Una vez allí, los técnicos del Biobanco recogieron dos muestras significativas del tumor, una para ser congelada y almacenada y otra para fragmentar, digerir y procesar para obtener posteriormente el cultivo primario (Figura 15). Todas las muestras fueron analizadas por Servicio de Anatomía Patológica y debidamente registradas por el personal del Biobanco. La obtención de muestras para investigación no interfirió en el diagnóstico clínico; ya que el patólogo, tras examinar la muestra, proporcionaba una parte de la muestra que no iba a utilizar. El Dr. Pablo Carbonell, del Centro de Genética Clínica del HCUVA, se encargó del análisis de las alteraciones genéticas de estas muestras.

A partir de la pieza quirúrgica, se llevó a cabo el siguiente procedimiento para la obtención de cultivos primarios. La muestra recogida por el personal del Biobanco se introdujo en un frasco estéril que contenía medio DMEM/Ham's F-12 (Laboratorios PAA GmbH Pasching). Este medio de cultivo fue suplementado con 200 U/mL de penicilina/estreptomicina, 2,5 µg/mL de anfotericina B (Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY), 50 µg/mL de gentamicina (Invitrogen), 20% de SBF, 10 µg/ml *Insulin-5.5* µg/ml, *Transferrin-6.7* ng/ml, *Selenium A* (ITS) (Gibco), hidrocortisona a una concentración de 50 mg/mL (Sigma Aldrich), y *Epidermal Growth Factor* (EGF) a una concentración de 20 mg/mL (Sigma Aldrich). La pieza quirúrgica se colocó sobre una placa Petri y se disgregó en trozos de 1-3 mm³, con ayuda de pinzas y bisturí estériles. Para realizar un lavado previo a la digestión, se recolectó con PBS estéril (del inglés *Phosphate-Buffered Saline*) y se realizó una centrifugación a 200 x g durante 5 minutos. Posteriormente se procedió a la digestión enzimática del precipitado con medio DMEM/Ham's F12, a los que se le añadieron las enzimas digestivas; hialuronidasa a 45 U/mL (Calbiochem), colagenasa a 3 mg/mL (Sigma Aldrich), pronasa a 10 mg/mL (Sigma Aldrich) y dispasa a 10 mg/mL (Gibco). La digestión se realizó durante una hora a 37°C en agitación suave. A continuación la muestra se hizo pasar por un filtro de 70 µm y se realizó una nueva centrifugación a 800 x g durante 5 minutos descartando el sobrenadante. Las células precipitadas se resuspendieron en 3 mL de un tampón de lisis óptima de glóbulos rojos, denominado tampón RL (*RBC Lysis solution*, Geneall Biotechnology) y 1 mL de PBS estéril durante 10 minutos, tras los que se centrifugó de nuevo y se lavó con PBS estéril volviendo a centrifugar. Este sobrenadante final se sembró en frascos de 25 cm² (VWR International) en medio de cultivo DMEM/Ham's F12 que se mantuvieron a 37°C y 5% de CO₂.

Cuando la confluencia celular alcanzó el 80-90%, se procedió a despegar las células con tripsina (Hyclone), tras lo cual fueron cultivadas en medio condicionado y en medio de cultivo

correspondiente al 50%. Este medio condicionado se obtuvo recogiendo el medio de cultivo DMEM empleado en las líneas celulares establecidas, que se filtró convenientemente para eliminar la posible presencia de células y se suplementó con 10 $\mu\text{g/ml}$ *Insulin*-5.5 $\mu\text{g/ml}$ *Transferrin*-6.7 ng/ml *Selenium A* (ITS) (Gibco), hidrocortisona a una concentración de 50 mg/mL, EGF a una concentración 20 mg/ μL y SBF en una proporción final del 20%.

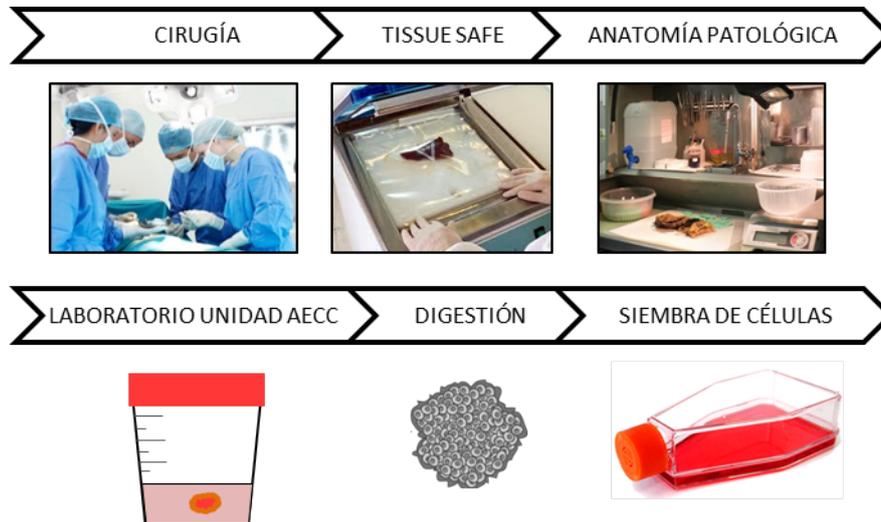


Figura 15. Procedimiento para la recogida y procesamiento de las muestras de cáncer colorrectal. Tras la consulta y firma del consentimiento informado, se somete al paciente a la cirugía correspondiente, la muestra extraída se introduce en el *Tissue Safe* para preservarla intacta. El anatomopatólogo se encarga de cortar la pieza que es entregada al laboratorio para su posterior digestión y siembra.

3. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR DEPENDIENTE DE ANCLAJE

Este ensayo se fundamenta en el crecimiento de las células en una superficie a la que se adhieren, son tratadas o no con determinados fármacos, para posteriormente analizar el número de células en cada condición por diversos ensayos colorimétricos. Se utilizó el colorante cristal violeta (Sigma Aldrich), el cual posee la capacidad de fijarse exclusivamente a las células vivas, en concreto a los núcleos celulares, de manera que se establece una relación directa entre el número de células viables y la cantidad de cristal violeta fijado (184).

Para la realización de este ensayo y experimentos posteriores se utilizaron varios quimioterápicos: Oxaliplatino (OXA), 5-Fluorouracilo (5-FU), Capecitabina, Irinotecan (IRI) y SN-38, todos ellos suministrados por la compañía Sigma Aldrich.

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo plano a diferentes densidades celulares, dependiendo de la línea celular escogida. Transcurridas 24 horas, las

células fueron tratadas con dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich), vehículo utilizado como condición control y con concentraciones crecientes de fármaco (cada concentración por sextuplicado) y se dejaron crecer durante 72 horas.

Transcurridas 72 horas, se eliminó el medio de cultivo, se lavaron los pocillos con PBS y se añadieron 100 μ L del reactivo cristal violeta preparado utilizando una solución de formaldehído al 37,5% (Sigma Aldrich) en agua destilada y 0.05% de cristal violeta (Sigma Aldrich). Las placas fueron incubadas con esta solución en oscuridad durante 30 minutos. A continuación se lavó tres veces con agua destilada y se dejó secar para posteriormente añadir 100 μ L de ácido clorhídrico 0,1 N para disolver la tinción y se leyó la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro (Infinite[®] M200PRO NanoQuant, Tecan Group, Suiza).

La inhibición de la proliferación celular producida por los fármacos se calculó considerando el 100% de la absorbancia control en ausencia de dicho compuesto. Los datos que se muestran consisten en al menos tres experimentos independientes +/- el error estándar de la media (EEM).

4. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR INDEPENDIENTE DE ANCLAJE

Los ensayos de proliferación celular independiente de anclaje se utilizan con el objetivo de comprobar el efecto de los fármacos en la transformación, la capacidad de las células de crecer sin adherirse a ningún sustrato, formando por tanto, colonias que derivan de una sola célula.

Para realizar este experimento se utilizaron placas de 6 pocillos en las cuales se vertieron dos capas de agar blando de diferentes concentraciones. En primer lugar se realizó una mezcla que contenía 25% de *Bacto Agar* (Becton Dickinson), 25% de medio DMEM 2X y 50% de medio DMEM suplementado con 20% de SBF. Esta mezcla se mantuvo a 42°C para evitar su solidificación. Para formar la capa inferior, en contacto con la placa, se vertió 1 mL de esta mezcla en los pocillos y se mantuvo a temperatura ambiente dentro de la cabina de flujo hasta su completa solidificación. Para formar la capa superior de cada pocillo se mezclaron 0,48 mL de la mezcla de agar con 0,32 mL de medio de cultivo DMEM/RPMI 1940, en los que había resuspendidas 10.000 células y fármaco a la concentración adecuada. La mezcla fue vertida sobre la capa inferior de agar solidificada (Figura 16). Esta capa superior se dejó enfriar, y una vez solidificada, se colocó en el incubador a 37°C y se dejaron crecer las células. Cada 3 días se añadió medio de cultivo fresco con la concentración de fármaco correspondiente, para

evitar la deshidratación del agar. Tras 14 días de incubación, y para teñir las colonias celulares, se añadió a cada pocillo 1 mL de Iodonitrotetrazolio (INTZ) (Serva) a una concentración 0,5 mg/mL, que se dejó actuar durante toda la noche en el incubador a 37°C. Al día siguiente mediante un escáner de luz visible (*Image Scanner III*, GE Healthcare), se obtuvo la imagen de cada uno de los pocillos y se contaron las colonias superiores a 25 μm^2 con el programa informático *Image Quant TL* (GE Healthcare). Cada experimento se realizó por triplicado y un mínimo de tres ocasiones.



Figura 16. Representación del ensayo de proliferación celular independiente de anclaje. La capa inferior formada exclusivamente por la mezcla de agar y la superior a la que se le añaden las células y el quimioterápico correspondiente.

5. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE PROTEÍNAS

Para obtener los extractos de proteína total, las células se sembraron en placas Petri de 60 o 100 cm de diámetro. Tras 24 horas, las células se trataron con DMSO o con los distintos fármacos a 24, 48 o 72 horas y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂. Pasado este tiempo de incubación, las células se lavaron con PBS frío, se mantuvieron en hielo y se despegaron de las placas mediante un raspador para ser recolectadas y posteriormente centrifugadas. Para eliminar los posibles restos de medio de cultivo, el pellet celular fue de nuevo lavado y centrifugado con PBS frío. El pellet resultante se resuspendió en tampón de lisis, entre 70-120 μL según el tamaño de pellet, siendo la composición del tampón: 1% NP-40, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaF, 30 mM Na₄P₂O₇, 1 mM Na₃VO₄ y 50 mM Tris-HCl a un pH 7,4. Además, al tampón de lisis se le añadieron 10 μL de un cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma Aldrich) por cada mililitro de tampón. Las muestras se incubaron con el tampón de lisis en hielo durante 30 minutos y posteriormente fueron centrifugadas a 16.000 x g en una microcentrífuga durante 15 minutos a 4°C para precipitar el material no solubilizado (restos de membrana, etc.). El sobrenadante constituyó el extracto de proteína total y fue congelado a -20°C para su posterior uso.

6. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS: Método de Bradford

La concentración de proteínas se determinó utilizando el método colorimétrico de Bradford, basado en el cambio de color del colorante *Coomassie brilliant blue* G-250 en respuesta a diferentes concentraciones de proteínas (185).

Este colorante puede presentarse en dos formas de diferente color: rojo y azul, dependiendo del pH de la solución. En una solución ácida, se encuentra en la forma catiónica, de color rojo, y en una solución neutra y alcalina, aparece de color azul, su forma aniónica. La unión del colorante con las proteínas provoca un cambio en el máximo de absorción del colorante desde 465 a 595 nm. Experimentalmente se mide la absorbancia a 595 nm.

Para la cuantificación de la cantidad de proteína total en las muestras, se realizó una recta de calibración utilizando como proteína patrón albúmina de suero bovino (BSA de sus siglas en inglés *Bovine Serum Albumin*) (Sigma Aldrich). A cada pocillo se añadieron 10 µL tanto de los extractos celulares (diluidos 1:50 en agua MilliQ) como de la recta patrón, y posteriormente 200 µL del reactivo Bradford (*Bio Rad Protein Assay*, a una dilución 1:5 en agua MilliQ). Pasados 5 minutos se midió la absorbancia a 595 nm de cada muestra en un lector de placas (Infinite® M200PRO NanoQuant). La concentración de las muestras se determinó interpolando su valor de absorbancia en la curva de calibración para obtener sus concentraciones.

7. WESTERN BLOT

Para la realización de los Western Blot se utilizó el sistema Mini Trans-Blot® (Bio-Rad Laboratories). El procedimiento llevado a cabo consta de varios pasos que se detallan a continuación.

7.1 PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Tras determinar la concentración de proteínas de cada extracto celular mediante el método de Bradford, se procedió a su preparación para posterior separación por electroforesis.

De cada extracto proteico, en función de su concentración, se tomó el volumen correspondiente a los microgramos de proteína deseados (normalmente 80 µg) y se le añadió tampón de carga para alcanzar la concentración necesaria de sus componentes (312,5 mM Tris

pH 6.8, 10% de SDS, 50% de glicerol, 0,5% p/v de azul de bromofenol y 5% de β -Mercaptoetanol) y tampón de lisis para igualar los volúmenes finales de todas las muestras. El detergente dodecil sulfato de sodio (SDS) contenido en el tampón es un detergente iónico que desnaturaliza a la proteína en su estructura primaria y la recubre de cargas negativas (Figura 17). El azul de bromofenol funciona como colorante aniónico, y el β -mercaptoetanol es un agente reductor utilizado para romper los puentes disulfuro. Tras realizar la mezcla, las muestras fueron incubadas durante 5 minutos a 95°C en agitación suave para la completa desnaturalización de las proteínas. Finalmente se realizó una rápida centrifugación para conseguir la mezcla total de los componentes.

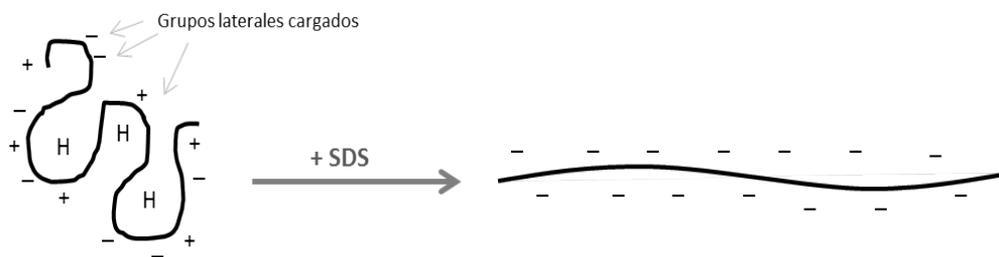


Figura 17. Desnaturalización de proteínas mediante SDS. Previa desnaturalización de la proteína, muestra cargas positivas y negativas debido a sus grupos laterales cargados. Las letras “H” representan dominios hidrofóbicos debidos a grupos laterales R no polares de la proteína que se han agrupado en el interior para evitar el ambiente polar proporcionado por el agua que rodea a la proteína. Al añadir SDS, se distorsionan las regiones hidrofóbicas y éste cubre la proteína con cargas negativas (la gran cantidad de cargas negativas del SDS superan a las cargas positivas de la proteína). Como resultado la proteína es desnaturalizada y se lineariza.

7.2 PREPARACIÓN DE LOS GELES DE POLIACRILAMIDA

La poliacrilamida es un polímero formado por monómeros de acrilamida que se unen formando un polímero lineal. Al incluir bisacrilamida, ésta da lugar a puntos de ramificación en el polímero, lo que permite formar una matriz tridimensional, dando lugar al gel de poliacrilamida.

El gel donde se depositan las muestras está formado por dos tipos de geles, un gel concentrador en la parte superior, con un 4,5% de poliacrilamida, y un gel separador en la parte inferior donde el porcentaje de poliacrilamida es variable. Éste se escoge en cada caso en función del peso molecular de las proteínas que se quieran detectar. Las funciones de cada porción del gel son diferentes. Así, el gel concentrador sirve de soporte para cargar las muestras y concentrar las proteínas de la muestra al inicio del gel separador, para que las

proteínas entren en él al mismo tiempo. Por otra parte, en el gel separador se desarrolla la separación de las proteínas propiamente dicha.

Los geles empleados están compuestos de 10 calles y tienen 1,5 mm de grosor. Los componentes de ambos geles (separador y concentrador) son los siguientes: H₂O milliQ, Tris-HCl pH 8,8, Tris-HCl pH 6,8, SDS al 10%, poliacrilamida (Protogel[®] 30%, National Diagnostics, Atlanta, EEUU), persulfato de amonio a una concentración 1 mg/10 µL (PSA) (Sigma Aldrich) y N,N,N',N-tetrametiletileno diamina (TEMED) (Sigma Aldrich), en las concentraciones mostradas en la Tabla 6.

COMPONENTES	Gel concentrador	Gel separador
Agua MilliQ	50%	Variable
Poliacrilamida	4,5 %	Variable (6-12%)
Tris-HCl pH 8,8	-	255 mM
Tris-HCl pH 6,8	123 mM	-
SDS	1 %	1 %
PSA	0,07 %	0,07 %
TEMED	0,07 %	0,07 %

Tabla 6. Componentes de los geles de electroforesis y concentraciones de los mismos

7.3 ELECTROFORESIS

Las muestras proteicas fueron separadas en condiciones desnaturalizantes por SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-PoliAcrylamide Gel Electrophoresis*) de acuerdo con Laemmli y colaboradores (186). La técnica SDS-PAGE está basada en la utilización de geles de poliacrilamida con SDS para conferir carga negativa a las proteínas, de manera que éstas son separadas únicamente en función de su peso molecular, siendo las más pequeñas las que migran más rápidamente. Para llevar a cabo la electroforesis, las muestras fueron colocadas en los pocillos del gel concentrador, tras ser sumergido en tampón de electroforesis (Tris 20 mM pH 8,3, glicina 0,2 M, SDS 0,1% (p/v) y se aplicó un voltaje de 80 V durante 10-20 minutos y posteriormente 150 V durante 50 minutos (Figura 18), con el objetivo de que las proteínas migraran hacia el polo positivo.

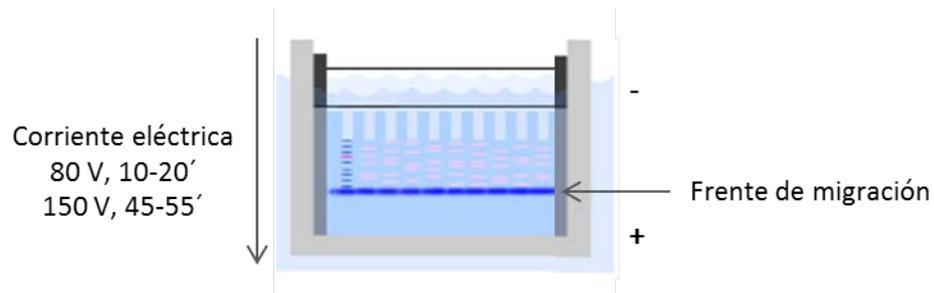


Figura 18. Electroforesis en gel de poliacrilamida. Las proteínas migran hacia el polo positivo al aplicar un campo eléctrico, a un voltaje determinado.

7.4 TRANSFERENCIA

Para poder visualizar la proteína de interés, las proteínas se transfieren desde el gel de poliacrilamida a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) (Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) mediante la aplicación de voltaje. Previa preparación del sándwich de transferencia, el gel fue incubado durante 10 minutos en el tampón de transferencia (25 mM base Tris-HCl pH 8,6, 192 mM Glicina, 20% de metanol). Además, la membrana fue sometida a un pretratamiento con metanol durante un minuto, tras el cual se retiró el exceso de metanol y se sumergió en el tampón de transferencia.

El sándwich de transferencia está compuesto por el gel de poliacrilamida, una membrana de PVDF, dos almohadillas, dos papeles absorbentes (Whatman®) y el respectivo soporte, tal y como se indica en la Figura 19. La cubeta se conectó a una fuente de alimentación. La membrana tiene carga positiva y por tanto, al aplicar voltaje, las proteínas, cargadas negativamente, migran hacia ella y quedan inmovilizadas. La transferencia se realizó a 4°C durante 2 horas a 110 V.

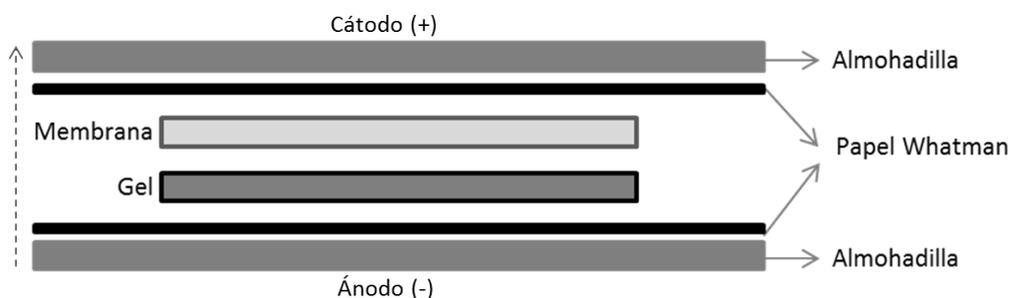


Figura 19. Sándwich de transferencia. Para la transferencia de las proteínas desde el gel de poliacrilamida a la membrana de PVDF se formó un sándwich compuesto por el gel, la membrana de PVDF, dos almohadillas, y dos papeles absorbentes. Las proteínas, con carga negativa, migran hacia el polo positivo bajo el efecto de un campo eléctrico determinado.

7.5 BLOQUEO

Para evitar que el anticuerpo se uniera a sitios inespecíficos de las membranas, estas membranas fueron incubadas con leche desnatada en polvo o con BSA al 5% reconstituida en tampón PBS-Tween al 0,05% (Sigma Aldrich), durante una hora a temperatura ambiente y en agitación suave. Durante el bloqueo, las proteínas de la leche o el BSA se unen inespecíficamente a todas las porciones de la membrana que no hayan absorbido proteínas.

7.6 INCUBACIÓN CON ANTICUERPOS

Una vez bloqueadas, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario de interés en un agitador a 4°C durante toda la noche. Los anticuerpos primarios fueron preparados a la concentración adecuada en tampón PBS-Tween, leche desnatada o BSA al 2% y azida sódica al 0,2%. Tras 16 horas, la membrana fue lavada tres veces durante 10 minutos con tampón PBS-Tween e incubada con los anticuerpos secundarios correspondientes durante una hora en agitación y a temperatura ambiente. Se utilizaron dos tipos de anticuerpos secundarios: anti-conejo o anti-ratón (GE Healthcare), los cuales se encuentran conjugados a la enzima peroxidasa de rábano. Estos anticuerpos secundarios fueron preparados en tampón PBS-Tween y 1% de leche desnatada en polvo o BSA a una dilución final 1:5.000. Tras esta incubación, la membrana fue lavada tres veces con tampón PBS-Tween durante 10 minutos. Los dos primeros lavados se realizaron con tampón PBS-Tween, y el último, con PBS sin Tween.

En la Tabla 7 se exponen todos los anticuerpos utilizados durante el transcurso de este trabajo.

Proteína	Compañía	Referencia	Epitopo
β-Actina	Sigma Aldrich	A2066	Residuos extremo C-terminal
Fosfo-Anexina A2	Santa Cruz Biotechnologies	sc-135752	Tirosina 24 fosforilada
Anexina A2	Abcam	Ab54771	Residuos 1-340 de ANXA2
Fosfo-ATM	Cell Signaling Technology®	#5883	Serina 1981 fosforilada
ATM	Pierce	MA5-14871	ATM recombinante
Fosfo-ATR	Cell Signaling Technology®	#2853	Serina 428 fosforilada
ATR	Pierce	PA5-17265	Residuos centrales de ATR
Cdc25A	Santa Cruz Biotechnologies	sc-97	Residuos extremo C-terminal
Cdc25B	Santa Cruz Biotechnologies	sc-326	Residuos extremo C-terminal
Cdc25C	Santa Cruz Biotechnologies	sc-13138	Residuos 1-150 de Cdc25C
Fosfo-chk1	Cell Signaling Technology®	#2348	Serina 345 fosforilada
Chk1	Santa Cruz Biotechnologies	sc-8408	Residuos 1-476 de chk1
Fosfo-chk2	Cell Signaling Technology®	#2661	Treonina 68 fosforilada
Chk2	Pierce	MA-515416	Residuos 481-531 de chk2
Chk2	Santa Cruz Biotechnologies	sc-9064	Residuos 1-300 de chk2
Fosfo-DNAPKcs	Cell Signaling Technology®	#4215	Serina 2056 fosforilada
Fosfo-DNAPKcs	Biolegend	612902	Treonina 2609 fosforilada
DNAPKcs	Biolegend	612702	DNAPK recombinante parcial
Hsp-90	Santa Cruz Biotechnology®	sc-13119	Residuos 610-723 de Hsp-90β
Ku86/XRCC5	Santa Cruz Biotechnology®	sc-5280	Residuos 433-732 de Ku86
MRE11	Pierce	MA5-15081	Residuos alrededor de Lys 496
fosfo-mTOR	Cell Signaling Technology®	#2974	Serina 2481 fosforilada
mTOR	Cell Signaling Technology®	#2972	Residuos alrededor serina 2481
NBS1	Pierce	PA5-22975	Residuos 700-C-terminal
Rad50	Pierce	PA5-17373	Residuos extremo N-terminal
Rad51	Abcam	Ab1837	Residuos extremo C-terminal
P21	Santa Cruz Biotechnology®	sc-397	Residuos extremo C-terminal
PARP-1	Cell Signaling Technology®	#9542	Extremo C-terminal de PARP-1
SMG1	Abcam	Ab30916	Residuos 3600- C-terminal
TTK/Mps1	Santa Cruz Biotechnology®	sc-540	Residuos extremo C-terminal
VRK1	Sigma Aldrich	HPA000660	Residuos extremo N-terminal

Tabla 7. Proteínas detectadas por Western Blot. En esta tabla aparecen las proteínas que fueron detectadas en este trabajo y sus anticuerpos correspondientes con la referencia y casa comercial.

7.7 DETECCIÓN

Para la detección de las proteínas se empleó el sistema *Enhanced ChemiLuminescence* (ECL) (GE Healthcare). Este sistema se basa en la reacción que desarrolla la enzima peroxidasa de rábano unida al anticuerpo secundario. Dicha enzima cataliza la oxidación del sustrato luminol en presencia de peróxido de hidrógeno produciéndose un producto de reacción quimioluminiscente. (Figura 20). Las membranas se incubaron durante 5 minutos con este sistema y la imagen con las proteínas marcadas por el anticuerpo fue capturada mediante el escáner de fluorescencia Typhoon 9410 (GE Healthcare).

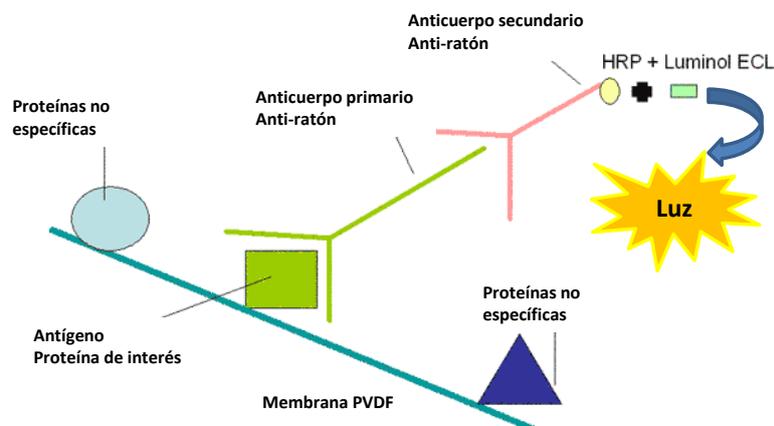


Figura 20. Reacción quimioluminiscente. En la figura se observa la reacción quimioluminiscente catalizada por la enzima peroxidasa de rábano (*Horseradish Peroxidase*, HRP) que se encuentra conjugada al anticuerpo secundario.

7.8 ELIMINACIÓN DE ANTICUERPOS DE LAS MEMBRANAS DE PVDF

Si se desea conocer la expresión de una proteína del mismo peso molecular que las ya analizadas, es necesario eliminar los anticuerpos primarios y secundarios de la membrana tras el revelado de dichas proteínas de interés. Las membranas previamente incubadas en una solución de acetonitrilo durante 10 minutos, se lavaron tres veces durante 10 minutos con PBS-Tween e incubada posteriormente en un tampón reductor (100 mM β -mercaptoetanol, 2% de SDS y 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,7), durante 40 minutos en una estufa de 56°C, para poder romper la unión de los anticuerpos con sus antígenos. Después de este proceso, la membrana fue lavada tres veces durante 10 minutos con PBS-Tween y bloqueada de nuevo con la solución de leche desnatada o BSA al 5% durante una hora. De ese modo la membrana ya pudo ser incubada de nuevo con los anticuerpos deseados.

7.9 DENSITOMETRÍA

Con la finalidad de cuantificar la señal de las bandas presentes en las imágenes obtenidas se empleó el programa informático *Quant TL*. A través de las distintas herramientas de dicho programa informático se detectaron las bandas en la imagen y se obtuvo un valor de su volumen, en función de su área y de la intensidad de la señal medida.

En los experimentos donde se comparan muestras sometidas a distintos tratamientos, se normalizaron los valores de las distintas muestras con los de una proteína que se empleó como control de carga. Los controles de carga son proteínas altamente conservadas y presentes en cantidades similares, independientemente del tipo celular o tratamiento de la muestra. En este trabajo se utilizaron como controles de carga la proteína HSP90 (*Heat Shock Protein 90*) y la proteína β -actina.

En el caso de los experimentos donde se investiga el efecto de OXA sobre los niveles de fosforilación de una determinada proteína, o la cantidad de proteína fosforilada en condiciones basales, se determinó un valor de densitometría para la banda correspondiente a la forma fosforilada de la proteína (valor x) y otro valor para la banda correspondiente a la proteína total (valor y), tanto para la condición control como para la condición tratada con OXA. Los valores obtenidos de las formas fosforiladas fueron normalizados con los valores obtenidos de las formas totales (cociente x/y). Estos valores normalizados fueron expresados de forma porcentual, asignando el 100% de fosforilación a la condición control en cada caso.

8. ESTUDIO DE LAS FASES DEL CICLO CELULAR

El análisis del contenido de ADN en las distintas fases del ciclo celular de las líneas celulares y cultivos primarios se llevó a cabo mediante experimentos de citometría de flujo. La suspensión celular de la que se partió, fue teñida con un colorante fluorescente que se une al ADN, en este caso el yoduro de propidio (IP) (Sigma Aldrich), cuya longitud de onda de excitación es de 535 nm y de emisión máxima 617 nm. Las células emiten una mayor o menor fluorescencia en función de su contenido de ADN y la cantidad de colorante unido es proporcional a la cantidad de ADN. Por tanto, las células emitirán una cantidad de luz fluorescente proporcional a su contenido de ADN. Así, las células que se encuentran en la fase G_2/M que ya han sintetizado y duplicado su material genético, emitirán el doble de señal de fluorescencia respecto a las células en la fase G_1 del ciclo celular. Por otra parte, las células en fase S darán una señal de fluorescencia intermedia entre G_1 y G_2/M . Además, mediante esta

técnica se puede detectar la aparición de células muertas provocada por el fármaco quimioterapéutico. Cuando una célula muere, su ADN se fragmenta y por tanto estas células emiten una fluorescencia menor que las células vivas, que conservan el ADN intacto. A esta fase del ciclo se la denomina SubG₁ y queda representada por un pico de menor intensidad de fluorescencia (Figura 21).

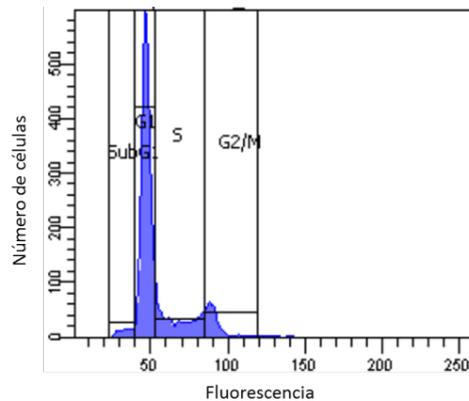


Figura 21. Perfiles de ciclo celular obtenidos mediante citometría de flujo por marcaje del ADN con yoduro de propidio. De izquierda a derecha aparecen las diferentes fases del ciclo celular: SubG₁, G₁, S y G₂/M.

Para la realización de estos experimentos las células se sembraron en frascos de 25 cm² y a las 24 horas fueron tratadas con DMSO como vehículo o con el quimioterápico correspondiente a la concentración escogida. Transcurridas 24, 48 y 72 horas, las células se tripsinizaron y lavaron con PBS para posteriormente ser fijadas con etanol al 75% y mantenidas durante al menos 2 horas a -20°C. Las células se lavaron con PBS y se resuspendieron en 500 µL de PBS suplementado con Ribonucleasa A (ARNasa A, SERVA) a una concentración de 25 µg/mL utilizada para degradar el ARN. Además, se adicionó yoduro de propidio a una concentración final de $25 \cdot 10^{-3}$ µg/mL. La suspensión celular se mantuvo durante 15-30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente, el contenido de ADN de las células marcadas fue analizado mediante un citómetro de flujo, FacsCanto™ (Becton Dickinson).

9. ESTUDIO DE LOS NIVELES DE FOSFORILACIÓN DE LA HISTONA H2A.X

Los niveles de fosforilación de H2A.X se determinaron mediante su marcaje con el anticuerpo específico y su posterior análisis mediante citometría de flujo.

Tras el tratamiento de las líneas celulares con los fármacos quimioterapéuticos durante 24, 48 y 72 horas, se procedió a la fijación con etanol al 75%, posterior lavado y

centrifugado de las células. Para cada línea celular se utilizaron dos tubos controles, un tubo sin teñir para medir la autofluorescencia celular y otro como control interno, teñido con 5 μ L del isotipo (Alexa Fluor® 488 Mouse IgG2b, κ Isotype ctrl, Biolegend) para determinar uniones inespecíficas. Para teñir las células de las condiciones control y tratamiento, se utilizaron 5 μ L de anticuerpo anti-fosfo histona H2A.X (Biolegend) por cada millón de células en 1 mL de una solución que contenía PBS y 1% de BSA, a temperatura ambiente y en oscuridad durante 2 horas. Ambos anticuerpos, isotipo y anti-fosfo histona H2A.X se encuentran conjugados a un fluorocromo (Alexa Fluor® 488) que se excita a 488 nm. Posteriormente la cantidad de γ H2AX fue determinada por citometría de flujo.

Cada experimento se realizó al menos tres veces con cada condición y línea celular.

10. INMUNOPRECIPITACIÓN

La técnica de inmunoprecipitación se emplea para aislar y concentrar una proteína particular de una mezcla proteica compleja. En este trabajo, se empleó esta técnica con el fin de conocer la unión de la proteína aislada a otras proteínas; es decir, se realizó un procedimiento de CO-INMUNOPRECIPITACIÓN. Es considerado el mejor ensayo para detectar las interacciones proteína-proteína y estas uniones son posteriormente detectadas mediante Western Blot.

Para la realización del ensayo de inmunoprecipitación, se empleó un anticuerpo específico para la proteína de interés y este conjunto antígeno-anticuerpo se precipitó selectivamente añadiendo proteína G unida a bolas de resinas como la agarosa (Thermo Scientific). La proteína G son proteínas de origen bacteriano que se unen a las porciones Fc (porciones constantes) de las inmunoglobulinas de tipo G (IgG) y, por lo tanto, se unen a los anticuerpos empleados en la inmunoprecipitación (187). Al estar estas proteínas conjugadas a bolas de resina, se precipitan selectivamente, lo que permite separar a la proteína de interés del resto de proteínas presentes en el extracto mediante sucesivos ciclos de lavados y centrifugaciones (Figura 22).

En este estudio se han inmunoprecipitado las proteínas **Chk1** y **Chk2**. La inmunoprecipitación se realizó con el propósito de determinar qué proteínas estaban unidas a ellas en condiciones control y tras el tratamiento con 10 μ M de OXA durante 24 horas.

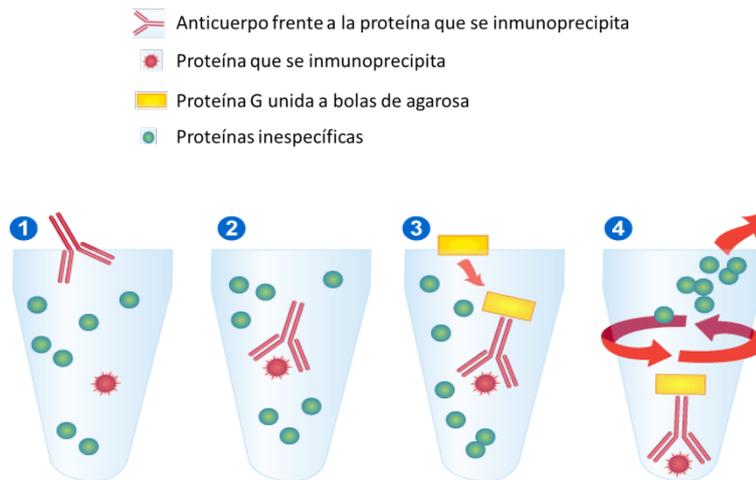


Figura 22. Esquema de la inmunoprecipitación de proteínas. Tras añadir el anticuerpo (1), éste se une a su proteína de interés (2), la proteína G hace insoluble el inmunocomplejo (3) que se lava (4) para su posterior análisis por Western Blot.

Los pasos específicos de este protocolo fueron los siguientes:

En primer lugar, la proteína G se lavó tres veces con 1 mL de PBS y se incubó toda la noche con PBS-0,1% BSA a 4°C en un agitador rotacional, con el fin de bloquear los sitios inespecíficos. Tras esta incubación se lavó de nuevo tres veces con 1 mL de PBS. Para obtener una concentración al 50% de peso/volumen, se añadió la misma cantidad de PBS que proteína G había en el tubo de 1,5 mL. Tras este procedimiento, la proteína G está lista para emplearse posteriormente.

Para la formación del inmunoprecipitado, es decir, la unión del anticuerpo a su antígeno (proteína que se inmunoprecipita) se utilizaron las siguientes cantidades:

- Muestra control y tratada: 500 mg de proteína (extracto control o tratado con OXA 10 μ M durante 24H) + 500 μ g de anticuerpo.
- Muestra control negativo: 500 μ g de proteína (extracto control) + 2 μ g de anticuerpo inespecífico contra ratón o contra conejo, según el anticuerpo utilizado en la inmunoprecipitación.

Estas mezclas se incubaron durante toda la noche en un agitador rotacional a 4°C.

Transcurrido este tiempo, se procedió a mezclar 30 μ L de Proteína G unida a las bolas de agarosa (50% peso/volumen) con el conjunto antígeno-anticuerpo formado. Este paso se realizó también en un agitador rotacional, durante una hora a 4°C.

Para eliminar el resto de proteínas que no fueron inmunoprecipitadas, se lavó y centrifugó el inmunoprecipitado tres veces con 500 μ L de PBS. Tras el primer lavado, el sobrenadante se guardó y se utilizó como control para comprobar si el protocolo había funcionado correctamente (*output*). Los inmunoprecipitados ya lavados se incubaron durante 5 minutos con 30 μ L de tampón de carga de electroforesis al 1% a 95°C para romper las uniones entre el anticuerpo y el antígeno y desnaturalizar las proteínas. Finalmente, se procedió a la detección de las proteínas en cada Western Blot, utilizando el mismo procedimiento descrito anteriormente en este trabajo. Además de las muestras inmunoprecipitadas, se analizó por Western Blot un extracto proteico sin inmunoprecipitar, así como el sobrenadante guardado tras la primera centrifugación.

11. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DE P53 EN LÍNEAS CELULARES

Para analizar la actividad de esta proteína en nuestras líneas celulares establecidas y en los cultivos primarios derivados de pacientes con CCR, con y sin tratamiento con OXA, se procedió a su transfección, es decir, a la introducción de material genético, mediante la utilización de los siguientes vectores.

11.1 VECTORES

Se emplearon los vectores representados en la Figura 23.

En primer lugar, un vector que contiene una secuencia de acción en CIS de unión al ADN, denominada elemento potenciador, que en nuestro caso es el **elemento de respuesta a p53**. Esta secuencia específica de unión al ADN se localiza en la dirección 5' de un **promotor** (caja TATA, P_{T_A}), el cual proporciona una mayor inducción del gen marcador con bajo nivel de ruido.

Bajo el control de este promotor se incluye un **gen marcador** que codifica el gen de la luciferasa de luciérnaga (*Firefly Luciferase*). Este gen se utiliza para identificar si la proteína de interés ha sido expresada por las células. Así, tras la unión de los factores de transcripción al elemento de respuesta de p53, se induce la transcripción y este gen marcador es activado emitiendo una cantidad de luz proporcional a la actividad de la proteína p53.

Es importante el uso de un control negativo para determinar señales de ruido asociadas al medio de cultivo o a la actividad del marcador. Como **control negativo**, se utiliza

un vector (P_{TA}-Luc) que posee un promotor y un marcador (no inducible) pero no incluye elemento de respuesta.

Además de todos ellos, es necesario incluir un **control interno** de la transfección, para normalizar la expresión del marcador, el cual distinguirá las diferencias entre la inducción de la transcripción y la variabilidad de la eficiencia de la transcripción. Este control interno es la Luciferasa de Renilla (*Renilla Luciferase*) ligada a un promotor que controla el gen de Renilla, concretamente el *Simian Virus-40* (SV40).

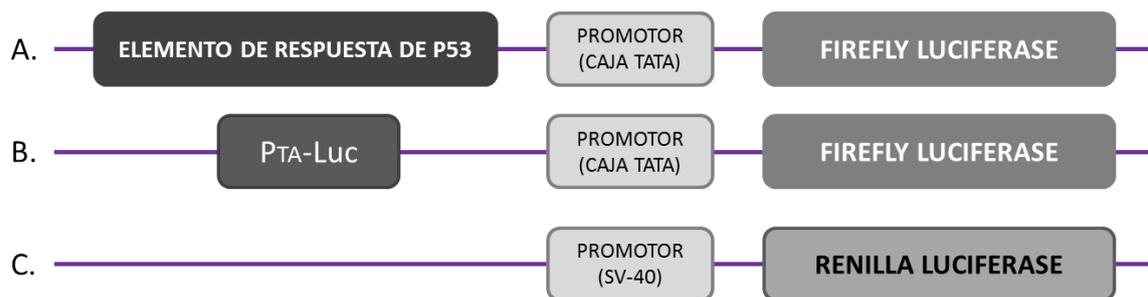


Figura 23. Vectores empleados en el ensayo de la medida de actividad de p53. La construcción A representa el control positivo que contiene el elemento de respuesta transcripcional, el promotor TATA y el marcador. El vector B constituye el control negativo de transfección. El control interno, C, contiene el vector que codifica la luciferasa de Renilla.

11.2 TRANFECCIÓN POR LIPOSOMAS CATIÓNICOS

Para poder llevar a cabo la incorporación de los diferentes vectores anteriormente descritos, se utilizó *Lipofectamine*TM 2000 (Invitrogen).

En primer lugar se procedió a la siembra de las células en placas de 24 pocillos. Se sembraron 2×10^5 células por pocillo en un volumen final de 500 μ L del medio correspondiente DMEM/RPMI 1940. Para ello, se contaron las células despegadas con tripsina con ayuda de una cámara de *Neubauer*. Para cada línea celular se emplearon cuatro condiciones: 2 pocillos sin transfectar, 2 pocillos que funcionan de control negativo, 2 pocillos de condición control y 2 pocillos que fueron tratados con OXA 10 μ M durante 24 horas.

Pasadas 24 horas después de la siembra, cuando se alcanzó una confluencia del 50-60%, se procedió a la transfección de las células. Para ello se prepararon tres tubos, correspondientes a tres condiciones por línea celular, los cuales contenían los siguientes elementos:

- Control negativo (por pocillo): 0,7 µg del vector **P_{TA}-Luc** + 0,1 µg del vector **luciferasa de Renilla** + 50 µL de medio de cultivo.
- Control positivo (incluye condiciones control y tratamiento con OXA) (por pocillo): 0,7 µg del vector **pp53-TA-Luc** + 0,1 µg del vector **luciferasa de Renilla** + 50 µL de medio de cultivo.
- Lipofectamina (por pocillo): 0,8 µg + 50 µL de medio de cultivo.

A continuación, se procedió a mezclar el control negativo más la cantidad de Lipofectamina correspondiente, al igual que el control positivo con la cantidad de Lipofectamina necesaria. Esta mezcla se mantuvo durante 20 minutos a temperatura ambiente para posteriormente añadir 100 µL por pocillo, según condición y dejar actuar durante seis horas.

Pasado ese tiempo, se eliminó el medio de transfección, se lavaron los pocillos con PBS estéril y se añadió medio fresco a todos los pocillos. Además, en las condiciones control y tratamiento se añadió la cantidad de DMSO y OXA 10 µM adecuada. El tratamiento se dejó actuar durante 24 horas.

11.3 LISIS CELULAR PASIVA

A partir de este momento, el procedimiento llevado a cabo se realizó utilizando el kit *Dual-Luciferase Reporter Assay System*, proporcionado por Promega (Promega Corporation, Madison, WI, EEUU).

Tras las 24 horas de tratamiento, se procedió a la lisis pasiva de las células. Para ello, el tampón de lisis pasiva, PLB, suministrado a una concentración 5X, fue diluido con agua destilada para obtener PLB 1X. El medio de cultivo fue absorbido y las células fueron lavadas con PBS para posteriormente añadir 100 µl de PLB 1X, dejándolo actuar durante 15 minutos a temperatura ambiente y en agitación. El lisado celular fue transferido a un tubo de 1,5 mL y centrifugado a velocidad máxima (16.000 x g) en una microcentrífuga durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante constituyó el extracto de proteína total y fue congelado a -20°C para su posterior lectura.

Todo el proceso queda representado en la Figura 24.

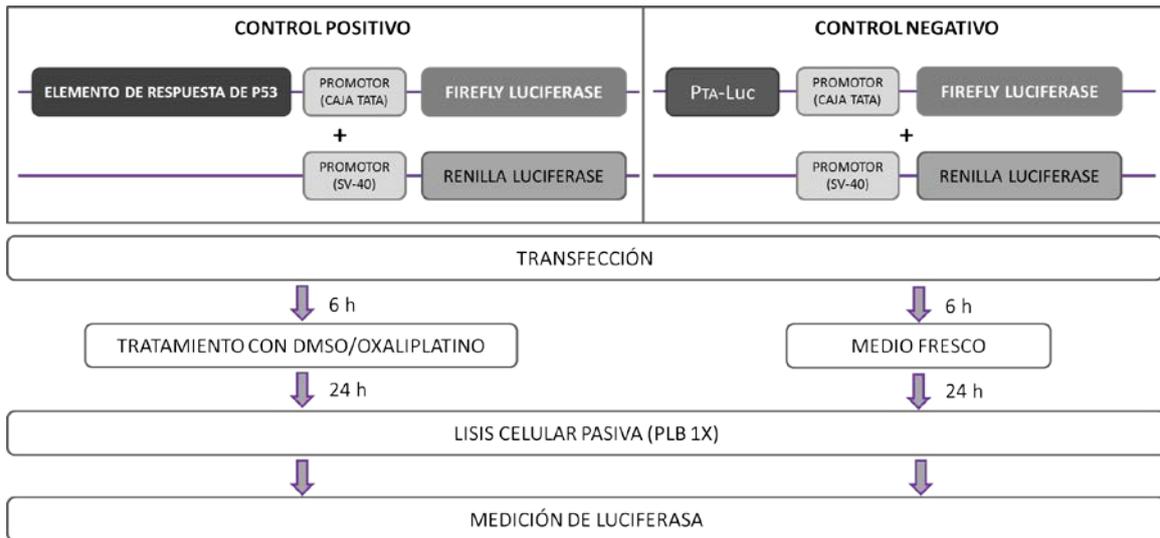


Figura 24. Proceso de transfección y tratamiento de las células de cáncer colorrectal. Ambas condiciones (control positivo y negativo) son transfectadas con sus respectivos plásmidos, sin embargo solo la condición positiva será tratada con DMSO/OXA 10 μ M durante 24 horas. Tras esto, se lisarán las células y se procederá a la cuantificación de la actividad luciferasa.

11.4 LECTURA DE LA EXPRESIÓN DE LUCIFERASA

El protocolo realizado permite la detección de las dos luciferasas, la de *Firefly* y la de *Renilla*, a partir de una sola muestra de manera secuencial, gracias al uso de dos sustratos diferentes para la detección de cada una de ellas. La diferencia entre las dos enzimas es que *Firefly Luciferase* utiliza luciferina (con O_2), ATP y Magnesio para producir luz de color amarillo verdoso a una longitud de onda de 550-750 nm. Sin embargo la *Renilla Luciferase* usa coelenteracina y O_2 , emitiendo luz azul a 480 nm.

En primer lugar se emplea el *Luciferase Assay Reagent II (LAR II)* como sustrato de la *Firefly Luciferase*. Este reactivo viene liofilizado (*Luciferase Assay Substrate*) y es reconstituido con 10 mL del *Luciferase Assay Buffer II*. Mediante el uso de tubos de vidrio, se añaden 20 μ L de la muestra a los que se incorporan 100 μ L del LAR II, mezclando dos o tres veces con la pipeta. Tras esto, se mide la emisión de luminiscencia con el luminómetro (modelo FB 12, BERTHOLD TECHNOLOGIES, Bad Wildbad, Germany).

Por otro lado, se preparó el *Stop&Glo[®] Reagent*, sustrato de la *Renilla luciferase*. Este reactivo viene suministrado como 50X *Stop&Glo[®] Reagent*, y debe diluirse al 1X añadiendo 1 volumen de sustrato por cada 50 de *Stop&Glo[®] Buffer*. Al igual que con la medida anterior, se emplearon 100 μ L de este reactivo por cada 20 μ L de lisado celular. Se agitó brevemente con el vórtex, y se inició la lectura de *Renilla Luciferase* con el luminómetro (Figura 25).

Tras la lectura de las luciferasas, se realizó un cociente entre el valor dado para la luciferasa de luciérnaga y el valor obtenido para la luciferasa de Renilla. Estos experimentos fueron realizados tres veces con cada línea celular y cultivo primario.

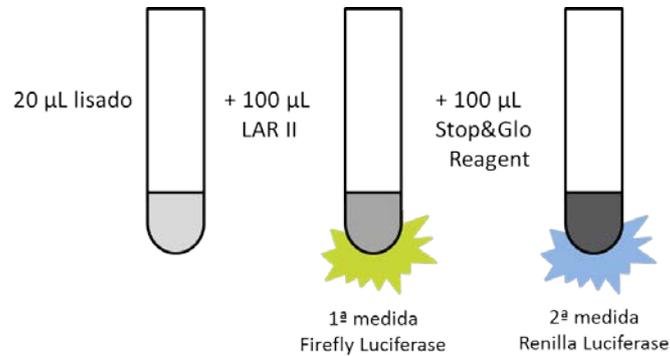


Figura 25. Lectura de la actividad luciferasa. Tras añadir 100 µL de *Luciferase Assay Reagent II* (LAR II), se mide la actividad luciferasa de *Firefly*. Se adicionan 100 µL de *Stop&Glo® Reagent*, para medir la actividad de la luciferasa de *Renilla*. La actividad de estos promotores se expresa por RLU (*Relative Luciferase Unit*).

12. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

La electroforesis bidimensional (2D) permite analizar mezclas complejas de proteínas mediante una primera separación en función del punto isoeléctrico (PI) y una segunda en función del peso molecular (PM). La técnica DIGE (*Differential In Gel Electroforesis*) permite la cuantificar las diferencias de abundancia de proteínas entre muestras separadas de manera simultánea en un mismo gel 2D, gracias a su marcaje con diferentes fluorocromos (Cy3 y Cy5).

12.1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA Y MARCAJE CON FLUORESCENCIA

Las líneas celulares se cultivaron por triplicado en placas de 100 mm a una densidad de 3×10^5 células por placa y se dejaron crecer durante 4 días en el medio de crecimiento correspondiente. Transcurrido el tiempo, las células se lavaron dos veces con PBS frío, y se recogieron con PBS frío, se centrifugaron a $500 \times g$ durante 5 minutos y se lavaron tres veces con un tampón en frío que contenía 10 mMol/L Tris (pH 8.0) y 5 mmol/L $MgAc_2$. Los pellets de células se resuspendieron en tampón de lisis (30 mmol/L Tris, 2 mol/L de base de tiourea, 7 mol/L de urea, 4% (peso/volumen) de CHAPS a pH=10) durante 10 minutos en hielo con varias agitaciones. El lisado celular fue sometido a ultrasonidos mediante cinco intervalos de 20 segundos en hielo. Se dejó un minuto en hielo entre los intervalos y los restos celulares se eliminaron mediante centrifugación a $12.000 \times g$ durante 5 minutos a $4^\circ C$. El exceso de sales e

impurezas que podrían dificultar el desarrollo de la primera dimensión se eliminaron mediante el kit 2D *Clean up* (GE Healthcare). Las muestras precipitadas se resuspendieron en tampón de lisis (30 mmol/L Tris, 2 mol/L de base de tiourea, 7 mol/L de urea, 4% (peso/volumen) de CHAPS) previamente a la medida de la concentración de proteína.

La concentración de proteína de cada muestra se determinó mediante el kit 2D *quant* (GE Healthcare). En una primera etapa del protocolo, se precipitaron 2 μ L de cada muestra tras añadir 500 μ L de la solución precipitante y 500 μ L de la solución co-precipitante. Tras centrifugar durante 5 minutos a 10.000 x g, se eliminó el sobrenadante y se añadieron 100 μ L de la solución de cobre más 400 μ L de agua MilliQ. A esta solución proteica se adicionó 1 mL de una solución reactiva y se dejó incubando durante 15-20 minutos. La absorbancia se determinó en un espectrofotómetro (Infinite® M200PRO NanoQuant) a 480 nm.

Los compuestos fluorescentes DIGE, derivados de éster de N-hidroxisuccinimidilo de los colorantes de cianina, Cy3 y Cy5 (GE Healthcare), se prepararon con N, N-dimetilformamida (Sigma-Aldrich). Las muestras proteicas, 50 μ g, se marcaron con 400 pmol de los fluoróforos DIGE, Cy3 y Cy5, en tubos separados en hielo durante 30 minutos. Las muestras individuales fueron marcadas con Cy3, mientras que se generó un patrón interno marcando con Cy5, mediante la mezcla de cantidades iguales de cada muestra de línea celular. La reacción de marcaje se paró mediante la adición de 1 μ L de 10 mmol/L de Lisina.

12.2 ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

Las tiras de gradiente de pH inmovilizado (pH 3-10) (GE Healthcare) se rehidrataron durante 12 horas de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se mezclaron cantidades iguales de las muestras individuales marcadas con Cy3 y del patrón interno marcado con Cy5, correspondientes a 50 μ g de proteína. Los 100 μ g de proteína por gel se cargaron en una tira de 18 cm con gradiente de pH inmovilizado (pH 3-10). Las proteínas se enfocaron en la primera dimensión tras un total de 60.000 Vh en el sistema *Ettan IPGphor 3* (GE Healthcare). Posteriormente, las tiras de pH inmovilizado se equilibraron en primer lugar en un tampón formado por 6 mol/L de urea, 2% SDS, 50 mmol/l de Tris (pH 8,8), 20% de glicerol y 2% de DTT, durante 15 minutos y en segundo lugar en un tampón, de las mismas características que el primero, suplementado con 2,5% de Iodoacetamida en vez de DTT, durante otros 15 minutos.

Las proteínas se separaron a continuación en la segunda dimensión de acuerdo a su peso molecular en el sistema *Ettan DALT six* (GE Healthcare) empleando geles del 12,5%. Los

seis geles corrieron juntos a 5 mA por gel durante 2 horas y a 2W por gel durante 13 horas, manteniendo la temperatura del sistema a 23°C. Posteriormente los geles se escanearon a 532/580 nm y 633/670 nm (como longitudes de onda de excitación/emisión) para las señales de los fluoróforos Cy3 y Cy5 respectivamente, utilizando un escáner de fluorescencia *Typhoon 9410* (GE Healthcare).

Las imágenes se analizaron con el programa informático *DeCyder 7.0* (GE Healthcare). El programa informático se utilizó siguiendo las recomendaciones del fabricante y el número estimado de *spots* se estableció en 2.500. Se realizó la prueba *t* de Student con la corrección de falsos positivos para cada punto encontrado, comparando la proporción media de un “spot” dado entre los grupos de alta capacidad de invasión (HI) y la baja invasividad (LI). En este análisis, sólo se consideraron los “spot” con un valor de $p < 0,05$, cuyo incremento de abundancia fue superior a 2 veces. Cada “spot” de interés se aisló para la identificación por LC-MS/MS a partir de geles preparativos. Estos geles contenían 400 µg de proteína y se tiñeron con azul de *Coomassie* R-250. Las imágenes fueron capturadas utilizando el Sistema *ImageScanner III* (GE Healthcare). Los *spots* de proteínas deseados se recortaron manualmente.

12.3 IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS PRESENTES MEDIANTE LC-MS/MS

Una vez recortados los “spots” de interés, las proteínas localizadas en ellos fueron reducidas y alquiladas mediante su incubación durante 30 minutos a 56°C con 10mM DTT y posteriormente con 55mM de Iodoacetamida. Posteriormente, se incubaron durante 16 h a 37°C con tripsina de grado proteómico (Sigma-Aldrich), siguiendo el protocolo descrito por Shevchenko y cols. (12). Los péptidos trípticos se analizaron por cromatografía líquida de fase inversa capilar, acoplada en línea con un espectrómetro de masas. La columna, BioBasic-18 de 5 µm partículas, 300 Å de tamaño de poro y 0,18 mm ID-30 mm L (Thermo, San Jose, CA), estaba conectada a una bomba MS Plus Surveyor (Thermo, San Jose, CA) y a continuación, a un espectrómetro de masas de trampa de iones (LXQ, Thermo, San Jose, CA). El caudal se fijó en 100 µl/min, pero mediante una división de flujo, se obtuvo una velocidad de flujo de 2 µl/min. La fase móvil A era 0,1% de ácido fórmico/2% de metanol en agua y B era ácido fórmico al 0,1% en metanol. Las muestras de péptidos se inyectaron y se aplicó un gradiente de elución bajo las siguientes condiciones: 5% de B en 2 minutos; un aumento lineal de 5% a 70% de B en 20 minutos; 70% durante 10 minutos; 5% de B durante 10 minutos. La trampa de iones MS se hizo funcionar en un modo MS/MS dependiente de los datos, donde los cinco iones

moleculares de péptidos más abundantes en cada espectro de masas se seleccionaron secuencialmente para su disociación inducida por colisión con una energía de colisión normalizada del 34%. Se aplicó una exclusión dinámica para minimizar la selección repetida de péptidos previamente elegidos para su disociación. La temperatura del capilar y la tensión de electrospray se establecieron a 200°C y 3,5 kV, respectivamente. Para la identificación de las proteínas se empleó la base de datos de proteínas humanas no redundante de NCBI (32.440 secuencias, publicado el 19 de Junio, 2006) con el programa informático *Proteome Discoverer 1.0* (Thermo Scientific). Se aplicaron los siguientes parámetros de búsqueda: estados de carga por defecto de 2+, 3+, y 4+; se permite un máximo de una escisión perdida, una tolerancia media de masa peptídica de 1,5 Da. Se admite una tolerancia para la búsqueda de fragmentos iónicos de 0,8 Da. Se establece la existencia de una modificación fija en cisteína (carbamidometilación) y una modificación variable que fue la oxidación de la metionina. En todas las muestras se realizaron búsquedas en contra de una base de datos de señuelo (*Decoy Database*). Se estableció una tasa de descubrimiento falso (FDR) del 1% para todos los experimentos. Se asignó una identificación positiva cuando se determinaron dos o más péptidos únicos con alta probabilidad.

13. ENSAYO DE MIGRACIÓN E INVASIÓN CELULAR

Para la realización de estos experimentos, se utilizó como referencia el protocolo de Imamura y cols., (188), que se llevó a cabo mediante el uso del kit de BD Biocoat™ Matrigel™ Invasion Chamber (BD Biosciences, Madrid, España) en placas de 24 pocillos. Para comprobar y medir la capacidad de **migración** de las células, éstas fueron suspendidas en insertos en cuya base hay una membrana con poros de 8 µm de diámetro. Para medir la **invasión** se utilizaron insertos que contienen una membrana con poros 8 µm de diámetro recubierta por una fina capa de Matrigel, mezcla proteica similar al entorno extracelular, que funciona como la membrana basal *in vitro* (188). El matrigel obstruye los poros de la membrana impidiendo que las células no invasivas migren por la membrana. Sin embargo, las células invasivas se separan entre ellas y migran a través del matrigel. El experimento se realizó con respecto a dos pocillos control sin insertos, en los cuales se sembró el mismo número de células que en los pocillos con insertos.

En primer lugar y para asegurar la fijación de las células a los pocillos control sin insertos, se vertieron 400 µL de gelatina al 0,1% y se dejaron solidificar a 37°C un mínimo de 20 minutos. Además, los insertos con membrana y matrigel fueron rehidratados añadiendo 500

μL de medio de cultivo DMEM/RPMI 1940 en la parte superior e inferior. Transcurrido el tiempo, se eliminó el medio usado para hidratar y se lavaron los pocillos e insertos dos veces con PBS.

Las células se despegaron con tripsina y se sembraron 200.000 células por pocillo en medio DMEM/RPMI 1940 con concentraciones variables de suero bovino fetal en la parte inferior de los insertos. Se seleccionó una concentración de suero al 20% por ser la más efectiva como atrayente para las células (Figura 26).

Tras 24 horas de incubación a 37°C , se retiraron las células de la cámara superior que no migraron ni invadieron, los insertos se lavaron con PBS y se pasó un bastoncillo de algodón suavemente por la parte superior de los mismos. En la parte inferior de los insertos, se añadieron $340 \mu\text{L}$ del reactivo MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) a una concentración 1 mg/mL y se incubó durante 4 horas en oscuridad a 37°C . Este ensayo se basa en la reducción metabólica del MTT por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazán), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células. Posteriormente se eliminó el reactivo MTT sobrante, se añadieron $300 \mu\text{L}$ de DMSO y se mantuvo la placa 30 minutos en agitación y oscuridad con el fin de disolver el formazán. La absorbancia se determinó en un espectrofotómetro (Infinite® M200PRO NanoQuant) a 570 nm .

Dado que el número de células sembradas en las tres condiciones (control, membrana porosa para medir migración y Matrigel para medir invasión) fueron las mismas, el porcentaje de invasión y migración se midió basándose en el control, cuyo valor asignado fue del 100%. El experimento se realizó un mínimo de tres veces para cada línea celular y cultivo primario analizados, y cada condición por duplicado.

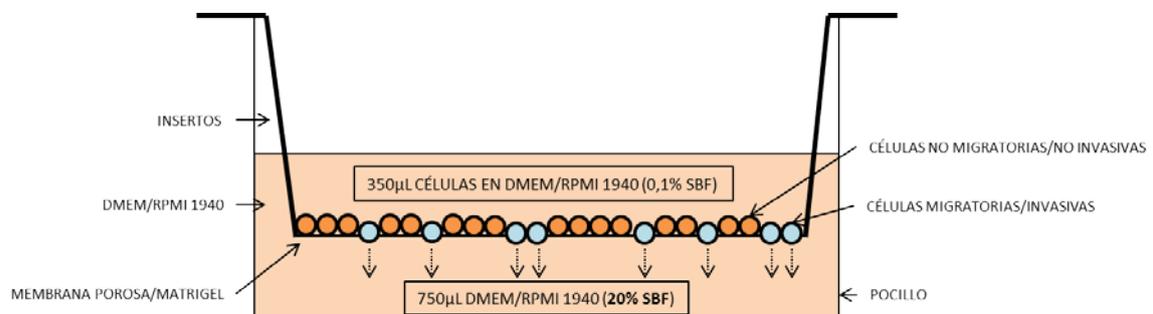


Figura 26. Esquema de los pocillos con el inserto de membrana o matrigel. Las células se sembraron en su medio correspondiente y las que consiguieron migrar e invadir fueron teñidas con el reactivo MTT, cuya absorbancia se midió posteriormente en un lector de placas.

14. INMUNOFLUORESCENCIA

La inmunofluorescencia es una técnica empleada para visualizar la localización de una determinada proteína o antígeno específico en células o en secciones de tejido. El procedimiento utilizado fue una inmunofluorescencia indirecta mediante el uso de anticuerpos primarios y secundarios, éstos últimos unidos a un fluoróforo.

Para llevar a cabo este ensayo, las células fueron separadas con tripsina y sembradas en su medio correspondiente DMEM/RPMI 1940 en placas de 24 pocillos (10.000 células por pocillo). Tras 24 horas de incubación, se lavaron con PBS y se fijaron con 500 μ L de metanol frío durante al menos una hora a -20°C . Después de la fijación, se retiró el metanol y los pocillos se lavaron dos veces con PBS. Para la permeabilización de la membrana celular se incubaron las células con 500 μ L de PBS-Tritón X-100 al 0,25% (Sigma Aldrich) durante 5 minutos. Se retiró el Tritón X-100 y se lavaron las células cuatro veces con 1 mL de PBS-BSA al 0,5%. En la etapa de bloqueo, se incubaron las células durante 30 minutos con 1 mL de PBS-BSA al 2%. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario Anexina A2 (Abcam, Cambridge, UK) a una dilución 1:50 en 1 mL de PBS-BSA al 1%, en un agitador a 4°C durante toda la noche. Tras retirarse el anticuerpo primario, se lavó con PBS-BSA al 0,5% y se incubó con el anticuerpo secundario, a una dilución 1:500 en 1 mL de PBS-BSA al 0,5% durante una hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Este anticuerpo secundario va unido a un fluoróforo, en este caso isotiocianato de fluoresceína, FITC, cuya longitud de onda de absorción es 494 nm y emite a 520 nm, dando color verde intenso.

Posteriormente se retiró el exceso de anticuerpo secundario y se procedió al marcaje de la cromatina. Para ello, se empleó el fluoróforo Hoechst 33342 (Molecular Probes), el cual penetra en las células, se une al ADN y permite la distinción de los núcleos celulares. Esta incubación se realizó a una concentración de 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en 1 mL de PBS, durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente, los pocillos se lavaron cuatro veces con PBS, se observaron y fotografiaron las células en un microscopio de fluorescencia invertido modelo Nikon Eclipse T2000 U con un objetivo 20X.

15. INMUNOHISTOQUÍMICA

Gracias a la colaboración del Servicio de Anatomía Patológica, se pudieron obtener cortes histológicos de pacientes afectados por CCR. Estos cortes histológicos se obtuvieron a partir de biopsias incluidas en parafina de una muestra tumoral de cada paciente y fueron

teñidos por dos métodos distintos. Tres de los cuatro cortes se sometieron a una tinción inmunohistoquímica con ANXA2, y el cuarto se tiñó con Hematoxilina-Eosina (H&E).

El primer método supone la aplicación de Hematoxilina, compuesto básico que tiñe los núcleos celulares debido a que contienen ácidos nucleicos ricos en radicales ácidos, obteniendo un color púrpura, y de Eosina, colorante ácido que tiñe componentes básicos en tonos rosados debido a su naturaleza ácida, como el citoplasma celular. Estas tinciones se realizaron utilizando un sistema de tinción automática (Dako Artisan®, Dako Diagnostics, Carpinteria, CA).

Además, para el segundo método se realizó una técnica ABC estándar (Complejo de Avidina Biotina peroxidasa) utilizando un kit comercial (Dako EnVision Flex) en un sistema de tinción automática (Dako Autostainer Plus) y empleando un anticuerpo monoclonal de ratón anti-ANXA2 (Abcam) a una dilución 1:1000).

Estas tinciones fueron analizadas por el Dr. Carlos Manuel Martínez del Laboratorio de Patología Experimental del Servicio de Cirugía Experimental, encargado de realizar el conteo de células con tinción positiva de Anexina A2 en la membrana celular. Se estudió la expresión media de las células tumorales positivas con el patrón membranoso en el frente invasivo del tumor. Este porcentaje se midió contando el número de células positivas teñidas con ANXA2 por cada 100 células tumorales en un mínimo de 20 campos al azar, utilizando un microscopio óptico con objetivo de alta resolución (400X), modelo Zeiss Axio Scope A10.

16. ESTUDIO CLÍNICO-PATOLÓGICO DE PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL

Para la realización del estudio de asociación entre el patrón de tinción celular de Anexina A2 y la presencia o ausencia de metástasis en los ganglios linfáticos de los pacientes afectados por CCR, se revisaron las historias clínicas de dichos pacientes. El objetivo fue recoger datos demográficos y clínico-patológicos en una serie prospectiva entre julio de 2011 y octubre de 2014. Para poder tener acceso a las historias clínicas, se contó con la colaboración del departamento del Registro y del Servicio de Oncología del HCUVA.

Uno de los criterios de inclusión en el estudio fue el grado de penetración del tumor primario, T, donde se decidió incluir a aquellos con un valor igual o superior a 3, donde el tumor atraviesa la capa muscular hacia tejidos pericólicas.

Los datos necesarios para el estudio se recopilaron utilizando dos formularios, a partir de los cuales se generó una base de datos. Los formularios de Anatomía Patológica y de Cirugía y Oncología quedan representados en las siguientes tablas (Tabla 8).

FORMULARIO	
ANATOMÍA PATOLÓGICA	CIRUGÍA Y ONCOLOGÍA
Identificación del paciente	Técnica quirúrgica utilizada
Nº de Biopsia y fecha	Localización del tumor
Edad y sexo	Adenocarcinomas o pólipos presentes
T/N/M	Tratamiento con quimioterapia
Fase	Detección de metástasis simultánea
Nº de ganglios analizados y afectados	Tipo de metástasis
Células marcadas con ANXA2	Tratamiento adyuvante
Células marcadas con ANXA2 en la capa muscular	Régimen de adyuvancia
Invasión perineural	Fecha de recidiva
Invasión venosa extramural	Técnica de detección de recidiva
Invasión de los vasos linfáticos	CEA>5ng/mL
Depósitos tumorales en la grasa	Fecha de revisión

Tabla 8. Formularios de Anatomía Patológica y de Cirugía/Oncología. En esta tabla se señalan las variables que se recogieron de las historias clínicas de los pacientes afectados por cáncer colorrectal.

17. ESTADÍSTICA

Las diferencias de las medias obtenidas en las diferentes condiciones experimentales se compararon utilizando el test estadístico de la *t* de Student en el programa GraphPad (GraphPad Programa informático Inc., San Diego, CA).

Tras la recogida de datos de las historias clínicas y habiendo realizado el conteo de células marcadas con Anexina A2 en la membrana celular, se procedió al estudio de asociación entre la presencia de metástasis en los ganglios linfáticos y el número de células positivas con Anexina A2 en la membrana, así como los diversos parámetros histopatológicos recogidos. Los datos demográficos y patológicos de los casos con la condición de ganglios positivos o negativos fueron comparados estadísticamente utilizando la prueba exacta de Fisher, χ^2 prueba o la prueba U de Mann-Whitney, de acuerdo con las variables estudiadas.

Con el fin de determinar la asociación entre el factor estudiado y las variables significativas, se utilizó un análisis multivariante de regresión logística, partiendo de un modelo donde se introdujeron las variables que habían resultado significativas en el estudio univariante junto a la presencia de células tumorales en los ganglios linfáticos. En este análisis se obtuvieron las "Odds Ratio" con un intervalo de confianza del 95%.

Conjuntamente, se estudió mediante un análisis univariante por medio de la Prueba U de Mann-Whitney la asociación entre el número de células con patrón de tinción con ANXA2 en membrana en el frente invasivo del tumor con diversos factores demográficos e histopatológicos.

En todos los casos, se consideraron estadísticamente significativos los valores de p inferiores a 0,05. Estos análisis estadísticos se realizaron mediante el programa estadístico SPSS versión 10.0 (SPSS Inc, Chicago, Illinois, EE.UU.).

RESULTADOS

RESULTADOS

1. ESTUDIO DEL EFECTO DE FÁRMACOS UTILIZADOS EN CLÍNICA EN EL CRECIMIENTO DE LÍNEAS CELULARES Y CULTIVOS PRIMARIOS DE CÁNCER DE COLON

1.1 EFECTOS DEL FÁRMACO 5-FLUOROURACILO

1.1.1 *CRECIMIENTO DEPENDIENTE DE ANCLAJE*

Para comenzar el estudio del fármaco 5-FU, se analizó su posible efecto antiproliferativo sobre un panel de líneas celulares humanas de cáncer colorrectal. Los primeros ensayos que se realizaron fueron experimentos de crecimiento celular dependiente de anclaje, donde las líneas celulares de CCR fueron sembradas y tratadas durante 72 horas con concentraciones crecientes de 5-FU, desde 1 nM hasta 100 μ M.

Los resultados obtenidos muestran que este quimioterápico ejerció un efecto antiproliferativo dependiente de la concentración. Concentraciones inferiores o iguales a 1 μ M de 5-FU no tuvieron apenas efecto sobre las líneas celulares estudiadas, cuya proliferación celular superó el 90% en todos los casos. A una concentración de 10 μ M y superiores, el efecto del fármaco fue diferente según la línea celular estudiada. A partir de dicha concentración, la disminución del crecimiento celular comenzó a acentuarse pero sin llegar a ser significativa (Figura 27).

Con estos datos, se calculó para cada línea celular el valor de IC_{50} (Tabla 9), que muestra la concentración media de fármaco necesaria para inhibir el 50% de la proliferación celular. La mayoría de ellas se vieron poco afectadas por el tratamiento, a excepción de SW620 y HCT 116 cuya proliferación se vio afectada en más de un 50% con 10 μ M del fármaco.

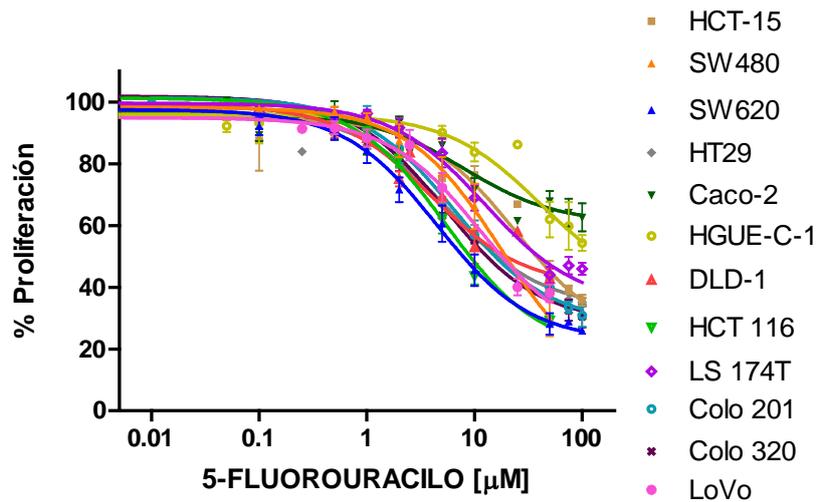


Figura 27. Proliferación de líneas celulares establecidas de cáncer colorrectal tratadas con 5-Fluorouracilo. Las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de 5-FU. La proliferación celular fue analizada como se describe en Materiales y Métodos. En la gráfica se representa el promedio de la proliferación \pm EEM ($n \geq 4$).

Línea celular	IC ₅₀ (µM)	EEM
Caco-2	80,94	7,82
HGUE-C-1	73,62	3,39
DLD-1	52,91	2,41
SW480	46,23	4,90
HCT-15	41,18	1,19
LoVo	40,64	1,82
Colo 201	39,93	1,43
LS 174T	17,22	2,13
HT29	14,11	1,99
Colo 320	11,39	0,78
SW620	9,36	0,96
HCT 116	8,97	0,46

Tabla 9. Valores de IC₅₀ (µM) de inhibición de la proliferación celular causado por 5-Fluorouracilo en líneas celulares establecidas de cáncer colorrectal. Estos datos reflejan el promedio de al menos 4 experimentos \pm EEM.

Se realizó el mismo experimento para comprobar el posible efecto antiproliferativo de 5-FU en los cultivos primarios (Figura 28). Al escoger una concentración de 50 µM, y como se puede apreciar en la figura, la proliferación celular tras 72 horas de exposición al fármaco 5-FU se redujo entre un 20 y un 25% en los cultivos primarios estudiados. Por lo tanto, dichos cultivos serían considerados resistentes al tratamiento con 50 µM de 5-FU.

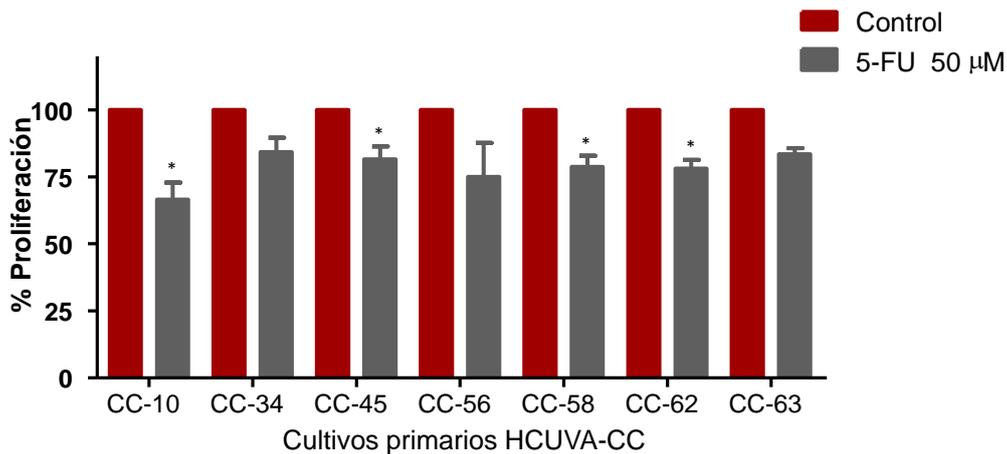


Figura 28. Proliferación de cultivos primarios de cáncer colorrectal tratados con 50 µM de 5-Fluorouracilo. La proliferación celular se determinó como se describe en Materiales y Métodos. En la gráfica se representa el promedio de la proliferación \pm EEM ($n \geq 3$). Valor de P calculado mediante el test estadístico, *t* de Student, * $P < 0,05$.

1.1.2 CRECIMIENTO INDEPENDIENTE DE ANCLAJE

Además del estudio del crecimiento dependiente de anclaje, se realizaron experimentos para valorar el efecto de 5-FU sobre el crecimiento independiente de anclaje. Para ello, se escogieron las líneas celulares Caco-2, LS 174T y HT29, por el diferente efecto que 5-FU producía sobre ellas respectivamente.

Como ocurría en los experimentos de crecimiento dependiente de anclaje, una concentración de 1 µM de 5-FU no fue capaz de disminuir el crecimiento celular, analizado por número de colonias formadas. A 10 µM del fármaco obtuvimos una diferencia significativa entre las líneas celulares estudiadas. Como se observa en la Figura 29, en la línea celular Caco-2 no se disminuyó el número de colonias formadas al exponer esta línea celular a concentraciones crecientes del fármaco. Sin embargo, con las demás líneas celulares se consiguió un descenso muy notable en el porcentaje de colonias formadas. Tan solo se obtuvo un $23,88 \pm 3,40\%$ y un $6,25 \pm 0,81\%$ de colonias en las líneas celulares LS 174T y HT29 respectivamente. Con una concentración de 50 µM de 5-FU el efecto fue mucho más drástico, y el crecimiento celular no llegó al 10% en ninguna de las líneas celulares estudiadas por lo que este ensayo muestra que 5-FU fue más eficaz en este tipo de ensayos que en los experimentos de crecimiento dependiente de anclaje.

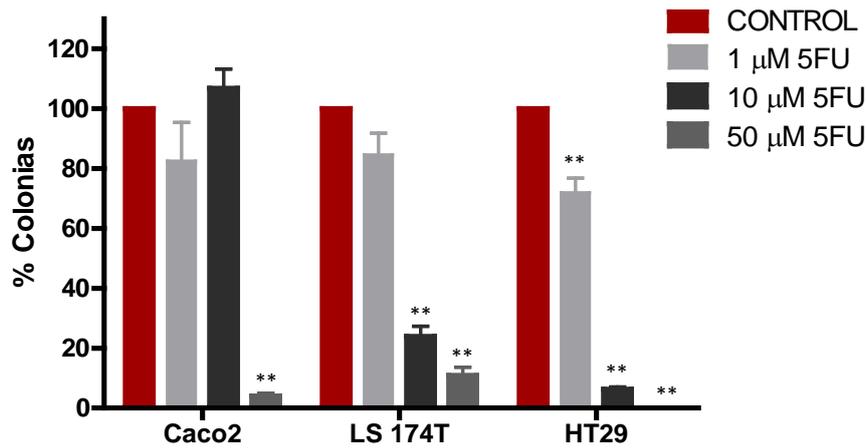


Figura 29. Efecto de 5-Fluorouracilo sobre la proliferación independiente de anclaje en líneas celulares establecidas de cáncer colorrectal. El valor 100% pertenece al número mayor de colonias formadas en la condición control. En la gráfica se representa el promedio de la proliferación \pm EEM ($n \geq 3$). Valor de P calculado mediante el test estadístico, *t* de Student, $**P < 0,01$.

En el laboratorio se instauró un protocolo para trabajar con los cultivos primarios. En primer lugar, se realizaba una verificación de la capacidad de formación de colonias. Para ello, se realizó un ensayo de crecimiento independiente de anclaje en ausencia de tratamiento con cada uno de ellos. En la Figura 30 queda representado el número de colonias formadas por cultivos primarios con los que se trabajó en el estudio. Se puede apreciar cómo existe una gran variabilidad en cuanto a la capacidad de estos cultivos en el crecimiento independiente de anclaje.

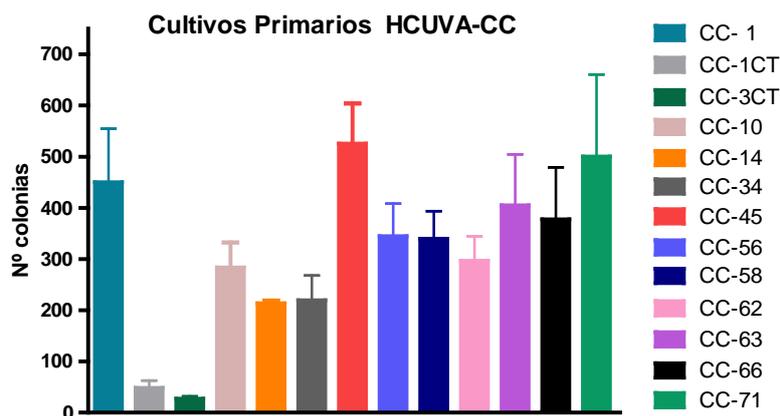


Figura 30. Crecimiento independiente de anclaje de cultivos primarios. Las células se mantuvieron 14 días en agar blando añadiendo medio de cultivo, como aparece en el apartado de Materiales y Métodos.

Tras la comprobación de dicha característica tumoral, se procedió a realizar un ensayo de crecimiento independiente de anclaje con 5-FU. Dicho experimento se llevó a cabo con los cultivos primarios HCUVA-CC-1 y HCUVA-CC-34. Como se puede observar en la Figura 31, a una

concentración 10 μM de 5-FU se consiguió disminuir el crecimiento celular de HCUVA-CC-1 en un $91,17 \pm 1,22\%$ y de HCUVA-CC-34 al $90,61\%$. Los resultados de crecimiento dependiente de anclaje (Figura 28) demuestran que la inhibición producida por 5-FU en HCUVA-CC-34 era del $15,78 \pm 5,41\%$. Por tanto, del mismo modo que ocurría con las líneas celulares establecidas, 5-FU parece ser más eficaz en ensayos de crecimiento independiente de anclaje en los cultivos primarios estudiados.

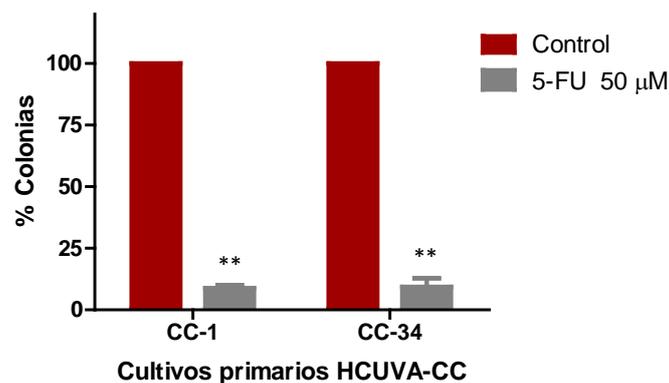


Figura 31. Efecto de 5-Fluorouracilo sobre la proliferación independiente de anclaje en HCUVA-CC-1 y CC-34. El valor 100% corresponde al número de colonias formadas en la condición control. En la gráfica se representa el promedio de la proliferación \pm EEM. Valor de P calculado mediante el test estadístico, *t* de Student, $**P < 0,01$.

1.2 EFECTOS DEL FÁRMACO CAPECITABINA

1.2.1 CRECIMIENTO DEPENDIENTE DE ANCLAJE

Tras realizar estos experimentos frente a 5-FU, se procedió al estudio de su precursor, Capecitabina. Este fármaco se administra en los tratamientos quimioterápicos de manera oral en fases III y IV del CCR. Se realizaron experimentos de crecimiento dependiente de anclaje en las mismas condiciones descritas para el ensayo con 5-FU.

Para comprobar si este precursor de 5-FU producía toxicidad en las líneas celulares, se escogieron líneas celulares con sensibilidad diferente a 5-FU, Caco-2, HGUE-C-1, DLD-1, LoVo y HCT-15 y HT-29.

Como se puede observar en la Figura 32, el efecto de Capecitabina en las líneas celulares resistentes a 5-FU fue mínimo incluso a concentraciones de 50 μM . De hecho, a esta elevada concentración, no se consiguió disminuir el crecimiento celular al 50%, por lo que no se ha podido comprobar el valor de IC_{50} frente a estas líneas celulares. En la línea celular HT29, se obtuvo una disminución del crecimiento del $35,73 \pm 3,24\%$ con 50 μM de Capecitabina, y su

IC₅₀ es de 21,73±3,88 μM. Este resultado contrasta con la IC₅₀ de 5-FU, que era de 14,11±1,99 μM, lo que indica un mejor efecto antiproliferativo de 5-FU frente a Capecitabina.

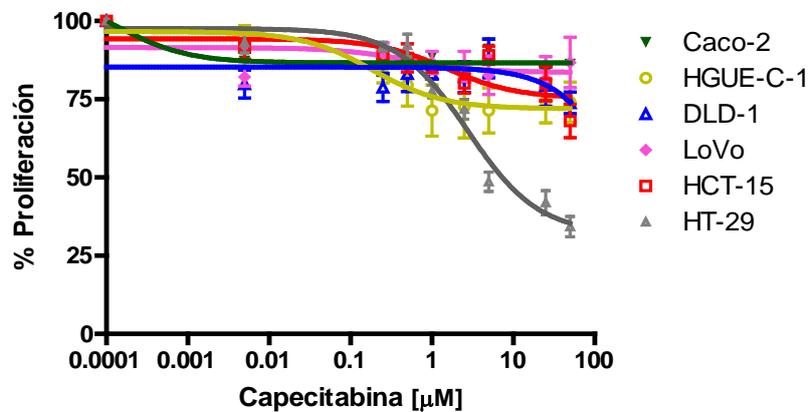


Figura 32. Proliferación de líneas celulares establecidas de cáncer colorrectal tratadas con Capecitabina. Las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de Capecitabina. La proliferación celular fue determinada como indica Materiales y Métodos. En la gráfica se representa el promedio de la proliferación ± EEM (n≥3).

Para comprobar el posible efecto antiproliferativo de Capecitabina en los cultivos primarios, se realizó un experimento de crecimiento dependiente de anclaje con algunos de ellos. Tal y como ocurría con las líneas celulares establecidas, este fármaco poseía un efecto antiproliferativo casi inexistente, consiguiendo que todos los cultivos estudiados proliferasen más del 80% con una concentración de 50 μM de Capecitabina y por tanto clasificándolos de nuevo como resistentes (Figura 33).

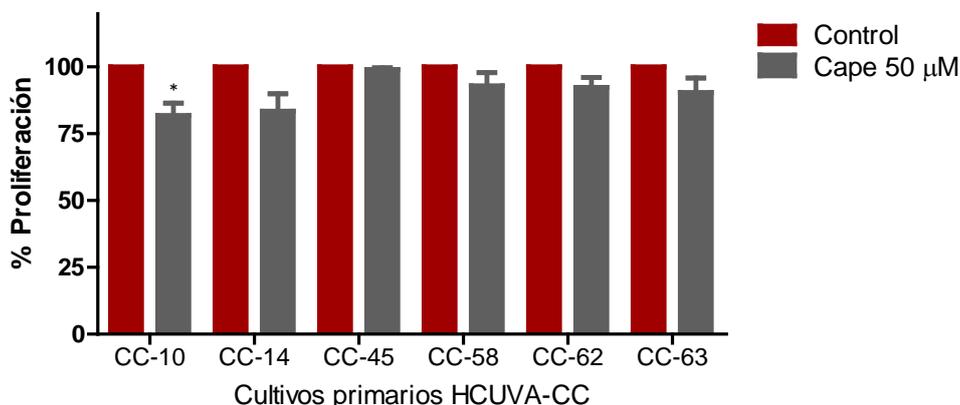


Figura 33. Proliferación de cultivos primarios de cáncer colorrectal tratados con 50 μM de Capecitabina. En la gráfica se representa el promedio de la proliferación ± EEM (n≥3). Valor de P calculado mediante el test estadístico, *t* de Student, *P<0,05. CAPE: Capecitabina.

Debido a que el fármaco Capecitabina no tenía un efecto significativo en ensayos de proliferación celular, se decidió no realizar ensayos de crecimiento independiente de anclaje.

1.3 EFECTOS DEL FÁRMACO IRINOTECAN

1.3.1 CRECIMIENTO DEPENDIENTE DE ANCLAJE

Otro de los fármacos utilizados en la clínica para tratar el CCR es Irinotecan (IRI). Para comprobar su posible efecto antiproliferativo se realizaron experimentos de crecimiento dependiente de anclaje, donde un panel de líneas celulares establecidas de CCR fue tratado con concentraciones crecientes de IRI, desde 1 nM hasta 100 μ M.

Los resultados obtenidos, al igual que ocurría con 5-FU, revelaron que IRI ejerce un efecto antiproliferativo dependiente de la concentración. Concentraciones inferiores o iguales a 1 μ M no tuvieron apenas ningún efecto sobre las líneas celulares estudiadas, a excepción de SW620, donde a esa concentración se consiguió disminuir el crecimiento celular en torno al 40%. A partir de esta concentración y superiores, el efecto del fármaco comenzó a ser más notable en las distintas líneas celulares; pero en contraposición al efecto de 5-FU, IRI fue más eficaz y se necesitó menor concentración de fármaco para disminuir el 50% del crecimiento celular. Entre 1-10 μ M de IRI la disminución de la proliferación celular empezó a ser más destacada (Figura 34). Seleccionando una concentración de 10 μ M de IRI, se pudo hacer una distinción entre células resistentes al fármaco, aquellas cuya IC_{50} supera 10 μ M de IRI (Caco-2, HCT-15 y DLD-1) y líneas celulares sensibles, cuya IC_{50} es inferior a la concentración citada (HGUE-C-1, Colo 201, LoVo, LS 174T, HCT 116, HT29, Colo 320, SW480 y SW620) (Tabla 10).

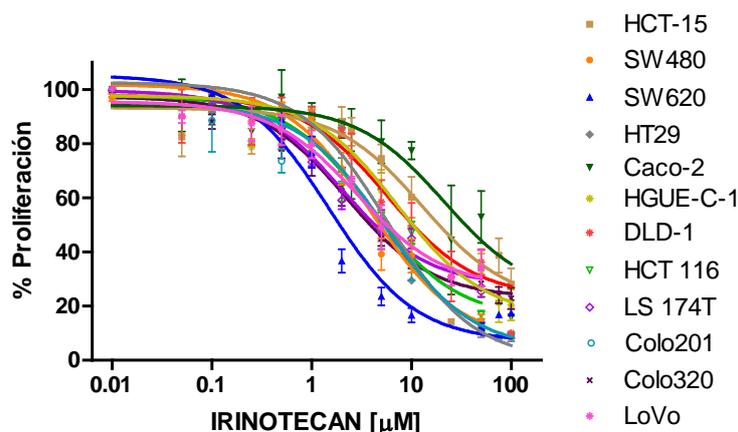


Figura 34. Proliferación de líneas celulares establecidas de cáncer colorrectal tratadas con Irinotecan. Las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de IRI. La proliferación celular fue determinada como indica Materiales y Métodos. En la gráfica se representa el promedio de la proliferación \pm EEM ($n \geq 4$).

Línea celular	IC ₅₀ (μM)	EEM
Caco-2	23,37	5,47
HCT-15	14,91	2,70
DLD-1	10,96	1,59
HGUE-C-1	9,12	2,45
Colo 201	8,47	0,97
LoVo	5,33	0,92
LS 174T	5,23	0,40
HCT 116	5,22	0,36
HT29	4,77	0,26
Colo 320	4,60	0,23
SW480	4,27	0,41
SW620	3,29	0,15

Tabla 10. Valores de IC₅₀ (μM) de inhibición de la proliferación celular causado por Irinotecan en líneas celulares establecidas de cáncer colorrectal. Estos datos reflejan el promedio de al menos 4 experimentos ± EEM.

Se analizó el potencial efecto antiproliferativo de IRI en varios cultivos primarios (Figura 35). Se puede apreciar que aun con una concentración de 50 μM de fármaco, no se consiguió disminuir la proliferación celular más de un 30%. Por tanto, el fármaco IRI parece tener mayor efecto antiproliferativo en las líneas celulares establecidas que en los cultivos primarios estudiados.

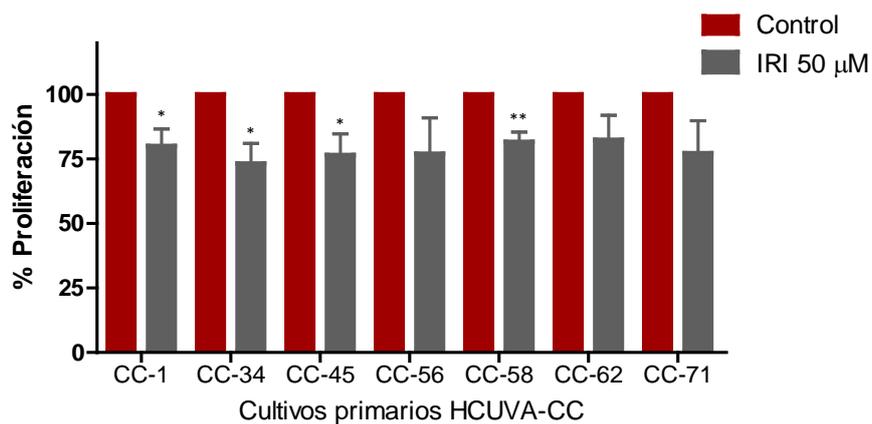


Figura 35. Proliferación de cultivos primarios tratados con 50 μM de Irinotecan. En la gráfica se representa el promedio de la proliferación ± EEM (n≥3). Valor de P calculado mediante el test estadístico, *t* de Student, *P<0,05, **P<0,01.

1.3.2 CRECIMIENTO INDEPENDIENTE DE ANCLAJE

Para analizar la capacidad de crecimiento independiente de anclaje de diversas líneas celulares frente a IRI, se escogieron cuatro líneas celulares atendiendo al diferente efecto que IRI producía sobre ellas: Caco-2, HCT-15, DLD-1 y LS 174T.

La línea celular Caco-2, clasificada como resistente frente a 10 μM de IRI, se comportó de manera similar que en los ensayos de crecimiento dependiente de anclaje, consiguiéndose una inhibición del crecimiento del $21,72 \pm 15,64\%$, al ser expuesta a dicha concentración. Al someter esta línea a una concentración de 50 μM se consiguió una proliferación celular únicamente del $14,35 \pm 0,69\%$, que contrasta con un crecimiento superior al 50% obtenido en crecimiento dependiente de anclaje. Las líneas celulares HCT-15 y DLD-1, también catalogadas como resistentes a 10 μM de IRI, no sobrevivieron a dicha concentración y se produjo una disminución de la proliferación significativa con respecto a la condición control. La línea celular LS 174T, sensible en experimentos de proliferación dependiente de anclaje, posee una mayor sensibilidad al tratamiento al ser expuesta durante un mayor periodo de tiempo, consiguiendo una inhibición del crecimiento aun con concentraciones de 1 μM (Figura 36).

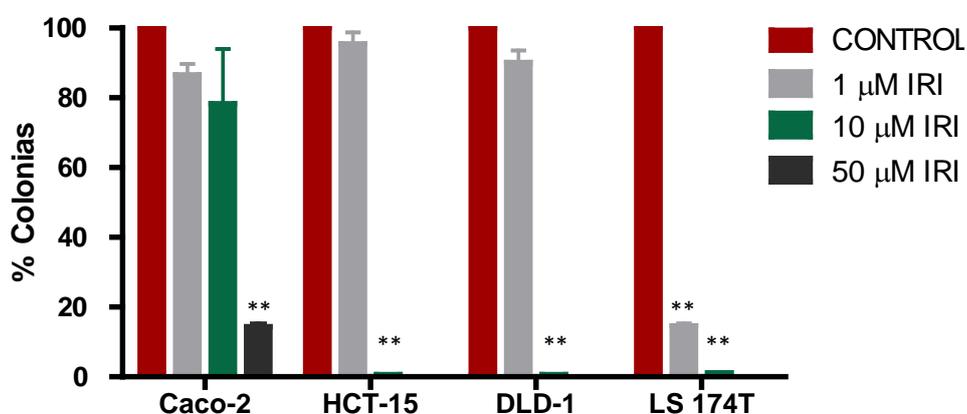


Figura 36. Efecto de Irinotecan sobre la proliferación independiente de anclaje en líneas celulares establecidas de cáncer colorrectal. El valor 100% pertenece al número mayor de colonias formadas en la condición control. En la gráfica se representa el promedio de la proliferación \pm EEM ($n \geq 3$). Valor de P calculado mediante el test estadístico, *t* de Student, $**P < 0,01$.

Estos experimentos se repitieron con dos cultivos primarios, HCUVA-CC-1 y CC-34. Con una concentración 50 μM del fármaco IRI se consiguió una inhibición del crecimiento de los cultivos del $77,1 \pm 4,4\%$ en HCUVA-CC-1 y una reducción del crecimiento del $86,0 \pm 7,4\%$ en HCUVA-CC-34 (Figura 37). Estos resultados contrastan con los obtenidos de los ensayos de crecimiento dependiente de anclaje, y del mismo modo que ocurría con 5-FU, el efecto

antiproliferativo de IRI en líneas establecidas y en cultivos primarios fue superior en crecimiento independiente de anclaje.

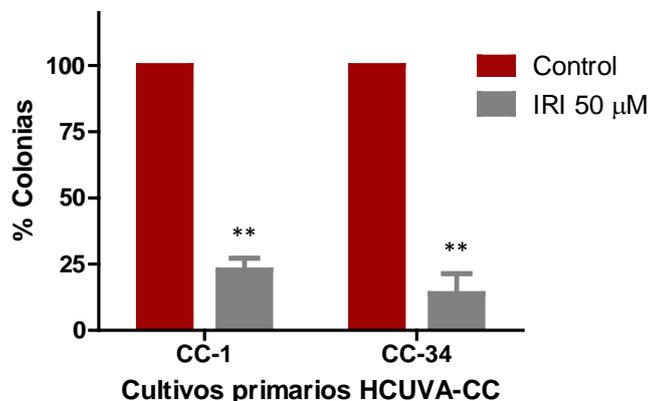


Figura 37. Efecto de Irinotecan sobre la proliferación independiente de anclaje en HCUVA-CC-1 y CC-34. El valor 100% corresponde al número de colonias formadas en la condición control. En la gráfica se representa el promedio de la proliferación \pm EEM ($n \geq 3$). Valor de P calculado mediante el test estadístico, *t* de Student, $**P < 0,01$.

1.4 EFECTOS DEL FÁRMACO SN-38

1.4.1 CRECIMIENTO DEPENDIENTE DE ANCLAJE

Del mismo modo que se analizó el efecto antiproliferativo de Irinotecan, se realizaron experimentos de crecimiento dependiente de anclaje en un amplio panel de líneas celulares de CCR frente al metabolito activo de IRI, SN-38, utilizando concentraciones crecientes, desde 1 nM hasta 50 µM.

Como se puede comprobar en la Figura 38, este fármaco ejerció un efecto antiproliferativo muy eficaz. En todas las líneas celulares se consiguió inhibir el crecimiento celular por encima del 50%. Centrándonos en las líneas celulares catalogadas con menor sensibilidad frente a IRI; concretamente la línea celular Caco-2 es la que necesitó una mayor concentración de fármaco para conseguir una disminución del crecimiento celular, y aun así con una concentración de 1 µM de SN-38, su proliferación es del $39,65 \pm 8,60\%$. Debido a esto, todas las líneas celulares de CCR estudiadas han sido consideradas sensibles al tratamiento con SN-38. La IC_{50} calculada para todas las líneas celulares está en torno a 30-40 nM de SN-38, aunque para Caco-2 esta concentración es ligeramente superior, 79 nM de SN-38 (Tabla 11).

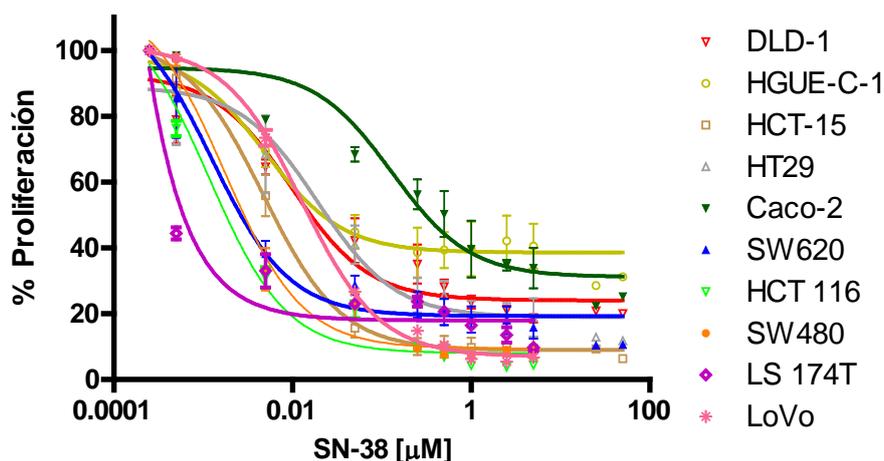


Figura 38. Proliferación de líneas celulares establecidas de cáncer colorrectal tratadas con SN-38. Las células fueron tratadas con concentraciones crecientes. La proliferación celular se determinó como indica Materiales y Métodos. En la gráfica se representa el promedio de la proliferación \pm EEM ($n \geq 3$).

Línea celular	IC ₅₀ (nM)	EEM
Caco-2	79,65	7,83
HGUE-C-1	46,20	7,75
DLD-1	44,62	10,09
HT29	43,27	8,10
SW620	34,51	2,85
LoVo	34,12	1,00
LS 174T	32,51	0,58
SW480	32,37	2,86
HCT 116	31,79	1,84
HCT-15	30,37	2,11

Tabla 11. Valores de IC₅₀ (nM) de inhibición de la proliferación celular causado por SN-38 en líneas celulares establecidas de cáncer colorrectal. Estos datos reflejan el promedio de al menos 3 experimentos \pm EEM.

1.4.2 CRECIMIENTO INDEPENDIENTE DE ANCLAJE

El estudio de crecimiento celular independiente de anclaje con el fármaco SN-38 se realizó exclusivamente con los cultivos primarios HCUVA-CC-1 y CC-34, dado que el efecto en las líneas celulares fue muy elevado en ensayos anteriores. Como se puede valorar en la Figura 39, con una concentración de 5 μ M de SN-38 se consiguió disminuir el crecimiento celular de forma significativa con respecto a la condición control, obteniendo una proliferación celular en forma de colonias del $51,91 \pm 5,15\%$ en HCUVA-CC-1 y únicamente del $6,05 \pm 1,57$ en HCUVA-CC-34.

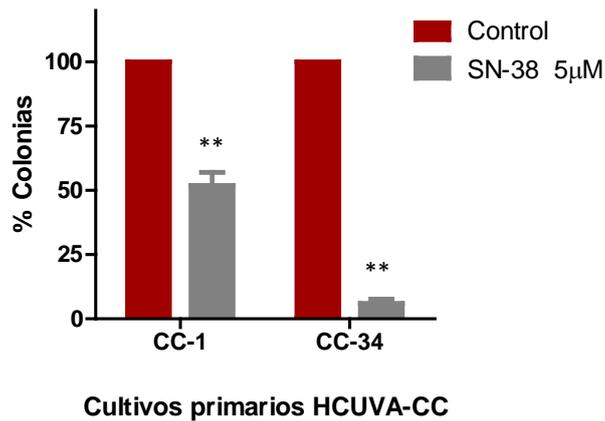


Figura 39. Efecto de SN-38 sobre la proliferación independiente de anclaje en HCUVA-CC-1 y CC-34. El valor 100% corresponde al número de colonias formadas en la condición control. En la gráfica se representa el promedio de la proliferación \pm EEM ($n \geq 3$). Valor de P calculado mediante el test estadístico, *t* de Student, $**P < 0,01$.

1.5 EFECTOS DEL FÁRMACO OXALIPLATINO

1.5.1 CRECIMIENTO DEPENDIENTE DE ANCLAJE

Para comenzar el estudio del quimioterápico Oxaliplatino (OXA), se analizó su posible efecto antiproliferativo sobre un panel de líneas celulares humanas de cáncer colorrectal. Los primeros ensayos que se realizaron fueron experimentos de crecimiento dependiente de anclaje, donde un panel de líneas celulares de CCR fueron tratadas con concentraciones crecientes de OXA desde 1 nM hasta 100 µM.

El efecto de este quimioterápico, del mismo modo que ocurría con los demás, fue dependiente de la concentración. Además, estos resultados revelan una clara diferencia entre las líneas celulares estudiadas (Figura 40). El efecto del fármaco comenzó a ser notable a partir de concentraciones superiores a 1 µM de OXA; a excepción de las líneas celulares SW480 y SW620, donde el crecimiento descendió en torno al 50%, incluso a concentraciones inferiores. A partir de esta concentración, algunas líneas celulares comenzaron a ser más sensibles al tratamiento. De hecho, al tratar a las células con concentraciones superiores (10 µM), se observa un perfil diferente entre ellas. Teniendo en cuenta esta concentración, las líneas celulares se han clasificado en sensibles, aquellas cuya proliferación se vió afectada notablemente a concentraciones menores de 10 µM, y menos sensibles o resistentes, en las cuales se obtuvo un crecimiento mayor del 50% a concentraciones mayores de 10 µM. En este contexto, las líneas celulares tumorales HCT-15 y DLD-1 se consideran resistentes a OXA, alcanzando solamente una reducción de su proliferación celular de un 29% y 32%

respectivamente, a la concentración de 10 μM de OXA. El resto de líneas celulares estudiadas son consideradas como sensibles al fármaco: SW620, SW480, HCT 116, LS 174T, Caco-2, HGUE-C-1, HT29, Colo 201, Colo 320 y LoVo. Con estos resultados, se calculó para cada línea celular y experimento el valor medio de IC_{50} (Tabla 12), que refleja la concentración media máxima de fármaco que inhibe el 50% del crecimiento celular.

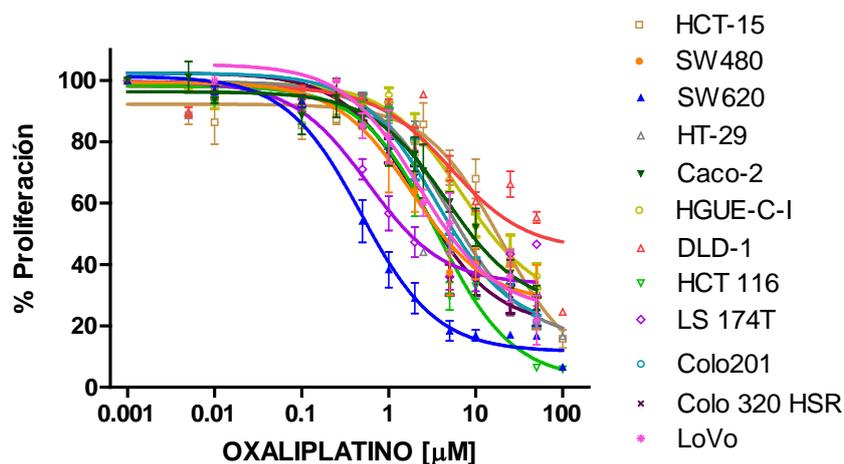


Figura 40. Proliferación de líneas celulares establecidas de cáncer colorrectal tratadas con Oxaliplatino. Las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de OXA. La proliferación celular se determinó como se describe en Materiales y Métodos. En la gráfica se representa el promedio de la proliferación \pm EEM ($n \geq 4$).

Línea celular	IC_{50} (μM)	EEM
DLD-1	14,38	0,70
HCT-15	13,90	3,24
HGUE-C-1	6,92	0,77
CaCo2	6,52	0,44
LoVo	6,05	1,61
HT29	5,65	0,48
Colo201	4,76	0,24
Colo320	3,95	0,32
SW480	3,85	0,77
HCT 116	3,57	0,90
SW620	3,07	0,12
LS 174T	1,94	0,15

Tabla 12. Valores de IC_{50} de inhibición de la proliferación celular por Oxaliplatino en líneas celulares establecidas de cáncer colorrectal. La tabla representa los valores de IC_{50} (μM) obtenidos para cada línea celular. Estos datos muestran el promedio de al menos 4 experimentos \pm EEM.

Tras analizar el efecto antiproliferativo de OXA en las líneas celulares establecidas, se realizaron los mismos experimentos en los cultivos primarios derivados de pacientes con CCR. Las condiciones del ensayo fueron las mismas que para las líneas celulares establecidas. En este caso, como se puede observar en la Figura 41, en la mayoría de los cultivos primarios fue necesaria una concentración alta de fármaco para obtener una disminución de su proliferación. Cuando estos cultivos fueron tratados con concentraciones de OXA entre 1 nM y 1 μ M, se observa una inhibición de la proliferación menor al 15% en todos ellos. Sin embargo, el cultivo primario HCUVA-CC-34 respondió excepcionalmente a concentraciones inferiores a 1 μ M, consiguiéndose una inhibición del crecimiento de un 30%. No obstante, al aumentar la concentración del fármaco, incluso hasta 50 μ M, no se consiguió un mayor descenso de la proliferación.

Conforme se aumenta la concentración del fármaco, los cultivos primarios se comportaron de manera diferente, sobre todo al utilizar la máxima concentración de 50 μ M. Seleccionando una concentración de 10 μ M, al igual que en el ensayo con líneas celulares establecidas, se podría realizar una clasificación en cultivos sensibles (HCUVA-CC-1, CC-3CT y CC-34) y resistentes (HCUVA-CC-1CT, CC-56, CC-60, CC-62 y CC-71); logrando en estos últimos una inhibición del crecimiento menor del 50%.

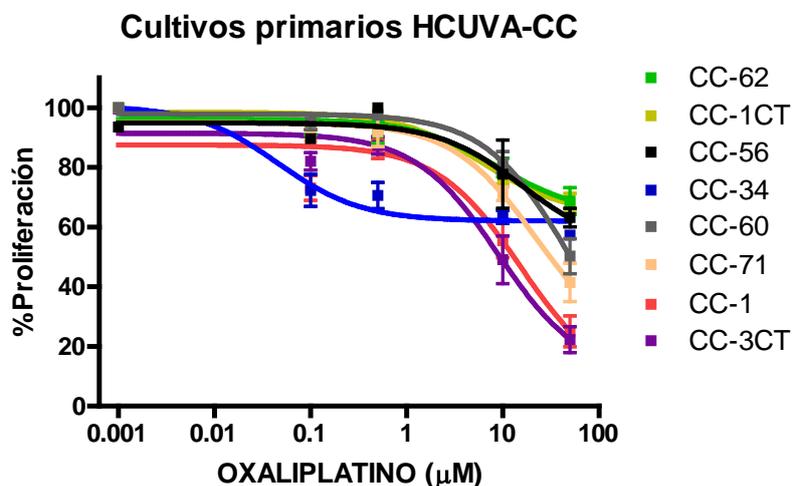


Figura 41. Proliferación de cultivos primarios derivados de pacientes con cáncer colorrectal tratados con Oxaliplatino. Las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de OXA. La proliferación celular fue determinada como indica Materiales y Métodos. En la gráfica se representa el promedio de la proliferación \pm EEM ($n \geq 4$).

1.5.2 CRECIMIENTO INDEPENDIENTE DE ANCLAJE

Para evaluar cómo afecta el fármaco OXA en la formación de colonias, se eligieron seis líneas celulares establecidas con respuestas dispares a este quimioterápico. Estas líneas celulares fueron: DLD-1 y HCT-15 como líneas celulares resistentes y HCT 116, LS 174T, SW480 y SW620 como líneas celulares sensibles. Una primera aproximación mostró que la línea celular SW480 no era capaz de formar colonias en agar blando, por lo que se descartó para el experimento. Las demás líneas celulares fueron tratadas con una concentración de OXA 10 μ M durante 14 días. Al analizar estos resultados, comprobamos cómo en la línea celular DLD-1 no se obtuvo una disminución en el número de colonias tras el tratamiento. Sin embargo, en la línea celular HCT-15, la formación de colonias se redujo a un $68,26 \pm 1,58\%$. En las líneas sensibles se consiguió un descenso significativo en el número de colonias con respecto al control; así en las líneas LS 174T, HCT 116 y SW620, esta proliferación se ve reducida al $9,30 \pm 3,12\%$, $7,96 \pm 2,52\%$ y $1,29 \pm 0,98\%$, respectivamente. Estos resultados corroboraron el resultado obtenido de inhibición de la proliferación celular dependiente de anclaje descrito anteriormente (Figura 42).

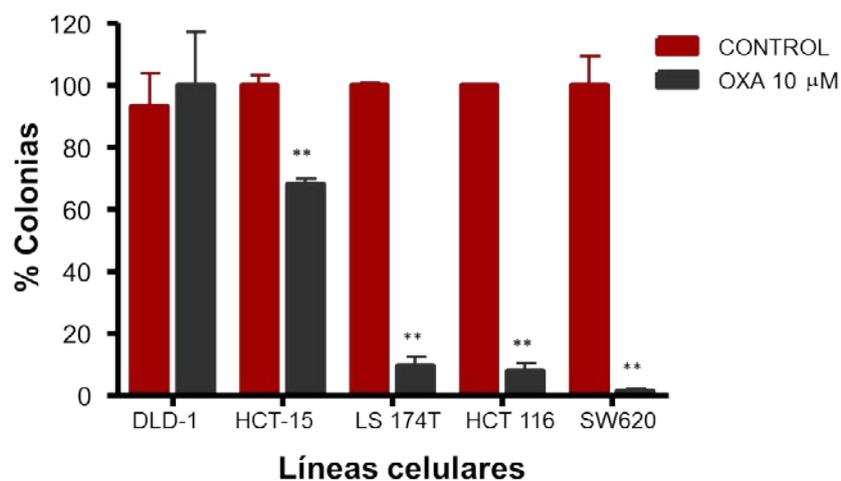


Figura 42. Efecto de Oxaliplatino sobre la proliferación independiente de anclaje en líneas celulares establecidas de cáncer colorrectal. El valor 100% corresponde al número de colonias formadas en la condición control. En la gráfica se representa el promedio de la proliferación \pm EEM ($n \geq 3$). Valor de P calculado mediante el test estadístico, *t* de Student, $**P < 0,01$.

Al igual que en los experimentos de proliferación celular dependiente de anclaje, se decidió comprobar la capacidad de formación de colonias que tenían los cultivos primarios al ser tratados con OXA (Figura 43). El resultado de estos experimentos mostró como en los cultivos HCUVA-CC-1 y CC-3CT se disminuía la formación de colonias de forma llamativa, al responden con mayor intensidad al tratamiento cuando eran tratados durante 14 días.

HCUVA-CC-34, cuya capacidad de respuesta se quedaba en torno al 50% en el ensayo de proliferación dependiente de anclaje, responde de igual manera en ensayos de *soft agar*, concretamente se consigue un $54,62 \pm 7,33\%$ de crecimiento. En el cultivo HCUVA-CC-56, donde reducía su crecimiento en torno a un 20% en ensayos de proliferación dependiente de anclaje, se consigue disminuir el número de colonias formadas de forma similar. Finalmente, en el cultivo HCUVA-CC-71, el crecimiento independiente de anclaje alcanzó el $74,56 \pm 6,8\%$, lo que coincide con los resultados obtenidos en los experimentos de crecimiento celular dependiente de anclaje, donde el cultivo disminuía su crecimiento un $28,83 \pm 2,27\%$. Todos estos resultados validaron los obtenidos en el experimento de crecimiento dependiente de anclaje.

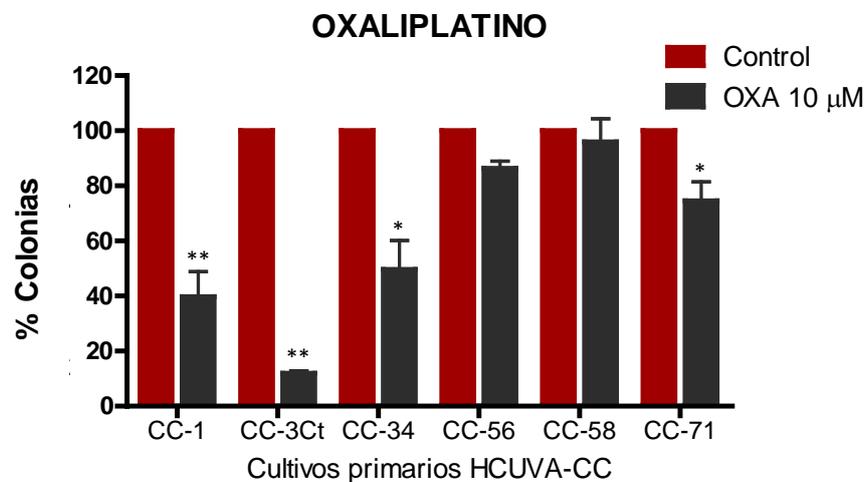


Figura 43. Efecto de Oxaliplatino sobre la proliferación independiente de anclaje en cultivos primarios. El valor 100% corresponde al número de colonias formadas. En la gráfica se representa el promedio de la proliferación \pm EEM ($n \geq 3$). El valor de P se calculó mediante el test estadístico *t* de Student (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$).

Para una mejor visualización del ensayo, se muestra en la Figura 44 el efecto de OXA sobre la formación de colonias en un cultivo primario. Concretamente, para el cultivo HCUVA-CC-1 se utilizaron concentraciones de 10 y 50 µM, obteniéndose un descenso en el número de colonias del $60,23 \pm 9,05$ y $97,5 \pm 0,17\%$ respectivamente.

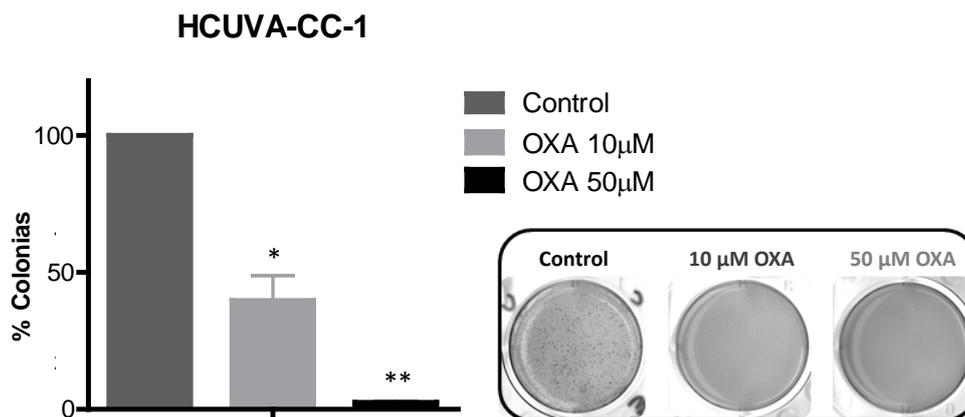


Figura 44. Efecto de Oxaliplatino en HCUVA-CC-1. Se muestra el porcentaje de colonias formadas con concentraciones de OXA 10 y 50 μ M, y una fotografía del efecto de OXA en el número de colonias. El valor 100% corresponde al número de colonias formadas en la condición control. Estos datos muestran el promedio de al menos 3 experimentos \pm EEM. El valor de P se calculó mediante el test estadístico *t* de Student (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$).

2. ANÁLISIS DE LOS MECANISMOS DE DETECCIÓN Y SEÑALIZACIÓN DEL DAÑO EN EL ADN

2.1 NIVELES DE EXPRESIÓN DEL COMPLEJO MRN

El complejo MRN, formado por las proteínas MRE11, Rad50 y NBS1, inicia la cascada de señalización del daño en el ADN. Dicho complejo detecta la alteración producida y se une a la cadena de ADN para posteriormente transmitir esta información a la proteína ATM (151).

Para comprobar si las líneas celulares establecidas de CCR eran capaces de responder a las alteraciones en la cadena de ADN que los fármacos utilizados en este estudio podrían provocar, se analizó el nivel de expresión de las tres proteínas del complejo MRN por ensayos de Western Blot.

El análisis reveló que las líneas celulares estudiadas expresan diferentes niveles de las proteínas del complejo MRN. Como se puede observar en la Figura 45, el nivel de expresión de dichas proteínas es prácticamente inexistente en las líneas celulares HCT 116 y LS 174T que en el resto de líneas celulares. De hecho, estas dos líneas celulares poseen una mutación conocida en el gen que codifica una de las tres proteínas del complejo, *MRE11*. Estos resultados indican que estas dos líneas celulares no son capaces de formar el complejo inicial necesario para la activación posterior de ATM y los siguientes pasos en las vías de señalización del daño en la cadena de ADN. La línea celular SW620 mostró un nivel de expresión de NBS1 inferior al resto.

Su capacidad de respuesta se estudió en ensayos posteriores, al no conocerse mutaciones asociadas a dicho gen. El resto de líneas celulares estudiadas expresan las tres proteínas y por tanto pueden responder los efectos de los fármacos en la cadena de ADN (Figura 45).

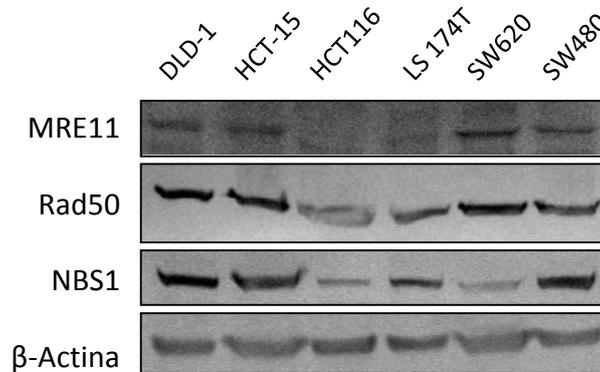


Figura 45. Nivel de expresión de las proteínas del complejo MRN (MRE11, Rad50 y NBS1) en líneas celulares establecidas. Se analizó la expresión de las proteínas por Western Blot como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. Se muestra una imagen representativa de este experimento, realizado tres veces.

Además de realizar estudios con las líneas celulares establecidas, también se decidió comprobar si los cultivos primarios con los que trabajábamos expresaban las proteínas del complejo MRN y por tanto tenían capacidad para iniciar la respuesta a roturas en la cadena de ADN (Figura 46). Por experimentos de Western Blot evidenciamos que los cuatro cultivos estudiados expresaban las tres proteínas aunque con variación en los niveles de expresión de estas, apareciendo niveles bajos de expresión de Rad50 en HCUVA-CC-1 y de NBS1 en HCUVA-CC-71. Aun con diferente nivel de expresión, pueden iniciar la activación de las rutas de señalización consecuencia de los efectos dañinos de los fármacos en la cadena de ADN.

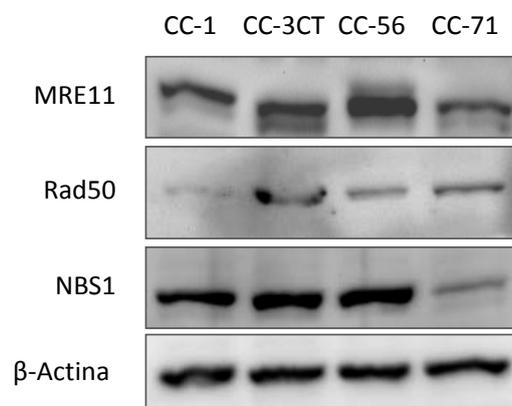


Figura 46. Nivel de expresión de las proteínas del complejo MRN (MRE11, Rad50 y NBS1) en los cultivos primarios. Se analizó la expresión de las proteínas por Western Blot. Los anticuerpos utilizados fueron: Rad50, MRE11, NBS1 y β -actina, como control interno.

2.2 NIVELES DE FOSFORILACIÓN (SERINA 139) DE LA HISTONA H2A.X TRAS EL TRATAMIENTO CON OXALIPLATINO

Para comprobar el estado de fosforilación de la histona H2A.X tras el tratamiento con OXA, las células se sometieron a dicho tratamiento y se analizaron los niveles de γ H2AX por citometría de flujo. En las líneas celulares DLD-1 y HCT-15, que no respondían a OXA en experimentos de proliferación al ser tratadas con OXA 10 μ M durante 24, 48 y 72 horas, no se vió incrementada de manera significativa la cantidad de histona H2A.X fosforilada (γ H2AX) después de dicho tratamiento. En cambio, en las líneas celulares SW480 y SW620, se produjo un mayor porcentaje de células marcadas con γ H2AX, incluso tras sólo 24 horas de exposición. La activación de la histona confiere a las células la capacidad para continuar con los primeros pasos en la activación de las rutas de señalización tras el daño en la cadena de ADN.

Por el contrario, observamos cómo en las líneas celulares sensibles HCT 116 y LS 174T, aun disminuyendo la proliferación celular con una concentración de OXA 10 μ M, no se apreció incremento en el número de células marcadas con γ H2AX. Al no haber un incremento de la cantidad de histona H2A.X fosforilada, ésta no se une al complejo MRN impidiendo la progresión de señalización de roturas en la cadena de ADN (Figura 47).

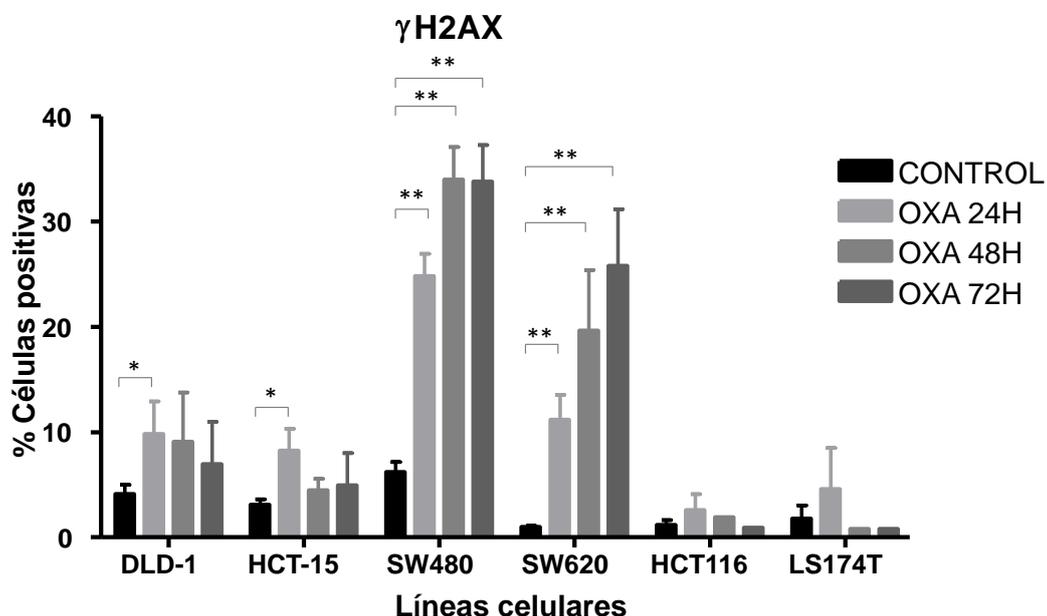


Figura 47. Efecto de Oxaliplatino en la fosforilación de la histona H2AX (γ H2AX). Las células fueron tratadas con OXA durante los tiempos indicados, fijadas e incubadas con el anticuerpo anti- γ H2AX y Alexa fluor 488. El porcentaje de células marcadas con γ H2AX se determinó por citometría de flujo y fue estadísticamente superior en los tratamientos de las líneas celulares SW480 y SW620 (*t* de Student, * $P < 0,5$; ** $P < 0,01$).

Tras los experimentos con las líneas celulares establecidas, se analizaron los niveles de fosforilación (Ser139) de la histona H2A.X en los cultivos primarios. Como se observa en la Figura 48, no había grandes diferencias de respuesta a OXA entre ellos. Los cuatro cultivos estudiados respondieron de igual manera al fármaco; se produjo un incremento de células positivas marcadas con γ H2AX, que se fue incrementando conforme aumenta el tiempo de exposición. Esto indica que todos ellos, aun con diferencias de sensibilidad y resistencia frente al fármaco, son capaces de responder, en principio, a roturas del ADN, activando rutas de señalización del daño en la doble hélice. En HCUVA-CC-71 se observa la misma tendencia que en los demás cultivos, aun habiéndose realizado un único experimento y no haberse podido realizar análisis estadístico, debido a que el cultivo no perduró lo suficiente para poder repetir estos experimentos.

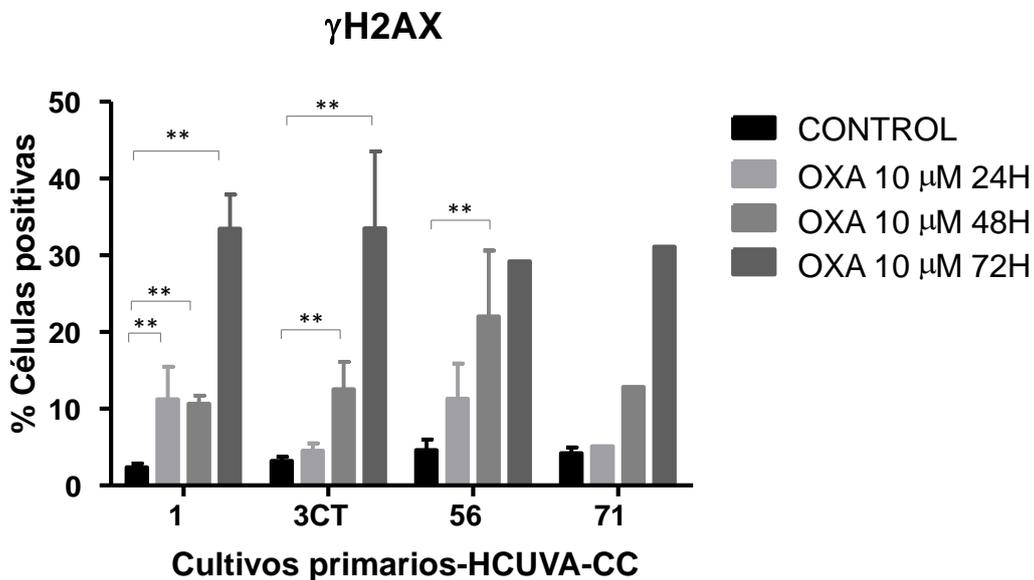


Figura 48. Efecto de Oxaliplatino en la fosforilación de la histona H2AX (γ H2AX) en cultivos primarios. El porcentaje de células marcadas con γ H2AX se determinó por citometría de flujo y fue estadísticamente superior en los tratamientos de los cultivos primarios HCUVA-CC-1, CC-3CT y CC-56 (*t* de Student, ** $P < 0,01$). N=3., En HCUVA-CC-71 se realizó un solo ensayo.

2.3 EFECTOS DE OXALIPLATINO EN LAS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN DEL DAÑO EN EL ADN

Para continuar el estudio de las vías moleculares de señalización del daño, las líneas celulares fueron tratadas con 10 μ M de OXA durante 24 horas. Se analizaron las proteínas pertenecientes a las rutas de señalización por experimentos de Western Blot.

En primer lugar, se analizaron las vías de señalización de las líneas celulares sensibles SW480 y SW620. En ambos casos se obtuvo el mismo resultado. El fármaco OXA es capaz de continuar activando las vías de señalización del daño. Como se aprecia en la Figura 49, tras el tratamiento con OXA, en primer lugar se produce la fosforilación en serina 1981 de la proteína ATM, la cual se unirá al complejo MRN para amplificar la señal de daño en doble cadena. Posteriormente, una vez activa, esta proteína ATM es capaz de fosforilar a las proteínas Chk1 y Chk2 en serina 345 y treonina 68, respectivamente. Se analizó el nivel de fosforilación en serina 428 de ATR, que no se vio modificado por la administración del fármaco.

Ambas proteínas, Chk1 y Chk2 ya activas, promueven la fosforilación de las fosfatasa Cdc25A y Cdc25C respectivamente. La consecuencia de la fosforilación de Cdc25A es la disminución de los niveles de proteína total debido a su ubiquitinación, apreciado en SW480. Cdc25C fosforilada aporta el sitio de unión para 14-3-3 a Cdc25C que la secuestra en el citoplasma, y contribuye a su degradación por el proteosoma, por lo que la cantidad de proteína total disminuye, como se observa en la Figura 49.

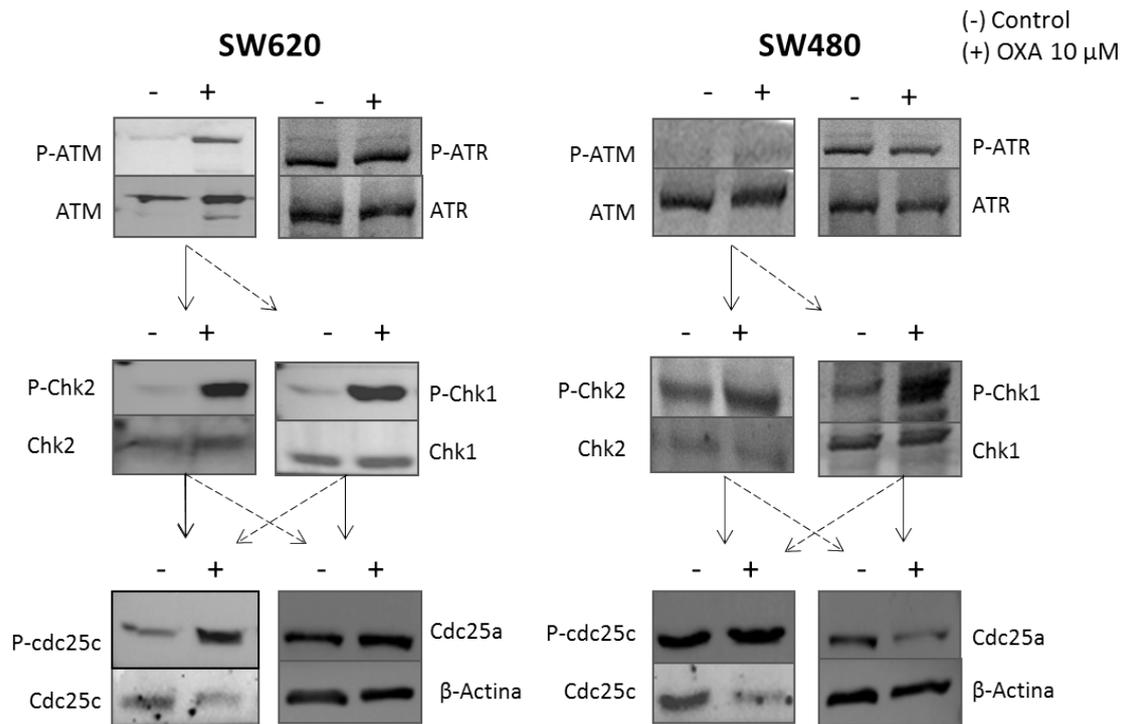


Figura 49. Expresión de las proteínas de las vías de señalización del ADN de las líneas celulares SW480 y SW620. Las células fueron sembradas y tratadas con OXA durante 24 horas. Los extractos proteicos fueron analizados por Western Blot utilizando los anticuerpos indicados. β -actina se utilizó como control interno.

En las líneas celulares HCT 116 y LS 174T (Figura 50), ambas sensibles a 10 μ M de OXA (Figura 40), al ser tratadas con el fármaco, no se produce fosforilación y por tanto activación de las dos proteínas implicadas en el inicio de señalización y reparación del daño en cadena sencilla y cadena doble, ATR y ATM respectivamente. Sin embargo, la proteína Chk2, siguiente etapa de la vía de señalización, sí que se encuentra activada por fosforilación de treonina 68 tras el tratamiento. Consecuentemente, Chk2 inhibe la defosforilación de la fosfatasa Cdc25C, lo que conlleva la disminución de los niveles de expresión de Cdc25C total. Otra consecuencia es la inhibición de la fosfatasa Cdc25A, reflejada en el menor nivel de expresión de la proteína, provocado por su degradación por el proteosoma.

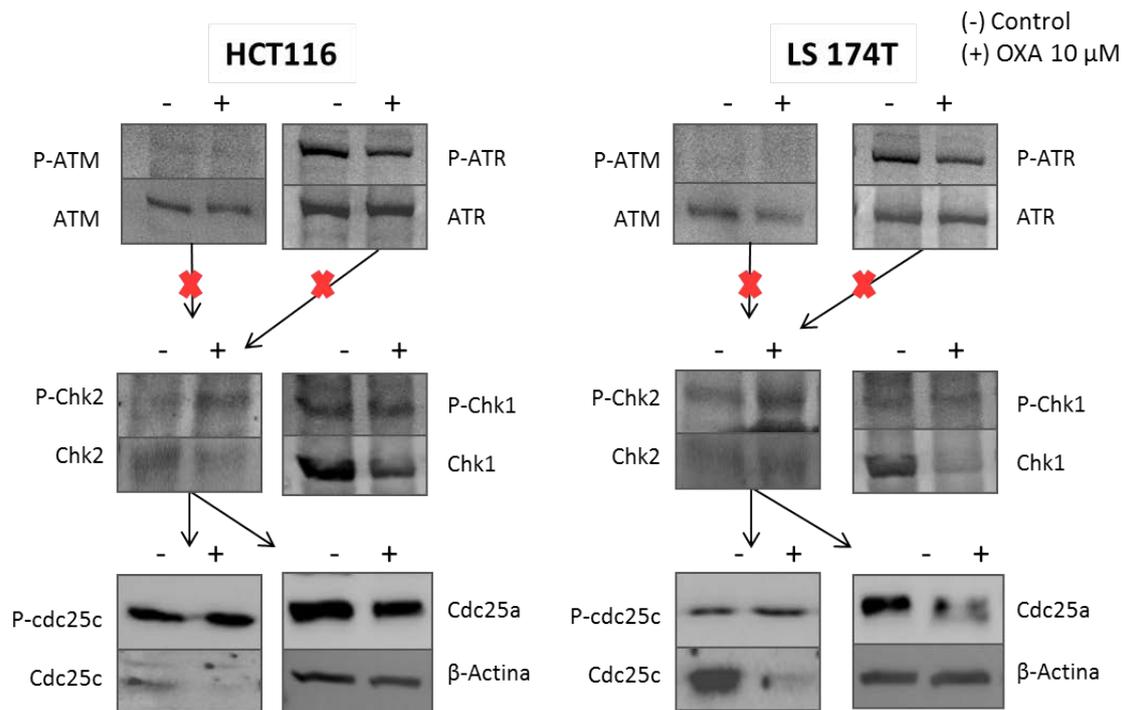


Figura 50. Expresión de las proteínas de las vías de señalización del ADN de las líneas celulares HCT 116 y LS 174T. Las células se sembraron y trataron durante 24 horas con OXA 10 μM. Los extractos proteicos fueron analizados por Western Blot utilizando los anticuerpos indicados. β-actina se utilizó como control interno.

En ambas líneas celulares, HCT 116 y LS 174T, el gen de *TP53* no presenta mutaciones. La proteína p53 es activada por Chk2 en condiciones de estrés y una de sus funciones es la activación de p21. Comprobamos como tras el tratamiento con OXA 10 μM durante 24 horas se produjo la inducción de p21 en HCT 116 y LS 174T. Sin embargo, en las demás líneas celulares estudiadas, debido a que todas poseen mutaciones en *TP53*, no se consiguió la inducción de p21 tras el tratamiento (Figura 51).

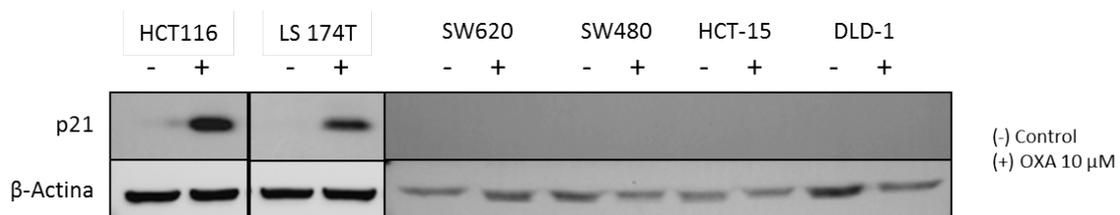


Figura 51. Inducción de p21 tras el tratamiento con Oxaliplatino 10 μM durante 24 horas. Los extractos proteicos fueron analizados por Western Blot utilizando un anticuerpo anti-p21. β-actina se utilizó como control interno.

Finalmente, se analizó la respuesta de las líneas celulares DLD-1 y HCT-15, a OXA 10 μ M durante 24 horas. Estas dos líneas poseen resistencia a OXA, determinado en ensayos de proliferación dependiente e independiente de anclaje (Figura 40 y Figura 42). Se observa cómo al someterlas al tratamiento, no se consigue una activación de las primeras proteínas de la ruta, ATM y ATR (Figura 52). Aun así, el siguiente escalón de la vía de señalización, la proteína checkpoint Chk1, sí que se ve afectada por el tratamiento y se activa por medio de fosforilación de serina 345. En este caso, Chk1, no consigue por sí sola la fosforilación de las fosfatasa Cdc25A y Cdc25C, y por tanto no se produce una disminución en el nivel de expresión total de dichas proteínas.

Cabe mencionar que ambas líneas celulares, DLD-1 y HCT-15, provienen del mismo paciente con CCR y son portadores de mutaciones en el gen que codifica la proteína Chk2 (189). Dichas mutaciones provocan la formación de una proteína no funcional, haciendo que no sea capaz de fosforilarse y por tanto activarse por ATM y/o ATR.

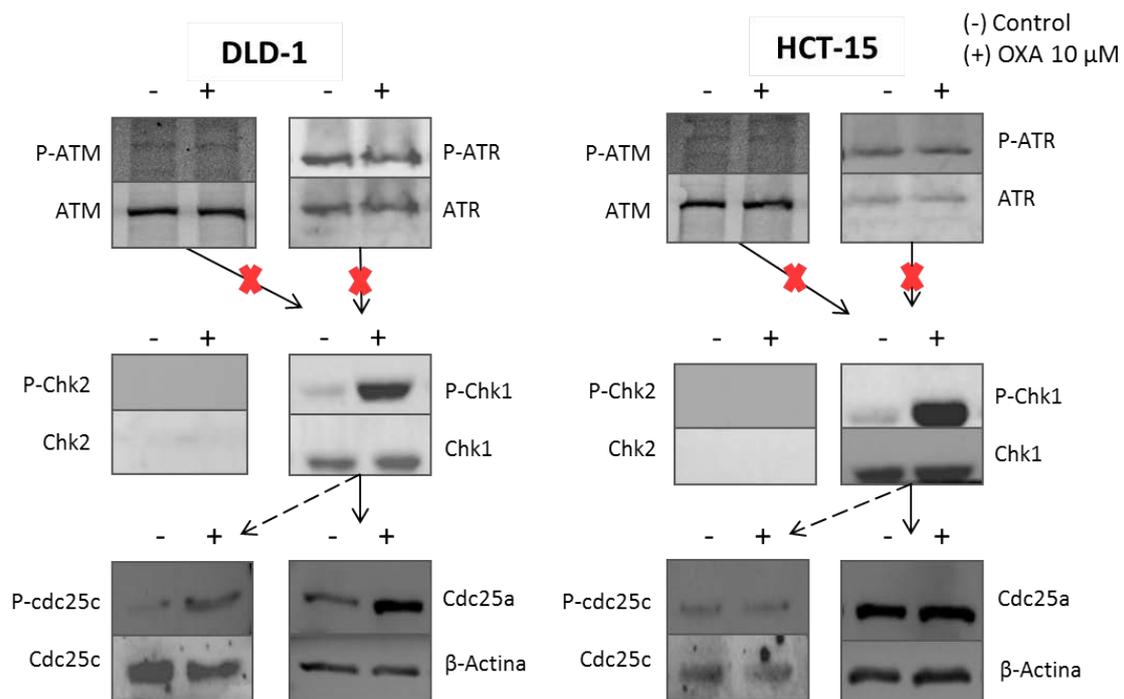


Figura 52. Expresión de las proteínas de las vías de señalización del ADN de las líneas celulares DLD-1 y HCT-15. Las células fueron sembradas y tratadas durante 24 horas con OXA 10 μ M. Los extractos proteicos obtenidos fueron examinados por Western Blot, utilizando los anticuerpos indicados. Como control de carga, se utilizó β -actina.

2.4 EFECTOS DE OXALIPLATINO EN EL CICLO CELULAR

Con el objetivo de conocer el efecto de OXA sobre la replicación del ADN en las líneas celulares de CCR, se realizaron estudios de distribución de su contenido en las distintas fases del ciclo celular. Para ello, las células fueron tratadas con 10 μM de OXA durante 24, 48 o 72 horas y analizadas mediante citometría de flujo.

En las líneas celulares que han sido consideradas como resistentes tras los experimentos de proliferación, HCT-15 y DLD-1 (Figura 40), el análisis del ciclo celular mostró ligeros cambios en las fases del ciclo. En ambas líneas celulares, como se aprecia en la Figura 53, tras 24 y 48 horas de tratamiento, se produjo una acumulación en la fase S que continúa hasta las 72 horas, sobre todo en la línea HCT-15. Cabe destacar que tras 72 horas de tratamiento, la línea DLD-1 experimentó un pequeño aumento en la fase SubG₁, el cual podría considerarse un signo de apoptosis, debido al largo tiempo de exposición al fármaco, ya que el perfil general de ciclo celular permanece casi inalterado respecto a la condición control sin tratamiento.

Cuando las líneas celulares sensibles son tratadas con el quimioterápico, se producen distintas respuestas. La consecuencia de 24 horas de incubación con el fármaco en las líneas celulares HCT 116 y LS 174T fue un bloqueo en la fase G₂/M, mucho más acusado en la línea celular HCT 116, lo que conduce a una disminución en la proporción de células en la fase G₁. El efecto de acumulación en la fase G₂/M fue máximo tras 72 horas de tratamiento, produciéndose un aumento del bloqueo del 5,8% al 28,03% en la línea celular HCT 116 y del 8,9% al 18,3% en la línea celular LS 174T. En el estudio de las líneas celulares SW480 y SW620 se refleja, tras 24 horas de tratamiento, una acumulación de células en la fase S. A las 48 y 72 horas, ambas líneas celulares respondieron con un aumento muy acentuado en la fase SubG₁ y en la fase G₂/M, destacando este fenómeno en la línea celular SW620 que evolucionó de un 8% a un 38% de bloqueo en fase G₂/M.

El bloqueo observado en las fases S y G₂/M del ciclo celular en dichas líneas celulares sensibles al fármaco OXA es la consecuencia final de la activación de la ruta de señalización del daño en la cadena de ADN.

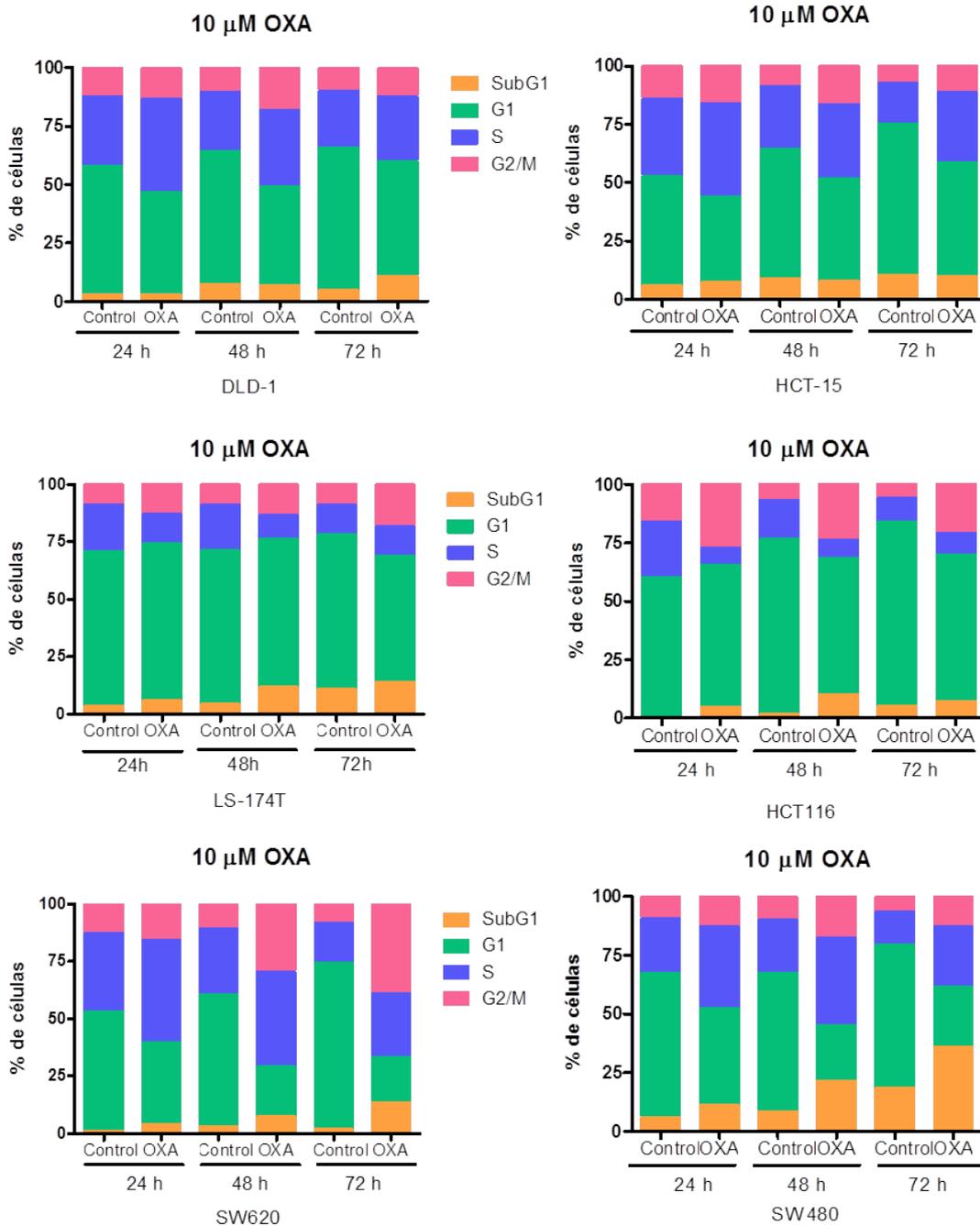


Figura 53. Análisis del contenido de ADN de las distintas fases del ciclo celular (SubG₁, G1, S y G2/M) en las líneas celulares de carcinoma colorrectal. Las células se sembraron y trataron con OXA durante 24, 28 o 72 horas. El contenido de ADN de las distintas fases del ciclo celular fue analizado por citometría de flujo. Estos experimentos se realizaron al menos 3 veces (n≥3).

Estos experimentos de ciclo celular también fueron llevados a cabo con los cultivos primarios derivados de pacientes con CCR. Para ello se escogieron los cultivos HCUVA-CC-1, CC-3CT como cultivos sensibles a 10 μ M de OXA, y los cultivos CC-56 y CC-71 como resistentes.

A pesar del nivel de sensibilidad o resistencia al fármaco OXA, todos los cultivos primarios estudiados tienen la capacidad de activar las rutas de señalización del daño al ADN, que culmina con el bloqueo en una determinada fase el ciclo celular (Figura 54). Concretamente HCUVA-CC-1, sensible a OXA, respondió al tratamiento con un aumento de la fase S tras 24 y 48 horas de exposición al fármaco y evoluciona aumentando la fase SubG₁ a 72 horas de tratamiento. Por otro lado, el resto de cultivos estudiados poseía un comportamiento semejante. A las 24 y 48 horas de tratamiento se aprecia un aumento de la fase S que continúa con un incremento de la fase G₂/M, más pronunciado en el cultivo HCUVA-CC-56 a las 72 horas. El aumento de células en la fase SubG₁ fue más pronunciado a las 72 horas de tratamiento en HCUVA-CC-1, CC-3CT y CC-71.

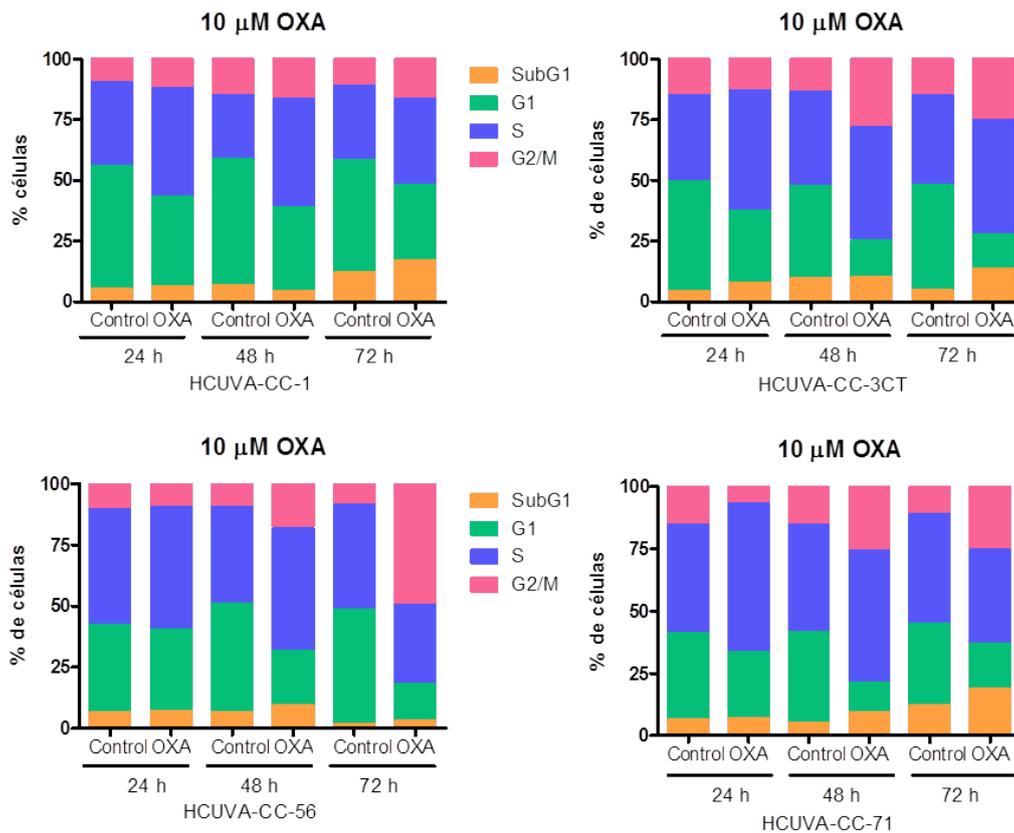


Figura 54. Análisis del contenido de ADN de las distintas fases del ciclo celular (SubG₁, G₁, S y G₂/M) en los cultivos primarios. Las células se sembraron y trataron con OXA durante 24, 28 o 72 horas. El contenido de ADN de las distintas fases del ciclo celular fue analizado por citometría de flujo.

2.5 EFECTO DE OXALIPLATINO EN APOPTOSIS CELULAR

Una de las consecuencias del tratamiento con quimioterápicos es la activación de vías de apoptosis celular. Por ello, además de daño en la cadena de ADN, se comprobó si el fármaco OXA producía dichos fenómenos de apoptosis, mediante el análisis de la fragmentación de la proteína PARP-1. Las líneas celulares DLD-1 y SW480 fueron tratadas con OXA 10 μ M durante 24, 48 o 72 horas. Como se observa en la Figura 55, en la línea celular catalogada como sensible, SW480, se produjo muerte celular que se va incrementando en el tiempo, advertido por la rotura de la proteína PARP-1 en dos fragmentos, de 86 y 24 kDa (no observado en este Western Blot por el bajo porcentaje de poliacrilamida). Sin embargo, en la línea celular donde no se produjo una disminución de la proliferación celular (DLD-1) a esta concentración del fármaco, tampoco se obtuvo fragmentación de PARP-1 tras el tratamiento. Estos resultados coinciden con los obtenidos al analizar las fases del ciclo celular, donde en la línea celular SW480 se producía un aumento células en SubG₁, que no se observó en la línea celular DLD-1.

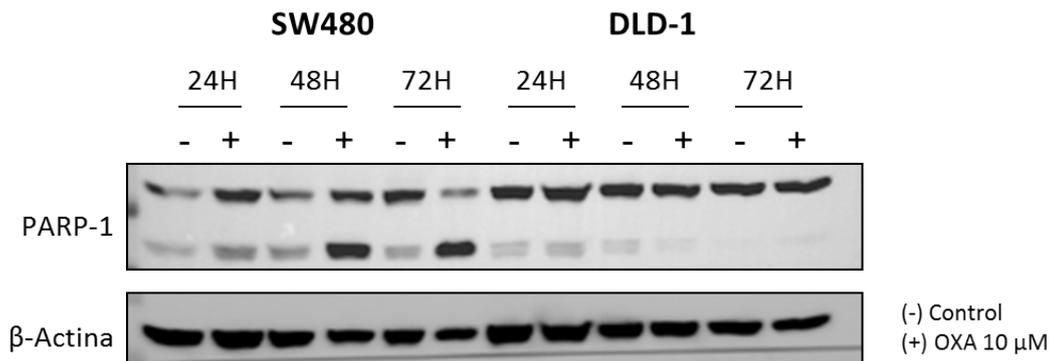


Figura 55. Expresión de la proteína PARP-1 en las líneas celulares SW480 y DLD-1. Las células fueron sembradas y tratadas con OXA durante 24, 48 y 72 horas y los extractos celulares fueron lisados y analizados por Western Blot, utilizando un anticuerpo frente a PARP-1 y β -actina como control de carga.

Asimismo se realizaron experimentos para comprobar si se producía apoptosis celular en varios cultivos primarios. La Figura 56 muestra como en los cultivos HCUVA-CC-1 y CC-3CT, tras un tratamiento de 24 horas apareció un incremento en la fragmentación de la proteína PARP-1, corroborando la sensibilidad que poseen al fármaco. Sin embargo, en HCUVA-CC-71, de baja sensibilidad a OXA, no se observó un incremento notable en la fragmentación de la proteína PARP-1.

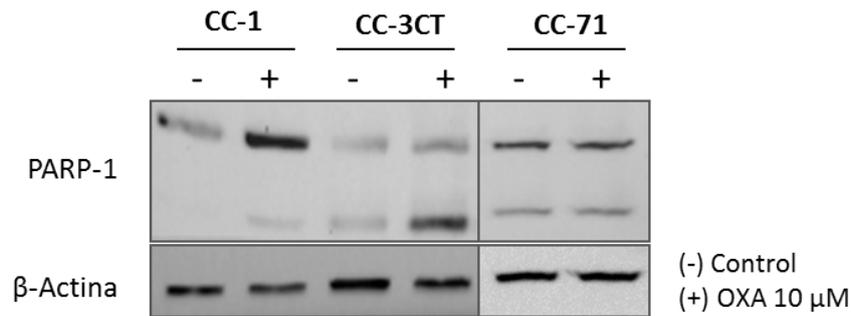


Figura 56. Expresión de la proteína PARP-1 en los cultivos primarios HCUVA-CC-1, CC-3CT y CC-71. Los extractos celulares fueron lisados y analizados por Western Blot, utilizando un anticuerpo frente a PARP-1 y β -actina como control de carga.

2.6 BÚSQUEDA DE QUINASAS ACTIVADORAS DE LAS PROTEÍNAS CHK1 Y CHK2

Tras los experimentos mostrados, se planteó la existencia de una o varias proteínas que pudieran estar implicadas en la activación de Chk1 y/o Chk2, al margen de ATM y ATR, en las líneas celulares DLD-1 y HCT-15 que experimentan un aumento de la fosforilación de Chk1 y también en las líneas HCT 116 y LS 174T, con un incremento en la fosforilación de Chk2.

El estudio se centró en la familia PIKK, quinasas con estructura similar a las quinasas trifosfato, que son ATM, ATR, DNA-PK, mTOR y SMG1. Además de estas proteínas, existen otras quinasas implicadas en daño al ADN cuyos niveles también fueron analizados: VRK1, quinasa activadora de p53 (190) y TTK/MPS1, quinasa que fosforila a Chk2 en treonina 68 y colocaliza con γ H2AX en los focos de daño al ADN (179).

En una primera aproximación, se quiso averiguar si los niveles de expresión y fosforilación, indicativo de activación, de estas proteínas se modificaban tras el tratamiento de OXA 10 μ M durante 24 horas. Como se puede observar en la Figura 57, el tratamiento con OXA no condujo a una variación significativa de los niveles de expresión de estas proteínas. En lo respectivo a DNA-PK, sus niveles de fosforilación disminuyeron ligeramente en las líneas celulares resistentes a OXA, DLD-1 y HCT-15, y aumentaron en la línea celular sensible, SW620. En la proteína mTOR, los niveles de la proteína fosforilada y total disminuyeron en las líneas celulares DLD-1, HCT-15 y SW480 tras el tratamiento con el fármaco y se desconoce la razón. En la línea celular LS 174T, se puede apreciar dos formas de la proteína TTK/hMps1, produciéndose un descenso de la expresión de ambas tras el tratamiento con OXA. Se desconoce si dicha disminución pudiera tener una función de activación de Chk2.

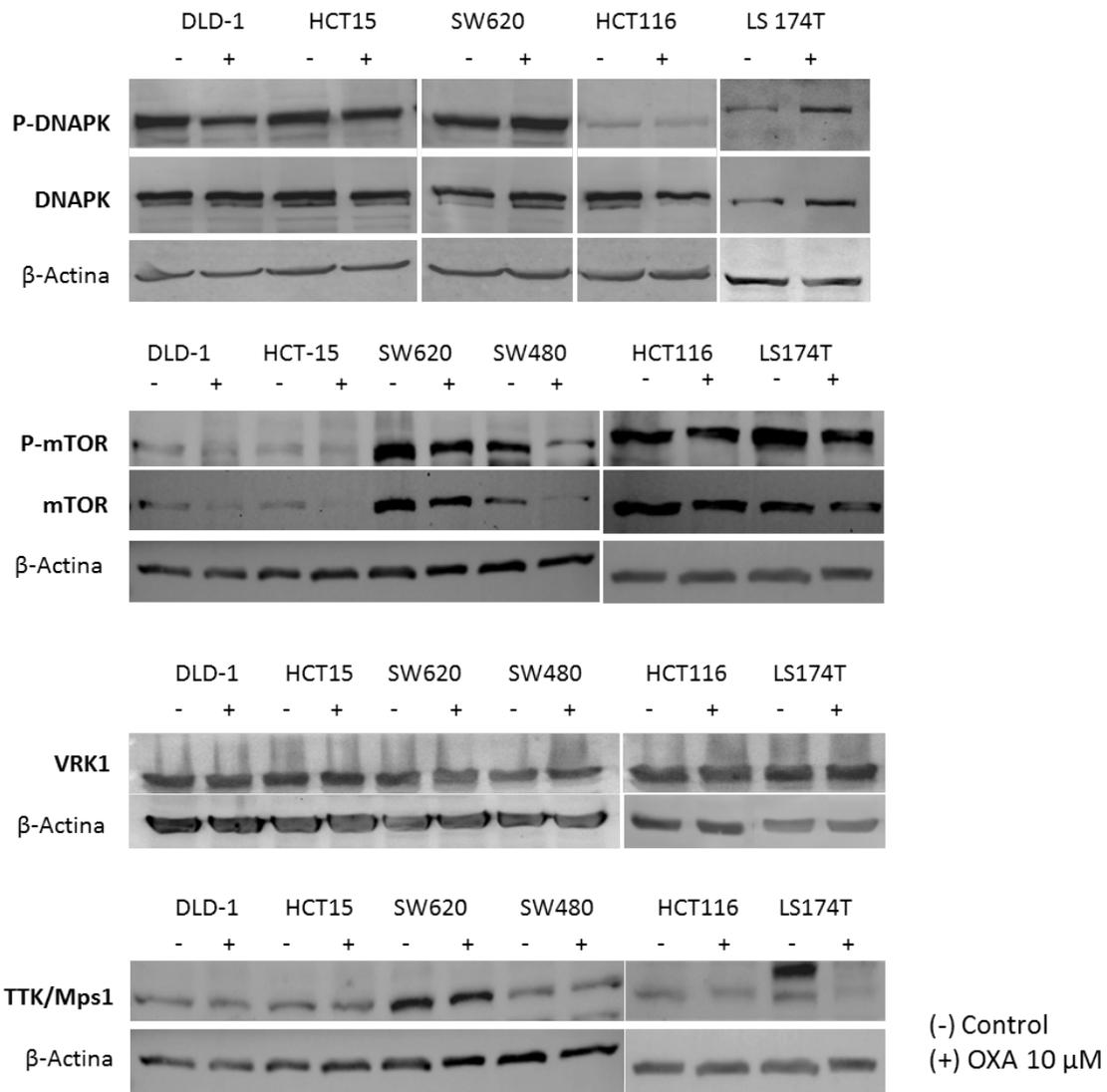


Figura 57. Niveles de expresión de las proteínas DNAPK, mTOR, VRK1 y TTK/Mps1. Las líneas celulares se sembraron durante 24 horas con DMSO (control) y con OXA 10 μM. Tras la lisis celular, la expresión de las proteínas fue analizada por experimentos de Western Blot, utilizando un anticuerpo frente a dichas proteínas y β-actina como control de carga.

El hecho de que la expresión de estas proteínas no se viera modificada con el tratamiento no supone que no estén fosforilando y en consecuencia activando a Chk1 y/o Chk2. Por ello, tras analizar el nivel de expresión de las quinasas, se plantearon experimentos de co-inmunoprecipitación para averiguar si dichas proteínas se unían a Chk1 y/o Chk2 tras el tratamiento y consecuentemente, las activaban. La proteína Chk1 fue inmunoprecipitada en la línea celular HCT-15. Del mismo modo, la proteína de control Chk2 fue inmunoprecipitada en la línea celular HCT 116.

En la línea celular HCT-15, considerada resistente al tratamiento con OXA, se produjo una unión de la proteína Chk1 con las proteínas VRK1 y Rad51. Dicha unión se vio incrementada cuando las células son tratadas con 10 μ M de OXA (Figura 58). Estos resultados podrían implicar que VRK1, involucrada en el daño en el ADN, podría activar a Chk1 tras el tratamiento con OXA, en ausencia de ATM y ATR. Rad51 relacionada con la reparación de dicho daño se uniría a Chk1 para comenzar dicho proceso.

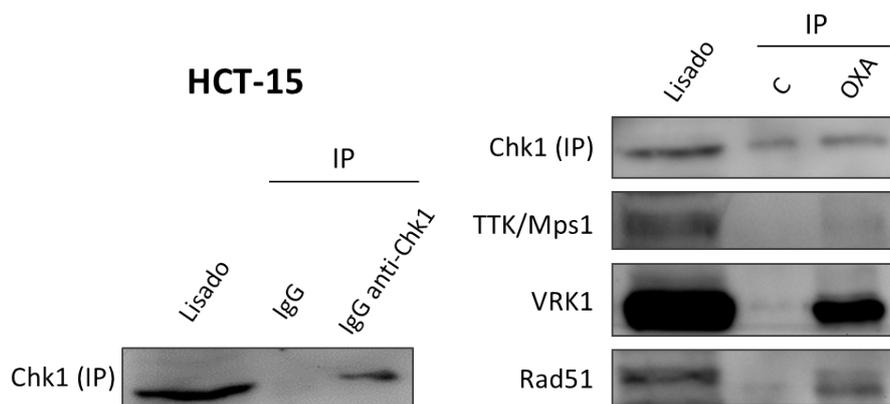


Figura 58. Co-Inmunoprecipitación de Chk1 en la línea celular HCT-15. La proteína Chk1 fue inmunoprecipitada como se describe en Materiales y Métodos. Las proteínas coimmunoprecipitadas fueron detectadas por experimentos de Western Blot, utilizando los anticuerpos que se indican. IP: muestras inmunoprecipitadas, IgG: inmunoglobulina G, C: control 24H, OXA: Oxaliplatino 24H.

Se analizó la inmunoprecipitación de Chk2 en la línea celular HCT 116, clasificada como sensible al tratamiento con OXA. A diferencia de HCT-15, este experimento no mostró una unión clara entre la proteína inmunoprecipitada y las demás analizadas, que en ningún caso se incrementó tras el tratamiento con OXA 10 μ M durante 24 horas (Figura 59).

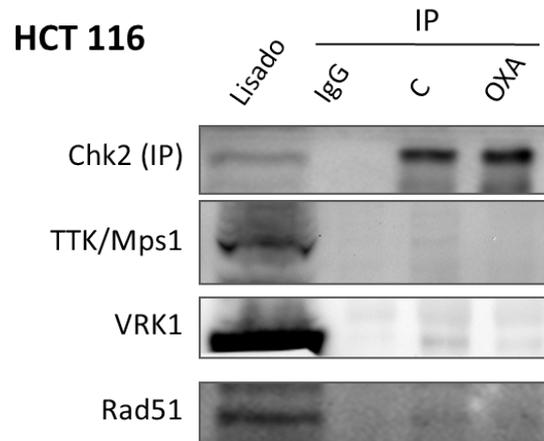


Figura 59. Co-Imunoprecipitación de Chk2 en la línea celular HCT 116. La proteína Chk1 fue inmunoprecipitada como se describe en Materiales y Métodos. Las proteínas coimmunoprecipitadas fueron detectadas por experimentos de Western Blot, utilizando los anticuerpos indicados. IP: muestras inmunoprecipitadas, IgG: inmunoglobulina G, C: control 24H, OXA: Oxaliplatino 24H.

3. ANÁLISIS DE MUTACIONES SOMÁTICAS DE LAS LÍNEAS CELULARES Y CULTIVOS PRIMARIOS DE CÁNCER COLORRECTAL

En colaboración con la Unidad de Genética Molecular del Centro de Bioquímica y Genética Clínica del HCUVA, el Dr. Pablo Carbonell analizó la presencia de mutaciones en genes asociados con la carcinogénesis en las líneas celulares establecidas y de los cultivos primarios derivados de pacientes con CCR. En la Tabla 13 se muestra la mutación identificada para cada línea celular en cada uno de los genes en el exón indicado.

Tras comparar dichas mutaciones con las diferentes respuestas de las líneas celulares y cultivos primarios a OXA, los resultados indicaron que no existe una relación entre dichas mutaciones somáticas y la mayor o menor sensibilidad con el fármaco OXA. Centrándonos en el gen *KRAS*, no parece existir nexo entre las mutaciones de las líneas celulares y su sensibilidad a OXA. Dentro del panel de líneas celulares estudiadas, se encontraron algunas líneas celulares sensibles al tratamiento con genotipo silvestre (HT29, HGUE-C-1, Caco-2 y Colo 320) y otras con mutación en *KRAS* (SW480, SW620, LoVo, HCT 116 Y LS 174T).

En el caso del gen *BRAF* ocurre algo similar, en las células sensibles HT29, Colo 201 y Caco-2 ha ocurrido una sustitución puntual en el aminoácido 600 de *BRAF* de una Valina(V) por un ácido glutámico (E), mientras que el resto no posee ningún tipo de mutación.

La presencia de mutaciones en el gen *PIK3CA*, concretamente en los exones 9 y 20, tampoco parece estar asociada al comportamiento de las células frente al tratamiento con OXA, ya que las células que presentan dicha mutación responden de forma variable al tratamiento, habiendo líneas celulares sensibles (HT29, HCT 116 y LS 174T) y líneas celulares clasificadas como resistentes (DLD-1 y HCT-15), que son portadoras de mutaciones en este gen.

Línea celular	<i>KRAS</i> (Ex1)	<i>BRAF</i> (Ex15)	<i>PIK3CA</i> (Ex9 y Ex20)
DLD-1	p.G13D	WT	p.E545K, p.D549N
HCT-15	p.G13D	WT	p.E545K, p.D549N
HT29	WT	p.V600E	p.P449T
SW480	p.G12V	WT	WT
SW620	p.G12V	WT	WT
LoVo	p.G13D	WT	WT
HCT 116	p.G13D	WT	p.H1047R
LS 174T	p.G12D	WT	p.H1047R
HGUE-C-1	WT	WT	WT
Colo 201	WT	p.V600E	WT
Caco-2	WT	p.V600E	WT
Colo 320	WT	WT	WT

Tabla 13. Análisis de las mutaciones somáticas (*KRAS*, *BRAF* y *PIK3CA*) de las líneas establecidas de cáncer colorrectal.

Además de analizar la presencia de mutaciones en las líneas celulares establecidas, se instauró un protocolo para estudiarlas también en todos los cultivos primarios con los que se trabajara en el laboratorio. Las mutaciones encontradas en ellos quedan reflejadas en la Tabla 14. Debido a la alta cantidad de muestras recibidas y analizadas, se muestran únicamente los cultivos primarios utilizados en el presente trabajo.

Cultivo primario	<i>KRAS</i> (Ex1)	<i>BRAF</i> (Ex15)	<i>PIK3CA</i> (Ex9 and Ex20)
HUVA-CC-1	WT	WT	p.T1025T
HCUVA-CC-1CT	WT	WT	WT
HCUVA-CC-3CT	p.G12V, p.G13D	WT	p.E544K, p.D548N
HUVA-CC-34	p.G12A	WT	WT
HCUVA-CC-56	p.G12S	WT	WT
HCUVA-CC-60	WT	WT	WT
HCUVA-CC-62	WT	WT	WT
HCUVA-CC-63	WT	WT	p.G546R
HCUVA-CC-71	p.G13D	WT	p.E544K, p.D548N

Tabla 14. Análisis de las mutaciones somáticas (*KRAS*, *BRAF* y *PIK3CA*) de los cultivos primarios derivados de pacientes con cáncer colorrectal.

Del mismo modo que ocurría con las líneas celulares establecidas, parece que no existe una relación entre el estado mutacional de *KRAS*, *BRAF* y *PIK3CA* con la sensibilidad o resistencia al tratamiento con OXA. Ninguno de los cultivos estudiados posee mutaciones en el gen *BRAF*. Los cultivos considerados sensibles (HCUVA-CC-1, CC-3CT y CC-34) poseen mutaciones completamente distintas en los citados genes. Aquellos considerados resistentes a 10 μ M de OXA, HCUVA-CC-56 y CC-71, poseen mutación en *KRAS* aunque en aminoácidos distintos; mientras que el gen *PIK3CA* solamente aparece mutado en el cultivo HCUVA-CC-71.

4. ANÁLISIS DE LAS MUTACIONES DE *TP53* DE LAS LÍNEAS CELULARES Y CULTIVOS PRIMARIOS DE CÁNCER COLORRECTAL

Asimismo, el Dr. Pablo Carbonell de la Unidad de Genética Molecular del Centro de Bioquímica y Genética Clínica del HCUVA, analizó la presencia de mutaciones en el gen *TP53* en las líneas celulares establecidas de CCR y en los cultivos primarios derivados de pacientes con CCR.

En la siguiente tabla (Tabla 15) se exponen las mutaciones concretas encontradas tanto en las líneas celulares establecidas como en los cultivos primarios. Las líneas celulares DLD-1 y HCT-15, así como en el cultivo primario HCUVA-CC-71, todos ellos con baja sensibilidad a 10 μ M de OXA, poseen una mutación en el aminoácido 241, donde una serina (S)

ha sido sustituida por una Fenilalanina (F). Además DLD-1 y HCT-15 poseen una mutación desconocida en heterocigosis (c.1101-2A>C), que afecta al ARN mensajero.

En el caso de las líneas celulares altamente sensibles a 10 μ M de OXA, SW480 y SW620, al igual que los cultivos primarios HCUVA-CC-1 y HCUVA-CC-3CT, encontramos una mutación en el aminoácido 273, en el cual se produce una sustitución de una arginina (R) por una histidina (H).

Finalmente, las líneas celulares sensibles a 10 μ M de OXA, HCT 116 y LS 174T, no presentan mutaciones en el gen *TP53*, al igual que el cultivo primario HCUVA-CC-56, catalogado como resistente.

LÍNEAS CELULARES	Mutación de <i>TP53</i>	CULTIVOS PRIMARIOS
DLD-1 HCT-15	p.S241F	HCUVA-CC-71
SW480 SW620	p.R273H	HCUVA-CC-1 HCUVA-CC-3CT
HCT 116 LS 174T	WT	HCUVA-CC-56

Tabla 15. Análisis mutacional del gen *TP53* de las líneas establecidas de cáncer colorrectal y de varios cultivos primarios estudiados.

4.1 NIVELES DE ACTIVIDAD DE P53 EN LÍNEAS CELULARES DE CCR

Los resultados anteriormente expuestos llevaron a cuestionar si el hecho de encontrar una misma mutación puntual en el gen *TP53* en una línea celular establecida y un cultivo primario concretos, haría que la proteína tuviera un comportamiento similar. Para comprobar la actividad basal de la proteína p53 se realizaron experimentos de transfección, en los que se incorporó un vector que funciona como elemento de respuesta a p53.

Analizando las líneas celulares establecidas, se observa como en condiciones de crecimiento sin tratamiento se apreció una mayor funcionalidad de la proteína p53 en las líneas celulares con *TP53* silvestre, donde se incluyen las líneas celulares HCT 116 y LS 174T. Esta funcionalidad fue significativamente superior ($P < 0,01$) a la observada en aquellas líneas celulares que poseen una mutación conocida de *TP53*. Concretamente la mutación p.S241F, representada por las líneas celulares establecidas DLD-1 y HCT-15, tiene como consecuencia la

formación de una proteína con actividad basal significativamente inferior a la expresada por la condición silvestre ($P < 0,01$). Cuando se analizó la funcionalidad de la proteína cuyo gen posee la mutación p.R273H, representado por las líneas celulares SW480 y SW620, se apreció una funcionalidad mucho menor que en el genotipo sin mutaciones (Figura 60).

Al estudiar los cultivos primarios, se obtuvo el mismo resultado. En concreto, la mutación p.S241F, representada por el cultivo primario HCUVA-CC-71, tiene como consecuencia la formación de una proteína con funcionalidad significativamente inferior a la expresada por la condición silvestre; representado por el cultivo primario HCUVA-CC-56. Examinando la mutación p.R273H (HCUVA-CC-1 y HCUVA-CC-3CT) se obtuvo una funcionalidad superior a la obtenida por las líneas celulares portadoras de la mutación, debido a una mezcla de clones homocigóticos portadores de mutaciones y heterocigóticos para *TP53*. Aun así, dicha actividad fue significativamente menor al genotipo silvestre (HCUVA-CC-56) (Figura 60).

Estos resultados sugieren que las dos mutaciones examinadas (p.S241F y p.R273H) afectan a la actividad funcional de la proteína p53. Al ser portadores de dicha mutación, dichas líneas celulares o cultivos primarios tienen como consecuencia la pérdida de función de la proteína.

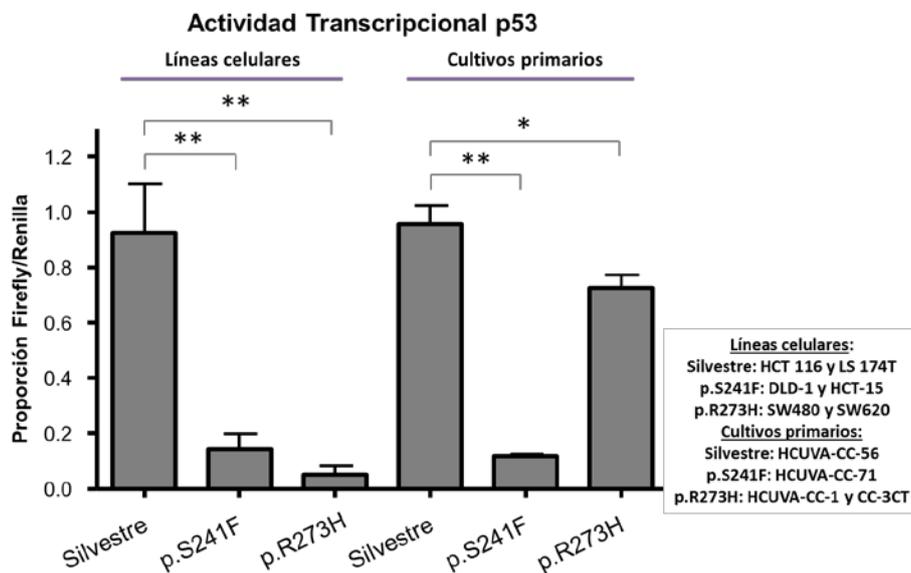


Figura 60. Actividad transcripcional de p53. Las células fueron sembradas y transfectadas con un plásmido de pP53 (elemento de respuesta a p53). El valor representa la proporción entre la actividad de la luciferasa de luciérnaga y de la luciferasa de Renilla; (*t* de Student, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$).

4.2 RELACIÓN ENTRE TP53 Y EL TRATAMIENTO CON OXALIPLATINO

Tras conocer la actividad basal de la proteína p53, se quiso investigar si las mutaciones conocidas ejercían algún papel importante en la respuesta al fármaco OXA. Se realizaron ensayos de transfección, en los cuales las líneas celulares y cultivos primarios fueron tratados con DMSO como condición control y OXA 10 μ M durante 24 horas.

Analizando el comportamiento de las líneas celulares establecidas, aquellas con *TP53* silvestre (HCT 116 y LS 174T), vieron incrementada la actividad transcripcional de p53 con el tratamiento respecto al control en un porcentaje significativamente superior (Figura 61). De este modo, el tratamiento con OXA estaría activando al gen *TP53*. No obstante, no se observó un incremento significativo de la actividad transcripcional de p53 en las líneas celulares portadoras de mutaciones en *TP53*. Dada la escasa actividad basal expresada por las líneas celulares con la mutación p.S241F (HCT-15 y DLD-1) y con la mutación p.R273H (SW480 y SW620), el tratamiento con el fármaco OXA no tuvo la capacidad de activar su función transcripcional de manera significativa.

Respecto a los cultivos primarios, únicamente en el cultivo primario con la mutación p.S241F (HCUVA-CC-71) se obtuvo una actividad significativamente mayor a la expresada por la condición sin tratamiento. Los cultivos que presentan la mutación p.R273H (HCUVA-CC-1 y HCUVA-CC-3CT), cuya actividad basal era inferior a la del genotipo silvestre, no incrementaron la actividad de manera significativa con el tratamiento de OXA (Figura 61).

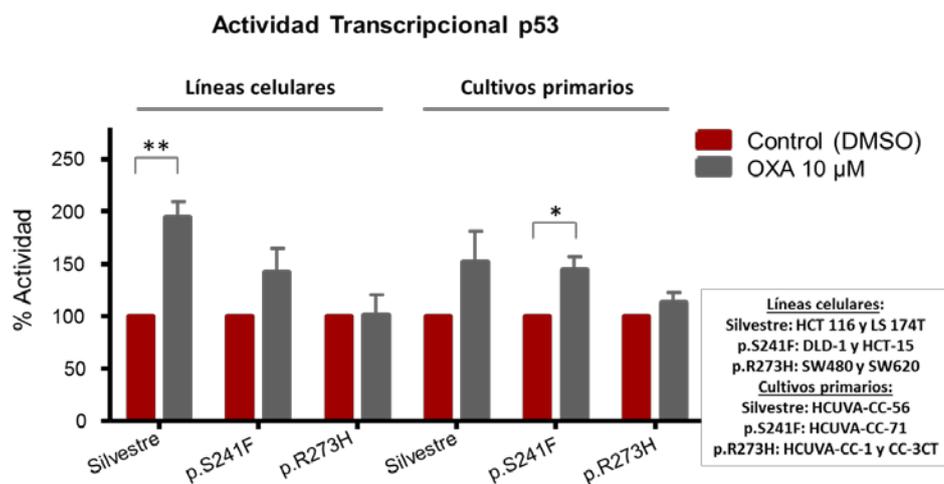


Figura 61. Actividad transcripcional de p53 tras el tratamiento con Oxaliplatino. Las células fueron transfectadas y tratadas con OXA 10 μ M. El porcentaje de actividad se comparó con la condición sin tratamiento. La actividad de p53 aumentó de manera significativa en el genotipo silvestre de las líneas celulares y en los cultivos primarios con la mutación p.S241F (t de Student, *P<0,05).

5. COMPARACIÓN DEL PROTEOMA DE LAS LÍNEAS CELULARES SENSIBLES Y RESISTENTES A OXALIPLATINO

Tras analizar el nivel de sensibilidad que poseían las líneas celulares y clasificarlas en sensibles y resistentes al tratamiento con OXA, se realizó un análisis 2D-DIGE de sus proteomas. El objetivo de este experimento fue explorar los cambios en la abundancia de las diferentes proteínas expresadas en los dos grupos, DLD-1 y HCT-15 como líneas celulares resistentes y HCT 116 y LS 174T como líneas celulares sensibles.

Para ello se realizaron experimentos de 2D-DIGE por triplicado, donde se encontraron 17 proteínas con una mayor abundancia en las líneas celulares DLD-1 y HCT-15, en comparación con las líneas celulares HCT 116 y LS 174. De la lista de proteínas localizadas, un tercio de éstas fueron mitocondriales y otro tercio fueron proteínas implicadas en el procesamiento del ARN mensajero (Tabla 16).

Nº spot	Av.Ratio	t-Test	Nº	Accesion number	Nombre de la proteína	Score	Péptidos únicos	Cobertura de secuencia	KDa	Función
1009	3.37	0.0089	1	gi10863945	Helicasa II dependiente de ATP	2973.21	20	26.5%	82.65	Reparación ADN
1010	4.41	0.0038	2	gi5803115	Proteína de la membrana interna mitocondrial	1766.55	12	20.18%	83.62	Estructural
1012	4.25	0.0025								
1013	3.8	0.014								
1138	7.58	0.0025	3	gi16507237	Proteína de choque térmico (Hsp70)	4109.38	15	28.59%	72.29	Chaperona
1140	9.49	0.014								
1423	3.21	0.0032	4	gi19743875	Fumarato hidratasa	238.72	4	9.22%	54.6	Metabolismo mitocondrial
1424	3.5	0.0087								
1426	3.43	0.0025	5	gi4503571	Enolasa 1	867.74	5	13.36%	47.14	Glicolisis
1499	2.18	0.029	6	gi5453539	Fosforibosil-aminoimidazol carboxilasa	166.31	3	7.76%	47.05	Metabolismo mitocondrial
1511	13.22	0.0025								
1521	2.62	0.013	7	gi40354195	Queratina 18 del tipo I del citoesqueleto	4574.56	12	36.47%	48.03	Estructural
1527	2.39	0.0068	8	gi6678271	Proteína de unión al ADN TAR-43	527.18	2	6.52%	44.71	Procesamiento del ARNm
1532	2.38	0.002	9	gi34147630	Factor de elongación Tu, mitocondrial	2770.5	6	16.48%	49.84	Biosíntesis de proteínas
1628	2.97	0.0025	10	gi4557237	Acetil CoA acetiltransferasa, mitocondrial	184.94	3	10.3%	45.17	Metabolismo mitocondrial
1658	5.99	0.002								
1660	6.12	0.0025	11	gi55956921	Ribonucleoproteína heterogénea nuclear del grupo A/B	193.17	2	8.42%	30.57	Procesamiento del ARNm

Nº punto	Av.Ratio	t-Test	Nº	Accesion number	Nombre de la proteína	Score	Péptidos únicos	Cobertura de secuencia	KDa	Función
1667	4.84	0.0033	12	gi51477708	Ribonucleoproteína hererogénea nuclear del grupo D	119.22	2	8.36%	30.65	Procesamiento del ARNm
1670	5.89	0.0056	13	gi5453854	Proteína 1 de unión a Poli(rC)	784.42	4	15.17%	37.5	Procesamiento del ARNm
1767	9.75	0.0025	14	gi4757756	Anexina A2	3940.41	13	49.26%	38.58	Unión a fosfolípidos dependiente de Calcio
1768	6.19	0.0025								
1774	3.47	0.0081								
1779	4.25	0.028	15	gi23503095	Ribonucleoproteína hererogénea nuclear del grupo H3	97.92	2	8.38%	36.9	Procesamiento del ARNm
2052	3.41	0.0058	16	gi2492759	3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa tipo 2	674.12	5	28.74%	26.91	Maduración mitocondrial del ARNt
2054	3.6	0.005	17	gi116241354	Proteína homóloga ES1, mitocondrial	135.63	2	19.03%	28.15	Desconocida

Tabla 16. Proteínas diferenciales encontradas entre las líneas celulares DLD-1, HCT-15, HCT 116 y LS 174T tras análisis 2D-DIGE.

5.1 ESTUDIO DE LA PROTEÍNA KU80

Una de las proteínas presente en mayor abundancia en las líneas celulares estudiadas resistentes fue **Helicasa II dependiente de ATP**. Esta proteína, denominada comúnmente Ku80 y codificada por el gen XRCC5, forma un complejo junto con Ku70, un heterodímero que se une a la hebra de ADN cuando ha sufrido un corte y participa en la reparación del ADN en el proceso de recombinación no homóloga (191).

Dado que las cuatro líneas celulares estudiadas poseían diferencias en la respuesta al quimioterápico OXA, se quiso comprobar si los niveles de expresión de Ku80 variaban tras el tratamiento con el fármaco a una concentración 10 μ M durante 24 horas. Como se puede comprobar en la Figura 62, el nivel de expresión de la proteína Ku80 no varió de una línea celular a otra, al igual que no se modificó tras el tratamiento con OXA. Por tanto, estos resultados sugieren que el incremento de Ku80 observado no se asociaría con el tratamiento con OXA.

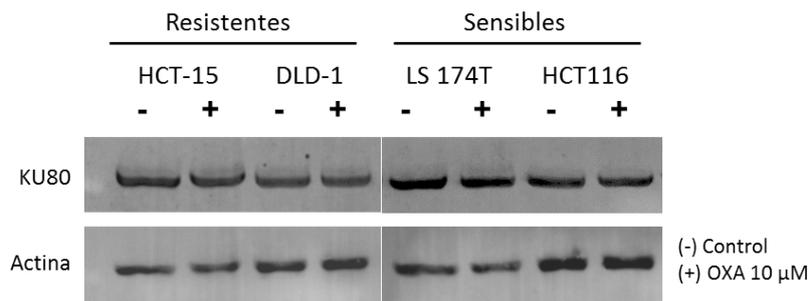


Figura 62. Niveles de expresión de la proteína Ku80. Las líneas celulares fueron sembradas y tratadas con OXA 10 μ M durante 24 horas. Tras la lisis celular, la expresión de la proteína fue analizada por Western Blot utilizando un anticuerpo frente a Ku80 y β -actina como control interno.

5.2 ESTUDIO DE LA PROTEÍNA ANEXINA A2

Otra de las proteínas encontradas cuya expresión es más abundante en las líneas celulares resistentes a OXA con respecto a las líneas celulares sensibles fue **Anexina A2** (ANXA2). Esta proteína fue identificada en tres puntos (1767, 1768 y 1774), en los que la abundancia estandarizada en todas ellas fue significativamente mayor en las líneas celulares con mayor resistencia a OXA (R) (Figura 63).

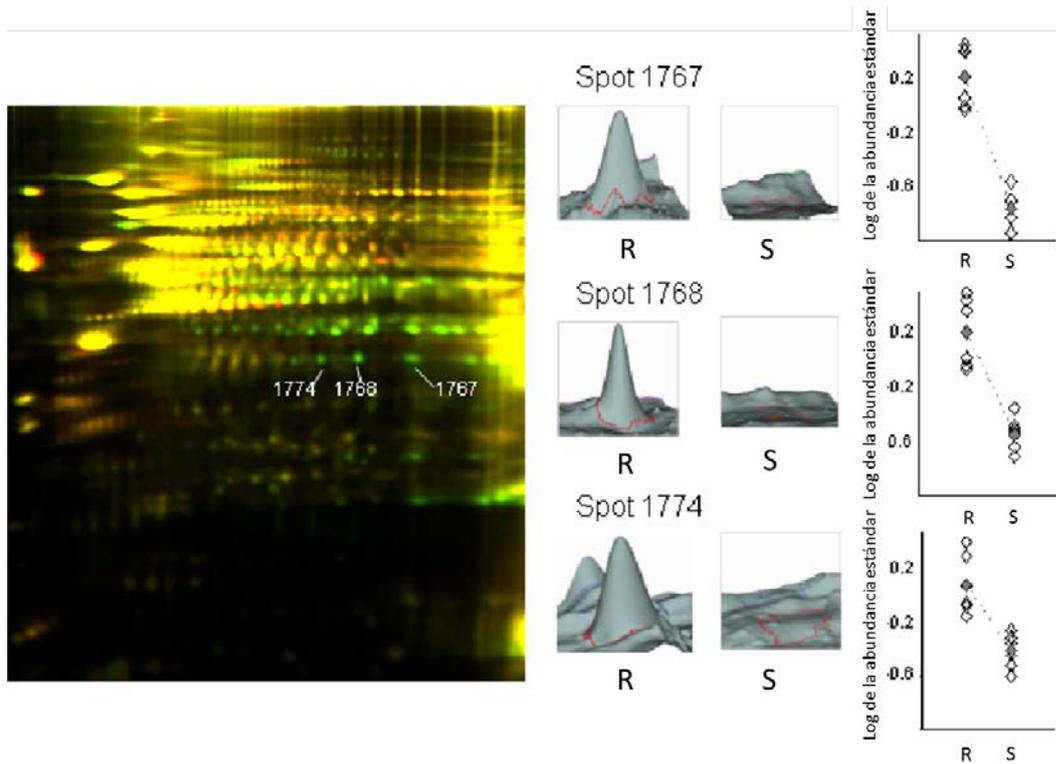


Figura 63. Tinción representativa del análisis proteómico 2D-DIGE. Visión tridimensional de la abundancia de los puntos de ANXA2 en las líneas celulares. Registro estandarizado de abundancia individual (\diamond) y media (\blacklozenge) para cada punto seleccionado; agrupados en líneas celulares resistentes (R) y sensibles (S), tal como se obtiene por análisis computacional con el programa informático DeCyder.

5.2.1 NIVELES DE EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA ANEXINA A2

Se analizó la abundancia de ANXA2 por Western Blot en condiciones de crecimiento sin adición de fármaco. Como se puede observar en la Figura 64, destaca que ANXA2 se encontró en mayor abundancia en las líneas celulares que presentaron una mayor resistencia al tratamiento con OXA, HCT-15 y DLD-1. Además, se detectó una isoforma de ANXA2 de alto peso molecular en la línea celular DLD-1 que no se expresó en las otras líneas celulares estudiadas.

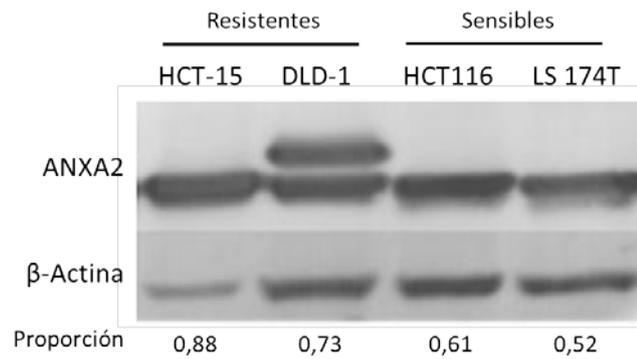


Figura 64. Niveles de expresión de la proteína Anexina A2. Las células fueron lisadas y el extracto proteico se analizó por Western blot, utilizando anticuerpos frente a ANXA2 y β -actina, que se utilizó como control de carga. Se muestran los valores de densitometrado de la proporción entre la cantidad ANXA2 y la cantidad de β -actina expresadas.

5.3 ESTUDIO DE MIGRACIÓN E INVASIÓN CELULAR

Anexina A2 es una proteína de unión a fosfolípidos de la membrana plasmática que posee múltiples funciones implicadas en la migración y en la invasión celular, así como en la reorganización del citoesqueleto entre otras (72–74,192,193,194). Se ha encontrado que sus niveles de expresión son elevados en diferentes tipos de cáncer como el cáncer de cuello y cabeza (69), cáncer de mama (70,71) y de páncreas (72,73).

Dada la importancia de los procesos de migración e invasión en el desarrollo del cáncer, se procedió a examinar dichas funciones entre el grupo de líneas celulares resistentes a OXA, DLD-1 y HCT-15 y el grupo de líneas celulares sensibles, HCT 116 y LS 174T.

Los resultados obtenidos mostraron una mayor capacidad de migración e invasión de las líneas celulares con una sobreexpresión de ANXA2, DLD-1 y HCT-15, cuyos valores fueron superiores al 25% respecto a la condición control, calculado como el número de células obtenidas en los pocillos sin insertos. Sin embargo, las líneas celulares con menor expresión de la proteína ANXA2, HCT 116 y LS 174T, no poseían gran habilidad migratoria e invasiva, obteniendo valores en torno al 6%. Debido a esto, las líneas celulares DLD-1 y HCT-15 han sido clasificadas como grupo de alta invasividad y las líneas celulares HCT 116 y LS 174T se caracterizaron como grupo de baja invasividad (Figura 65).

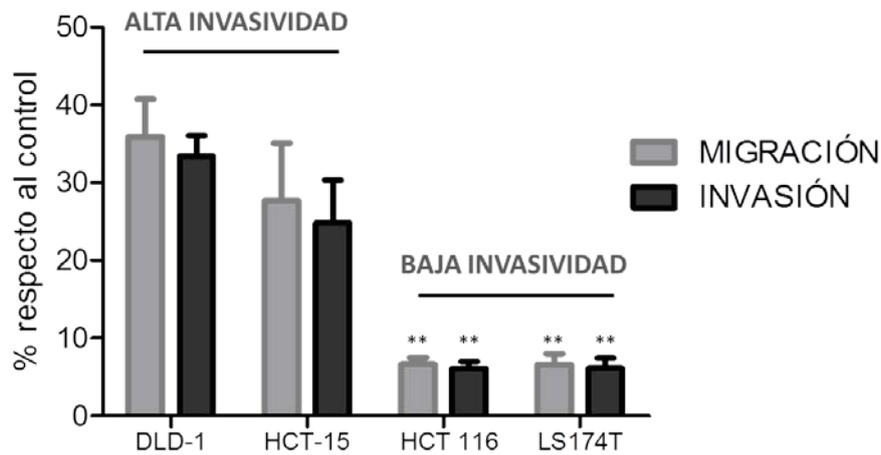


Figura 65. Migración e invasión de las líneas celulares resistentes (DLD-1 y HCT-15) y sensibles (HCT 116 y LS 174T) a Oxaliplatino. La capacidad migratoria e invasiva se midió con respecto al número de células obtenidas en los pocillos sin insertos. Las barras de error corresponden al EEM (n≥3) (t de Student, ** P < 0.01).

Estos experimentos se realizaron además, en un modelo celular altamente caracterizado. Se analizó la capacidad migratoria e invasiva de las líneas celulares SW480 y SW620, ambas provenientes del mismo paciente: SW480 obtenida a partir de un adenocarcinoma de colon primario y SW620 derivada de un ganglio linfático de la metástasis del mismo tumor (195). Como cabía esperar, se observó que las células SW620 poseían una mayor capacidad invasiva, en comparación con las células SW480 (Figura 66), y por tanto, se describen como líneas celulares de alta y baja invasividad respectivamente.

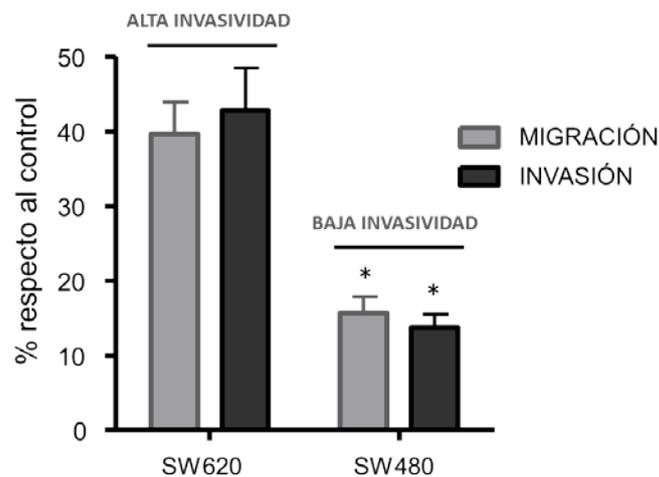


Figura 66. Migración e invasión de las líneas celulares SW480 y SW620. La capacidad fue calculada como se describe en Materiales y métodos. Las barras de error corresponden al EEM (n≥3) (t de Student, * P < 0.05).

Al mismo tiempo, se realizaron estos estudios en dos cultivos primarios. La elección de los cultivos primarios se realizó según las características del tumor primario. Por un lado, se utilizó el cultivo primario HCUVA-CC-34 que proviene de un varón de 67 años con un tumor en fase IV y cuya clasificación TNM es T4a, que indica que el tumor ha penetrado la superficie del peritoneo visceral, N2b que se han encontrado más de 7 ganglios linfáticos cercanos con afectación tumoral y M1 con metástasis a distancia. Concretamente, fue localizada una metástasis hepática.

En segundo lugar, se utilizó el cultivo primario HCUVA-CC-62 que procede de un varón de 68 años cuya clasificación TNM es T3 que indica que el tumor invade los tejidos cercanos al intestino grueso por medio de la muscularis propia; N0 significa que de los 12 ganglios analizados de este paciente en ninguno se obtuvieron células tumorales; y M0 que no se le detectó metástasis a distancia. Por tanto, se ha clasificado como un tumor en fase IIA.

Al analizar estos cultivos en ensayos de invasión y migración celular, se aprecia cómo el cultivo HCUVA-CC-34 poseía una mayor capacidad migratoria e invasiva, al igual que las líneas celulares, superando el 25% de capacidad frente al control. Concretamente, un $34,90 \pm 7,13\%$ de capacidad migratoria y un $33,52 \pm 6,89\%$ de habilidad invasiva. Sin embargo, el cultivo HCUVA-CC-62 no destacó por su habilidad migratoria e invasiva, obteniéndose un porcentaje de migración e invasión cercano al 10% frente a la condición control. En concreto, $14,85 \pm 1,21\%$ en capacidad migratoria y un $13,89 \pm 1,60\%$ de habilidad invasiva (Figura 67).

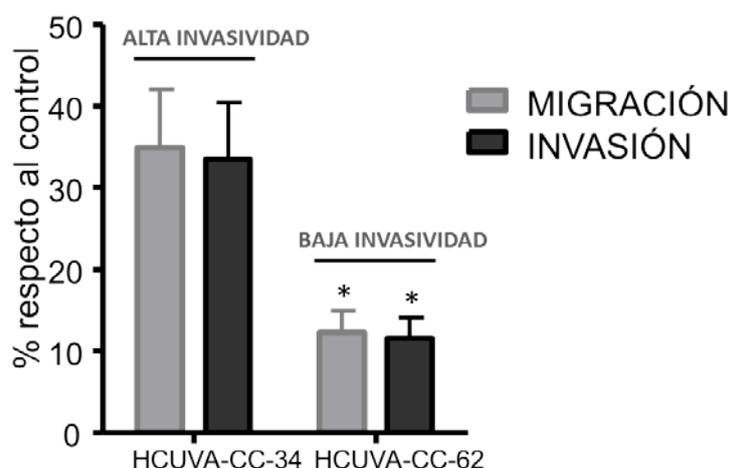


Figura 67. Migración e invasión de los cultivos primarios HCUVA-CC-34 y HCUVA-CC-62. En la gráfica se muestra el promedio de la proliferación \pm el EEM de tres experimentos ($n=3$), (t de Student, * $P < 0.05$).

5.4 NIVELES DE FOSFORILACIÓN DE LA PROTEÍNA ANEXINA A2

La proteína ANXA2 se une a la membrana plasmática cuando se encuentra fosforilada (P-ANXA2) (73). Debido a esto, además de analizar la expresión de la proteína total, se planteó analizar los niveles de fosforilación de la proteína, P-ANXA2, mediante ensayos de Western Blot.

Para ello, se utilizaron la línea celular SW620, con gran capacidad migratoria e invasiva, y la línea celular SW480, con menor habilidad de migrar e invadir. Los resultados mostraron que la proporción entre los niveles de proteína fosforilada y de proteína total en la línea celular SW620 fue significativamente superior a la proporción calculada en línea celular SW480 (Figura 68).

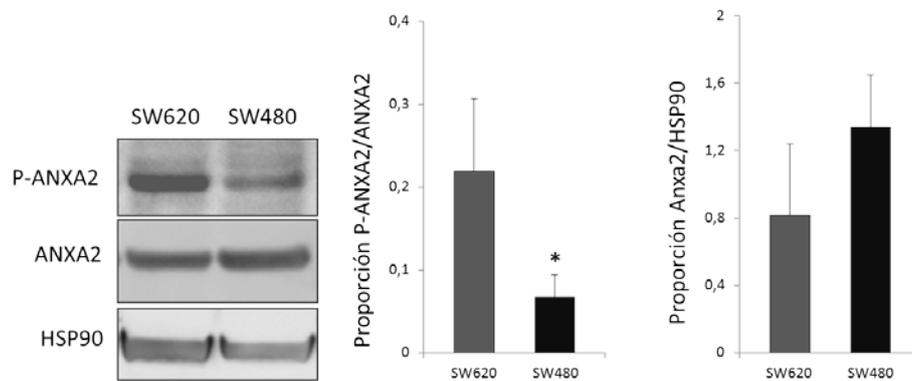


Figura 68. Niveles de expresión de P- Anexina A2 y Anexina A2 en SW480 y SW620. Los extractos celulares fueron analizados por ensayos de Western Blot para detectar los niveles basales de P-ANXA2 y ANXA2, así como de HSP90, utilizada como control de carga; $n \geq 3$, (Test U de Mann-Whitney, * $P < 0.05$).

5.5 LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA ANEXINA A2

Dada la función de ANXA2 como activadora de la migración en la superficie de la célula (73), se planteó analizar su localización celular en las líneas celulares establecidas y en los cultivos primarios. Para ello, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia.

Al estudiar la localización celular de la proteína ANXA2 se demostró cómo en las líneas celulares más invasivas DLD-1 y HCT-15, la proteína se encontraba principalmente en la membrana celular, mientras que en aquellas con menor capacidad de invadir, HCT 116 y LS 174T, el marcaje de la proteína ANXA2 apareció en el citoplasma (Figura 69).

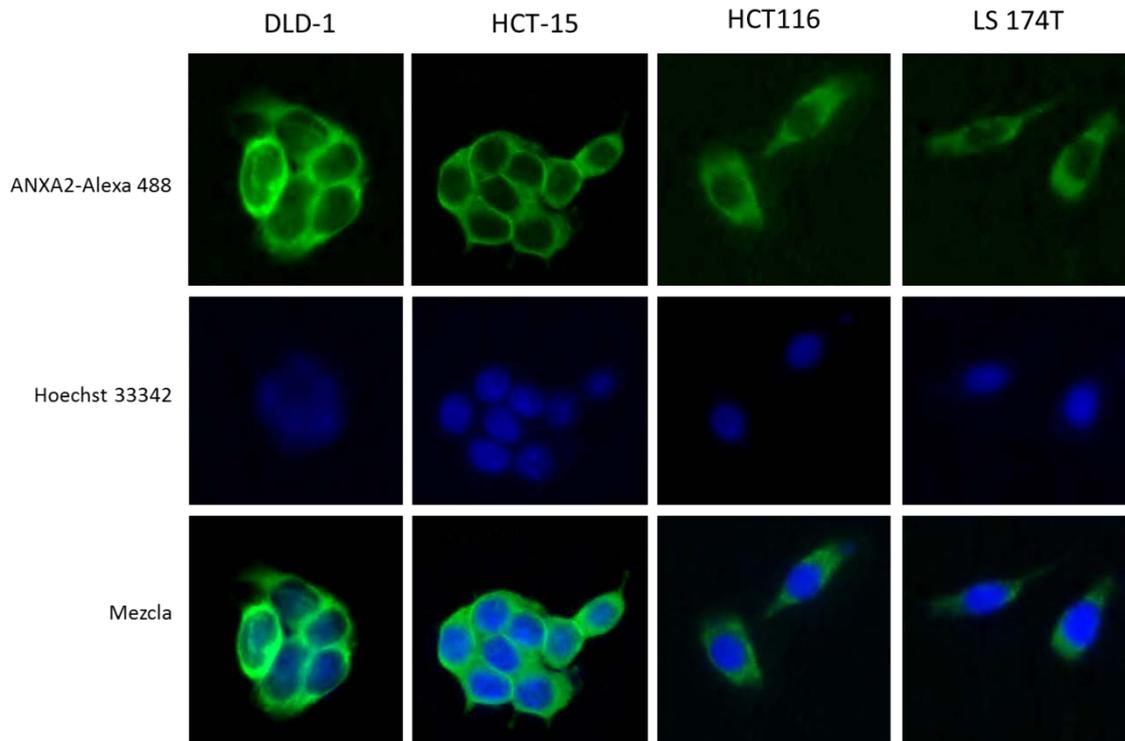


Figura 69. Detección de Anexina A2 por inmunofluorescencia en las líneas celulares DLD-1, HCT-15, HCT 116 y LS 174T. Las células fueron sembradas, fijadas y teñidas con el anticuerpo ANXA2 conjugado a Alexa 488, y la cromatina se teñió con Hoechst 33342. Las imágenes fueron realizadas con un microscopio de fluorescencia con un objetivo 20X.

En segundo lugar, se planteó el mismo experimento comparando las dos líneas celulares, SW480 y SW620. Como cabía esperar, en la línea celular SW620, catalogada como altamente migratoria e invasiva, se mantuvo un patrón de tinción en la membrana celular, en comparación con las células SW480, de menor capacidad migratoria e invasiva, donde ANXA2 se localizó principalmente en el citoplasma (Figura 70).

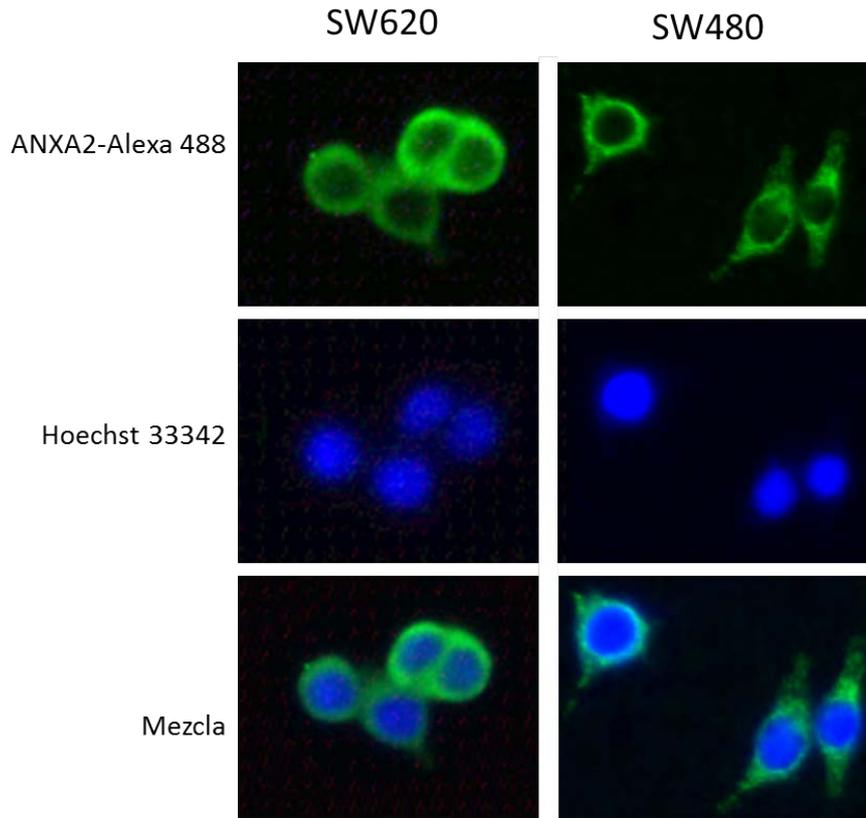


Figura 70. Detección de Anexina A2 por inmunofluorescencia en las líneas celulares SW480 y SW620. Las células se sembraron y fijaron para posteriormente ser teñidas con el anticuerpo Anexina A2 y Alexa Flour 488. Las imágenes fueron realizadas con un microscopio de fluorescencia con un objetivo 20X.

Dado que los experimentos de migración e invasión celular se habían realizado con los cultivos primarios HCUVA-CC-34 y HCUVA-CC-62, se comprobó igualmente la localización de la proteína ANXA2. En el cultivo primario HCUVA-CC-34, que tenía alrededor de un 35% de habilidad migratoria e invasiva, se observó la proteína ANXA2 localizada en la membrana celular. Sin embargo, en el cultivo primario HCUVA-CC-62, con una invasión y migración en torno al 10%, considerada poco invasiva, encontramos que ANXA2 tenía una localización citoplasmática (Figura 71).

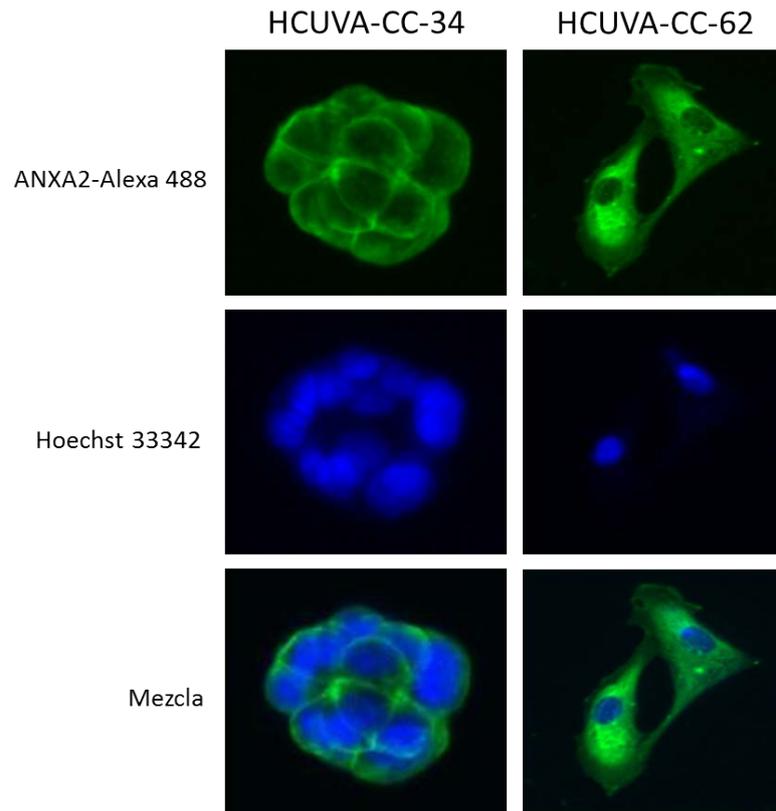


Figura 71. Detección de Anexina A2 por inmunofluorescencia en los cultivos primarios HCUVA-CC-34 y HCUVA-CC-62. Las células se sembraron y fijaron para posteriormente ser teñidas con el anticuerpo ANXA2. Las imágenes fueron realizadas con un microscopio de fluorescencia con un objetivo 20X.

5.6 EFECTO DE OXALIPLATINO EN LA LOCALIZACIÓN CELULAR DE ANEXINA A2

Dadas las diferencias encontradas entre las líneas celulares en cuanto a la sensibilidad al fármaco OXA y respecto a la localización celular de la proteína ANXA2, se planteó comprobar el efecto de este fármaco en dicha localización celular.

Para examinar este efecto, tratamos las líneas celulares DLD-1 y SW620, resistente y sensible respectivamente, con OXA 10 μ M durante 24 horas. Los resultados obtenidos aportaron que esta localización no se asoció con la mayor o menor sensibilidad al fármaco OXA, y que además el patrón de tinción no se vió alterado con el tratamiento (Figura 72).

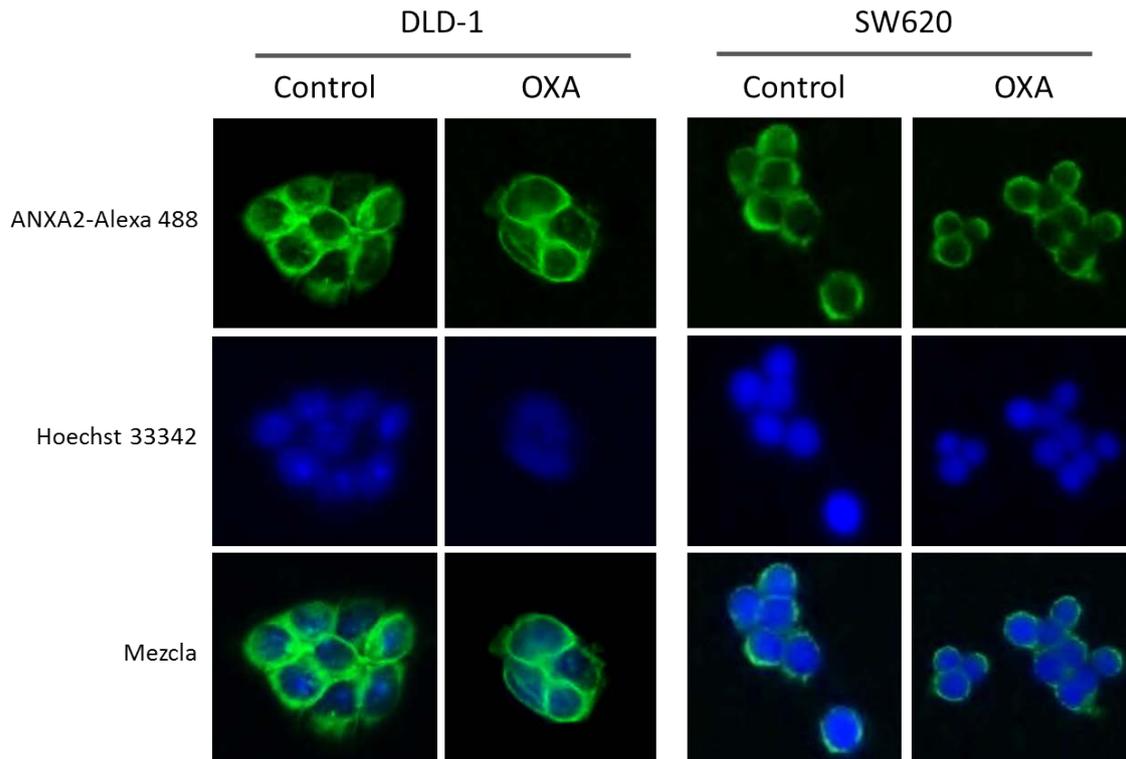


Figura 72. Detección de Anexina A2 por inmunofluorescencia en las líneas celulares DLD-1 y SW620 tras el tratamiento con Oxaliplatino. Las células se trataron con OXA 10 μ M durante 24 horas, se fijaron y tiñeron con el anticuerpo ANXA2. Las imágenes fueron realizadas con un microscopio de fluorescencia con un objetivo 20X.

6. ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE EL PATRÓN DE ANEXINA A2 Y LA PRESENCIA DE METÁSTASIS EN GÁNGLIOS LINFÁTICOS DE PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL

6.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE LOS PACIENTES

Se generó una base de datos con la información clínica de pacientes afectados por cáncer colorrectal que aceptaron participar en el estudio. De manera global, la base de datos quedó compuesta por 72 pacientes, pero desafortunadamente, 5 de ellos fallecieron durante el estudio (6,94%). Con respecto a las características generales de los pacientes, 24 de ellos fueron mujeres (33,33%) y 48 varones (66,67%), lo que se corresponde con los últimos estudios epidemiológicos estimados del año 2012 en España (7). La media de edad de los pacientes fue de $70,07 \pm 1,44$ años, en un rango entre 34 y 94 años. Los datos de sexo y rangos de edad quedan recogidos en la Tabla 17.

GÉNERO					
HOMBRES: 48 (66,67%)			MUJERES: 24 (33,33%)		
RANGO DE EDAD					
34-49 Años	50-59 Años	60-69 Años	70-79 Años	80-89 Años	90-99 Años
5 (6,94%)	9 (12,5 %)	15 (20,83%)	29 (40,28%)	11 (15,28%)	3 (4,17%)

Tabla 17. Datos de sexo y edad de los pacientes afectados por cáncer colorrectal utilizados en este estudio.

Uno de los criterios de inclusión en el estudio fue que el tumor debía tener un grado de penetración a través de las paredes del intestino, T, mayor o igual a 3, es decir que atraviesa la capa muscular hacia tejidos pericólicas (subserosa o tejidos grasos). Tras comprobar y anotar la penetración del tumor, la afectación de los ganglios linfáticos regionales y la presencia o no de metástasis a distancia, se anota la fase del tumor. En la siguiente Tabla 18 se refleja el número de pacientes diagnosticados en las distintas fases tumorales, así como la clasificación TNM de dichos pacientes.

FASE DEL TUMOR					
II: 37 (51,38%)		III: 23 (31,94%)		IV: 12 (16,67%)	
IIA: 29	IIB: 6	IIC: 1	IIIB: 19	IIIC: 4	12
PENETRACIÓN DEL TUMOR (T)					
T3: 48 (66,67%)			T4: 24 (33,33%)		
AFECTACIÓN GANGLIONAR (N)					
N0: 36		N1: 26 (36,11%)		N2: 9 (13,8%)	
36 (50%)	N1A: 8	N1B: 9	N1C: 5	N2A: 4	N2B: 5
METÁSTASIS (M)					
M0: 60 (83,33%)			M1: 12 (16,67%)		

Tabla 18. Fase tumoral y clasificación TNM de los pacientes afectados por cáncer colorrectal utilizados en este estudio. No se obtuvo la clasificación concreta de un paciente en fase II y de cuatro pacientes con N1.

En relación a la localización del tumor, destacamos que la mayoría de los pacientes se distribuyeron en dos grupos principales respecto a la localización del tumor. En un 38,88% (28 pacientes) el tumor primario fue localizado en el colon ascendente, y también en un 38,88% dicho tumor primario se localizó en el colon sigmoide. Este último grupo destacó por el alto número de metástasis detectadas, todas ellas hepáticas, 5 de 28 pacientes, lo que supone un 26,31%. Incluso en este grupo apareció un paciente que sufrió recidiva pulmonar, dos años después de la operación (Tabla 19).

Localización Tumoral	Ciego	Ascendente	Transverso	Descendente	Sigma	Transverso + Sigma	Recto + Sigma
Nº Pacientes	3 (4,17%)	28 (38,88%)	3 (4,17%)	3 (4,17%)	28 (38,88%)	1 (2,08%)	1 (2,08%)
Complicación	1 recidiva	3 metástasis	-	-	5 metástasis, 1 recidiva	-	-

Tabla 19. Localización del tumor en los pacientes afectados por cáncer colorrectal estudiados en este trabajo.

Uno de los hallazgos más llamativos que se observó en el transcurso del estudio fue la disparidad en el número de ganglios analizados en las muestras examinadas por Anatomía Patológica. Como se menciona en la Introducción, el número recomendado de ganglios linfáticos estudiado siempre debe ser mayor de 12 y en nuestro estudio se encontró un 40,28% de los casos con un número menor de 12 ganglios analizados, frente al 59,72% con más de 12 ganglios examinados.

Debido a lo limitado en el número de muestras, no se pudieron realizar estudios de asociación referentes a la localización tumoral, la técnica quirúrgica utilizada o el tipo de tratamiento adyuvante administrado.

6.2 ANÁLISIS DE LA LOCALIZACIÓN CELULAR DE ANEXINA A2 EN CORTES HISTOLÓGICOS DE PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL

La tinción inmunohistoquímica con ANXA2 procedente de secciones sanas del colon mostró un patrón membranoso muy débil en el lado apical de las células caliciformes de las glándulas de secreción de la mucosa normal del colon (Figura 73d), y un fuerte patrón de tinción en el citoplasma de las células endoteliales. En contraste, el patrón de tinción de las células tumorales fue diferente al del tejido sano, apreciándose una fuerte tinción membranosa, especialmente distinguible en zonas concretas del frente invasivo del tumor, en aquellos nidos tumorales que invaden la lámina muscular (señalados con flechas) (Figura 73e).

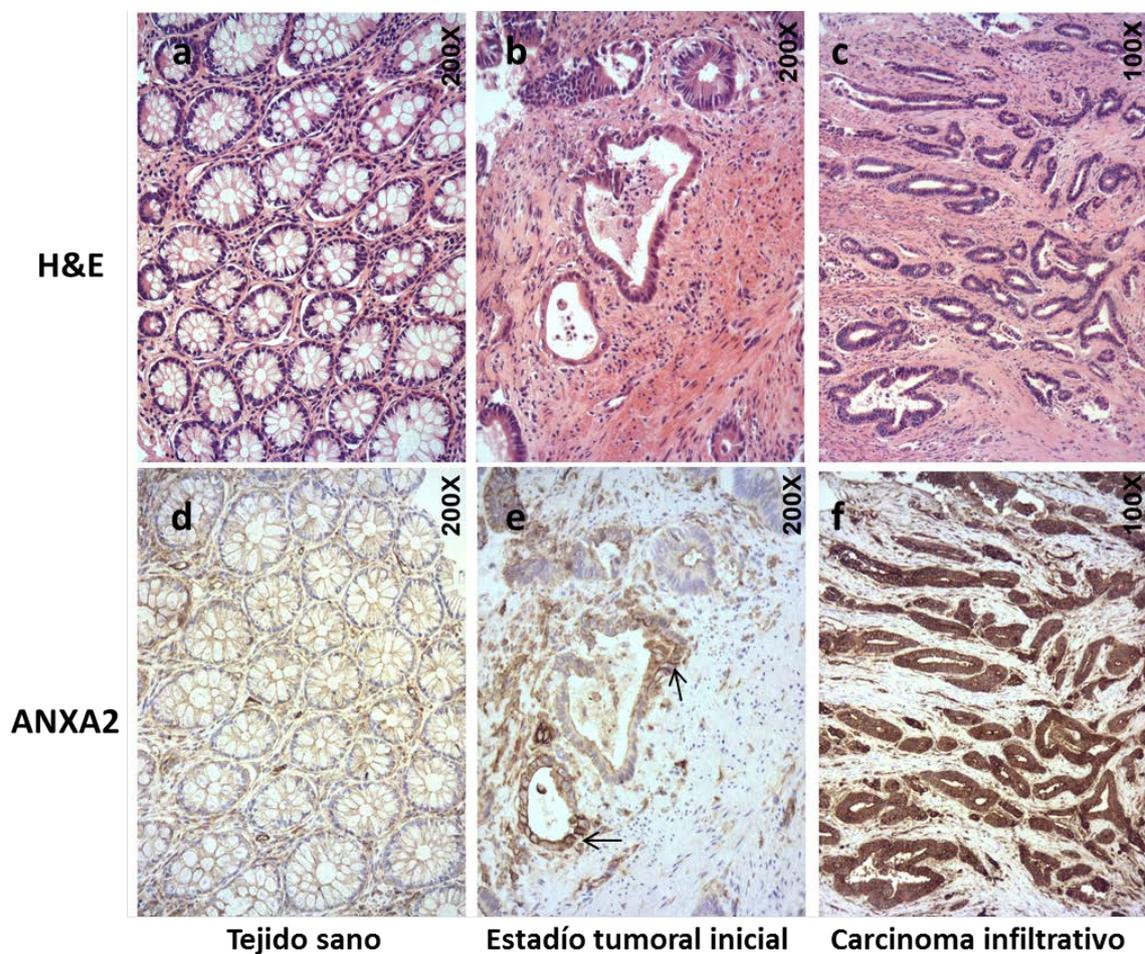


Figura 73. Localización celular de Anexina A2 en cortes histológicos de cáncer colorrectal. Secciones consecutivas de la pieza histológica se tiñeron con Hematoxilina-Eosina (H&E) o con un anticuerpo anti-ANXA2. (Imágenes preparadas por C.M. Martínez y analizadas con un objetivo 200X). Mucosa sana (a, d), mucosa tumoral (b, e), lámina muscular (c, f). Las flechas indican la localización de nidos tumorales que invaden la lámina muscular.

Destacamos además cortes histológicos de un tumor de uno de los pacientes investigados en el estudio, del cual se obtuvo al cultivo primario denominado HCUVA-CC-34. Este tumor corresponde a un varón de 67 años, clasificado T4aN2bM1, y por tanto fase IV, en el que se encontró invasión venosa extramural, perineural y de los vasos linfáticos, así como depósitos tumorales en la grasa pericólica. La metástasis detectada simultáneamente fue a nivel hepático y ganglionar. A las biopsias de colon realizadas a este paciente también se le practicaron cortes consecutivos de tejido tumoral y éstos fueron teñidos con ANXA2. La tinción con ANXA2 encontrada en dichos cortes histológicos se halló principalmente a nivel de la membrana celular, como se puede observar en la Figura 74. Estos datos concuerdan con la pauta de tinción encontrada (por experimentos de inmunofluorescencia) en las células aisladas del tumor primario (Figura 71).

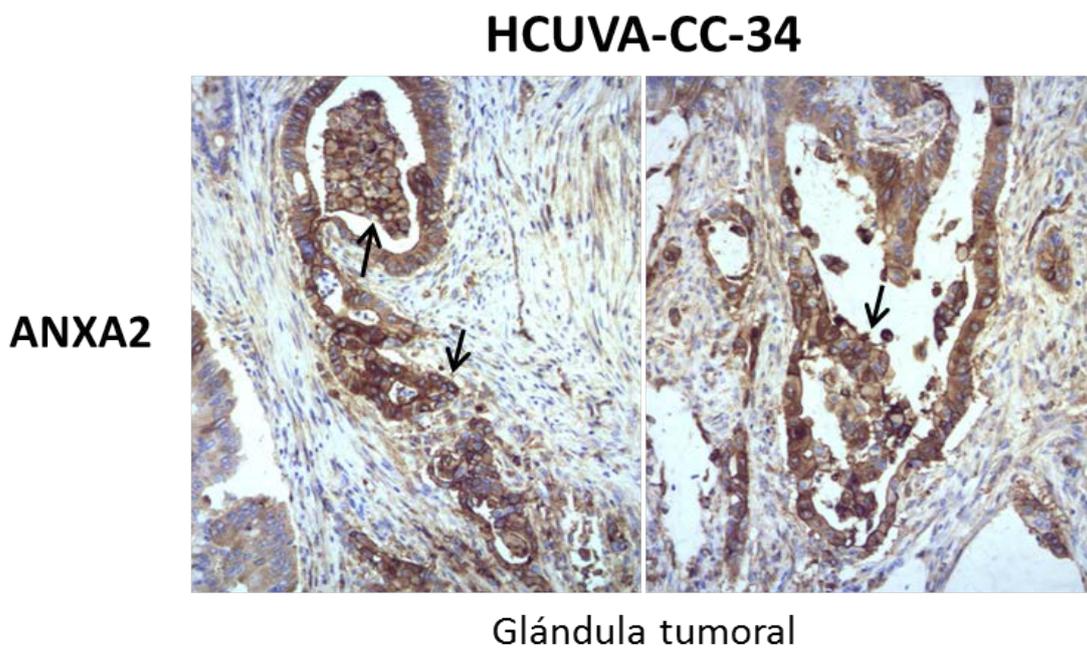


Figura 74. Localización celular de Anexina A2 en cortes histológicos de HCUVA-CC-34. Secciones de tejido tumoral teñidas con ANXA2, como se describe en Materiales y Métodos. (Imágenes preparadas por C.M. Martínez y analizadas con un objetivo 200X). El patrón de expresión membranoso de ANXA2 queda indicado con flechas.

Se comprobó además, que este patrón de tinción en la membrana celular se presentó en *tumor budding*, término definido como pequeños grupos de células tumorales en el borde del tumor y asociado a otros factores que aportan peor pronóstico, la presencia de invasión perineural y linfovascular y metástasis en nódulos linfáticos (80). El *tumor budding* queda reflejado en la Figura 75 c y f, donde se aprecia una tinción muy marcada en la membrana

celular, indicada con flechas. Además, en esta figura se vuelve a mostrar, a mayor aumento, la tinción tanto en la mucosa colónica normal, donde se observa una expresión débil de ANXA2, concretamente en el lado luminal de las células caliciformes (Figura 75 d); así como la tinción del corte tumoral, donde el patrón de expresión de ANXA2 de las células cancerígenas en el frente invasivo del tumor también fue característico de la membrana celular (indicado con asteriscos en Figura 75 b y e).

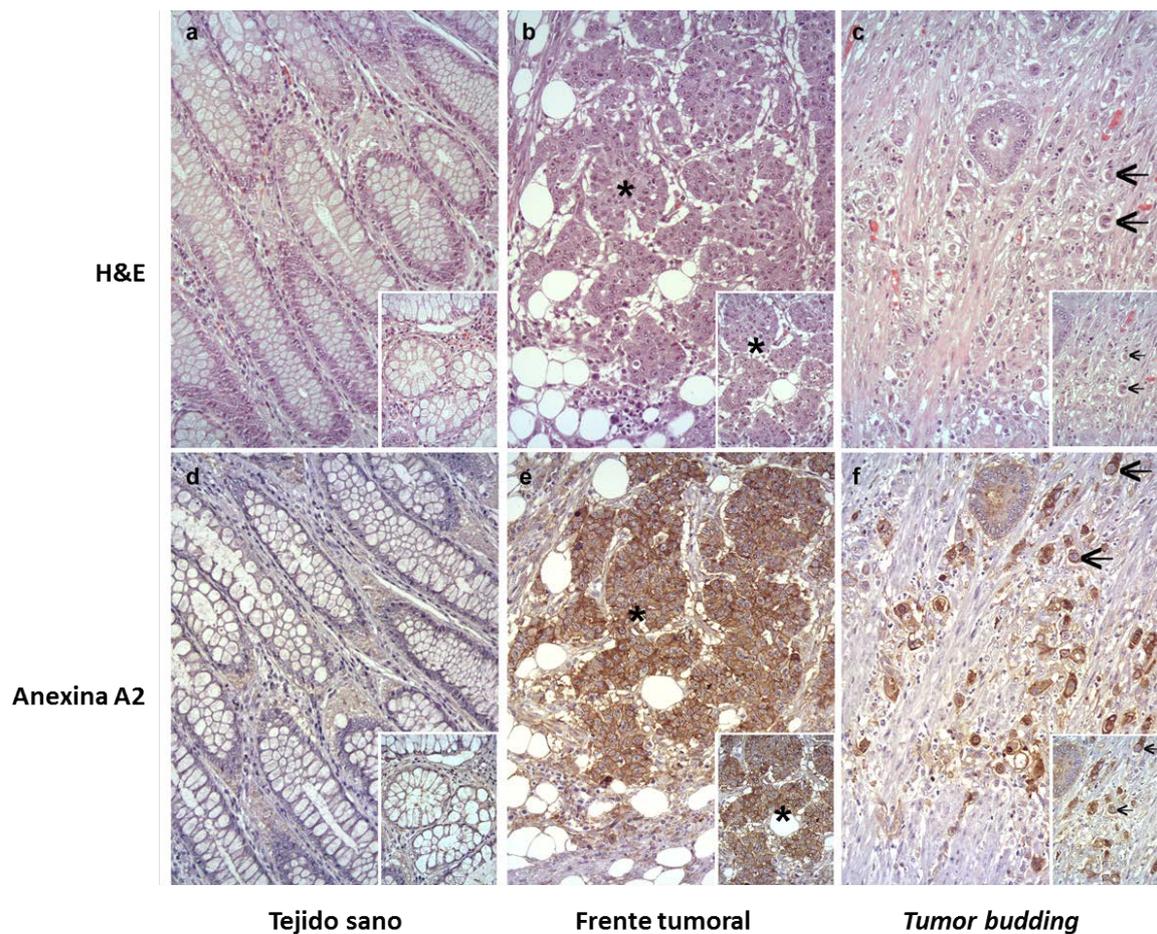


Figura 75. Localización celular de Anexina A2 en cortes histológicos de pacientes con cáncer colorrectal. Los cortes histológicos se tiñeron con Hematoxilina-Eosina (H&E) y con el anticuerpo anti-ANXA2. Mucosa colónica normal (a, d), frente tumoral pobremente diferenciado (b, e), y *tumor budding* (c, f). El patrón de expresión membranoso de ANXA2 queda indicado con asteriscos y flechas. (Imágenes preparadas por C.M. Martínez y analizadas con un objetivo 100X y 400X).

6.3 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE EL PATRÓN DE ANEXINA A2 Y LA PRESENCIA DE METÁSTASIS EN LOS GANGLIOS LINFÁTICOS DE PACIENTES AFECTADOS POR CÁNCER COLORRECTAL

Se realizó un estudio para comprobar si existía alguna asociación entre la presencia de metástasis en los ganglios linfáticos y el número de células con tinción de ANXA2 en la membrana celular evaluado en los cortes histológicos de tumores de CCR de pacientes con fase II-III.

Para realizarlo, de la serie prospectiva de 72 pacientes de los que se recogieron los datos, se eliminaron aquellos en los que se encontró metástasis simultánea al localizar el tumor primario, al no conocer con seguridad si la tinción con ANXA2 pudiera deberse a las características del tumor primario o a cambios posteriores en la migración de las células tumorales. Además de estos pacientes, se eliminaron a otros cinco tras ofrecer una inmunohistoquímica defectuosa. Por tanto, el número de pacientes incluidos en el estudio fue de 58.

Conjuntamente con el número de células con tinción positiva de ANXA2 en la membrana celular, los factores demográficos y los factores histopatológicos fueron estadísticamente comparados con la presencia o ausencia de metástasis en los ganglios linfáticos utilizando un análisis univariante, mediante los test estadísticos de Fisher y la prueba U de Mann-Whitney, según las variables estudiadas.

Los resultados del análisis univariante quedan reflejados en la Tabla 20.

VARIABLES	TOTAL	%	Metástasis en ganglios linfáticos		Valor p
			Positivo	Negativo	
Sexo					
Femenino	20	34,5	8 (34,8)	12 (34,3)	1,000*
Masculino	38	65,5	15 (65,2)	23 (65,7)	
Penetración tumoral					
T3	39	67,3	12 (52,2)	27 (77,2)	0,085 *
T4	19	32,7	11 (47,8)	8 (22,8)	
DT (n=43)					
Ausente	42	75,0	12 (54,6)	30 (88,2)	0,010 *
Presente	14	25,0	10 (45,4)	4 (11,8)	
IVEM (n=56)					
Ausente	42	75,0	13 (56,5)	29 (87,9)	0,012 *
Presente	14	25,0	10 (43,5)	4 (12,1)	
IPN (n=56)					
Ausentes	46	82,2	16 (72,8)	30 (88,2)	0,167 *
Presente	10	17,8	6 (27,2)	4 (11,8)	
Budding					
Ausente	35	30,4	11 (47,8)	24 (68,6)	0,170 *
Presente	23	39,6	12 (52,2)	11 (31,4)	
Diferenciación tumoral					
Pobre/moderada	44	75,9	16 (69,6)	28 (80,0)	0,532*
Buena	14	24,1	7 (30,4)	7 (20,0)	
N^a ganglios linfáticos analizados (mediana)	12,0		12,0	12,0	0,811 †
Media de edad	74,0		69,0	76,0	0,075 †
N^o medio de células ANXA2 positivas (mediana)	17		28	14	0,001 †

Tabla 20. Análisis univariante de relación entre factores histopatológicos y la presencia de metástasis en los nódulos linfáticos. IVEM, invasión vascular extramural; IPN, invasión perineural; DT, depósitos tumorales en grasa pericólica. Los valores de p fueron calculados usando el test estadístico de Fisher's (*) o la prueba U de Mann-Whitney (†).

El análisis estadístico univariante reveló que de los pacientes estudiados, 16 (36,4%) presentaban metástasis en los ganglios linfáticos y no hubo diferencias significativas entre la presencia de células tumorales en dichos ganglios con las variables estudiadas: sexo, edad, fase tumoral, diferenciación tumoral, invasión perineural o la presencia de *tumor budding*.

Sin embargo, este análisis mostró una asociación significativa entre la presencia de metástasis en los ganglios linfáticos y las siguientes variables histopatológicas:

- Presencia de depósitos tumorales en grasa (DTs), $p= 0,010$
- Presencia de invasión venosa extramural (IVEM), $p= 0,012$
- Número de células con patrón de membrana ANXA2 en el frente invasivo del tumor, $p= 0,001$

En este estudio se pudo comprobar como el número de ganglios analizado, siendo el valor de la mediana igual a 12, seguía las recomendaciones de la Comisión Americana Mixta sobre el Cáncer y la Unión Internacional Contra el Cáncer.

Se realizó además un análisis **multivariante** de regresión logística para valorar aquellas variables estadísticamente asociadas con la presencia de células tumorales en los ganglios linfáticos. Este análisis demostró una asociación de la presencia de metástasis en ganglios linfáticos con dos de las variables significativas: los depósitos tumorales en grasa (Ratio de probabilidad (IC del 95%); 9,82 (2,06-46,68); $p<0,05$) y el número de células con patrón de membrana ANXA2 en el frente invasivo del tumor (Ratio de probabilidad (IC del 95%); 1,09 (1,03-1,15) $p<0,05$). Así, la presencia de depósitos tumorales determina que haya 9,82 veces más probabilidad de tener metástasis en los ganglios linfáticos, que aquellos pacientes sin depósitos tumorales en la grasa pericólica. Del mismo modo, a mayor número de células con tinción de ANXA2 en la membrana celular, existe una probabilidad 1,09 veces mayor de que posean células tumorales en los nódulos linfáticos.

Posteriormente se evaluó mediante un análisis **univariante** la asociación que existía entre número de células con patrón de tinción de ANXA2 en membrana en el frente invasivo del tumor y diversos factores histopatológicos. Este análisis reveló que sólo la presencia de *tumor budding* en el borde invasivo ($p=0,001$) se asociaba significativamente con este patrón de tinción (Tabla 21).

VARIABLES	TOTAL	%	Nº Células marcadas con ANXA2 MEDIANA+RIC	VALOR p
Penetración tumoral				
T3	39	67,3	18±19	0,980
T4	19	32,7	16±25	
DT (n=56)				
Ausente	42	75,0	18±21	0,977
Presente	14	25,0	17±25	
IVEM (n=56)				
Ausente	42	75,0	17±21	0,850
Presente	14	25,0	21±19	
IPN (n=56)				
Ausentes	46	82,2	16±21	0,257
Presente	10	17,8	21±23	
<i>Budding</i>				
Ausente	35	60,4	14±23	0,001
Presente	23	43,6	24±19	
Diferenciación tumoral				
Pobre/moderada	44	75,9	16±22	0,456
Buena	14	24,1	20±22	

Tabla 21. Análisis univariante de relación entre factores histopatológicos y el número de células marcadas con Anexina A2. Los valores de p fueron calculados usando la prueba U de Mann-Whitney. RIC: rango intercuartílico.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El importante avance del diagnóstico molecular como consecuencia del desarrollo de la secuenciación genética y su aplicación en la generación de terapias dirigidas, ha permitido que el tratamiento del cáncer colorrectal haya comenzado a encaminarse hacia un proceso más individualizado. Estos avances junto con la mejora en la detección precoz de la enfermedad y la eliminación de pólipos precancerosos ha permitido que la mortalidad por CCR haya disminuido en los últimos años (196).

A pesar de todo esto, la supervivencia a cinco años de los pacientes afectados por CCR metastásico es menor del 10% (58). El mayor problema en el tratamiento de estos pacientes es la resistencia de los tumores a los fármacos empleados. Dicha resistencia, ya sea intrínseca o adquirida, resulta en el fracaso del tratamiento para la gran mayoría de los pacientes con enfermedad metastásica, y también es un problema importante en la enfermedad localmente avanzada, donde el 40-50% de los pacientes suele recaer (90,122). Por ello, hoy en día existe una clara necesidad de encontrar marcadores de pronóstico que sean capaces de predecir la respuesta o la resistencia a las terapias y así poder ser aplicados a la clínica con mayor éxito (197).

Durante las últimas dos décadas se han realizado multitud de estudios enfocados a identificar biomarcadores predictivos de respuesta a fármacos (122). Los biomarcadores pueden tener un valor pronóstico, pudiendo ser capaces de estimar la evolución de un paciente independientemente del tratamiento. A pesar del gran número de publicaciones que se ocupan de biomarcadores pronósticos y predictivos en CCR, sólo unos pocos biomarcadores moleculares se han aplicado en la práctica clínica.

EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE COLON FRENTE A FÁRMACOS QUIMIOTERAPÉUTICOS

El primer objetivo planteado en este trabajo fue identificar el nivel de sensibilidad de líneas celulares establecidas de cáncer de colon y de cultivos primarios derivados de pacientes, frente a los quimioterápicos utilizados en la práctica clínica (5-Fluorouracilo, Capecitabina, Irinotecan y Oxaliplatino) y al metabolito activo de Irinotecan, SN-38. Esta etapa es fundamental para poder determinar modelos celulares donde se puedan identificar posibles biomarcadores asociados a quimiorresistencia. De hecho, las líneas celulares tumorales y los

cultivos primarios proporcionan un buen modelo para estudiar el tumor en condiciones controladas *in vitro*.

Para evaluar la sensibilidad de las líneas celulares frente a los diferentes fármacos se examinó el posible efecto de éstos sobre la proliferación celular. Para ello, se realizaron curvas de crecimiento celular con concentraciones entre 1 nM y 100 μ M. Dichas concentraciones se seleccionaron de acuerdo con la bibliografía, queriendo abarcar un rango extenso y así comprobar el comportamiento celular de manera global. La concentración a la cual el fármaco disminuye el 50% de la proliferación celular (IC_{50}), se utilizó para determinar el punto de corte para discriminar entre células sensibles y resistentes a un determinado quimioterápico.

Se iniciaron los experimentos con el fármaco quimioterapéutico **5-Fluorouracilo**. Este fármaco se utiliza como terapia adyuvante en pacientes con cáncer de colon en fase III en combinación con OXA (FOLFOX) o IRI (FOLFIRI) (132). Se ha estudiado que la resistencia a 5-FU puede ser debida a una gran variedad de mecanismos. Se han descrito algunos como la reducción de la expresión de genes implicados en la activación de 5-FU, la sobreexpresión de la enzima timidilato sintasa o una disminución en la expresión de genes implicados en la replicación del ADN (198). Además, los transportadores de fármacos de la membrana, determinantes críticos de las concentraciones de fármaco intracelular, pueden desempeñar un papel en la aparición de toxicidad y el desarrollo de la resistencia contra la terapia basada en fluoropirimidinas (199). Estos factores protegerían a la célula resistente de la muerte celular inducida por la incorporación de 5-FU, dejando tiempo para reparar el daño producido.

Los estudios descritos en la literatura referentes a 5-FU suelen realizarse con un número no muy elevado de líneas celulares. Cheah y cols., consideraron a la línea celular Caco-2 resistente a 5-FU, utilizando 100 μ M de 5-FU para reducir la viabilidad celular al 88% (200). Del mismo modo Gómez-Monterrey y cols., obtuvieron una elevada IC_{50} (46 μ M) en su estudio con la línea celular Caco-2 (201). Asimismo, nuestros colaboradores han demostrado que la línea celular HGUE-C-1 derivada de un paciente resistente a 5-FU, presenta resistencia a dicho fármaco (202), al igual que en los experimentos mostrados en esta tesis.

Con el fin de obtener modelos celulares que describan los mecanismos asociados a la quimiorresistencia, se escogió un gran panel de líneas celulares de CCR. Se comprobó cómo dicho quimioterápico posee un escaso efecto inhibitorio en la proliferación de muchas de las líneas celulares estudiadas, aunque se pueden distinguir algunas con distintos grados de sensibilidad al fármaco. Estos resultados se refuerzan con el estudio de la proliferación celular

mediante crecimiento dependiente e independiente de anclaje y con la utilización de cultivos primarios derivados de pacientes con CCR. Las líneas celulares Caco-2 y HGUE-C-1 serían consideradas las que peor responden en comparación con SW620 y HCT 116, que serían las más sensibles (Figura 27), resultado que apoya los mostrados anteriormente.

Los ensayos de formación de colonias en agar blando, que permiten medir la proliferación independiente de anclaje de las células, han mostrado cómo 5-FU es más eficaz en esas condiciones, consiguiendo disminuir el crecimiento de manera notable de la línea celular Caco-2 con 50 μM de 5-FU (Figura 29). Tras comprobar que todos los cultivos primarios eran capaces crecer de manera independiente de anclaje, se continuó el estudio con los fármacos utilizados en la clínica. Concretamente, con una concentración de 50 μM de 5-FU no se consigue disminuir la proliferación celular más de un 20% en ninguno de ellos y sin embargo, si se logra en ensayos de crecimiento independiente de anclaje (Figura 31). Para continuar los ensayos con 5-FU, sugerimos elegir una concentración de 10 μM , que diferencia claramente a Caco-2 y HGUE-C-1 como resistentes y a SW620 y HCT 116 como líneas celulares sensibles.

Para superar las complicaciones médicas y los inconvenientes asociados con la administración intravenosa de 5-FU (como mucositis, diarrea, neutropenia y vómitos entre otros) (199), se han desarrollado fármacos como **Capecitabina**, precursor de 5-FU administrado de forma oral cuyo uso es equivalente al de 5-FU (133,141). La mayoría de los artículos donde se estudia el efecto de Capecitabina, han sido realizados en pacientes. En un estudio llevado a cabo por Ciccolini y cols., comprobaron que 100 μM de Capecitabina no disminuía el crecimiento de la línea celular LS 174T en más de un 20%, del mismo modo que los resultados presentados (203). Las diferencias encontradas entre 5-FU y Capecitabina se deben a que ésta última necesita ser metabolizada a 5-FU. Apoyando este mínimo efecto descrito en literatura en líneas celulares, nuestros resultados aportan que únicamente en la línea celular HT29, se consigue disminuir el crecimiento más del 50% con una concentración elevada de Capecitabina, en torno a 20 μM (Figura 32). En cultivos primarios el resultado es similar a 5-FU, donde el fármaco no consigue inhibir el crecimiento celular más del 20%, confirmando su baja efectividad, y por tanto considerando a todos ellos resistentes al tratamiento con Capecitabina (Figura 33). Nuestro estudio ha demostrado *in vitro*, que aun utilizando un amplio panel de líneas celulares y alta concentración de Capecitabina, no se consigue disminuir la proliferación celular del mismo modo que con 5-FU. Aunque resulte

efectiva en experimentos con pacientes, no lo es utilizándola en líneas celulares al no poder ser metabolizada por éstas.

Otro de los fármacos utilizados como terapia adyuvante y en CCRm es **Irinotecan**. La adquisición de resistencia a este fármaco se debe entre otros motivos a los niveles de expresión y alteraciones en la estructura de la enzima topoisomerasa I (204). Del mismo modo que ocurría con los fármacos anteriormente comentados, los estudios referentes a IRI *in vitro* suelen utilizar un número bajo de líneas celulares. Un estudio con multitud de líneas celulares fue realizado por Li y cols., donde analizaron mediante ensayos de proliferación celular el efecto de IRI. Observaron que en las células SW620 y LoVo se obtiene una IC_{50} no muy elevada, pero por el contrario, en líneas celulares como HCT 116, SW480, DLD-1, Caco-2, HT29 y LS 174T se necesitan concentraciones superiores del fármaco. Las diferencias con nuestro estudio podrían deberse al mayor tiempo de exposición utilizado (144 horas) (205). Los resultados hallados en el presente trabajo amplían el conocimiento acerca de la respuesta al fármaco IRI, al utilizar un amplio panel de líneas celulares y cultivos primarios derivados de pacientes. Al analizar el efecto antiproliferativo, en todas las líneas celulares estudiadas se logra una disminución de la proliferación (Figura 34). Sin embargo, el estudio de los cultivos primarios demuestra que en ninguno de ellos el fármaco disminuye su crecimiento más del 30% con 50 μ M de IRI (Figura 35). Al analizar el crecimiento mediante experimentos de proliferación independiente de anclaje, se comprueba una mayor eficacia tanto en líneas celulares establecidas como en cultivos primarios, al igual que ocurría con el fármaco 5-FU. Además de estudios de proliferación celular se realizaron ensayos de ciclo celular por citometría de flujo (datos no mostrados). Estos experimentos reflejan un bloqueo en una determinada fase del ciclo celular en todas las líneas celulares, incluso en la que peor responde en proliferación celular (Caco-2), corroborando el efecto antiproliferativo de IRI.

Del mismo modo que se analizó el efecto antiproliferativo de Irinotecan, se estudió su metabolito activo, **SN-38**. Se ha comprobado cómo SN-38 posee una potencia 1.000 veces mayor en lo que se refiere a la inhibición de la topoisomerasa I y 2.000 veces mayor desde el punto de vista citotóxico, al compararlo con Irinotecan (206). Según la bibliografía, este fármaco es mucho más efectivo que IRI, consiguiendo una disminución del crecimiento celular con concentraciones 100 veces menores que las utilizadas para IRI, lo que nuestros resultados corroboran. Curiosamente, el cultivo primario HCUVA-CC-1 es el que responde peor a SN-38, obteniendo una proliferación celular en forma de colonias del $51,91 \pm 5,15\%$, tras ser tratado con una concentración de 5 μ M.

Dado que con el estudio de Irinotecan y SN-38 no se apoya la hipótesis inicial de hallar líneas celulares sensibles y resistentes, debido a que todas las células responden de manera similar, no se continuaron analizando los mecanismos que predispongan a una mayor o menor sensibilidad. Para continuar el estudio de SN-38 se deberían realizar ensayos de proliferación con menores concentraciones que diferenciaran líneas celulares resistentes y sensibles.

Finalmente, el último fármaco donde se estudió el efecto antiproliferativo fue **Oxaliplatino**. Los resultados de los ensayos de proliferación celular dependiente e independiente de anclaje apoyan la hipótesis planteada y permitieron clasificar a las líneas celulares en sensibles, con una IC_{50} inferior a 10 μ M y en resistentes, si su valor de IC_{50} era superior a 10 μ M. Basados en los resultados obtenidos con estos dos tipos de ensayos, las líneas celulares DLD-1 y HCT-15 se consideran resistentes, mientras que el resto de las líneas celulares son catalogadas como sensibles. Desde ese momento, ensayos posteriores se realizaron con las líneas celulares DLD-1 y HCT-15 como resistentes y HCT 116, LS 174T, SW480 y SW620 como sensibles. En los cultivos primarios estudiados también se realizó una clasificación en sensibles (HCUVA-CC-1, CC-3CT y CC-34) y resistentes (HCUVA-CC-1CT, CC-56, CC-58, CC-60, CC-62 y CC-71). Estudios sucesivos se hicieron con HCUVA-CC-1, CC-3CT, CC-56 y CC-71.

Varios estudios avalan los resultados aquí mostrados. Gaur y cols., observaron que las líneas celulares HCT 116, LS 174T y SW480 mostraron niveles bajos de IC_{50} (207); al igual que un estudio realizado por Ikehata y cols., donde los investigadores advirtieron una alta sensibilidad de HCT 116 y HT29 frente al fármaco (208).

Igual que ocurre con los fármacos anteriormente comentados, la bibliografía referente al estudio de proliferación celular con OXA es muy variada y se evidencia que, aun con la misma línea celular y el mismo fármaco, los efectos sobre la proliferación celular difieren entre estudios. Se ha determinado que el pase de la línea celular, la densidad celular, el tiempo de exposición, el vehículo en el que se disuelve el compuesto y el ensayo que se use para cuantificar el efecto citotóxico (XTT, MTT, Resazurina, cristal violeta, ensayo luminiscencia de ATP) pueden influir sobre la determinación de los valores de IC_{50} (209,210). Así mismo, hay que tener en cuenta las condiciones en las que se encuentran las líneas celulares y el pase que se utilice para los experimentos.

Tras el estudio de los fármacos anteriormente expuestos, se decidió continuar la identificación de biomarcadores asociados a la sensibilidad y/o resistencia en el fármaco

Oxaliplatino. Aunque con experimento con 5-Fluorouracilo distinguíamos entre líneas celulares sensibles y resistentes, decidimos profundizar en el estudio con Oxaliplatino, al ser un fármaco más novedoso y en el que su mecanismo de acción no ha sido tan estudiado.

CAPACIDAD DE SEÑALIZACIÓN Y REPARACIÓN DE DAÑO AL ADN FRENTE A OXALIPLATINO

Para buscar posibles marcadores moleculares que pudiesen explicar este comportamiento diferencial, se escogió una concentración de 10 μ M como punto de corte para clasificar a las líneas celulares como resistentes y sensibles. Hoy en día los mecanismos más estudiados para la búsqueda de marcadores asociados a la respuesta a OXA son el del propio fármaco y los sistemas de reparación del ADN, como las proteínas XRCC1 y ERCC1 (122). Sin embargo, la señalización del daño en el ADN es un fenómeno importante previo a la reparación que no ha sido ampliamente estudiado, por lo que se decidió buscar marcadores asociados a dicha señalización.

Se comenzó esta búsqueda atendiendo al efecto de rotura que produce el fármaco en la cadena de ADN, investigando en primer lugar si las líneas celulares eran capaces de responder a esas roturas. Al comienzo del daño en el ADN, el complejo MRN, integrado por MRE11, Rad50 y NBS1, percibe el daño, se une a la cadena rota del ADN y transmite esa información a la enzima ataxia telangiectasia mutada (ATM) encargada de continuar la señalización. Para poder formar el complejo, las proteínas que lo constituyen deben ser funcionales, y de hecho, es sabido que MRE11 estabiliza a Rad50 y a NBS1 en la formación del complejo (151,211).

Dada la importancia de la histona H2A.X al inicio de la respuesta al daño en la cadena de ADN, se realizaron experimentos orientados a comprobar el nivel de fosforilación de la dicha proteína. La primera función de la histona H2A.X es unirse al complejo MRN, previamente unido a ATM, para potenciar la señal de rotura y reparación de la hebra de ADN. Esta variante fosforilada, γ H2AX, tiene una extensión C-terminal que es utilizada para reparación del ADN (212,213).

Con el fin de comprobar el efecto que ejercía OXA en las rutas de señalización del daño, se analizaron además los niveles de expresión de proteínas de las rutas ATR-Chk1 y ATM-Chk2, implicadas en la señalización de respuesta a daño en cadena sencilla y de cadena doble, respectivamente. Posteriormente, para una mejor comprensión del efecto antiproliferativo del

fármaco, y como consecuencia final de la señalización del daño, se estudió por citometría de flujo la distribución del contenido de ADN en las fases del ciclo celular.

Debido al papel que ejerce p53 en la respuesta al daño en el ADN (señalización y reparación) y la progresión del ciclo celular (110,155) en esta tesis se han analizado las mutaciones puntuales en este gen en las líneas celulares establecidas y en los cultivos primarios, para comprobar si existe asociación entre las mutaciones de dicho gen y la respuesta a OXA (Tabla 15). *TP53* es un gen supresor que aparece mutado en la mitad de los tumores sólidos conocidos, aunque la frecuencia de mutación difiere según el tipo de cáncer. Alrededor del 90% de las mutaciones encontradas pertenecen a la región entre los codones 125-300 (107). Del mismo modo, se investigó la actividad transcripcional de p53, antes y después del tratamiento con OXA. En concordancia con dicha información, la mayoría de las mutaciones encontradas en las líneas celulares estudiadas están localizadas en el dominio de unión a ADN (aminoácidos 102-293), y dichas mutaciones fueron comprobadas en la base de datos de la Agencia internacional de investigación en Cáncer (IARC).

Tras analizar las rutas de señalización del daño en el ADN se obtuvieron tres modelos celulares. En ellos se explica el mecanismo de acción del fármaco Oxaliplatino desde el daño producido en el ADN, el efecto en el ciclo celular y la supervivencia o muerte celular.

El **PRIMER MODELO**, representado por las líneas celulares sensibles, **SW480** y **SW620**, sigue el patrón más conocido descrito para las roturas en la cadena de ADN, consiguiendo una correcta señalización de dicho patrón. Se expresan niveles basales de las proteínas del complejo MRN y consecuentemente, son capaces de formar el complejo que se unirá a la doble hélice. A este complejo, se ensambla posteriormente la proteína ATM habiéndose activado por fosforilación en serina 1981 (Figura 49). ATM interacciona directamente con la subunidad NBS1 y fosforilará a la histona H2A.X en serina 139, cuyos niveles aumentan considerablemente conforme se incrementa el tiempo de exposición al fármaco (γ H2AX) (Figura 47). En un estudio previo se investigó el efecto de OXA en la línea celular SW480, donde sin embargo, no se observó un incremento importante de γ H2AX (207). En dicho estudio, los investigadores utilizaron la misma concentración pero tiempos de exposición al fármaco menores.

Posteriormente la proteína ATM además de fosforilar a la histona H2A.X activa a las proteínas control, Chk1 y Chk2, por fosforilación en serina 345 y treonina 68 respectivamente. Ambas proteínas fosforiladas inhiben la defosforilación de la fosfatasa Cdc25C. Cdc25C

fosforilada es secuestrada por 14-3-3 en el citoplasma, contribuyendo a su degradación por el proteosoma, reflejado en la disminución en los niveles de expresión de Cdc25C total. La consecuencia de la disminución en la expresión de Cdc25C es la inhibición del paso hacia la mitosis y bloqueo del ciclo en la fase G₂/M. Del mismo modo, Chk1 y Chk2, fosforilan a Cdc25A (datos no mostrados) y dicha fosforilación, que es una señal de ubiquitinación, induce la disminución de los niveles de expresión de Cdc25A total (Figura 49). La consecuencia de la disminución de Cdc25A es el bloqueo de la ciclina A/E con Cdk2, lo que conlleva un bloqueo en el paso de la fase G₁ a la fase S del ciclo celular (182). Concretamente, se produce al inicio una acumulación de células en la fase S, que va evolucionando hacia un aumento de la proporción de células en la fase SubG₁ y en la fase G₂/M, ésta última muy marcada en la línea celular SW620 (Figura 53). El bloqueo observado en las fases S y G₂/M del ciclo celular en dichas líneas celulares sensibles al fármaco OXA es la consecuencia final de la activación de la ruta de señalización del daño en la cadena de ADN.

Un estudio realizado por Nannizzi y cols., demostró que en las líneas SW620, LS 174T y HT29 se producía un aumento del porcentaje celular en la fase S y G₂/M del ciclo celular tras el tratamiento con OXA, del mismo modo que en nuestro estudio (120).

Además del efecto a nivel de las rutas de señalización, se comprobó cómo el fármaco OXA era capaz de provocar muerte celular programada o apoptosis. Esto se ve reflejado por un lado, en experimentos de ciclo celular, con un aumento en el número de células en la fase SubG₁ del ciclo y por otro, mediante la fragmentación de la proteína PARP-1, concretamente en la línea celular SW480 y en los cultivos primarios HCUVA-CC-1 y CC-3CT (Figura 55).

En este modelo se incluyen además a los cultivos primarios **HCUVA-CC-1 y HCUVA-CC-3CT**, ambos sensibles al fármaco OXA. Se comprobó el nivel de expresión basal de las tres proteínas del complejo MRN (MRE11, Rad50 y NBS1), y el aumento de γ H2AX tras el tratamiento con OXA durante 24, 48 y 72 horas. Con ello se corrobora que poseen la capacidad de iniciar la respuesta frente a posibles roturas en la cadena de ADN (Figura 46 y Figura 48). Además, se produce un aumento de fosforilación de Chk1 y Chk2 tras el tratamiento con 10 μ M de OXA durante 24 horas (datos no mostrados). La consecuencia final de la señalización del daño se observó en una acumulación celular en la fase S del ciclo celular y posteriormente, a mayor tiempo de exposición, un bloqueo en fase G₂/M y acumulación de células en SubG₁, síntoma de muerte celular.

En lo relativo a *TP53*, las líneas celulares SW480 y SW620 tienen una mutación en el aminoácido 273, en este caso en homocigosis, donde una Arginina ha sido sustituida por una Histidina (**p.R273H**). Nuestros resultados de actividad transcripcional sugieren que la presencia de dicha mutación, encontrada también en los cultivos primarios HCUVA-CC-1 y HCUVA-CC-3CT, tendría como consecuencia una funcionalidad de la proteína p53 significativamente inferior a la actividad presentada por las líneas celulares sin mutaciones (Figura 60). Este cambio de aminoácidos provoca que la proteína formada no reconozca la secuencia específica de ADN a la que se tiene que unir, debido a la localización de p.R273H en la zona de unión a la doble cadena. Cuando estas células se exponen al tratamiento con OXA, la proteína p53 no puede ejercer su función de forma adecuada, y no es capaz de unirse a las secuencias promotoras del ADN. Dichas secuencias podrían ser aquellas que codifiquen proteínas de reparación, cuyo resultado es que el daño causado no sea remediado. Se forma una proteína inactiva que provocaría que las células no sobrevivan al tratamiento. Esto se puede ver reflejado de manera gráfica cuando analizamos la funcionalidad de p53, donde ésta no se ve modificada con OXA (Figura 61). Aunque las vías de señalización estén intactas, las rutas de reparación no consiguen activarse, por lo que la consecuencia final es la muerte celular.

Del mismo modo, se analizó la actividad transcripcional de p53 de los cultivos primarios HCUVA-CC-1 y CC-3CT, ambos sensibles al tratamiento con OXA. Comprobamos que la consecuencia de dicha mutación (p.R273H) es la formación de p53 con una actividad elevada, pero significativamente inferior a la presentada por el fenotipo silvestre (Figura 60). Tras el tratamiento con OXA obtenemos el mismo resultado que en SW480 y SW620; no se aprecia modificación de la actividad, es decir, p53 no puede activarse frente al daño causado por el fármaco (Figura 61). Parece ser que aun con una mezcla de clones homocigóticos portadores de mutaciones y heterocigóticos para *TP53*, se forma una cantidad de proteína insuficiente para desencadenar procesos de reparación. De este modo, corroborando lo descubierto en las líneas celulares, la señalización se realizaría de manera independiente de p53 que culmina con el bloqueo del ciclo celular en fase S y G₂/M. Sin embargo, la reparación sería dependiente de p53, ya que HCUVA-CC-1 y CC-3CT no son capaces de remediar el daño provocado y mueren. Estas mutaciones concretas no impiden que p53 active procesos de muerte celular, aunque es sabido que la mutación p.R273H, tiene implicación en multitud de vías celulares principalmente en respuesta al daño al ADN y también en ciclo celular y apoptosis (214,215), comprobado en el presente trabajo. Un único estudio analiza la importancia de la localización de una mutación en R273, punto caliente de mutaciones conocidas como p.R273H, p.R273C y p.R273G, que ocurren con elevada frecuencia en

muestras de pacientes. En dicho estudio encontraron un incremento de proliferación, invasión y resistencia a fármacos *in vitro* en muestras con p.R273H y p.R273C, a diferencia de las que poseían la mutación p.R273G (216). Sin embargo en nuestros resultados, la presencia de p.R273H no aumenta la resistencia a OXA.

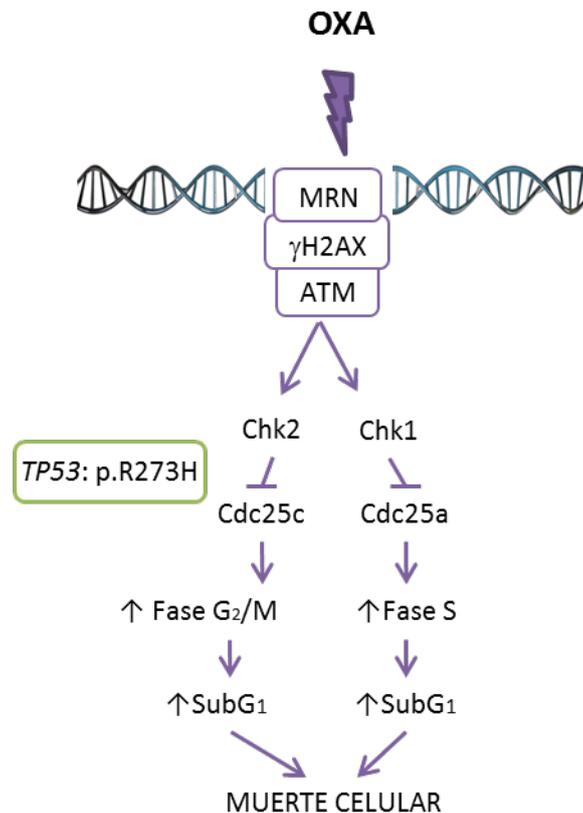


Figura 76. Representación esquemática de la ruta de señalización del daño en el ADN del primer modelo.

El **SEGUNDO MODELO** celular quedaría representado por las líneas celulares **HCT 116** y **LS 174T**, sensibles al tratamiento con OXA. En el complejo MRN, los niveles de Rad50 son muy inferiores a los de las demás líneas celulares, y además no expresan MRE11, debido a una mutación conocida en el gen *MRE11* (154). De este modo, no forman de manera correcta el complejo MRN, y no son capaces de unirse a la cadena doble de ADN cuando ha sufrido una rotura. Como consecuencia inmediata, la proteína ATM no se activa (Figura 50) y la histona H2A.X no se fosforila (Figura 47), ambos eventos implicados en el inicio de la señalización correcta del daño. Aun siendo sensibles al tratamiento, la fosforilación de ATM y de la histona H2A.X no se considerarían biomarcadores de roturas en el ADN.

En los trabajos de Takemura y cols., estudiando el complejo MRN demostraron que las células deficientes en este complejo, también lo son para activación de la proteína Chk2,

dependiente de ATM. Sin embargo, sus resultados confirman que la activación de Chk1 es independiente de MRN (211). No obstante, nuestros experimentos demuestran lo contrario, ya que obtenemos una activación de la proteína Chk2, reflejado en una mayor fosforilación tras el tratamiento, en estas líneas celulares, donde *MRE11* aparece mutado. Esto sugiere una activación de la proteína Chk2 por un sistema independiente de MRN-ATM. Park y cols., demostraron activación de Chk2 en la línea celular HCT 116, al igual que en nuestro estudio, tras el tratamiento con OXA 10 μ M (217).

Una vez activada por fosforilación en treonina 68, Chk2 es capaz de inhibir la defosforilación de la fosfatasa Cdc25C, impidiendo que defosforile cdc2 y por tanto ésta siga unida a ciclina B, produciendo una parada del ciclo celular en la fase G₂/M (Figura 50 y Figura 53). El efecto de OXA en la fosfatasa Cdc25C fue también estudiado por Volland y cols., donde las células se trataron con 5 μ M de OXA durante 24 y 48 horas y consiguieron una disminución de la proteína total dependiente del tiempo (218). Al analizar el nivel de expresión de la fosfatasa Cdc25A, comprobamos cómo desciende con el tratamiento, tras su ubiquitinación, consecuencia de fosforilación por parte de Chk2 (datos no mostrados). Sin embargo dicha disminución no tiene efecto a nivel de ciclo celular, donde se produce una bajada en la fase S.

Comprobamos por citometría de flujo que en dichas líneas celulares se produce un bloqueo en la fase G₂/M, mucho más marcado en la línea celular HCT 116, y máximo tras 72 horas de tratamiento. Del mismo modo que ocurría con SW480 y SW620, el bloqueo observado en la fase G₂/M del ciclo celular en HCT 116 y LS 174T es la consecuencia final de la activación de la ruta de señalización del daño en la cadena de ADN. El perfil de ciclo celular en la línea celular HCT 116 ha sido ampliamente estudiado. Arango y cols. (219) encontraron acumulación de células en la fase G₂/M del ciclo celular y reducción en la proporción de éstas en la fase S, tras el tratamiento con OXA, acompañándose de una acumulación de células en la fase SubG₁, que indica desencadenamiento de apoptosis dependiente del tiempo. Este acúmulo de células HCT 116 en la fase G₂/M también se reflejó en un estudio donde fueron tratadas con 10 μ M de OXA durante 24 horas (159).

Como ya se ha indicado, otro de los mediadores de la señalización, activado por ATM y Chk2 es p53. HCT 116 y LS 174T no poseen mutaciones en este gen, de modo que, cuando las células se tratan con OXA, se consigue la inducción de uno de sus efectores, la proteína p21, cuya función es el bloqueo en las fases S y G₂/M del ciclo celular. En las demás líneas celulares, con mutaciones en *TP53* no se consigue activar la expresión de p21 (Figura 51).

Al analizar la actividad transcripcional de p53 en las líneas celulares HCT 116 y LS 174T, con TP53 silvestre, observamos una actividad basal de p53 significativamente superior a la del resto de líneas celulares. Cuando se exponen al quimioterápico, ven incrementada su funcionalidad en un porcentaje muy elevado respecto al control (Figura 61). En estas células se activa p53, fosforilado por Chk2, que impulsa mecanismos señalización. Estas líneas celulares poseen una mutación en el gen *MRE11*, lo que no impide que se active Chk2 y consecuentemente aparezca un aumento en las fases S y G₂/M del ciclo celular. Sin embargo, aun bloqueando el ciclo celular, las células no son capaces de reparar el daño y consecuentemente se produce una muerte celular. Esto es debido a que MRE11 está implicada en procesos de reparación homóloga del daño de cadena sencilla y cadena doble por su actividad endo y exonucleasa (220) y al no ser activa no se consigue reparar el daño. Debido a esto, la reparación potenciada también por γ H2AX no se llevaría a cabo.

Dado que **HCUVA-CC-56** no posee mutaciones en *TP53*, al igual que HCT 116 y LS 174T, se incluyó dentro del segundo modelo. Dichas células poseen una elevada actividad basal de la proteína p53. Al analizar la funcionalidad tras el tratamiento, ésta aumenta aunque no de manera significativa. Se ha observado que HCUVA-CC-56, al contrario que HCT 116 y LS 174T, tiene la capacidad de iniciar la señalización del daño, observado en los niveles basales del complejo MRN. El hecho de tener intacto el complejo MRN les daría la capacidad de seguir la señalización del daño mediante el aumento de fosforilación de la histona H2A.X tras OXA. Como consecuencia final se produce el incremento de la fase G₂/M pronunciado a las 72 horas y, aun habiéndose considerado resistentes en experimentos de proliferación celular, activan rutas de señalización del daño que se traduce en un bloqueo de las fases del ciclo celular. El bloqueo en la fase G₂/M del ciclo celular sería necesario para la posterior reparación de las lesiones. La proteína p53 activa es capaz de unirse a las secuencias promotoras de proteínas de reparación, cuya consecuencia es la supervivencia celular tras el tratamiento, observado tanto en experimentos de crecimiento dependiente e independiente de anclaje, como en el aumento de la fase SubG₁ en el ciclo celular. Además de p53 activa, el hecho de poseer MRE11 intacto, y un aumento de fosforilación de H2A.X contribuiría en la reparación del daño.

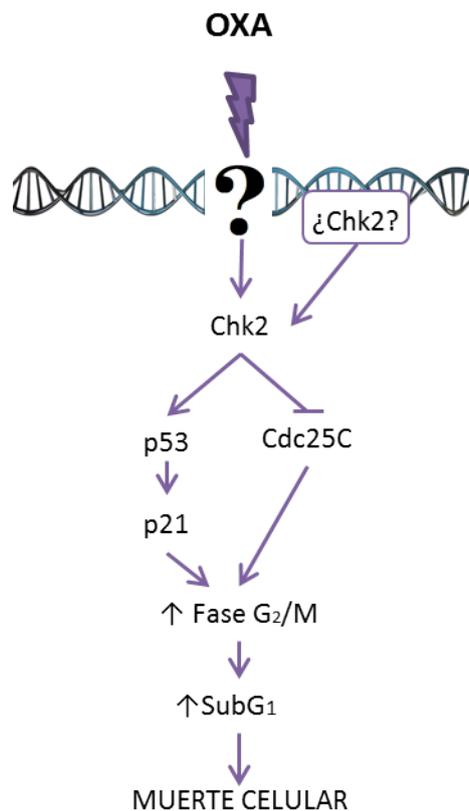


Figura 77. Representación esquemática de la ruta de señalización del daño en el ADN del segundo modelo.

El **TERCER MODELO** celular fue desarrollado en las líneas celulares, **DLD-1** y **HCT-15**, resistentes al tratamiento con OXA. En ellas observamos valores de expresión basal para las proteínas formadoras del complejo MRN (Figura 45), por lo que son capaces de unirse entre ellas a la doble hebra de ADN y detectar roturas cuando éstas se produzcan.

Curiosamente, el fármaco no es capaz de provocar la activación de ATM por fosforilación y consecuentemente no se une al complejo MRN. De este modo, al analizar los niveles de fosforilación (serina 139) de la proteína H2A.X, γ H2AX, no obtenemos un incremento importante de ésta tras el tratamiento (Figura 47). Asimismo, tampoco se produce un aumento en la fosforilación de la proteína ATR, comúnmente activadora de Chk1. No obstante, al continuar explorando la ruta de señalización en estas líneas celulares observamos un incremento en la fosforilación de Chk1 tras 24 horas de tratamiento. De este modo, Chk1 se activaría por una vía distinta a las conocidas de ATM o ATR. Sin embargo, a pesar de la activación de Chk1 no se aprecia un descenso en los niveles de Cdc25C tras el tratamiento, siguiente paso de la ruta. Los valores elevados de Cdc25C provocan que no se consiga un bloqueo en la fase G₂/M del ciclo celular, y finalmente las células continúen dividiéndose. Del

mismo modo, los niveles totales de la fosfatasa Cdc25A, responsable del paso de la fase G₁ a la fase S del ciclo celular no se modifican tras el tratamiento. Por citometría de flujo se confirmaron dichos resultados, observando que el perfil del ciclo celular de DLD-1 y HCT-15 no se veía alterado por OXA (Figura 53), salvo por una leve acumulación en la fase S, la no aparición de fenómenos de apoptosis y por consiguiente la supervivencia celular. Además se comprobó cómo a 24, 48 y 72 horas de tratamiento tampoco se producía fragmentación de PARP-1, otro de los signos de apoptosis celular. Por tanto, se deduce que el efecto del fármaco no es suficiente para producir parada en ninguna fase del ciclo, por lo que las células siguen proliferando.

El cultivo primario representativo en este modelo sería HCUVA-CC-71, también resistente a 10 µM de OXA en experimentos de proliferación celular. Dicho cultivo primario, como todos los estudiados, posee una expresión basal de las tres proteínas del complejo MRN (MRE11, Rad50 y NBS1). El siguiente paso analizado de la ruta de señalización fue el nivel de fosforilación de H2A.X tras el tratamiento con OXA durante 24, 48 y 72 horas, donde al contrario que con DLD-1 y HCT-15, se obtuvo un aumento de γH2AX. Tras este paso, Chk2 se activó por fosforilación (datos no mostrados). La consecuencia final de la señalización del daño fue analizada por ciclo celular. El primer efecto a 24 horas es un bloqueo del ciclo en la fase S y posteriormente, a mayor tiempo de exposición, un bloqueo en fase G₂/M y acumulación de células en SubG₁ a las 72 horas, síntoma de muerte celular.

En lo relativo a *TP53*, las líneas celulares DLD-1 y HCT-15, poseen una mutación en el aminoácido 241 en heterocigosis, donde una serina ha sido sustituida por una Fenilalanina (p.S241F). Este aminoácido (serina) se encuentra en el dominio de unión al ADN, haciendo que la proteína pierda funcionalidad en las líneas celulares descritas. Esta mutación impide que se forme una proteína capaz de activarse frente al daño, observado en su bajo nivel de funcionalidad (Figura 60); e impide que se desencadenen mecanismos de señalización tras el daño en el ADN. En esta vía, estas células poseen otra mutación en *Chk2*, lo que implica un paso más de bloqueo en la correcta señalización que se desencadena tras detectarse la lesión producida. La señalización sólo se aprecia en el aumento de fosforilación de Chk1 y en el débil aumento producido en la fase S del ciclo celular en estas células.

Estos hallazgos han sido corroborados en el cultivo primario HCUVA-CC-71, el cual también posee la mutación p.S241F y es resistente a concentraciones 10 µM de OXA. En contraposición a lo ocurrido en las líneas celulares establecidas, en este cultivo primario al tratarlo con OXA observamos un aumento en las fases S y G₂/M del ciclo celular. Sin embargo,

del mismo modo que ocurre con las células DLD-1 y HCT-15, la proteína p53 posee una actividad basal mínima en experimentos de transfección (Figura 60). La funcionalidad de la proteína p53 con la mutación p.S241F en HCUVA-CC-71 aumenta de manera significativa tras el tratamiento (Figura 61), por lo que tiene la capacidad de bloquear el ciclo celular y activar proteínas de señalización y reparación y consecuentemente, las células consiguen superar el tratamiento y se siguen dividiendo. Este aumento significativo podría ser debido a que en HCUVA-CC-71 existen clones homocigóticos sin mutaciones y heterocigóticos silvestres/mutantes. Dichos clones sin mutación serían capaces de formar una proteína p53 que funcionaría de manera correcta. Estos estudios se complementan con la expresión del complejo MRN funcional y de la proteína Chk2 (datos no mostrados). La expresión de Chk2 funcional activaría a p53 tras el tratamiento con OXA y contribuiría a la correcta señalización. No se han encontrado artículos que relacionen la presencia de la mutación p.S241F con la sensibilidad a fármacos quimioterapéuticos.

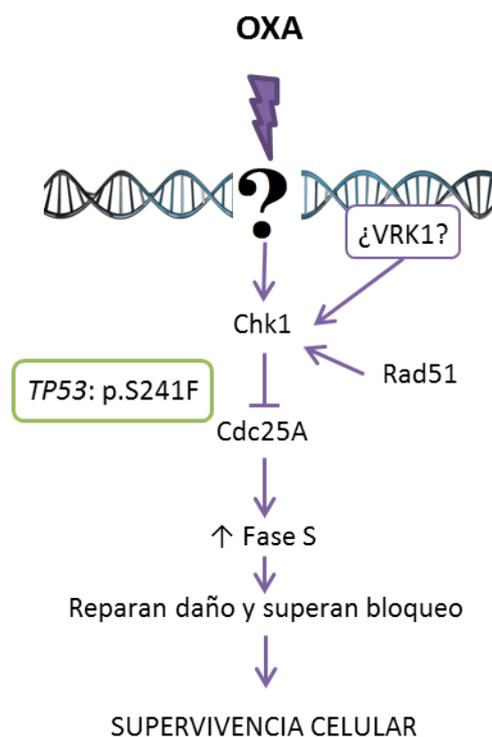


Figura 78. Representación esquemática de la ruta de señalización del daño en el ADN del tercer modelo.

De manera resumida, en las líneas celulares SW480 y SW620 y cultivos primarios HCUVA-CC-1 y CC-3CT, sensibles a OXA y con mutación p.R273H en *TP53*, se observa una activación de H2A.X, Chk1 y Chk2, y un bloqueo en las fases S y G₂/M del ciclo celular. En las líneas celulares HCT 116 y LS 174T, sensibles al tratamiento y con mutación en *MRE11* y sin

mutaciones en *TP53* se observa un incremento en la fosforilación de Chk2, de manera independiente de ATM/ATR, cuya consecuencia final es el bloqueo en la fase G₂/M del ciclo celular. En las líneas celulares DLD-1 y HCT-15, resistentes al fármaco y con mutaciones en *Chk2* y *TP53* se obtiene fosforilación de Chk1 que es independiente de ATM/ATR e insuficiente para provocar un bloqueo en alguna fase del ciclo celular. Por tanto, cabe destacar que para que las células sean resistentes a OXA, es necesario que haya al menos dos mutaciones en las rutas de reparación de daño en el ADN, como es el caso de DLD-1 y HCT-15, con mutaciones en *Chk2* y *TP53*. La presencia de ambas mutaciones tendría como consecuencia la continuidad del ciclo celular y por consiguiente la supervivencia celular. Por tanto, a nivel clínico sería importante analizar las mutaciones existentes en la ruta de señalización, para poder predecir la respuesta al fármaco Oxaliplatino.

Tras proponer estos tres modelos celulares, la gran incógnita que se presenta es cómo se produce la activación de Chk2 en HCT 116 y LS 174T y de Chk1 en DLD-1 y HCT-15. Para profundizar en ello, se planteó la búsqueda de posibles quinasas implicadas en la fosforilación de dichas proteínas control, Chk1 y Chk2. Se comprobaron los niveles de quinasas involucradas en la señalización iniciada tras daño en el ADN y otras conocidas, pero no se obtuvieron resultados concluyentes que apoyasen la activación de estas proteínas.

Dada la gran importancia de la quinasa VRK1 implicada en la respuesta al daño a varios niveles, como fosforilación de H2A.X y colocalización en los focos del daño (176), se investigó su nivel de expresión en las líneas celulares y se comprobó cómo todas ellas expresan la proteína, lo que implica un paso más en el estudio de la respuesta al daño provocado por el fármaco. Sin embargo, su expresión no se induce tras el tratamiento con OXA (Figura 57).

De igual modo, se analizaron los niveles de expresión de TTK/hMps1, DNA-PKcs y mTOR, quinasas implicadas en la respuesta al daño en el ADN. Únicamente se produjo una disminución en los niveles de TTK/hMps1 en LS 174T tratada con OXA. Los niveles de fosforilación de DNA-PK disminuyen en las líneas celulares resistentes a OXA, DLD-1 y HCT-15, y aumentan en la línea celular sensible, SW620; donde quizá pudiera tener un papel activador de las rutas de señalización. El papel de la proteína mTOR es conocido a nivel de proliferación y crecimiento celular y supervivencia (221), pero además actúa de manera indirecta en la regulación de la respuesta al daño en el ADN (222). Por ello se determinó si los niveles de expresión de dicha proteína se modificaban tras el tratamiento. En las líneas celulares DLD-1, HCT-15 y SW480 los niveles de la proteína fosforilada y total disminuyen tras el tratamiento con el fármaco, por tanto *a priori* no parece haber una conexión entre la activación de esta

proteína y su implicación en la respuesta a OXA así como en la posible activación de Chk1 y Chk2.

Para comprobar si existía una posible activación de Chk1 y Chk2 por parte de dichas proteínas, Chk1 fue inmunoprecipitada en HCT-15 y Chk2 en la línea celular HCT 116.

La proteína VRK1 tiene la función de activar a p53 en condiciones de estrés (174). En **HCT-15**, con mutación en *TP53*, no se pudo comprobar dicha activación. Sin embargo, en experimentos de co-inmunoprecipitación se observa una unión entre VRK1 y Chk1, que aumenta tras el tratamiento con OXA. Dicha activación podría suponer una nueva diana de VRK1, la proteína Chk1, después del tratamiento con OXA. VRK1 se activaría en respuesta al daño en la cadena de ADN, uniéndose a Chk1 y fosforilándola (Figura 58).

Otra de las proteínas ensambladas a Chk1, cuya unión se incrementa tras el tratamiento con OXA es Rad51. La recombinasa Rad51 se une a las hebras dañadas del ADN en los lugares donde se encuentra la proteína de replicación A (RPA), implicada en la señalización por parte de ATR, para promover la reparación homóloga del ADN (223). Esta activación de Rad51 viene promovida por su fosforilación por parte de Chk1 (224). Se ha comprobado cómo se producen focos de Rad51 en células HT29 tras el tratamiento con gemcitabina (225). Sin embargo, se han realizado escasos estudios relacionando Rad51 con el tratamiento con OXA. Park y cols., comprobaron cómo en células con deficiencias en proteínas MSH tratadas con OXA, la inhibición de Rad51 incrementaba marcadores de daño en cadena doble como γ H2AX y la fragmentación de PARP-1 (217). Las células HCT-15, que poseen mutaciones en dichas proteínas (226), parecen responder al tratamiento incrementando el número de Rad51 en el foco del daño, pero no aumentando γ H2AX. El reclutamiento de Rad51 en la hebra dañada supondría su activación por parte de Chk1 tras el tratamiento con quimioterápicos en líneas celulares de CCR. En las células HCT-15 podría considerarse que tiene lugar el inicio de una correcta reparación del daño cuyo objetivo final sería la supervivencia celular. Además de ello, la incorporación de Rad51 se realizaría de manera independiente de ATR, ya que no se encuentra activada en HCT-15 tras la administración de OXA.

En la línea celular **HCT 116**, clasificada como sensible al tratamiento con OXA, no se consigue una unión clara entre la proteína Chk2 con las proteínas TTK/hMps1, VRK1 y Rad51. La función más conocida de la proteína TTK/hMps1, que es la activación de Chk2 en treonina 68 (179), no se observó en nuestras condiciones. La ligera unión entre VRK1 y Chk2 no podría explicar la activación de Chk2. Sanz-García y cols., comprobaron que VRK1 es necesaria para

una completa fosforilación de H2A.X en serina 139 y que sin embargo, ATM y Chk2 no eran dianas de fosforilación de VRK1 (176). Esto se apoya con nuestros resultados, donde VRK1 no se une a Chk2 tras el tratamiento con OXA (Figura 59). Los experimentos de co-inmunoprecipitación no sugieren una clara unión de Rad51 con Chk2. Estos resultados apoyarían los obtenidos por Bahassi y cols., donde apuntan que la localización de Rad51 está regulada por Chk1 y no por Chk2 (227). En HCT 116, no se produciría una unión de Rad51 a la hebra dañada y consecuentemente, la rotura no se restauraría por la vía homóloga de reparación. La muerte celular se produciría debido a la no actuación de Rad51 y a la no expresión de MRE11, implicada también en el proceso de recombinación homóloga.

Una posible explicación de la activación de Chk2 sería la existencia de un pequeño acúmulo de dicha proteína asociada directamente a la cromatina. Esta cantidad de Chk2 asociado con la cromatina se activaría y liberaría de ella en respuesta al daño del ADN (228). Esta hipótesis tendría que ser demostrada en nuestras líneas celulares tras el tratamiento con OXA para comprobar si HCT 116 y LS 174T poseen dicho *pool* de Chk2 y qué otras implicaciones a nivel de señalización y reparación tendría.

VALORACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LA SENSIBILIDAD A OXALIPLATINO DE MUTACIONES SOMÁTICAS ASOCIADAS A CARCINOGENÉISIS

Otro de los objetivos planteados en esta tesis doctoral era investigar si la respuesta al fármaco OXA se asociaba a alteraciones genéticas de los genes ***KRAS***, ***BRAF*** y ***PIK3CA*** implicados en proliferación y supervivencia celular. Para ello, se analizó la presencia de dichas mutaciones en las líneas celulares establecidas y en los cultivos primarios. Los datos de las mutaciones determinadas para cada gen coinciden con la información consultada en la literatura y con los datos de la base de datos Cosmic del Instituto Sanger (226).

Tras analizar las mutaciones somáticas de las principales vías de señalización asociadas a la carcinogénesis y la proliferación celular con OXA, encontramos diferencias y similitudes entre las líneas celulares sensibles y resistentes a OXA presentando mutaciones puntuales tanto en el gen ***KRAS*** en el exón 1 como en el gen ***PI3K*** en los exones 9 y 20, así como para el gen ***BRAF*** (Tabla 13). La importancia de estas mutaciones suele ser estudiada en pacientes. Su implicación con la resistencia al fármaco Oxaliplatino no ha sido ampliamente estudiada en líneas celulares.

Concretamente, la respuesta de líneas celulares con mutación en *KRAS* frente al fármaco OXA fue diferente, por lo que *a priori* se demostraría que dichas mutaciones no predecirían la sensibilidad a OXA. Pocos estudios han valorado la influencia de dicha mutación utilizando un amplio rango de líneas celulares. De hecho, un estudio reciente con únicamente cuatro líneas celulares comprobó cómo SW480 y SW620 (con mutación) resultaron más sensibles que HT29 y HCT-8 (sin mutaciones) (229). Según los resultados expuestos, la mutación en el gen *KRAS* por sí sola no sería suficiente para predecir la respuesta al fármaco Oxaliplatino.

Se ha descrito que la mutación p.V600E en *BRAF* es una de las más frecuentes en tumores colorrectales (98,230). Sin embargo, la mayoría de las líneas celulares analizadas no poseen mutaciones en este gen, a excepción de Caco-2, Colo 201 y HT29 y la presencia de dicha mutación no predispone a un comportamiento celular determinado frente a OXA. Corroborando nuestros resultados de *BRAF*, Hirschi y cols., no observaron asociación entre la sensibilidad de líneas celulares a OXA y las diferentes mutaciones encontradas en *BRAF* (231).

En nuestro estudio observamos gran variación de respuesta a OXA entre las líneas celulares que presentan mutaciones en *PIK3CA*, concretamente en los exones 9 y 20, por lo que dichas mutaciones tampoco parecen estar asociadas al comportamiento de las células frente al tratamiento con OXA; y no predecirían la sensibilidad a OXA.

Se ha estudiado la existencia de mutaciones de *KRAS*, *BRAF* y *PIK3CA* en todos los cultivos primarios procedentes de pacientes afectados por CCR. De igual modo que en líneas celulares establecidas, no hay una relación entre *KRAS*, *BRAF* y *PIK3CA* y la sensibilidad o resistencia al tratamiento con OXA. En ningún de ellos aparecen mutaciones en el gen *BRAF*. Los cultivos primarios que responden a OXA (HCUVA-CC-1, CC-3CT y CC-34) poseen mutaciones distintas en los citados genes y aquellos que no responden bien a dicho fármaco, HCUVA-CC-56 (sin mutaciones en *PIK3CA*) y CC-71 (con mutación en *PIK3CA*), poseen mutaciones en *KRAS* en aminoácidos diferentes. Por todo ello, no se puede afirmar que exista una asociación entre el estado mutacional de dichos genes y la respuesta al fármaco Oxaliplatino.

ANÁLISIS DE LA PROTEÍNA ANEXINA A2 Y SU PAPEL EN LA INVASIVIDAD Y LA METÁSTASIS EN CÁNCER COLORRECTAL

Se realizó un análisis 2D-DIGE de las líneas celulares DLD-1, HCT-15, HCT 116 y LS 174T para explorar posibles cambios en la abundancia de las diferentes proteínas expresadas en dichas líneas celulares resistentes y sensibles a OXA. Entre las 17 proteínas encontradas, un tercio poseen funciones implicadas en el procesamiento del ARN mensajero y el otro tercio son mitocondriales.

Una de las proteínas con mayor abundancia en las líneas celulares DLD-1 y HCT-15 es la subunidad 2 de la helicasa dependiente de ATP, también denominada **Ku80**, implicada en la reparación del ADN, dentro del proceso de recombinación no homóloga (191). Aunque los estudios de búsqueda de biomarcadores de quimiorresistencia a OXA se centran en proteínas de reparación del daño en el ADN, existen pocos estudios que correlacionen el nivel de expresión de la proteína Ku80 como biomarcador de respuesta a OXA. Únicamente Jensen y cols., en 2004 demostraron que células deficientes en Ku80 eran resistentes a tratamientos con cisplatino (232). En nuestro estudio, todas las líneas celulares presentan niveles similares de expresión de Ku80, y éstos no se ven afectados por el tratamiento con OXA (Figura 62). Por tanto no se pudieron validar los resultados iniciales del 2D- DIGE y no se puede considerar esta proteína como biomarcador de sensibilidad al tratamiento con Oxaliplatino.

Otra de las proteínas presente en mayor abundancia en el grupo de resistentes fue **Anexina A2**. Experimentos de Western Blot validaron las diferencias encontradas en el análisis 2D-DIGE. ANXA2 se encuentra sobreexpresada en las líneas celulares HCT-15 y DLD-1 en comparación con HCT 116 y LS 174T (Figura 64). Dadas las múltiples funciones de ANXA2 relacionadas con la migración e invasión celular (71,73,233–235), quisimos comprobar dichas funciones en las líneas celulares sensibles y resistentes. Así, aquellas líneas celulares con una sobreexpresión de ANXA2, DLD-1 y HCT-15, resultaron tener mayor capacidad invasiva y migratoria en comparación con HCT 116 y LS 174T, cuya expresión de ANXA2 fue menor y presentaron menor habilidad para invadir y migrar (Figura 65). Una baja capacidad de invadir y migrar fue comprobada por Liu y cols., en HCT 116 y LS 174T (236). Del mismo modo, se analizó la capacidad migratoria e invasiva en un modelo celular altamente caracterizado. Cabe destacar que las líneas celulares SW480 y SW620 fueron derivadas del mismo paciente pero en fases distintas del cáncer. La línea SW480 se obtuvo del adenocarcinoma primario que padeció el paciente en el colon, mientras que la línea celular SW620 fue derivada de un ganglio

linfático cuando el cáncer evolucionó en una amplia metástasis al año siguiente de obtener la línea SW480 (195). Las células SW480 poseen una menor capacidad invasiva y migratoria frente a la línea celular SW620, la cual resultó tener mayor capacidad para atravesar la membrana porosa y la matriz a base de Matrigel en dichos experimentos *in vitro* (Figura 66). Un estudio recientemente publicado comparó del mismo modo la capacidad de invadir y migrar de ambas líneas celulares. Al igual que en nuestro estudio, estos investigadores demostraron que la línea celular SW620 poseía una capacidad significativamente superior de migración e invasión frente a la línea celular SW480 (237). Del mismo modo, otros estudios corroboran la habilidad invasiva de la línea celular SW620 (236,238). Estos resultados apoyan la hipótesis inicial de la existencia de líneas celulares con mayor y menor capacidad invasiva y uno de los mecanismos moleculares que explicarían dicha diferencia sería la proteína ANXA2.

Existen diversos estudios que relacionan el alto nivel de expresión de ANXA2 y la capacidad invasiva y migratoria de líneas celulares de cáncer de mama. Sharma y cols., demostraron que la línea celular altamente invasiva, MDA-MB231, expresaba altos niveles de ANXA2. Sin embargo, en la línea celular no metastásica MCF-7, no observaron o expresión de ANXA2 (71). Posteriormente, Zhang y cols., en 2006 observaron una sobreexpresión de ANXA2 y p11 en células invasivas de cáncer de mama comparado con células no invasivas (239). Estudios posteriores de Sharma y cols., en 2009, confirmaron la importancia de las interacciones entre ANXA2 y el activador tisular del plasminógeno en la superficie celular y demostraron que la generación de plasmina era esencial para la migración y neoangiogénesis celular (233).

ANXA2 ejerce su efecto potenciador de la migración al fosforilarse en tirosina 23 (P-ANXA2) (73,235). Esto fue comprobado en las líneas celulares SW480 y SW620. Experimentos de Western Blot demostraron que aun habiendo mayor cantidad de ANXA2 en la línea celular SW480 que en SW620, los niveles de fosforilación de ANXA2, P-ANXA2, en SW620 son superiores a los niveles de P-ANXA2 en la línea celular SW480 (Figura 68). Esta mayor proporción de P-ANXA2 se asociaría con mayor capacidad de invasión y migración.

Un estudio realizado por Wu y cols., mostró unos resultados similares al analizar la expresión de ANXA2 en líneas celulares de cáncer de cuello y cabeza. Utilizando 2D-DIGE con dos líneas celulares derivadas del tumor primario y del tumor metastásico del mismo paciente, observaron una mayor cantidad de ANXA2 en la línea celular proveniente de la metástasis (69). Otro estudio elaborado con células de cáncer de ovario reveló por técnicas de cuantificación y 2D-DIGE acoplada a cromatografía líquida-espectrometría de masas que ANXA2 estaba

sobreexpresada en la línea celular epitelial metastásica TOV-112D, comparada con la línea celular TOV-81D, con menor potencial maligno (240). Estos estudios junto con nuestros resultados, sugieren el importante papel que la proteína ANXA2 juega en las líneas celulares altamente invasivas y/o metastásicas.

La localización de ANXA2 en la célula ha sido ampliamente estudiada a lo largo de los años. Se ha demostrado que ANXA2 se une a los fosfolípidos de la membrana plasmática y es ahí donde participa en múltiples funciones, tales como activación del plasminógeno, agregación vesicular, regulación de canales iónicos, fibrinólisis, transporte por la membrana, reorganización del citoesqueleto, angiogénesis, adhesión celular y migración (72–74,192–194,235). Nuestros estudios de inmunofluorescencia en las líneas celulares de CCR revelan que en aquellas con una mayor capacidad invasiva (HCT-15, DLD-1 y SW620), ANXA2 se encuentra localizada en la membrana celular, mientras que en aquellas con menor capacidad migratoria e invasiva, HCT 116, LS 174T y SW480 (Figura 69-Figura 70), el patrón de tinción de la proteína ANXA2 aparece en el citoplasma.

La importancia de la localización en la membrana de esta proteína fue propuesta por Zheng y cols., donde examinaron, al igual que en el presente trabajo, la localización subcelular de ANXA2 en diversas líneas celulares de adenocarcinoma pancreático ductal. Encontraron que ANXA2 se localizaba predominantemente en la membrana celular en todas las líneas celulares que poseían alta capacidad de invasión, mientras que ANXA2 estaba presente predominantemente en el citoplasma de las líneas celulares con bajo potencial invasivo. En este estudio comprobaron cómo la fosforilación de tirosina 23 era necesaria para la localización de ANXA2 en la superficie celular. Para ello, aislaron la membrana de células que presentaban ANXA2 en la membrana, donde identificaron la proteína fosforilada y de células con ANXA2 citoplasmática, en las cuales no consiguieron aislar ANXA2 de la superficie celular (73).

Los ensayos realizados en líneas celulares establecidas se pudieron corroborar en de dos cultivos primarios derivados de pacientes con CCR. La capacidad migratoria e invasiva de estos cultivos primarios se observó en el cultivo primario cultivo HCUVA-CC-34, proveniente de un paciente con un carcinoma en fase IV, con metástasis hepática, el cual mostró gran capacidad migratoria e invasiva, al igual que las líneas celulares HCT-15, DLD-1 y SW620. Por el contrario, el cultivo HCUVA-CC-62, cuyo origen es un paciente en fase IIA, fue clasificado como un cultivo de baja capacidad invasiva, obteniéndose porcentajes de migración e invasión similares a las líneas celulares HCT 116, LS 174T y SW480 (Figura 67). Al realizar ensayos de

inmunofluorescencia para comprobar la localización celular de ANXA2 en estos cultivos primarios comprobamos que en HCUVA-CC-34, considerado dentro del grupo de alta capacidad invasiva, ANXA2 tiene una localización de membrana, a diferencia de HCUVA-CC-62, caracterizado por una menor capacidad de migrar e invadir, donde ANXA2 tiene una localización citoplasmática (Figura 71).

Dada la diferencia entre las líneas celulares respecto a su respuesta frente al tratamiento con OXA, quisimos comprobar si la localización de ANXA2 estaba implicada en la mayor o menor sensibilidad al tratamiento. Los resultados de estos experimentos confirman que OXA no afecta a la localización subcelular de la proteína ANXA2, la cual no se modifica tras el tratamiento, tanto en la línea celular sensible SW620, como en la resistente DLD-1 (Figura 72). Recientemente, en un estudio realizado en 2014, se comprobó también cómo no hay efecto alguno en la sensibilidad frente a OXA al silenciar *ANXA2* y *S100A10*, cuya proteína se une a los dímeros de ANXA2 en la superficie celular y ayuda en la activación de la plasmina (241). Al realizar ensayos con líneas celulares de CCR, RKO (sin mutaciones en *TP53*) y H630 (*TP53* mutado), ambas sensibles a tratamientos con 5-FU, demostraron que la expresión de ANXA2 en la línea silvestre no se veía alterada tras el tratamiento.

La siguiente fase del trabajo fue el estudio de la localización celular de ANXA2 en cortes histológicos de las biopsias de pacientes afectados por CCR del HCUVA. La tinción con hematoxilina y eosina (H&E) es la forma rutinaria de realizar una evaluación histológica del tumor, así como de analizar los ganglios linfáticos cercanos. Sin embargo, algunos estudios plantean que el análisis basado únicamente en la tinción con H&E es insuficiente para una evaluación adecuada. Por ello, hoy en día se han incorporado nuevas técnicas, como la biopsia del ganglio centinela o análisis inmunohistoquímicos y moleculares de las muestras de cáncer (87). El análisis de tejido sano de los pacientes estudiados mostró una tinción con ANXA2 con un patrón membranoso muy frágil en el lado apical de las células caliciformes de las glándulas de secreción de la mucosa normal del colon, y un patrón moderado de tinción citoplasmática en las células endoteliales. Por el contrario, el esquema de tinción de las células tumorales fue distinto al del tejido sano, apreciándose una potente tinción membranosa, especialmente marcada en el frente invasivo del tumor, en aquellos nidos tumorales que invaden la lámina muscular (Figura 73). Un ejemplo destacado es HCUVA-CC-34, paciente con CCR metastásico que muestra un patrón de tinción membranoso de ANXA2 (Figura 74).

La localización de ANXA2 de cortes histológicos de pacientes fue estudiada por Duncan y cols. (192), donde identificaron en muestras de pacientes con CCR un incremento de la

tinción con ANXA2 en el tumor primario, en comparación con tejido colónico normal. En este mismo estudio, obtuvieron mayor intensidad de expresión de ANXA2 en nódulos linfáticos afectados y esta expresión se vio incrementada con la fase tumoral. Experimentos de inmunohistoquímica en tejidos de hepatocarcinoma fueron realizados en 2012 por Sun y cols., donde encontraron ANXA2 expresada en el 60% de los tejidos. Su tinción era débil y se limitaba al citoplasma de los hepatocitos en tejidos no tumorales, mientras que identificaron una mayor tinción membranosa en las muestras tumorales (193), como se observa en las tinciones del presente trabajo. En muestras de pacientes con cáncer de páncreas, se ha estudiado la expresión de ANXA2 en tejido a nivel de ARNm y cantidad de proteína, encontrándose una sobreexpresión en el tejido canceroso frente a tejidos pancreáticos sanos (242). Además, un estudio realizado en 52 tejidos frescos, reveló una expresión importante de ANXA2 en la membrana celular (73). Concretamente, en 39 de los 52 tejidos de pacientes afectados por el cáncer de páncreas se vio incremento en la expresión de ANXA2 en la superficie celular y en el caso de los metastásicos, todos los estudiados sobreexpresaban ANXA2 en la membrana celular, lo que apoya el papel de ANXA2 en la progresión del carcinoma pancreático ductal. Estas investigaciones junto con la presentada en este trabajo, confirman la elevada expresión de ANXA2 en la membrana celular como un marcador de tejido tumoral.

Además de la tinción en membrana de la célula, se ha observado una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de *budding* y la tinción con la proteína ANXA2. Concretamente, el patrón de tinción encontrado en la membrana celular es característico de una determinada zona del tumor, denominada *tumor budding*, e identificada por pequeños grupos de células tumorales, pobremente diferenciadas, en el borde del tumor (Figura 75).

El *tumor budding* es un factor estudiado ampliamente en fases tempranas de la enfermedad. Ueno y cols., han demostrado que en fases tempranas de CCR con invasión en la submucosa existen tres factores asociados independientemente con la aparición de metástasis en los ganglios linfáticos: el grado tumoral, la invasión linfática y la presencia de *tumor budding*. Conforme se añade uno de estos factores, el riesgo de padecer metástasis en los ganglios linfáticos cercanos se incrementa considerablemente (243). Hace y cols., mostraron que la tasa de supervivencia a 5 años en pacientes en fase II con presencia de *tumor budding* era peor que la de aquellos pacientes con fase III sin presencia de *budding*. En otro estudio, Okuyama y cols. encontraron que el *tumor budding* era el único factor que podía asociarse con

una disminución de la supervivencia, incluso comparado con la presencia de metástasis ganglionares en estadio II-III de la enfermedad (81,82).

Dada la controversia en cuanto a las indicaciones de quimioterapia en CCR en fase II, se ha explorado la presencia de *tumor budding* como un factor para la inclusión de pacientes en los tratamientos quimioterápicos. Lamentablemente, no existen datos suficientes que evalúen la eficacia de la quimioterapia en pacientes en fase II y con presencia de *tumor budding* (80). Los estudios de *budding* en CCR de fase III son muy escasos y controvertidos. Lugli y cols., aun reconociendo que es un factor de mal pronóstico, no lo consideran importante en la enfermedad con afectación ganglionar (244). Del mismo modo, Sy y cols., aportan que el *budding* no proporciona información pronóstico independiente más allá de la aportada por los informes anatomopatológicos de rutina (245). El estudio de *budding* en el CCR metastásico no ha recibido mucha atención. Únicamente, un estudio de 43 pacientes demostró que la presencia de *budding* predice la respuesta a terapia anti-EGFR. Aquellos pacientes con mutación en *KRAS* y alta presencia de *budding* no respondieron de forma significativa a la terapia (244).

En el estudio presentado en este trabajo con 58 pacientes, además de comprobar que el patrón membranoso de tinción con ANXA2 es característico de *tumor budding*, se realizó un estudio de asociación entre el número de células con patrón positivo de tinción con ANXA2 en membrana en el frente invasivo del tumor y diversos factores demográficos e histopatológicos, entre los que se encuentra *tumor budding*. Curiosamente, sólo la presencia de *budding* en el borde invasivo ($p=0,001$) se asocia significativamente con esta pauta de tinción (Tabla 21).

Diversos estudios han correlacionado la expresión de ANXA2 en tejidos tumorales con parámetros similares a los estudiados en este trabajo. Sun y cols., también demostraron que la expresión de ANXA2 no se asociaba significativamente con el tamaño tumoral y el grado de diferenciación tumoral en tumores hepáticos (193). Al igual que ellos, Yang y cols., no encontraron asociación con la edad, el género y la localización tumoral. Sin embargo, sí encontraron una mayor expresión de ANXA2 en tejidos de tumores pobre o moderadamente diferenciados, así como asociación con el estadio tumoral, apareciendo una mayor expresión en aquellos con metástasis en ganglios linfáticos, en la capa muscular y en las zonas de invasión tumoral, sugiriendo su papel importante en metástasis en CCR. En este mismo trabajo, al realizar un análisis multivariante afirman que la expresión de ANXA2 es un factor independiente para predecir recurrencia tumoral (246). En otro estudio, se exploró el papel de la ANXA2 en el desarrollo y progresión del cáncer gástrico. La elevada expresión de ANXA2 se

correlacionó con la ubicación del tumor, el tamaño del tumor, la diferenciación, el tipo histológico, la profundidad de la invasión (T), la invasión vascular, la presencia de metástasis ganglionares y la metástasis a distancia (234).

De este modo se puede señalar que la tinción con ANXA2 en los cortes histopatológicos de pacientes afectados con CCR podría servir para facilitar la identificación de la presencia de *tumor budding*, y contribuiría a una mejor caracterización.

Para comprobar si existía alguna relación entre la agresividad del tumor (entendida como presencia de metástasis en los ganglios linfáticos) y la presencia de células teñidas con ANXA2 en la membrana celular en el frente invasivo del tumor, se realizó un estudio de asociación con la misma muestra de 58 pacientes incluyendo las variables demográficas e histopatológicas de los dichos pacientes. Además de la estadificación TNM, diversos factores histopatológicos son importantes para determinar un buen pronóstico de la enfermedad, así como para aportar información sobre la evolución del paciente. Dentro de estos factores se incluyen la invasión linfática, invasión venosa, diferenciación tumoral, patrón de crecimiento de componentes tumorales intramucosos, depósitos tumorales en grasa o *budding* en el borde de la submucosa invasiva (77). En nuestro estudio se ha observado cómo la presencia de células tumorales en los ganglios linfáticos cercanos se asocia de manera significativa con el número de **células** positivas con **tinción de ANXA2 ($p < 0,01$)** en la **membrana** celular, con la aparición de **depósitos tumorales** en grasa (**$p < 0,01$**), así como con **la invasión vascular extramural ($p < 0,01$)** (Tabla 20). Al analizar estos resultados por medio de regresión logística, hemos encontrado que los depósitos tumorales en grasa y el número de células con patrón de membrana ANXA2 en el frente invasivo del tumor son las variables que mejor se asocian con la presencia de células tumorales en los ganglios linfáticos.

Respecto a la presencia de depósitos tumorales, siempre ha habido controversia en cuanto a su clasificación y papel desempeñado en el pronóstico del paciente. De hecho, en las últimas ediciones de la AJCC y la IARC ha habido cambios acerca de su clasificación, basándose en número, tamaño y forma. En uno de los estudios donde se investiga la correlación entre ellos y la recurrencia de pacientes en fase II y III, se comprobó cómo aquellos con fase II pero con presencia de DTs poseían una supervivencia libre de enfermedad menor a aquellos con fase III sin DTs, y viceversa (247).

Otro de los factores asociados a metástasis en los ganglios en nuestro estudio fue la invasión extramural. Esto se ha podido comprobar en cáncer gástrico de fases tempranas,

donde la presencia de invasión submucosa y vascular predicen la probabilidad de enfermedad en los ganglios (248).

La identificación de las células tumorales en los ganglios linfáticos es esencial para la correcta clasificación de pacientes con cáncer colorrectal. De hecho, un número insuficiente de ganglios linfáticos examinados puede dar lugar a diagnósticos erróneos. Dicha variable ha sido identificada como un predictor muy eficaz, concretamente con un empeoramiento del pronóstico con el aumento de número de ganglios linfáticos afectados por el cáncer. Así, el sistema de estadificación de la AJCC y la IARC basan su estratificación de la enfermedad en el número absoluto de ganglios linfáticos positivos (55,249). En nuestro estudio encontramos un 40,28% de los casos con un número menor de 12 ganglios analizados, frente al 59,72% con más de 12 ganglios examinados. Pese a esto, es complicado analizar un mismo número de ganglios en todas las muestras de pacientes. Además, existen otros parámetros que afectan a la significación clínica de la estadificación ganglionar en la práctica rutina diaria, tales como la minuciosidad del patólogo a la hora de la disección, el uso de técnicas de inmunohistoquímica para detectar micrometástasis o células tumorales aisladas, entre otras.

En nuestro estudio, el número de células con tinción positiva de ANXA2 en la membrana celular se asoció con la metástasis en los ganglios linfáticos. Un trabajo similar en cáncer de pulmón demostró asociación entre la metástasis en los ganglios analizados con la sobreexpresión de ANXA2 y esta sobreexpresión a su vez se asoció con fases clínicas avanzadas, una tasa de recaída mayor, así como una disminución de la supervivencia global. A diferencia de nuestro trabajo, este estudio fue realizado en pacientes con cáncer metastásico (250).

Los resultados presentados en esta tesis sugieren que la presencia de un alto número de células en el frente invasivo del tumor primario teñidas con ANXA2 en la membrana celular sería considerada un factor asociado con la presencia de metástasis de los ganglios linfáticos en cáncer de colon. Este nuevo marcador también podría ser una variable útil para ayudar a una mejor selección de los pacientes que se beneficiarían de la terapia adyuvante como pacientes de alto riesgo. Esta hipótesis tan prometedora requiere próximos estudios con un tamaño muestral mayor y en diferentes etapas tumorales para validar la localización ANXA2 como un marcador clínico.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Los fármacos quimioterapéuticos 5-Fluorouracilo, Oxaliplatino, Irinotecan y su metabolito activo SN-38 inhiben la proliferación celular dependiente de anclaje y de forma más efectiva, la formación de colonias o crecimiento independiente de anclaje de modelos celulares de cáncer colorrectal.
2. La poca eficacia de inhibición de la proliferación celular por parte de Capecitabina descarta a dicho fármaco para la identificación de biomarcadores asociados a su sensibilidad en modelos celulares.
3. SN-38, metabolito activo de Irinotecan, es mucho más efectivo que Irinotecan en experimentos de proliferación celular.
4. Con la utilización de 10 μ M de Oxaliplatino se puede distinguir DLD-1, HCT-15, HCUVA-CC-56 y HCUVA-CC-71 como células resistentes, y a SW480, SW620, HCT 116, LS 174T, HCUVA-CC-1 y HCUVA-CC-3CT como células sensibles. El comportamiento celular ha sido dividido en tres modelos.
5. En el primer modelo representado por SW480, SW620, HCUVA-CC-1 y CC-3CT, que poseen la mutación p.R273H en *TP53*, la señalización del daño se realiza de manera independiente de p53 y culmina con el bloqueo del ciclo celular en las fases S y G₂/M. Sin embargo, la reparación es dependiente de p53, ya que estas células no consiguen reparar el daño provocado y mueren.
6. El segundo modelo queda constituido por HCT 116, LS 174T y HCUVA-CC-56, con *TP53* silvestre. En HCT 116 y LS 174T, con una mutación en *MRE11*, se activa la proteína de control Chk2 por un sistema independiente de MRN-ATM que junto con la actuación de p53 se consigue transmitir la señalización hasta el bloqueo en la fase G₂/M. Sin embargo, dicha mutación, no encontrada en HCUVA-CC-56, impide reparar el daño causado.
7. El tercer modelo se compone de DLD-1, HCT-15 y HCUVA-CC-71, que presentan la mutación p.S241F en *TP53*. En las líneas celulares DLD-1 y HCT-15, con mutación en *Chk2* y en *TP53* se produce la activación de Chk1. La presencia de mutaciones en estos dos genes, *TP53* y *Chk2*, actúan como biomarcadores de resistencia a Oxaliplatino.
8. La proteína Vrk1, activada en respuesta al daño en la cadena de ADN provocado por Oxaliplatino en la línea celular resistente HCT-15, se une a Chk1. La incorporación de Rad51 tras el daño en el ADN, se realiza de manera independiente de ATR y está implicada en la reparación del daño y por tanto la consiguiente supervivencia de estas células.

9. Las mutaciones encontradas en los genes *KRAS*, *BRAF* y *PIK3CA* no se asocian con el grado de sensibilidad al fármaco Oxaliplatino en las líneas celulares y cultivos primarios estudiados.
10. Las líneas celulares con mayor capacidad de invasión y migración (DLD-1, HCT-15, SW620 y HCUVA-CC-34) presentan localización de Anexina A2 en la membrana celular. Por el contrario, las líneas celulares con menor capacidad de invasión y migración (HCT 116, LS 174T y HCUVA-CC-62) presentan localización citoplasmática de Anexina A2.
11. La expresión de la proteína Anexina A2 en la membrana celular se observa en los nidos tumorales que invaden la lámina muscular y en *tumor budding* de cortes histológicos de pacientes con cáncer de colon. La presencia de *tumor budding* se asocia de manera significativa con el número de células marcadas con Anexina A2 en la membrana celular.
12. El número de células con tinción positiva de Anexina A2 en la membrana celular se asocia de manera significativa con la presencia de la metástasis en los ganglios linfáticos cercanos. Por tanto, es un nuevo biomarcador nos podrá permitir mejorar la selección de los pacientes de cáncer de colon con el objetivo de que se beneficien de una terapia adyuvante.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Bach SP, Renehan AG, Potten CS. Stem cells: the intestinal stem cell as a paradigm. *Carcinogenesis*. marzo de 2000;21(3):469-76.
2. Cabrera CM, López-Nevot MA. APC e inestabilidad cromosómica en el cáncer de colon. *Rev Esp Enfermedades Dig*. octubre de 2005;97(10):738-43.
3. Leslie A, Carey FA, Pratt NR, Steele RJC. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Br J Surg*. julio de 2002;89(7):845-60.
4. Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol*. septiembre de 2001;2(9):533-43.
5. Wang X, Kuang Y-Y, Hu X-T. Advances in epigenetic biomarker research in colorectal cancer. *World J Gastroenterol WJG*. 21 de abril de 2014;20(15):4276-87.
6. CANCERmondial [Internet]. [citado 28 de septiembre de 2014]. Recuperado a partir de: <http://www-dep.iarc.fr/>
7. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JWW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 1 de abril de 2013;49(6):1374-403.
8. Asociación Española Contra el Cáncer- mejorando la vida de las personas [Internet]. [citado 28 de septiembre de 2014]. Recuperado a partir de: <https://www.aecc.es/Paginas/PaginaPrincipal.aspx>
9. Carballal S, Moreira L, Balaguer F. [Serrated polyps and serrated polyposis syndrome]. *Cir Esp*. marzo de 2013;91(3):141-8.
10. Salas D. Cribado del cáncer colorrectal: Fortalezas para avanzar en el cribado en España. *Gac Sanit*. agosto de 2011;25(4):329-30.
11. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary Colorectal Cancer. *N Engl J Med*. 2003;348(10):919-32.
12. Bogaert J, Prenen H. Molecular genetics of colorectal cancer. *Ann Gastroenterol*. 2014;27(1):9-14.
13. Hampel H. Genetic Testing for Hereditary Colorectal Cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. octubre de 2009;18(4):687.
14. Kastrinos F, Balmana J, Syngal S. Prediction models in Lynch syndrome. *Fam Cancer*. junio de 2013;12(2):217-28.
15. Steinke V, Engel C, Buttner R, Schackert HK, Schmiegel WH, Propping P. Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (HNPCC)/Lynch Syndrome. *Dtsch Arztebl Int*. enero de 2013;110(3):32-8.
16. Half E, Bercovich D, Rozen P. Familial adenomatous polyposis. *Orphanet J Rare Dis*. 12 de octubre de 2009;4:22.

17. Patel SG, Ahnen DJ. Familial Colon Cancer Syndromes: an Update of a Rapidly Evolving Field. *Curr Gastroenterol Rep.* octubre de 2012;14(5):428-38.
18. Kastrinos F, Syngal S. Inherited Colorectal Cancer Syndromes. *Cancer J Sudbury Mass.* noviembre de 2011;17(6):405-15.
19. Rusan NM, Peifer M. Original CIN: reviewing roles for APC in chromosome instability. *J Cell Biol.* 2 de junio de 2008;181(5):719-26.
20. Moon RT, Kohn AD, Ferrari GVD, Kaykas A. WNT and β -catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet.* septiembre de 2004;5(9):691-701.
21. Kashfi SMH, Golmohammadi M, Behboudi F, Nazemalhosseini-Mojarad E, Zali MR. MUTYH the base excision repair gene family member associated with colorectal cancer polyposis. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.* 2013;6(Suppl 1):S1-10.
22. Vogt S, Jones N, Christian D, Engel C, Nielsen M, Kaufmann A, et al. Expanded extracolonic tumor spectrum in MUTYH-associated polyposis. *Gastroenterology.* diciembre de 2009;137(6):1976-85.e1-10.
23. Marra G, Jiricny J. Multiple Colorectal Adenomas — Is Their Number Up? *N Engl J Med.* 2003;348(9):845-7.
24. Benson AB. Epidemiology, disease progression, and economic burden of colorectal cancer. *J Manag Care Pharm JMCP.* agosto de 2007;13(6 Suppl C):S5-18.
25. Tarraga Lopez PJ, Albero JS, Rodriguez-Montes JA. Primary and Secondary Prevention of Colorectal Cancer. *Clin Med Insights Gastroenterol.* 14 de julio de 2014;7:33-46.
26. Colditz GA, Atwood KA, Emmons K, Monson RR, Willett WC, Trichopoulos D, et al. Harvard report on cancer prevention volume 4: Harvard Cancer Risk Index. Risk Index Working Group, Harvard Center for Cancer Prevention. *Cancer Causes Control CCC.* julio de 2000;11(6):477-88.
27. Dyson JK, Rutter MD. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: what is the real magnitude of the risk? *World J Gastroenterol WJG.* 7 de agosto de 2012;18(29):3839-48.
28. Baron JH. Inflammatory bowel disease up to 1932. *Mt Sinai J Med N Y.* mayo de 2000;67(3):174-89.
29. McTiernan A. Mechanisms linking physical activity with cancer. *Nat Rev Cancer.* marzo de 2008;8(3):205-11.
30. De Pergola G, Silvestris F. Obesity as a Major Risk Factor for Cancer. *J Obes [Internet].* 2013 [citado 30 de julio de 2014];2013. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3773450/>
31. Ma Y, Yang Y, Wang F, Zhang P, Shi C, Zou Y, et al. Obesity and Risk of Colorectal Cancer: A Systematic Review of Prospective Studies. *PLoS ONE [Internet].* 17 de enero de 2013 [citado 30 de julio de 2014];8(1). Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3547959/>

32. McKeown-Eyssen G. Epidemiology of colorectal cancer revisited: are serum triglycerides and/or plasma glucose associated with risk? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 12 de enero de 1994;3(8):687-95.
33. Stone WL, Krishnan K, Campbell SE, Palau VE. The role of antioxidants and pro-oxidants in colon cancer. *World J Gastrointest Oncol.* 15 de marzo de 2014;6(3):55-66.
34. Fu Z, Shrubsole MJ, Li G, Smalley WE, Hein DW, Cai Q, et al. Interaction of cigarette smoking and carcinogen-metabolizing polymorphisms in the risk of colorectal polyps. *Carcinogenesis.* abril de 2013;34(4):779-86.
35. Zauber NP, Sabbath-Solitare M, Marotta S, Zauber AG, Foulkes W, Chan M, et al. Clinical and genetic findings in an Ashkenazi Jewish population with colorectal neoplasms. *Cancer.* 15 de agosto de 2005;104(4):719-29.
36. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from Hereditary Colorectal Cancer. *Cell.* 18 de octubre de 1996;87(2):159-70.
37. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1 de junio de 1990;61(5):759-67.
38. Nagase H, Nakamura Y. Mutations of the APC (adenomatous polyposis coli) gene. *Hum Mutat.* 1993;2(6):425-34.
39. Alcaraz A, Mrowiec A, Insausti CL, García-Vizcaíno EM, Ruiz-Canada C, López-Martínez MC, et al. Autocrine TGF- β Induces Epithelial to Mesenchymal Transition in Human Amniotic Epithelial Cells. *Cell Transplant.* 9 de agosto de 2013;22(8):1351-67.
40. Chen YQ, Hsieh JT, Yao F, Fang B, Pong RC, Cipriano SC, et al. Induction of apoptosis and G2/M cell cycle arrest by DCC. *Oncogene.* 29 de abril de 1999;18(17):2747-54.
41. Bendardaf R, Lamlum H, Pyrhönen S. Prognostic and predictive molecular markers in colorectal carcinoma. *Anticancer Res.* agosto de 2004;24(4):2519-30.
42. Suppiah A, Greenman J. Clinical utility of anti-p53 auto-antibody: systematic review and focus on colorectal cancer. *World J Gastroenterol WJG.* 7 de agosto de 2013;19(29):4651-70.
43. Naccarati A, Polakova V, Pardini B, Vodickova L, Hemminki K, Kumar R, et al. Mutations and polymorphisms in TP53 gene--an overview on the role in colorectal cancer. *Mutagenesis.* marzo de 2012;27(2):211-8.
44. Russo A, Bazan V, Iacopetta B, Kerr D, Soussi T, Gebbia N, et al. The TP53 colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of p53 mutation: influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 20 de octubre de 2005;23(30):7518-28.
45. Kastan MB. Wild-Type p53: Tumors Can't Stand It. *Cell.* 9 de marzo de 2007;128(5):837-40.
46. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science.* 7 de mayo de 1993;260(5109):816-9.

47. Gyapay G, Morissette J, Vignal A, Dib C, Fizames C, Millasseau P, et al. The 1993-94 Généthon human genetic linkage map. *Nat Genet.* junio de 1994;7(2 Spec No):246-339.
48. Vilar E, Taberero J. Molecular Dissection of Microsatellite Instable Colorectal Cancer. *Cancer Discov.* mayo de 2013;3(5):502-11.
49. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.* 15 de noviembre de 1998;58(22):5248-57.
50. Leggett B, Whitehall V. Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology.* junio de 2010;138(6):2088-100.
51. Di Lena M, Travaglio E, Altomare DF. New strategies for colorectal cancer screening. *World J Gastroenterol WJG.* 28 de marzo de 2013;19(12):1855-60.
52. DeBarros M, Steele SR. Colorectal Cancer Screening in an Equal Access Healthcare System. *J Cancer.* 20 de marzo de 2013;4(3):270-80.
53. Cunningham D, Atkin W, Lenz H-J, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B, et al. Colorectal cancer. *The Lancet.* marzo de 2010;375(9719):1030-47.
54. Cirugía para el cáncer colorrectal [Internet]. [citado 1 de diciembre de 2014]. Recuperado a partir de: <http://www.cancer.org/espanol/cancer/colonyrecto/resumen/resumen-sobre-el-cancer-colorrectal-treating-surgery>
55. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol.* junio de 2010;17(6):1471-4.
56. Obrocea FL, Sajin M, Marinescu EC, Stoica D. Colorectal cancer and the 7th revision of the TNM staging system: review of changes and suggestions for uniform pathologic reporting. *Romanian J Morphol Embryol Rev Roum Morphol Embryol.* 2011;52(2):537-44.
57. Cáncer de colon: Tratamiento (PDQ®) - National Cancer Institute [Internet]. [citado 1 de diciembre de 2014]. Recuperado a partir de: <http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/colon/Patient/page2>
58. Compton CC. Colorectal carcinoma: diagnostic, prognostic, and molecular features. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* abril de 2003;16(4):376-88.
59. Radiografía torácica: MedlinePlus enciclopedia médica [Internet]. [citado 5 de diciembre de 2014]. Recuperado a partir de: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/003804.htm>
60. Ecografía: MedlinePlus en español [Internet]. [citado 5 de diciembre de 2014]. Recuperado a partir de: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ultrasound.html>
61. Zbar AP, Rambarat C, Shenoy RK. Routine preoperative abdominal computed tomography in colon cancer: a utility study. *Tech Coloproctology.* junio de 2007;11(2):105-9.

62. Young H, Baum R, Cremerius U, Herholz K, Hoekstra O, Lammertsma AA, et al. Measurement of clinical and subclinical tumour response using [18F]-fluorodeoxyglucose and positron emission tomography: review and 1999 EORTC recommendations. European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) PET Study Group. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. diciembre de 1999;35(13):1773-82.
63. Gámez C. Tomografía por emisión de positrones (PET/TC): presente y futuro de una nueva técnica de imagen en oncología. *Cir Esp*. marzo de 2005;77(3):111-3.
64. Bolocan A, Ion D, Ciocan DN, Paduraru DN. Prognostic and predictive factors in colorectal cancer. *Chir Buchar Rom* 1990. octubre de 2012;107(5):555-63.
65. Patología estructural y funcional robbins, cotran - octava edición [Internet]. [citado 1 de diciembre de 2014]. Recuperado a partir de: <http://es.slideshare.net/diegomuniozz/patologa-estructural-y-funcional-robbins-cotran-octava-edicin>
66. Dorudi S, Sheffield JP, Poulson R, Northover JM, Hart IR. E-cadherin expression in colorectal cancer. An immunocytochemical and in situ hybridization study. *Am J Pathol*. abril de 1993;142(4):981-6.
67. Zhang Y-Y, Chen B, Ding Y-Q. Metastasis-associated factors facilitating the progression of colorectal cancer. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP*. 2012;13(6):2437-44.
68. Lokman NA, Ween MP, Oehler MK, Ricciardelli C. The role of annexin A2 in tumorigenesis and cancer progression. *Cancer Microenviron Off J Int Cancer Microenviron Soc*. agosto de 2011;4(2):199-208.
69. Wu W, Tang X, Hu W, Lotan R, Hong WK, Mao L. Identification and validation of metastasis-associated proteins in head and neck cancer cell lines by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Clin Exp Metastasis*. 2002;19(4):319-26.
70. Zhang J, Guo B, Zhang Y, Cao J, Chen T. Silencing of the annexin II gene down-regulates the levels of S100A10, c-Myc, and plasmin and inhibits breast cancer cell proliferation and invasion. *Saudi Med J*. abril de 2010;31(4):374-81.
71. Sharma MR, Koltowski L, Ownbey RT, Tuszynski GP, Sharma MC. Angiogenesis-associated protein annexin II in breast cancer: selective expression in invasive breast cancer and contribution to tumor invasion and progression. *Exp Mol Pathol*. octubre de 2006;81(2):146-56.
72. Zheng L, Jaffee EM. Annexin A2 is a new antigenic target for pancreatic cancer immunotherapy. *Oncoimmunology*. 1 de enero de 2012;1(1):112-4.
73. Zheng L, Foley K, Huang L, Leubner A, Mo G, Olin K, et al. Tyrosine 23 phosphorylation-dependent cell-surface localization of annexin A2 is required for invasion and metastases of pancreatic cancer. *PLoS One*. 2011;6(4):e19390.
74. Gillette JM, Chan DC, Nielsen-Preiss SM. Annexin 2 expression is reduced in human osteosarcoma metastases. *J Cell Biochem*. 1 de julio de 2004;92(4):820-32.
75. Mutch MG. Molecular profiling and risk stratification of adenocarcinoma of the colon. *J Surg Oncol*. 15 de diciembre de 2007;96(8):693-703.

76. National Library of Medicine - National Institutes of Health [Internet]. [citado 28 de septiembre de 2014]. Recuperado a partir de: <http://www.nlm.nih.gov/>
77. Tateishi Y, Nakanishi Y, Taniguchi H, Shimoda T, Umemura S. Pathological prognostic factors predicting lymph node metastasis in submucosal invasive (T1) colorectal carcinoma. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* agosto de 2010;23(8):1068-72.
78. Schneider NI, Langner C. Prognostic stratification of colorectal cancer patients: current perspectives. *Cancer Manag Res.* 2 de julio de 2014;6:291-300.
79. Liebig C, Ayala G, Wilks J, Verstovsek G, Liu H, Agarwal N, et al. Perineural invasion is an independent predictor of outcome in colorectal cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1 de noviembre de 2009;27(31):5131-7.
80. Mitrovic B, Schaeffer DF, Riddell RH, Kirsch R. Tumor budding in colorectal carcinoma: time to take notice. *Mod Pathol.* octubre de 2012;25(10):1315-25.
81. Okuyama T, Oya M, Ishikawa H. Budding as a useful prognostic marker in pT3 well- or moderately-differentiated rectal adenocarcinoma. *J Surg Oncol.* mayo de 2003;83(1):42-7.
82. Okuyama T, Nakamura T, Yamaguchi M. Budding is useful to select high-risk patients in stage II well-differentiated or moderately differentiated colon adenocarcinoma. *Dis Colon Rectum.* octubre de 2003;46(10):1400-6.
83. Lugli A, Karamitopoulou E, Zlobec I. Tumour budding: a promising parameter in colorectal cancer. *Br J Cancer.* 22 de mayo de 2012;106(11):1713-7.
84. Ueno H, Price AB, Wilkinson KH, Jass JR, Mochizuki H, Talbot IC. A new prognostic staging system for rectal cancer. *Ann Surg.* noviembre de 2004;240(5):832-9.
85. Swanson RS, Compton CC, Stewart AK, Bland KI. The prognosis of T3N0 colon cancer is dependent on the number of lymph nodes examined. *Ann Surg Oncol.* febrero de 2003;10(1):65-71.
86. Lee S, Hofmann LJ, Davis KG, Waddell BE. Lymph node evaluation of colon cancer and its association with improved staging and survival in the Department of Defense Health Care System. *Ann Surg Oncol.* noviembre de 2009;16(11):3080-6.
87. Resch A, Langner C. Lymph node staging in colorectal cancer: Old controversies and recent advances. *World J Gastroenterol WJG.* 14 de diciembre de 2013;19(46):8515-26.
88. Goldstein NS, Turner JR. Pericolonic tumor deposits in patients with T3N+M0 colon adenocarcinomas: markers of reduced disease free survival and intra-abdominal metastases and their implications for TNM classification. *Cancer.* 15 de mayo de 2000;88(10):2228-38.
89. Maguire A, Sheahan K. Controversies in the pathological assessment of colorectal cancer. *World J Gastroenterol WJG.* 7 de agosto de 2014;20(29):9850-61.
90. Deschoolmeester V, Baay M, Specenier P, Lardon F, Vermorken JB. A Review of the Most Promising Biomarkers in Colorectal Cancer: One Step Closer to Targeted Therapy. *The Oncologist.* julio de 2010;15(7):699-731.

91. Patel GS, Karapetis CS. Personalized treatment for advanced colorectal cancer: KRAS and beyond. *Cancer Manag Res*. 21 de noviembre de 2013;5:387-400.
92. Ng K, Zhu AX. Targeting the epidermal growth factor receptor in metastatic colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. enero de 2008;65(1):8-20.
93. Yonesaka K, Zejnullahu K, Okamoto I, Satoh T, Cappuzzo F, Souglakos J, et al. Activation of ERBB2 signaling causes resistance to the EGFR-directed therapeutic antibody Cetuximab. *Sci Transl Med*. 7 de septiembre de 2011;3(99):99ra86.
94. Kountourakis P, Pavlakis K, Psyrris A, Rontogianni D, Xiros N, Patsouris E, et al. Prognostic significance of HER3 and HER4 protein expression in colorectal adenocarcinomas. *BMC Cancer*. 2006;6:46.
95. De Roock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilias G, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of Cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol*. agosto de 2010;11(8):753-62.
96. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates J, Dix BR, Iacopetta BJ, et al. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the «RASCAL II» study. *Br J Cancer*. 1 de septiembre de 2001;85(5):692-6.
97. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, et al. K-ras mutations and benefit from Cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med*. 23 de octubre de 2008;359(17):1757-65.
98. Prahallad A, Sun C, Huang S, Di Nicolantonio F, Salazar R, Zecchin D, et al. Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR. *Nature*. 1 de marzo de 2012;483(7387):100-3.
99. Maira S-M, Voliva C, Garcia-Echeverria C. Class IA phosphatidylinositol 3-kinase: from their biologic implication in human cancers to drug discovery. *Expert Opin Ther Targets*. febrero de 2008;12(2):223-38.
100. Cathomas G. PIK3CA in Colorectal Cancer. *Front Oncol* [Internet]. 3 de marzo de 2014 [citado 5 de agosto de 2014];4. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3939771/>
101. Sartore-Bianchi A, Martini M, Molinari F, Veronese S, Nichelatti M, Artale S, et al. PIK3CA mutations in colorectal cancer are associated with clinical resistance to EGFR-targeted monoclonal antibodies. *Cancer Res*. 1 de marzo de 2009;69(5):1851-7.
102. Russo A, Bazan V, Agnese V, Rodolico V, Gebbia N. Prognostic and predictive factors in colorectal cancer: Kirsten Ras in CRC (RASCAL) and TP53CRC collaborative studies. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. mayo de 2005;16 Suppl 4:iv44-9.
103. Farina Sarasqueta A, Forte G, Corver WE, de Miranda NF, Ruano D, van Eijk R, et al. Integral analysis of p53 and its value as prognostic factor in sporadic colon cancer. *BMC Cancer*. 5 de junio de 2013;13:277.

104. Linzer DI, Levine AJ. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell*. mayo de 1979;17(1):43-52.
105. Hupp TR, Lane DP. Regulation of the cryptic sequence-specific DNA-binding function of p53 by protein kinases. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1994;59:195-206.
106. Kussie PH, Gorina S, Marechal V, Elenbaas B, Moreau J, Levine AJ, et al. Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science*. 8 de noviembre de 1996;274(5289):948-53.
107. Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer*. agosto de 2002;2(8):594-604.
108. Okamoto K, Li H, Jensen MR, Zhang T, Taya Y, Thorgeirsson SS, et al. Cyclin G recruits PP2A to dephosphorylate Mdm2. *Mol Cell*. abril de 2002;9(4):761-71.
109. Takekawa M, Adachi M, Nakahata A, Nakayama I, Itoh F, Tsukuda H, et al. p53-inducible wip1 phosphatase mediates a negative feedback regulation of p38 MAPK-p53 signaling in response to UV radiation. *EMBO J*. 1 de diciembre de 2000;19(23):6517-26.
110. el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*. 19 de noviembre de 1993;75(4):817-25.
111. Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res*. 1 de diciembre de 1991;51(23 Pt 1):6304-11.
112. Pavletich NP, Chambers KA, Pabo CO. The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hot spots. *Genes Dev*. 12 de enero de 1993;7(12b):2556-64.
113. Wong KB, DeDecker BS, Freund SM, Proctor MR, Bycroft M, Fersht AR. Hot-spot mutants of p53 core domain evince characteristic local structural changes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 20 de julio de 1999;96(15):8438-42.
114. Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science*. 15 de julio de 1994;265(5170):346-55.
115. Chène P. The role of tetramerization in p53 function. *Oncogene*. 10 de mayo de 2001;20(21):2611-7.
116. Kitayner M, Rozenberg H, Kessler N, Rabinovich D, Shaulov L, Haran TE, et al. Structural basis of DNA recognition by p53 tetramers. *Mol Cell*. 23 de junio de 2006;22(6):741-53.
117. Appella E, Anderson CW. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur J Biochem FEBS*. mayo de 2001;268(10):2764-72.
118. Diez M, Medrano M, Mugüerza JM, Ramos P, Hernandez P, Villeta R, et al. Influence of tumor localization on the prognostic value of P53 protein in colorectal adenocarcinomas. *Anticancer Res*. octubre de 2000;20(5C):3907-12.

119. Reardon JT, Vaisman A, Chaney SG, Sancar A. Efficient nucleotide excision repair of cisplatin, oxaliplatin, and Bis-aceto-ammine-dichloro-cyclohexylamine-platinum(IV) (JM216) platinum intrastrand DNA diadducts. *Cancer Res.* 15 de agosto de 1999;59(16):3968-71.
120. Nannizzi S, Veal GJ, Giovannetti E, Mey V, Ricciardi S, Ottley CJ, et al. Cellular and molecular mechanisms for the synergistic cytotoxicity elicited by oxaliplatin and pemetrexed in colon cancer cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol.* agosto de 2010;66(3):547-58.
121. Boyer J, McLean EG, Aroori S, Wilson P, McCulla A, Carey PD, et al. Characterization of p53 wild-type and null isogenic colorectal cancer cell lines resistant to 5-fluorouracil, oxaliplatin, and irinotecan. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15 de marzo de 2004;10(6):2158-67.
122. Jiang W, Fu F, Li Y, Wang W, Wang H, Jiang H, et al. Molecular biomarkers of colorectal cancer: prognostic and predictive tools for clinical practice. *J Zhejiang Univ Sci B.* septiembre de 2012;13(9):663-75.
123. Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rödel C, Wittekind C, Fietkau R, et al. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med.* 21 de octubre de 2004;351(17):1731-40.
124. Tratamiento del cáncer de colon según la etapa [Internet]. [citado 5 de diciembre de 2014]. Recuperado a partir de: <http://www.cancer.org/espanol/cancer/colonyrecto/guiadetallada/cancer-colorrectal-treating-by-stage-colon>
125. Oyan B. Why do targeted agents not work in the adjuvant setting in colon cancer? *Expert Rev Anticancer Ther.* octubre de 2012;12(10):1337-45.
126. André T, Sargent D, Tabernero J, O'Connell M, Buyse M, Sobrero A, et al. Current issues in adjuvant treatment of stage II colon cancer. *Ann Surg Oncol.* junio de 2006;13(6):887-98.
127. Aranha O, Benson AB. Adjuvant therapy for colon cancer. *Curr Gastroenterol Rep.* octubre de 2007;9(5):415-21.
128. National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) [Internet]. [citado 28 de septiembre de 2014]. Recuperado a partir de: <http://www.nsabp.pitt.edu/>
129. Wolmark N, Fisher B, Rockette H, Redmond C, Wickerham DL, Fisher ER, et al. Postoperative adjuvant chemotherapy or BCG for colon cancer: results from NSABP protocol C-01. *J Natl Cancer Inst.* 2 de marzo de 1988;80(1):30-6.
130. Haller DG, Catalano PJ, Macdonald JS, O'Rourke MA, Frontiera MS, Jackson DV, et al. Phase III study of fluorouracil, leucovorin, and levamisole in high-risk stage II and III colon cancer: final report of Intergroup 0089. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1 de diciembre de 2005;23(34):8671-8.
131. Giacchetti S, Perpoint B, Zidani R, Le Bail N, Faggiuolo R, Focan C, et al. Phase III multicenter randomized trial of oxaliplatin added to chronomodulated fluorouracil-

- leucovorin as first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. enero de 2000;18(1):136-47.
132. Labianca R, Nordlinger B, Beretta GD, Brouquet A, Cervantes A, ESMO Guidelines Working Group. Primary colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, adjuvant treatment and follow-up. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. mayo de 2010;21 Suppl 5:v70-7.
 133. Twelves C, Scheithauer W, McKendrick J, Seitz J-F, Van Hazel G, Wong A, et al. Capecitabine versus 5-fluorouracil/folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer: final results from the X-ACT trial with analysis by age and preliminary evidence of a pharmacodynamic marker of efficacy. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. mayo de 2012;23(5):1190-7.
 134. Haller DG, Tabernero J, Maroun J, de Braud F, Price T, Van Cutsem E, et al. Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 10 de abril de 2011;29(11):1465-71.
 135. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 3 de junio de 2004;350(23):2335-42.
 136. Kabbinavar FF, Schulz J, McCleod M, Patel T, Hamm JT, Hecht JR, et al. Addition of bevacizumab to bolus fluorouracil and leucovorin in first-line metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase II trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 de junio de 2005;23(16):3697-705.
 137. Van Cutsem E, Köhne C-H, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien C-R, Makhson A, et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2 de abril de 2009;360(14):1408-17.
 138. Hoy SM, Wagstaff AJ. Panitumumab: in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Drugs*. 2006;66(15):2005-14; discussion 2015-6.
 139. Douillard J-Y, Siena S, Cassidy J, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, et al. Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 de noviembre de 2010;28(31):4697-705.
 140. Grem JL. 5-Fluorouracil: forty-plus and still ticking. A review of its preclinical and clinical development. *Invest New Drugs*. noviembre de 2000;18(4):299-313.
 141. Koukourakis GV, Kouloulis V, Koukourakis MJ, Zacharias GA, Zabatis H, Kouvaris J. Efficacy of the Oral Fluorouracil Pro-drug Capecitabine in Cancer Treatment: a Review. *Molecules*. 27 de agosto de 2008;13(8):1897-922.
 142. Santi DV, McHenry CS, Sommer H. Mechanism of interaction of thymidylate synthetase with 5-fluorodeoxyuridylate. *Biochemistry (Mosc)*. 29 de enero de 1974;13(3):471-81.
 143. Jaxel C, Kohn KW, Wani MC, Wall ME, Pommier Y. Structure-Activity Study of the Actions of Camptothecin Derivatives on Mammalian Topoisomerase I: Evidence for a Specific

- Receptor Site and a Relation to Antitumor Activity. *Cancer Res.* 15 de marzo de 1989;49(6):1465-9.
144. Fujita K, Sasaki Y. Optimization of Cancer Chemotherapy on the Basis of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics: From Patients Enrolled in Clinical Trials to Those in the 'Real World'; *Drug Metab Pharmacokinet.* 2014;29(1):20-8.
 145. Sinha BK. Topoisomerase inhibitors. A review of their therapeutic potential in cancer. *Drugs.* enero de 1995;49(1):11-9.
 146. Marsh S, Hoskins JM. Irinotecan pharmacogenomics. *Pharmacogenomics.* julio de 2010;11(7):1003-10.
 147. Kidani Y, Noji M, Tashiro T. Antitumor activity of platinum(II) complexes of 1,2-diamino-cyclohexane isomers. *Gann Gan.* octubre de 1980;71(5):637-43.
 148. Raymond E, Faivre S, Woynarowski JM, Chaney SG. Oxaliplatin: mechanism of action and antineoplastic activity. *Semin Oncol.* abril de 1998;25(2 Suppl 5):4-12.
 149. Esteban-Fernández D, Moreno-Gordaliza E, Cañas B, Palacios MA, Gómez-Gómez MM. Analytical methodologies for metallomics studies of antitumor Pt-containing drugs. *Metallomics.* 1 de enero de 2010;2(1):19-38.
 150. Harper JW, Elledge SJ. The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell.* 14 de diciembre de 2007;28(5):739-45.
 151. Lamarche BJ, Orazio NI, Weitzman MD. The MRN complex in Double-Strand Break Repair and Telomere Maintenance. *FEBS Lett.* 10 de septiembre de 2010;584(17):3682-95.
 152. You Z, Chahwan C, Bailis J, Hunter T, Russell P. ATM activation and its recruitment to damaged DNA require binding to the C terminus of Nbs1. *Mol Cell Biol.* julio de 2005;25(13):5363-79.
 153. Paull TT, Gellert M. The 3' to 5' Exonuclease Activity of Mre11 Facilitates Repair of DNA Double-Strand Breaks. *Mol Cell.* 1 de junio de 1998;1(7):969-79.
 154. Giannini G, Ristori E, Cerignoli F, Rinaldi C, Zani M, Viel A, et al. Human MRE11 is inactivated in mismatch repair-deficient cancers. *EMBO Rep.* 15 de marzo de 2002;3(3):248-54.
 155. Derheimer FA, Kastan MB. Multiple roles of ATM in monitoring and maintaining DNA integrity. *FEBS Lett.* 10 de septiembre de 2010;584(17):3675-81.
 156. Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, et al. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science.* 23 de junio de 1995;268(5218):1749-53.
 157. Bolderson E, Richard DJ, Zhou B-BS, Khanna KK. Recent advances in cancer therapy targeting proteins involved in DNA double-strand break repair. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15 de octubre de 2009;15(20):6314-20.
 158. Vignard J, Mirey G, Salles B. Ionizing-radiation induced DNA double-strand breaks: A direct and indirect lighting up. *Radiother Oncol.* 1 de septiembre de 2013;108(3):362-9.

159. Chiu S-J, Lee Y-J, Hsu T-S, Chen W-S. Oxaliplatin-induced gamma-H2AX activation via both p53-dependent and -independent pathways but is not associated with cell cycle arrest in human colorectal cancer cells. *Chem Biol Interact.* 10 de diciembre de 2009;182(2-3):173-82.
160. Hamer G, Kal HB, Westphal CH, Ashley T, de Rooij DG. Ataxia telangiectasia mutated expression and activation in the testis. *Biol Reprod.* abril de 2004;70(4):1206-12.
161. Lavin MF. Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* octubre de 2008;9(10):759-69.
162. Dai Y, Grant S. New insights into checkpoint kinase 1 in the DNA damage response signaling network. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15 de enero de 2010;16(2):376-83.
163. Paulsen RD, Cimprich KA. The ATR pathway: fine-tuning the fork. *DNA Repair.* 1 de julio de 2007;6(7):953-66.
164. Cimprich KA, Cortez D. ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol.* agosto de 2008;9(8):616-27.
165. Hanasoge S, Ljungman M. H2AX phosphorylation after UV irradiation is triggered by DNA repair intermediates and is mediated by the ATR kinase. *Carcinogenesis.* noviembre de 2007;28(11):2298-304.
166. Ward IM, Chen J. Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J Biol Chem.* 21 de diciembre de 2001;276(51):47759-62.
167. Chen BPC, Uematsu N, Kobayashi J, Lereenthal Y, Krempler A, Yajima H, et al. Ataxia telangiectasia mutated (ATM) is essential for DNA-PKcs phosphorylations at the Thr-2609 cluster upon DNA double strand break. *J Biol Chem.* 2 de marzo de 2007;282(9):6582-7.
168. Chan DW, Chen BP-C, Prithivirajasingh S, Kurimasa A, Story MD, Qin J, et al. Autophosphorylation of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is required for rejoining of DNA double-strand breaks. *Genes Dev.* 15 de septiembre de 2002;16(18):2333-8.
169. Lovejoy CA, Cortez D. Common mechanisms of PIKK regulation. *DNA Repair.* 2 de septiembre de 2009;8(9):1004-8.
170. Rogakou EP, Nieves-Neira W, Boon C, Pommier Y, Bonner WM. Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *J Biol Chem.* 31 de marzo de 2000;275(13):9390-5.
171. An J, Huang Y-C, Xu Q-Z, Zhou L-J, Shang Z-F, Huang B, et al. DNA-PKcs plays a dominant role in the regulation of H2AX phosphorylation in response to DNA damage and cell cycle progression. *BMC Mol Biol.* 2010;11:18.
172. McIlwain DR, Pan Q, Reilly PT, Elia AJ, McCracken S, Wakeham AC, et al. Smg1 is required for embryogenesis and regulates diverse genes via alternative splicing coupled to nonsense-mediated mRNA decay. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 6 de julio de 2010;107(27):12186-91.

173. Gehen SC, Stavarsky RJ, Bambara RA, Keng PC, O'Reilly MA. hSMG-1 and ATM sequentially and independently regulate the G1 checkpoint during oxidative stress. *Oncogene*. 3 de julio de 2008;27(29):4065-74.
174. Barcia R, López-Borges S, Vega FM, Lazo PA. Kinetic properties of p53 phosphorylation by the human vaccinia-related kinase 1. *Arch Biochem Biophys*. 1 de marzo de 2002;399(1):1-5.
175. Valbuena A, Vega FM, Blanco S, Lazo PA. p53 downregulates its activating vaccinia-related kinase 1, forming a new autoregulatory loop. *Mol Cell Biol*. julio de 2006;26(13):4782-93.
176. Sanz-García M, Monsalve DM, Sevilla A, Lazo PA. Vaccinia-related kinase 1 (VRK1) is an upstream nucleosomal kinase required for the assembly of 53BP1 foci in response to ionizing radiation-induced DNA damage. *J Biol Chem*. 6 de julio de 2012;287(28):23757-68.
177. Valbuena A, López-Sánchez I, Vega FM, Sevilla A, Sanz-García M, Blanco S, et al. Identification of a dominant epitope in human vaccinia-related kinase 1 (VRK1) and detection of different intracellular subpopulations. *Arch Biochem Biophys*. 1 de septiembre de 2007;465(1):219-26.
178. Huang Y-F, Chang MD-T, Shieh S-Y. TTK/hMps1 mediates the p53-dependent postmitotic checkpoint by phosphorylating p53 at Thr18. *Mol Cell Biol*. junio de 2009;29(11):2935-44.
179. Wei J-H, Chou Y-F, Ou Y-H, Yeh Y-H, Tyan S-W, Sun T-P, et al. TTK/hMps1 participates in the regulation of DNA damage checkpoint response by phosphorylating CHK2 on threonine 68. *J Biol Chem*. 4 de marzo de 2005;280(9):7748-57.
180. Yeh Y-H, Huang Y-F, Lin T-Y, Shieh S-Y. The cell cycle checkpoint kinase CHK2 mediates DNA damage-induced stabilization of TTK/hMps1. *Oncogene*. 12 de marzo de 2009;28(10):1366-78.
181. Maire V, Baldeyron C, Richardson M, Tesson B, Vincent-Salomon A, Gravier E, et al. TTK/hMPS1 is an attractive therapeutic target for triple-negative breast cancer. *PloS One*. 2013;8(5):e63712.
182. Falck J, Coates J, Jackson SP. Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature*. 31 de marzo de 2005;434(7033):605-11.
183. Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1999;39:361-98.
184. Drysdale BE, Zacharchuk CM, Shin HS. Mechanism of macrophage-mediated cytotoxicity: production of a soluble cytotoxic factor. *J Immunol Baltim Md 1950*. noviembre de 1983;131(5):2362-7.
185. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 7 de mayo de 1976;72:248-54.

186. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 15 de agosto de 1970;227(5259):680-5.
187. Moser JJ, Chan EKL, Fritzler MJ. Optimization of immunoprecipitation-western blot analysis in detecting GW182-associated components of GW/P bodies. *Nat Protoc*. 2009;4(5):674-85.
188. Imamura H, Takao S, Aikou T. A modified invasion-3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay for quantitating tumor cell invasion. *Cancer Res*. 1 de julio de 1994;54(13):3620-4.
189. Liu W, Zhong B, Zhang Y, Choi G. Mutation analysis of the checkpoint kinase 2 gene in colorectal cancer cell lines. *Chin Med J (Engl)*. 5 de diciembre de 2007;120(23):2119-23.
190. Lopez-Borges S, Lazo PA. The human vaccinia-related kinase 1 (VRK1) phosphorylates threonine-18 within the mdm-2 binding site of the p53 tumour suppressor protein. *Oncogene*. 27 de julio de 2000;19(32):3656-64.
191. Kotnis A, Du L, Liu C, Popov SW, Pan-Hammarström Q. Non-homologous end joining in class switch recombination: the beginning of the end. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 12 de marzo de 2009;364(1517):653-65.
192. Duncan R, Carpenter B, Main LC, Telfer C, Murray GI. Characterisation and protein expression profiling of annexins in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 29 de enero de 2008;98(2):426-33.
193. Sun Y, Gao G, Cai J, Wang Y, Qu X, He L, et al. Annexin A2 is a discriminative serological candidate in early hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*. marzo de 2013;34(3):595-604.
194. Pena-Alonso E, Rodrigo JP, Parra IC, Pedrero JMG, Meana MVG, Nieto CS, et al. Annexin A2 localizes to the basal epithelial layer and is down-regulated in dysplasia and head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Lett*. 8 de mayo de 2008;263(1):89-98.
195. Leibovitz A, Stinson JC, McCombs WB, McCoy CE, Mazur KC, Mabry ND. Classification of Human Colorectal Adenocarcinoma Cell Lines. *Cancer Res*. 12 de enero de 1976;36(12):4562-9.
196. Quintero E, Castells A, Bujanda L, Cubiella J, Salas D, Lanas Á, et al. Colonoscopy versus fecal immunochemical testing in colorectal-cancer screening. *N Engl J Med*. 23 de febrero de 2012;366(8):697-706.
197. Marques AM, Turner A, de Mello RA. Personalizing medicine for metastatic colorectal cancer: Current developments. *World J Gastroenterol WJG*. 14 de agosto de 2014;20(30):10425-31.
198. Wang W, Cassidy J, O'Brien V, Ryan KM, Collie-Duguid E. Mechanistic and predictive profiling of 5-Fluorouracil resistance in human cancer cells. *Cancer Res*. 15 de noviembre de 2004;64(22):8167-76.
199. Nies AT, Magdy T, Schwab M, Zanger UM. Role of ABC transporters in fluoropyrimidine-based chemotherapy response. *Adv Cancer Res*. 2015;125:217-43.

200. Cheah KY, Howarth GS, Bastian SEP. Grape seed extract dose-responsively decreases disease severity in a rat model of mucositis; concomitantly enhancing chemotherapeutic effectiveness in colon cancer cells. *PLoS One*. 2014;9(1):e85184.
201. Gomez-Monterrey I, Campiglia P, Scognamiglio I, Vanacore D, Dicitore A, Lombardi A, et al. DTNQ-Pro, a Mimetic Dipeptide, Sensitizes Human Colon Cancer Cells to 5-Fluorouracil Treatment. *J Amino Acids*. 2013;2013:509056.
202. S.Grasso, I. Martínez-Lacaci, V.M. Barberá, A. Castillejo, J.L. Soto, J. Gallego-Plazas, et al. HGUE-C-1 is an atypical and novel colorectal carcinoma cell line. *BMC Cancer* Apr 8;15:240.
203. Ciccolini J, Fina F, Bezulier K, Giacometti S, Roussel M, Evrard A, et al. Transmission of Apoptosis in Human Colorectal Tumor Cells Exposed to Capecitabine, Xeloda, Is Mediated via Fas 1 Supported in part by Nippon Roche, Japan and by Roche Oncologie, France. 1. *Mol Cancer Ther*. 9 de enero de 2002;1(11):923-7.
204. Xu Y, Villalona-Calero MA. Irinotecan: mechanisms of tumor resistance and novel strategies for modulating its activity. *Ann Oncol*. 12 de enero de 2002;13(12):1841-51.
205. Li X-X, Zheng H-T, Peng J-J, Huang L-Y, Shi D-B, Liang L, et al. RNA-seq reveals determinants for irinotecan sensitivity/resistance in colorectal cancer cell lines. *Int J Clin Exp Pathol*. 15 de abril de 2014;7(5):2729-36.
206. Ohtsuka K, Inoue S, Kameyama M, Kanetoshi A, Fujimoto T, Takaoka K, et al. Intracellular conversion of irinotecan to its active form, SN-38, by native carboxylesterase in human non-small cell lung cancer. *Lung Cancer Amst Neth*. agosto de 2003;41(2):187-98.
207. Gaur S, Chen L, Ann V, Lin W-C, Wang Y, Chang VH, et al. Dovitinib synergizes with oxaliplatin in suppressing cell proliferation and inducing apoptosis in colorectal cancer cells regardless of RAS-RAF mutation status. *Mol Cancer*. 4 de febrero de 2014;13:21.
208. Ikehata M, Ogawa M, Yamada Y, Tanaka S, Ueda K, Iwakawa S. Different effects of epigenetic modifiers on the cytotoxicity induced by 5-fluorouracil, irinotecan or oxaliplatin in colon cancer cells. *Biol Pharm Bull*. 2014;37(1):67-73.
209. Ulukaya E, Ozdikicioglu F, Oral AY, Demirci M. The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested. *Toxicol Vitro Int J Publ Assoc BIBRA*. febrero de 2008;22(1):232-9.
210. Zumpe C, Bachmann CL, Metzger AU, Wiedemann N. Comparison of potency assays using different read-out systems and their suitability for quality control. *J Immunol Methods*. 31 de agosto de 2010;360(1-2):129-40.
211. Takemura H, Rao VA, Sordet O, Furuta T, Miao Z-H, Meng L, et al. Defective Mre11-dependent activation of Chk2 by ataxia telangiectasia mutated in colorectal carcinoma cells in response to replication-dependent DNA double strand breaks. *J Biol Chem*. 13 de octubre de 2006;281(41):30814-23.
212. Kuo LJ, Yang L-X. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *Vivo Athens Greece*. junio de 2008;22(3):305-9.

213. Dickey JS, Redon CE, Nakamura AJ, Baird BJ, Sedelnikova OA, Bonner WM. H2AX: functional roles and potential applications. *Chromosoma*. diciembre de 2009;118(6):683-92.
214. COSMIC: Mutation overview page TP53 - p.P309S (Substitution - Missense) [Internet]. [citado 8 de octubre de 2014]. Recuperado a partir de: <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation/overview?id=11677>
215. COSMIC: Mutation overview page TP53 - p.R273H (Substitution - Missense) [Internet]. [citado 8 de octubre de 2014]. Recuperado a partir de: <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation/overview?id=10660>
216. Li J, Yang L, Gaur S, Zhang K, Wu X, Yuan Y-C, et al. Mutants TP53 p.R273H and p.R273C but not p.R273G enhance cancer cell malignancy. *Hum Mutat*. mayo de 2014;35(5):575-84.
217. Park JM, Huang S, Tougeron D, Sinicrope FA. MSH3 Mismatch Repair Protein Regulates Sensitivity to Cytotoxic Drugs and a Histone Deacetylase Inhibitor in Human Colon Carcinoma Cells. *PLoS ONE* [Internet]. 28 de mayo de 2013 [citado 28 de septiembre de 2014];8(5). Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3665625/>
218. Voland C, Bord A, Péleraux A, Pénarier G, Carrière D, Galiègue S, et al. Repression of cell cycle-related proteins by oxaliplatin but not cisplatin in human colon cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 9 de enero de 2006;5(9):2149-57.
219. Arango D, Wilson AJ, Shi Q, Corner GA, Arañes MJ, Nicholas C, et al. Molecular mechanisms of action and prediction of response to oxaliplatin in colorectal cancer cells. *Br J Cancer*. 29 de noviembre de 2004;91(11):1931-46.
220. Lafrance-Vanasse J, Williams GJ, Tainer JA. Envisioning the dynamics and flexibility of Mre11-Rad50-Nbs1 complex to decipher its roles in DNA replication and repair. *Prog Biophys Mol Biol*. 7 de enero de 2015;
221. Jiang B-H, Liu L-Z. Role of mTOR in anticancer drug resistance: perspectives for improved drug treatment. *Drug Resist Updat Rev Comment Antimicrob Anticancer Chemother*. junio de 2008;11(3):63-76.
222. Guo F. Mtor-Fanconi Anemia DNA Damage Repair Pathway in Cancer. *J Oncobiomarkers* [Internet]. 2014 [citado 23 de marzo de 2015];2(2). Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4303082/>
223. Karpenshif Y, Bernstein KA. From yeast to mammals: recent advances in genetic control of homologous recombination. *DNA Repair*. 1 de octubre de 2012;11(10):781-8.
224. Huang M, Miao Z-H, Zhu H, Cai Y-J, Lu W, Ding J. Chk1 and Chk2 are differentially involved in homologous recombination repair and cell cycle arrest in response to DNA double-strand breaks induced by camptothecins. *Mol Cancer Ther*. junio de 2008;7(6):1440-9.
225. Del Nagro CJ, Choi J, Xiao Y, Rangell L, Mohan S, Pandita A, et al. Chk1 inhibition in p53-deficient cell lines drives rapid chromosome fragmentation followed by caspase-independent cell death. *Cell Cycle*. 15 de enero de 2014;13(2):303-14.

226. COSMIC: Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer [Internet]. [citado 28 de septiembre de 2014]. Recuperado a partir de: <http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic>
227. Bahassi EM, Ovesen JL, Riesenbergr AL, Bernstein WZ, Hasty PE, Stambrook PJ. The checkpoint kinases Chk1 and Chk2 regulate the functional associations between hBRCA2 and Rad51 in response to DNA damage. *Oncogene*. 3 de marzo de 2008;27(28):3977-85.
228. Li J, Stern DF. DNA damage regulates Chk2 association with chromatin. *J Biol Chem*. 11 de noviembre de 2005;280(45):37948-56.
229. Orlandi A, Di Salvatore M, Bagalà C, Basso M, Strippoli A, Plastino F, et al. ERCC1 Induction after Oxaliplatin Exposure May Depend on KRAS Mutational Status in Colorectal Cancer Cell Line: In Vitro Veritas. *J Cancer*. 2015;6(1):70-81.
230. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, et al. Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. *N Engl J Med*. 30 de junio de 2011;364(26):2507-16.
231. Hirschi B, Gallmeier E, Ziesch A, Marschall M, Kolligs FT. Genetic targeting of B-RafV600E affects survival and proliferation and identifies selective agents against BRAF-mutant colorectal cancer cells. *Mol Cancer*. 2014;13:122.
232. Jensen R, Glazer PM. Cell-interdependent cisplatin killing by Ku/DNA-dependent protein kinase signaling transduced through gap junctions [Internet]. [citado 14 de diciembre de 2014]. Recuperado a partir de: <http://www.pnas.org>
233. Sharma M, Ownbey RT, Sharma MC. Breast cancer cell surface annexin II induces cell migration and neoangiogenesis via tPA dependent plasmin generation. *Exp Mol Pathol*. abril de 2010;88(2):278-86.
234. Zhang Q, Ye Z, Yang Q, He X, Wang H, Zhao Z. Upregulated expression of annexin II is a prognostic marker for patients with gastric cancer. *World J Surg Oncol*. 2012;10:103.
235. Wang Y-Q, Zhang F, Tian R, Ji W, Zhou Y, Sun X-M, et al. Tyrosine 23 Phosphorylation of Annexin A2 Promotes Proliferation, Invasion, and Stat3 Phosphorylation in the Nucleus of Human Breast Cancer SK-BR-3 Cells. *Cancer Biol Med*. diciembre de 2012;9(4):248-53.
236. Liu L, Wu D-H, Ding Y-Q. Tiam1 gene expression and its significance in colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol WJG*. 7 de febrero de 2005;11(5):705-7.
237. Cai K, Mulatz K, Ard R, Nguyen T, Gee SH. Increased diacylglycerol kinase ζ expression in human metastatic colon cancer cells augments Rho GTPase activity and contributes to enhanced invasion. *BMC Cancer*. 19 de marzo de 2014;14:208.
238. Baptista-Hon DT, Robertson FM, Robertson GB, Owen SJ, Rogers GW, Lydon EL, et al. Potent inhibition by ropivacaine of metastatic colon cancer SW620 cell invasion and Nav1.5 channel function. *Br J Anaesth*. julio de 2014;113 Suppl 1:i39-48.
239. Zhang J, Guo B, Zhang Y, Cao J, Chen T. Silencing of the annexin II gene down-regulates the levels of S100A10, c-Myc, and plasmin and inhibits breast cancer cell proliferation and invasion. *Saudi Med J*. abril de 2010;31(4):374-81.

240. Gagné J-P, Ethier C, Gagné P, Mercier G, Bonicalzi M-E, Mes-Masson A-M, et al. Comparative proteome analysis of human epithelial ovarian cancer. *Proteome Sci.* 2007;5:16.
241. Suzuki S, Tanigawara Y. Forced expression of S100A10 reduces sensitivity to oxaliplatin in colorectal cancer cells. *Proteome Sci.* 2014;12:26.
242. Esposito I, Penzel R, Chaib-Harriche M, Barcena U, Bergmann F, Riedl S, et al. Tenascin C and annexin II expression in the process of pancreatic carcinogenesis. *J Pathol.* abril de 2006;208(5):673-85.
243. Ueno H, Mochizuki H, Hashiguchi Y, Shimazaki H, Aida S, Hase K, et al. Risk factors for an adverse outcome in early invasive colorectal carcinoma. *Gastroenterology.* agosto de 2004;127(2):385-94.
244. Zlobec I, Molinari F, Martin V, Mazzucchelli L, Saletti P, Trezzi R, et al. Tumor budding predicts response to anti-EGFR therapies in metastatic colorectal cancer patients. *World J Gastroenterol WJG.* 14 de octubre de 2010;16(38):4823-31.
245. Sy J, Fung CL-S, Dent OF, Chapuis PH, Bokey L, Chan C. Tumor budding and survival after potentially curative resection of node-positive colon cancer. *Dis Colon Rectum.* marzo de 2010;53(3):301-7.
246. Yang T, Peng H, Wang J, Yang J, Nice EC, Xie K, et al. Prognostic and diagnostic significance of annexin A2 in colorectal cancer. *Colorectal Dis Off J Assoc Coloproctology G B Irel.* julio de 2013;15(7):e373-81.
247. Belt EJT, van Stijn MFM, Bril H, de Lange-de Klerk ESM, Meijer GA, Meijer S, et al. Lymph node negative colorectal cancers with isolated tumor deposits should be classified and treated as stage III. *Ann Surg Oncol.* diciembre de 2010;17(12):3203-11.
248. Ganeshalingam S, Koh D-M. Nodal staging. *Cancer Imaging.* 24 de diciembre de 2009;9(1):104-11.
249. Vather R, Sammour T, Kahokehr A, Connolly A, Hill A. Quantitative lymph node evaluation as an independent marker of long-term prognosis in stage III rectal cancer. *ANZ J Surg.* diciembre de 2011;81(12):883-8.
250. Luo C-H, Liu Q-Q, Zhang P-F, Li M-Y, Chen Z-C, Liu Y-F. Prognostic significance of annexin II expression in non-small cell lung cancer. *Clin Transl Oncol Off Publ Fed Span Oncol Soc Natl Cancer Inst Mex.* noviembre de 2013;15(11):938-46.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DERIVADA DE LA TESIS DOCTORAL

PUBLICACIONES

- **Elena Tristante**; Carlos M Martínez; Sofía Jiménez; Lucía Mora; Fernando Carballo; Isabel Martínez-Lacaci; Carlos de Torre. A characteristic membrane pattern of Annexin A2 is associated with high invasiveness and nodal status in colon adenocarcinoma. *Translational Research* 2015 Feb 28. pii: S1931-5244(15)00081-X. PMID: 25795236
- Leticia Mayor-López; **Elena Tristante**; Mar Carballo-Santana; Estefanía Carrasco-García; Silvina Grasso; Pilar García-Morales; Miguel Saceda; Juan Luján; José García-Solano; Fernando Carballo; Carlos De Torre; Isabel Martínez-Lacaci. Comparative study of 17-AGG and NVP-AUY922 in pancreatic and colorectal cancer cells: Are there common determinants of sensitivity?. *Translational Oncology*. 2014 Oct 24;7(5):590-604 PMID: 25389454
- Silvina Grasso; **Elena Tristante**; Miguel Saceda; Pablo Carbonell; Leticia Mayor-López; Mar Carballo-Santana; Estefanía Carrasco-García; Lourdes Rocamora-Reverte; Pilar García-Morales; Fernando Carballo; José A. Ferragut; Isabel Martínez-Lacaci. Resistance to Selumetinib (AZD6244) in colorectal cancer cell lines is mediated by p70S6K and RPS6 activation. *Neoplasia* 2014 Oct 23;16(10):845-60. PMID:25379021
- Silvina Grasso; M.P. Menéndez Gutiérrez; E Carrasco García; Leticia Mayor; **Elena Tristante**; L Rocamora Reverte; P García Morales; J.A. Ferragut; M Saceda; M^aIsabel Martínez-Lacaci Fortuny.. Libro: Apoptosis and medicine. Capítulo: Cell Death and Cancer. Novel Therapeutic Strategies (pp. 67 – 110). InTech-Open Access Publisher
- Estefanía Carrasco-García; Miguel Saceda; Leticia Mayor-López; **Elena Tristante**; Silvina Grasso; Pilar García-Morales; Jose Antonio Ferragut; Isabel Martínez-Lacaci. PDGR and IGFR inhibitors induce a G2/M arrest and concomitant apoptosis in human glioblastoma cell lines (en revisión).

COMUNICACIONES CIENTÍFICAS A CONGRESOS

23rd Biennial Congress of the European Association for Cancer Research (EACR) (July, 2014. Munich, Alemania)

- Isabel Martínez-Lacaci; Mar Carballo-Santana; **Elena Tristante**; Leticia Mayor-López; Silvina Grasso; Pablo Carbonel; Carlos De Torre; J Luján; J.L. Alonso; Fernando Carballo. The PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 is able to revert selumetinib resistance in colorectal cancer cellular models.

Semana de las Enfermedades Digestivas SED, Sociedad Española de Patología Digestiva. (Junio 2014, Valencia, España)

- **Elena Tristante**; Mar Carballo-Santana; Pablo Carbonel; Silvina Grasso; Leticia Mayor-López; Carlos De Torre; Fernando Carballo; Isabel Martínez-Lacaci. Reversión de la resistencia a AZD-6244 (Selumetinib) por inhibición de p70s6 quinasa en modelos celulares de carcinoma colorrectal

14th ASEICA International Congress, Spanish Society for Cancer Research (September, Madrid, Spain)

- **Elena Tristante**; Leticia Mayor-López; Mar Carballo; Carlos De Torre; Pablo Carbonel; Juan Luján; Rosario Martínez; Amparo Torroba; Fernando Carballo; Isabel Martínez-Lacaci. Oxaliplatin induces DNA damage in colorectal cells
- Leticia Mayor-López; **Elena Tristante**; Mar Carballo; Carlos De Torre; Rosario Martínez; Juan Luján; Amparo Torroba; Fernando Carballo; Isabel Martínez-Lacaci. Antineoplastic effects of a new inhibitor of HSP90, NVP-AUY9022, in pancreatic and colorectal carcinoma cells
- Silvina Grasso; **Elena Tristante**; Leticia Mayor; Miguel Saceda; José Ferragut; Claudia Bincoletto; Soraya Smaili; Isabel Martínez-Lacaci. Role of P70S6K and autophagy in mediating resistance to selumetinib in colorectal cancer cells

Semana de las Enfermedades Digestivas SED, Sociedad Española de Patología Digestiva. (Junio 2013, Murcia, España)

- Elena Tristante; Leticia Mayor; Carlos De Torre; Juan Luján; Amparo Torroba; Fernando Carballo; M^aIsabel Martínez-Lacaci Fortuny. Papel de la anexina a2 en "invasividad" y quimiorresistencia en cáncer colorrectal

- Leticia Mayor; Elena Tristante; Carlos De Torre; Juan Luján; Amparo Torroba; Fernando Carballo; M^aIsabel Martínez-Lacaci Fortuny. Eficacia de tanespimycin (17-AAG) como fármaco antitumoral en cáncer de páncreas y de colon

22nd Biennial Congress of the European Association for Cancer Research (EACR) (July 2012, Barcelona, Spain)

- **Elena Tristante**; Leticia Mayor; Juan Luján; Carlos De Torre; Pablo Carbonell; Rosario Martinez; Amparo Torroba; Juan Bermejo; Fernando Carballo; Isabel Martínez-Lacaci. Effects of Chemotherapeutic Drugs in Colorectal Cancer Cells
- Leticia Mayor; Carlos De Torre; **Elena Tristante**; Estefanía Carrasco; Pilar García; Miguel Saceda; Fernando Carballo; Isabel Martínez-Lacaci. Effects of different types of Hsp90 inhibitors in pancreatic and colorectal cancer cell lines

Semana de las Enfermedades Digestivas SED, Sociedad Española de Patología Digestiva. (Junio 2012, Bilbao, España)

- Fernando Carballo; **Elena Tristante**; Leticia Mayor; Juan Luján; Carlos De Torre; Pablo Carbonell; Rosario Martínez; Amparo Torroba; Juan Bermejo; Pedro Riquelme; Jose Luis Alonso; Isabel Martínez-Lacaci. Sensibilidad/resistencia celular a fármacos en cancer colorrectal

Cell Death in Cancer, European Association for Cancer Research (EACR) (January 2012, Amsterdam, Holland)

- Miguel Saceda; Estefanía Carrasco; Leticia Mayor; **Elena Tristante**; Pilar García-Morales; José A Ferragut; Isabel Martínez-Lacaci. IGFR-1 and PDGFR inhibitors-induced cell death in glioblastoma cell lines