

Localización de la célula madre tumoral circulante en sangre de pacientes con adenocarcinoma colorrectal mediante marcadores de superficie y regulación de su capacidad de autorrenovación.

PALOMA HONRUBIA GÓMEZ

Departamento de Ciencias Médicas

Facultad de Medicina



La presente Tesis Doctoral se ha realizado en el Centro Regional de Investigaciones Biomédicas de la Facultad de Medicina de Albacete, en la Universidad de Castilla La-Mancha, y ha sido financiada, principalmente, por la concesión de un proyecto de investigación, otorgado por la Asociación Española Contra el Cáncer.

“... y en lo de forzarles que estudien esta o aquella ciencia no lo tengo por acertado, aunque el persuadirles no será dañoso...”

D. Miguel de Cervantes

El ingenioso Hidalgo Don Quijote de la Mancha

“Daría todo lo que sé por la mitad de lo que no sé.”

Descartes

Je crois

A José Ángel, mis alas, por todo y por tanto.

A mis padres, por permitirme soñar.

A mi hermana, para que luche por sus sueños.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, en especial a la Doctora Carmen Ramírez Castillejo por haber confiado en mi persona, por su paciencia, por su dirección todos estos años y también por abrirme las puertas de su laboratorio, donde me he encontrado con los mejores compañeros y amigos, “los stemcitos”: Carmen Belén, Carmen Gil, Jesús y Paola. Gracias a vosotros por todo lo que me habéis enseñado, ayudado y, por supuesto, por los buenos momentos que hemos disfrutado juntos dentro y fuera del laboratorio. Especial agradecimiento a Carmen Belén, con la que empecé y he terminado este trabajo, pasando por difíciles momentos en el laboratorio pero que juntas, hemos conseguido superar, su apoyo ha sido siempre fundamental. También me gustaría agradecer el compromiso del doctor Francisco Sánchez Sánchez en el desarrollo de este trabajo de tesis doctoral. No me puedo olvidar de toda la gente que ha pasado por el laboratorio y que conscientemente o no, han puesto su granito de arena: Sebastián Bellón, Lupe, José Ramón, Juanma, Sara, Lucía, Cristina y Jorge.

Además, me gustaría dar las gracias a mis compañeras de facultad, a las genéticas Pilar, Ana y Cristina Medina y mis vecinas de laboratorio Idaira y Cristina “Granada”, porque con vosotras hacer la tesis ha sido un viaje al infinito y más allá. Son muchos los momentos compartidos: cumpleaños, cenas, viajes y hasta actividades deportivas. No solamente sois compañeras, al igual que mis “stemcitas”, os habéis convertido en unos de los pilares más fuertes de mi vida.

La colaboración con el Servicio de Oncología, el servicio de Radioterapia y el Hospital de día del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete ha sido fundamental para el desarrollo de esta tesis, por ello quiero dar las gracias a José María García Bueno, José Luis Sánchez, Ana Ferrer, Mamen Soriano, Manoli Baldoví, Pilar y Sebastián Sabater.

Y, por supuesto, el agradecimiento más profundo y sentido va para mi familia. Sin su apoyo, colaboración e inspiración hubiera sido imposible realizar este arduo trabajo. En primer lugar, a mis padres, Juan Antonio y Llanos, porque han sido un gran ejemplo de superación y lucha; a mi hermana Irene porque ha sido mi gran compañera de escritorio y ahora, siguiendo mis pasos, se adentra en el mundo de la ciencia. También quiero agradecer toda la ilusión y confianza que mis abuelos han depositado en mi tarea, en especial a mi abuela Encarna, que nos ha deleitado, a los chicos de la ciencia, en más de una ocasión con sus dulces típicos de la Mancha, sus bizcochos bien se merecen la denominación de origen. Además, también tengo que agradecer todo el apoyo que he recibido por mis tíos y primos, en particular a mi primo

José Antonio, por sus enseñanzas gráficas, y a Luis, por su paciencia e interés científico. Resaltar también el esfuerzo de mi prima Marta para que este trabajo saliera adelante, su ayuda ha sido muy importante, principalmente con los problemas informáticos y Vicente. Tampoco me puedo olvidar de mi nueva familia, Pepi, Marcial, Pablo y María, que se han interesado constantemente por el desarrollo del trabajo y me han permitido terminarlo con su ordenador. Por supuesto, agradecer a mis amigas del Santo Ángel, mis amigas las Pilares y mis compis del instituto todo su ánimo y su interés.

Finalmente y no por ello menos importante, a mi fiel compañero José Ángel, por brindarme su apoyo incondicional y por estar conmigo en aquellos momentos en los que el estudio y el trabajo ocuparon mi tiempo y esfuerzo. Tú has sido el responsable de que la realización de este trabajo haya sido más fácil de llevar, especialmente desde el año 2013. Gracias por estar siempre ahí sin esperar nada a cambio. Espero poder seguir disfrutando de la ciencia a tu lado.

CONTENIDO

ABREVIATURAS	3
1. RESUMEN	7
3. INTRODUCCIÓN	11
3.1 COLON: ESTRUCTURA Y FUNCIÓN	11
3.2 CÁNCER DE COLON	13
3.2.1.EL CÁNCER DE COLON EN CIFRAS	13
3.2.2. ¿QUÉ ES EL CÁNCER DE COLON?.....	14
3.2.3. FACTORES DE RIESGO EN CÁNCER COLORRECTAL.....	15
3.2.4. TIPOS DE CÁNCER COLORRECTAL.....	16
3.2.5. CARCINOGENÉISIS COLORRECTAL.....	16
3.2.6. CLASIFICACIÓN DE TUMORES COLORRECTALES	18
3.2.7. TRATAMIENTOS EN CÁNCER COLORRECTAL.....	20
3.3 CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES.....	24
3.3.1. ENFERMEDAD RESIDUAL.....	24
3.3.2. DETECCIÓN DE CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES	24
3.3.3. LA PROTEÍNA EPCAM	26
3.4 CÉLULAS MADRE TUMORALES.....	28
3.4.1. PROPIEDADES DE LAS CÉLULAS MADRE TUMORALES	28
3.4.2. HIPÓTESIS DE LAS CÉLULAS MADRE TUMORALES	34
3.4.3. DESCUBRIMIENTO DE LAS CÉLULAS MADRE TUMORALES	37
3.4.4. MARCADORES DE CÉLULAS MADRE TUMORALES.....	39
3.4.5. EVIDENCIA DE CÉLULAS MADRE TUMORALES EN CÁNCER COLORRECTAL	46
3.5 PROTEÍNAS REGULADORAS DE LA AUTORRENOVACIÓN: PEDF	53
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	59
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	63
5.1 LÍNEAS CELULARES, MUESTRAS DE PACIENTES Y ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	63
5.1.1. LÍNEAS CELULARES	63
5.1.2. MUESTRAS DE PACIENTES	65
5.1.3. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	67
5.2 RECOGIDA DE DATOS, INSTRUMENTACIÓN Y METODOLOGÍA	67

5.2.1.	AISLAMIENTO DE LA FRACCIÓN DE CÉLULAS NUCLEADAS EN SANGRE PERIFÉRICA	67
5.2.2.	CULTIVOS CELULARES.....	68
5.2.3.	OBTENCIÓN DE MEDIOS CONDICIONADOS CON EL EXTREMO C-TERMINAL DE LA PROTEÍNA PEDF	68
5.2.4.	WESTERN BLOT.....	68
5.2.5.	TRATAMIENTOS CON PÉPTIDOS DERIVADOS DE LA PROTEÍNA PEDF.....	69
5.2.6.	CITOMETRÍA DE FLUJO Y SORTING.....	70
5.2.7.	INYECCIONES EN RATONES INMUNODEPRIMIDOS.....	71
5.2.8.	ESTUDIO DE LA DIVISIÓN CELULAR MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO	71
5.2.9.	CURVA DOSIS-RESPUESTA.....	72
5.2.10.	ANÁLISIS DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS.....	73
5.2.11.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	74
6.	RESULTADOS	79
6.1	CARACTERIZACIÓN DE LAS CMTs EN LÍNEAS CELULARES TUMORALES DE CÁNCER DE COLON Y EFECTO DEL EXTREMO CARBOXILO DE LA PROTEÍNA PEDF SOBRE LA POBLACIÓN DE CMTs	79
6.1.1.	ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE CMTs EN LÍNEAS CELULARES	79
6.1.2.	EFECTO DEL EXTREMO CARBOXILO TERMINAL DE LA PROTEÍNA PEDF SOBRE MARCADORES DE CMTs	81
6.1.3.	ESTUDIO DE LA POBLACIÓN DE CICLO LENTO Y EFECTO DEL EXTREMO CARBOXILO TERMINAL DE LA PROTEÍNA PEDF.....	86
6.1.4.	ESTUDIO DEL EFECTO AGUDO DEL EXTREMO CARBOXILO TERMINAL DE LA PROTEÍNA PEDF SOBRE LA RESISTENCIA EN LÍNEAS CELULARES	88
6.1.5.	ESTUDIO DEL EFECTO CRÓNICO DEL EXTREMO CARBOXILO TERMINAL DE LA PROTEÍNA PEDF SOBRE LA RESISTENCIA EN LÍNEAS CELULARES	97
6.1.6.	ESTUDIO DEL EFECTO CRÓNICO DEL EXTREMO CARBOXILO TERMINAL DE LA PROTEÍNA PEDF SOBRE LA TUMOROGENEIDAD EN LÍNEAS CELULARES	105
6.2	CARACTERIZACIÓN DE LAS CMTs EN TUMORES XENOGRAFTS Y EFECTO DEL EXTREMO CARBOXILO TERMINAL DE LA PROTEÍNA PEDF.	110
6.2.1.	ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE CMTs EN TUMORES XENOGRAFTS	110
6.2.2.	ESTUDIO DE LA POBLACIÓN DE CICLO LENTO Y EFECTO DEL EXTREMO CARBOXILO DE LA PROTEÍNA PEDF EN TUMORES XENOGRAFTS	115
6.2.3.	ESTUDIO DEL EFECTO AGUDO DEL EXTREMO CARBOXILO DE LA PROTEÍNA PEDF SOBRE LA RESISTENCIA EN TUMORES XENOGRAFTS.....	116
6.2.4.	ESTUDIO DE LA TUMOROGENICIDAD DE LOS TUMORES XENOGRAFTS	123

6.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS CMTs EN LOS TUMORES FORMADOS A PARTIR DE INYECCIONES DE TUMORES XENOGRATS Y EFECTO DEL EXTREMO CARBOXILO DE LA PROTEÍNA PEDF SOBRE LA POBLACIÓN DE CMTs.....	125
6.3.1 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES DE ESTUDIO EN RE-XENOGRAFTS	125
6.4 ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS BIOMARCADORES AC133 Y BCRP1 EN LA FORMACIÓN DE TUMORES	126
6.4.1. CUANTIFICACIÓN DE LOS MARCADORES DE ESTUDIO EN LOS TUMORES FORMADOS A PARTIR DE SUBPOBLACIONES CELULARES DE LA LÍNEA HT-29.....	129
6.5 DETECCIÓN DE CMT EN SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON ENFERMEDAD NEOPLÁSICA COLORRECTAL.....	133
6.5.1. CLASIFICACIÓN DE LOS PACIENTES DE ESTUDIO.....	133
6.5.2. CLASIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE MUESTRAS DE PACIENTES.....	134
6.5.3. PUNTO DE CORTE DE LOS MARCADORES Y CARACTERÍSTICAS DE LA TÉCNICA	135
6.5.4. RELACIÓN DE LOS BIOMARCADORES DE ESTUDIO CON LA PREDICCIÓN DE RECAÍDA DE LA ENFERMEDAD Y LA SUPERVIVENCIA.....	139
6.5.5. CLASIFICACIÓN DE MUESTRAS POR PACIENTES.....	142
6.5.6. COMPARACIÓN DE LA DETECCIÓN DE CMTS MEDIANTE MARCADORES DE SUPERFICIE Y VERIDEX.....	144
7. DISCUSIÓN	149
7.1 CÉLULAS MADRE TUMORALES.....	149
7.1.1. HIPÓTESIS DE LAS CÉLULAS MADRE TUMORALES	149
7.1.2. MARCADORES DE CÉLULAS MADRE TUMORALES.....	152
7.2 TRATAMIENTO CON PÉPTIDOS DERIVADOS DE LA PROTEÍNA PEDF	162
7.2.1. EFECTO DEL EXTREMO CARBOXILO DE PEDF EN LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE SUPERFICIE	163
7.2.2. EFECTO DEL EXTREMO CARBOXILO DE PEDF EN LA CINÉTICA DE DIVISIÒN CELULAR	165
7.2.3. EFECTO DEL EXTREMO CARBOXILO DE PEDF EN LA RESISTENCIA A LOS TRATAMIENTOS CON OXALIPLATINO E IRINOTECAN.....	166
7.2.4. EFECTO DEL EXTREMO CARBOXILO DE PEDF EN LA FORMACIÓN DE TUMORES	166
7.2.5. CONCENTRACIONES DEL EXTREMO CARBOXILO DE PEDF UTILIZADAS Y TIEMPOS DE EXPOSICIÒN.....	167
7.3 DETECCIÓN DE CÉLULAS INICIADORAS DE TUMORES EN SANGRE PERIFÉRICA .	168
7.3.1. DETECCIÓN DE CÉLULAS INICIADORAS DE TUMORES EN SANGRE PERIFÉRICA, SU VALOR PRONÓSTICO Y SU RELACIÓN CON LA SUPERVIVENCIA.....	172

7.3.2. LIMITACIONES DE LA TÉCNICA	173
7.3.3. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA TÉCNICA.....	174
7.4 UTILIDAD DEL MODELO DE XENOGRAFT Y CULTIVO IN VITRO DE CÉLULAS DE PACIENTE.....	176
8. CONCLUSIONES	181
9. BIBLIOGRAFÍA.....	185

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

- 5-Fu** 5 Fluoracilo
- ABCG2** ATP Binding Cassette subfamily G 2
- AJCC** American Joint Committee on Cancer
- ALDH1** Aldeído Deshidrogenasa 1
- APC** Adenomatous Polyposis Coli
- ASCO** Asociación Americana de Oncología Médica
- BCRP1** Breast Cancer Resistant Protein 1
- BSA** Albúmina Sérica Bobina
- CC** Carcinogénesis colorrectal
- CCR** Cáncer Colorrectal
- CEA** Carcinoembryonic Antigen
- CHUA** Complejo Hospitalario Universitario de Albacete
- CIT** Células Iniciadora de Tumores
- CMH** Célula Madre Hematopoyética
- CMPI** Célula Madre Pluripotente inducida
- CMT** Célula Madre Tumoral
- CSC** Cancer Stem Cell
- CT** Extremo C-terminar de PEDF
- CTC** Célula Tumoral Circulante
- CTE** Mutante hiperfosforilado del Extremo C-terminal de PEDF
- D** Célula Diferenciada
- DMEN** Dubelcco's Modified Eagle Medium
- DIV** Días en *vitro*
- EGF** Factor de Crecimiento Epidérmico
- EMT** Epithelial Mesenchymal Transition
- EpCAM** Epithelial Cell Adhesión Molecule

► ABREVIATURAS

FBS	Suero Bovino Fetal
FDA	Food and Drug Administration
FGF	Factor de Crecimiento Fibroblástico
GL	Gáanglio Linfático
HNPCC	Cáncer Colorrectal Hereditario No Polipósico
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
M	Mucosa
Min	Minuto
MM	Muscular de la Mucosa
MMR	Mismatch repair
P	Progenitor
PAF	Poliposis Adenomatosa Familiar
Pb	pares de bases
PBS	Phosphate Buffered Saline
PEDF	Factor Derivado del Epitelio Pigmentario de la retina
PRA	Progenitor de Rápida Amplificación
ROS	Especies Reactivas a Oxígeno
S	Serosa
SLE	Supervivencia Libre de Enfermedad
SM	Submucosa
SP	Side Population
ST	Supervivencia Total
TNM	Tamaño del tumor, Nódulos, Metástasis
TP....	Topoisomerasa
TS....	Timidilato Sintetasa
UCLM	Universidad de Castilla la Mancha
UICC	Unión Internacional Contra el Cáncer

RESUMEN

1. RESUMEN

Desde hace menos de una década, se viene postulando que las células madre tumorales (CMT) o células iniciadoras de tumores (CITs) son las responsables de la aparición y expansión de la mayoría de los procesos neoplásicos. Su erradicación pasa por el estudio de su capacidad de autorrenovación, gracias a la cual, son capaces de autoperpetuarse a la vez que dar lugar a una gran progenie de células que componen los tumores. En numerosos tipos de tumores se ha descrito la existencia de células madre tumorales. Uno de estos tipos de tumor es el adenocarcinoma colorrectal. La carcinogénesis colorrectal (CC) es un proceso multifactorial influenciado por factores ambientales, genéticos y epigenéticos.

En este estudio se intenta localizar y caracterizar la población de células madre tumorales (CMC) en pacientes con metástasis avanzadas de carcinoma colorrectal. Para el estudio y caracterización de éstas, se realiza una purificación y cultivo de la población de células madre tumorales circulantes en sangre periférica, de pacientes con procesos neoplásicos avanzados de colon. Posteriormente, se realiza un análisis de marcadores de células tumorales circulantes en sangre: EpCam, BCRP1 y CD133. Estos marcadores han demostrado presentar una correlación entre su expresión elevada en una pequeña población en estos pacientes, la evolución de los mismos y respuesta ante el tratamiento. Dicha correlación, aun no siendo la causa origen de la existencia de células madre tumorales, puede ayudar en la predicción de futuras recaídas del paciente, y la predicción del posible efecto del tratamiento, lo que complementaría las terapias actualmente empleadas en clínica. A día de hoy, el único marcador, de este estudio, validado clínicamente es la proteína Epcam, sin embargo, la sensibilidad de la técnica actual podría aumentar si se complementase con otros marcadores, como por ejemplo la proteína CD133 y BCRP1.

Para mejorar la comprensión del papel que desempeña cada uno de los marcadores de estudio en la enfermedad neoplásica, hemos utilizado líneas celulares de adenocarcinoma colorrectal, que además de presentar estos marcadores, contienen poblaciones de ciclo celular lento. Tanto en los ensayos *in vitro*, como en los estudios de localización en sangre de pacientes, esta combinación de marcadores ha demostrado una mayor sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo que la técnica actualmente en uso.

► RESUMEN

Por otro lado, se pretende estudiar el efecto que ejerce la proteína PEDF en la regulación de la autorrenovación de las células madre tumorales. Se estudian, por tanto, los fenómenos de proliferación, perpetuación y la posible inactivación de estas células. Hemos comprobado que péptidos derivados del extremo carboxilo de la proteína PEDF inducen un cambio en la expresión de los marcadores de estudio en las líneas tumorales, cambios en la población de ciclo lento, en la resistencia a fármacos y en la tumorigenicidad de las líneas celulares empleadas, por lo que podrían ser candidatos al estudio de ensayos clínicos como nuevas moléculas terapéuticas.

INTRODUCCIÓN

3. INTRODUCCIÓN

3.1 COLON: ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

El colon es la penúltima porción del tubo digestivo. El intestino grueso está formado por el colon y el recto. El intestino delgado se une al intestino grueso en el abdomen inferior derecho a través de la válvula ileocecal. El colon es un tubo muscular de aproximadamente metro y medio de largo, tiene como principal función la reabsorción de iones y agua, posteriormente a la absorción de la mayor parte de los nutrientes en el intestino delgado. En este proceso, las células del epitelio colónico juegan un papel fundamental (Wheater P, 1987).

El intestino grueso procede embriológicamente de la parte del asa intestinal primitiva que sufre menor número de flexuras. El intestino presenta un giro positivo de 270° (contrario a las agujas del reloj), en torno al eje de la arteria mesentérica superior. El comienzo del intestino grueso se encuentra en la fosa ilíaca derecha. Teniendo en cuenta que existe un punto fijo (la cloaca primitiva que posteriormente originará el ano), el recorrido que hace el intestino primitivo dibuja perfectamente el futuro marco cólico del adulto. El marco cólico encuadra las asas yeyunales e ileales, que tienen situación inframesocólica.

El colon consta de cuatro secciones:

- **Colon ascendente o derecho:** es la primera sección y comienza en el área de unión con el intestino delgado. La primera porción del colon ascendente se llama ciego y es donde el apéndice se une al colon. El colon ascendente se extiende hacia arriba por el lado derecho del abdomen (figura 1A).
- **Colon transverso:** es la segunda sección y se extiende a través del abdomen del lado derecho hacia el lado izquierdo. Sus dos extremos forman dos ángulos que se llaman: ángulo hepático del colon, localizado en el lado derecho siendo la unión del colon ascendente con el colon transverso, ángulo esplénico del colon, localizado en el lado izquierdo, siendo la unión del colon transverso con el colon descendente (figura 1A).
- **Colon descendente o izquierdo:** es la tercera sección y continúa hacia abajo por el lado izquierdo (figura 1A).
- **Colon sigmoide o sigma:** es la cuarta sección y se llama así por la forma de S. El colon sigmoide se une al recto, y este se une al ano (figura 1A).

► INTRODUCCIÓN

La pared de cada una de estas secciones del colon y del recto tiene varias capas de tejido. La pared del colon (figura 1B) está compuesta por diferentes capas: mucosa, submucosa, muscular, subserosa y serosa. El cáncer colorrectal se origina en la capa más interna y puede crecer a través de alguna o de todas las demás capas.

El epitelio de la mucosa del colon (figura 1C) es un epitelio columnar simple que forma un gran número de profundas invaginaciones hacia el interior de la lámina propia (formada por tejido conectivo laxo) denominadas criptas de Lieberkühn. Este epitelio es renovado cada 3-4 días aproximadamente, lo que supone un proceso constante de regeneración de las células que constituyen las criptas.

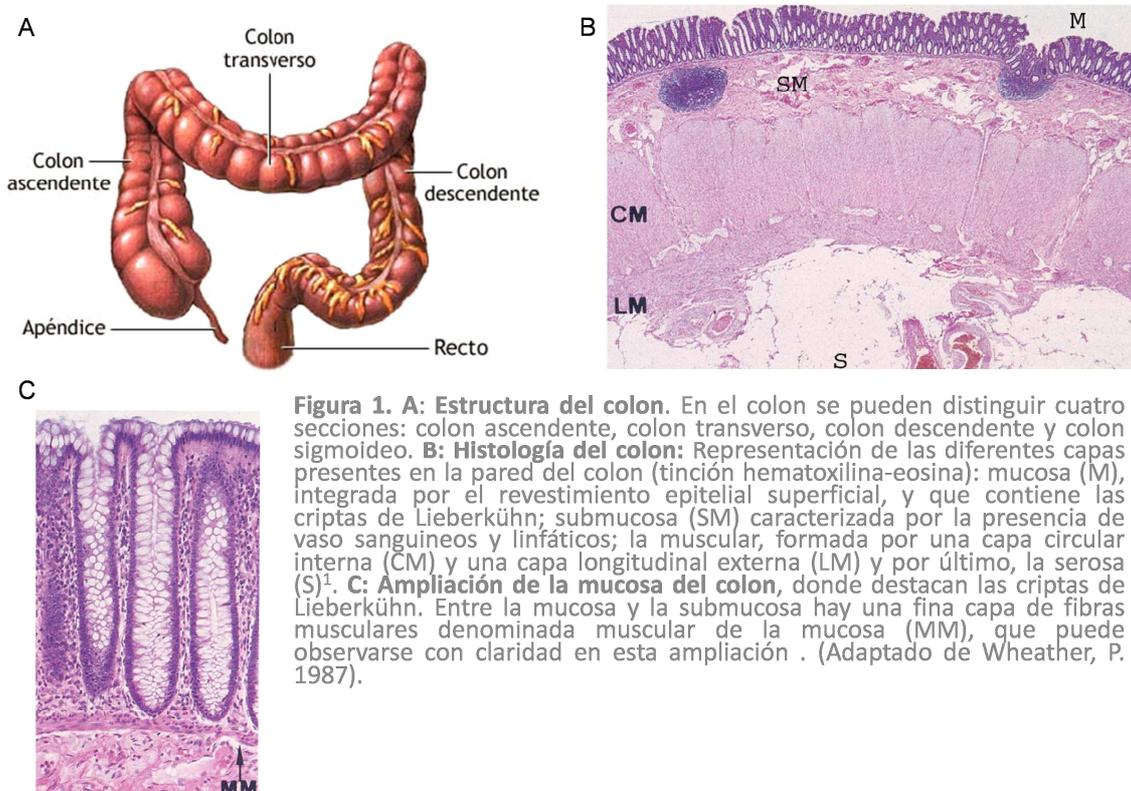


Figura 1. A: Estructura del colon. En el colon se pueden distinguir cuatro secciones: colon ascendente, colon transverso, colon descendente y colon sigmoideo. **B: Histología del colon:** Representación de las diferentes capas presentes en la pared del colon (tinción hematoxilina-eosina): mucosa (M), integrada por el revestimiento epitelial superficial, y que contiene las criptas de Lieberkühn; submucosa (SM) caracterizada por la presencia de vaso sanguíneos y linfáticos; la muscular, formada por una capa circular interna (CM) y una capa longitudinal externa (LM) y por último, la serosa (S)¹. **C: Ampliación de la mucosa del colon,** donde destacan las criptas de Lieberkühn. Entre la mucosa y la submucosa hay una fina capa de fibras musculares denominada muscular de la mucosa (MM), que puede observarse con claridad en esta ampliación. (Adaptado de Wheather, P. 1987).

3.2 CÁNCER DE COLON

3.2.1. EL CÁNCER DE COLON EN CIFRAS

SITUACIÓN GLOBAL

El cáncer colorrectal es el tercer tipo de tumor más común en hombres con 746000 nuevos casos en el año 2012 en todo el mundo, lo que supone un 10% del total, y el segundo cáncer más frecuente en mujeres, con 614000 nuevos casos durante el año 2012, suponiendo un 9.2% del total. Cabe destacar que la mayoría de los casos tienen lugar en países desarrollados. Existe una gran variación geográfica en cuanto a la incidencia de cáncer colorrectal con patrones muy similares en hombres y mujeres. Los valores de incidencia pueden llegar a variar hasta diez veces de una región desarrollada a otra subdesarrollada, por ejemplo, Australia y Nueva Zelanda presentan las tasas de incidencia más elevadas, 44.8 y 32.2 por cada 100000 en hombres y mujeres respectivamente, mientras que en el oeste de África se encuentra la tasa de incidencia más baja, 4.5 y 3.8 por cada 100000.

En cuanto a mortalidad del cáncer colorrectal, se observa una menor mortalidad, 694000 muertes (8.5 % del total) con más muertes en los países subdesarrollados (52 % del total). Esta gran diferencia refleja las peores condiciones de supervivencia y la pobreza sanitaria presentes en países subdesarrollados. Por ello, la diferencia en las tasas de mortalidad no varía tan notablemente con la variación geográfica, ésta varía hasta seis veces en hombres y 4 veces en mujeres. Las mayores tasas de mortalidad para ambos sexos se encuentran en el centro y este de Europa, con 20.3/100000 en hombres y 11.7/100000 en mujeres. La tasa de mortalidad más baja se encuentra en el oeste de África, 3.5 y 3 en hombres y mujeres respectivamente.

SITUACIÓN EN ESPAÑA

Para el caso de nuestro país, considerando ambos sexos conjuntamente, la incidencia fue de 32240 nuevos casos de cáncer colorrectal diagnosticados en España en el año 2012, suponiendo un 32% del total de tumores, tratándose del tumor más frecuente en España. Respecto al número de muertes, el cáncer colorrectal fue responsable de 14700 muertes en nuestro país, suponiendo un 14.3% del total de muertes producidas por tumores. La prevalencia a cinco años en España calculada en el año 2012 para el cáncer colorrectal fue de 89705, lo que supone un 15 % del total.

Si estudiamos los sexos por separados, vemos diferencias similares a lo ocurrido en el estudio de la población global. En hombres, el cáncer colorrectal se sitúa en tercera posición en incidencia en el año 2012, con un total de 19261 nuevos casos (15%), mientras que en mujeres el cáncer colorrectal ocupa la

segunda posición en incidencia, con 12979 (14.9%) nuevos casos en el año 2012.

Tabla 1: Tumores más frecuentes en España en 2012.

INDICENCIA	HOMBRE	MUJER	AMBOS SEXOS
1º	Próstata	Mama	Colorrectal
2º	Pulmón	Colorrectal	Próstata
3º	Colorrectal	útero	Pulmón

Respecto a la mortalidad, en hombres, el cáncer colorrectal fue responsable de 8742 (13.7%) y, 5958 (15.2%) muertes en mujeres. Un estudio sobre la mortalidad por cáncer, realizado entre 1990 y 2011, ha mostrado la variación en las tasas de mortalidad en varios países, y para el caso de España indica que se ha producido un descenso del 13%. Sin embargo, este descenso es inferior al presentado por otros países europeos o Estados Unidos.

Teniendo en cuenta la importancia de la dieta en la génesis de este tumor, los datos de mortalidad en España sugieren unos hábitos dietéticos más saludables en las mujeres. Esta diferencia sería menos marcada en España en las generaciones más jóvenes. La frecuencia de estos tumores se ha relacionado con el desarrollo económico, siendo más alta en países más desarrollados.

3.2.2. ¿QUÉ ES EL CÁNCER DE COLON?

Nuestro organismo está constituido por órganos y éstos a su vez por un conjunto de células, que se dividen de forma regular con el fin de reemplazar a las células ya envejecidas o muertas, y mantener así la integridad y el correcto funcionamiento de los distintos órganos. Este proceso está regulado por una serie de mecanismos que indican a la célula cuándo comenzar a dividirse y cuándo permanecer estable. Cuando estos mecanismos se alteran en una célula, ésta y sus descendientes inician una división incontrolada que con el tiempo dará lugar a un tumor o nódulo. Si estas células, además de crecer sin control, adquieren la facultad de invadir tejidos y órganos de alrededor (infiltración) y de trasladarse y proliferar a otras partes del organismo (metástasis) se denomina tumor maligno, que es a lo que llamamos cáncer. Cuando las células tumorales, con capacidad de invadir los tejidos sanos de alrededor y de alcanzar órganos alejados e implantarse en ellos, están ubicadas en el colon o recto, hablamos de cáncer colorrectal.

3.2.3. FACTORES DE RIESGO EN CÁNCER COLORRECTAL

En el desarrollo del cáncer colorrectal intervienen diversos factores, desde la predisposición genética de cada individuo hasta factores ambientales. Se han descrito diferentes enfermedades hereditarias asociadas a un mayor riesgo de padecer cáncer colorrectal, sin embargo el 90% de los tumores colorrectales son de origen esporádico.

Los principales factores de riesgo para la aparición de tumores colorrectales esporádicos aparecen reflejados en la tabla 2. Principalmente son factores ambientales, estrechamente relacionados con el estilo de vida desarrollado en los países occidentales, entre los que se incluye la avanzada edad. El estilo de vida occidental caracterizado por un ritmo de vida sedentaria también ha sido reconocido como un factor de riesgo en este tipo de tumores. Hábitos tóxicos, como el tabaco o el exceso de consumo de alcohol, han sido descritos como factores de riesgo en la mayoría de los tumores. Aunque los resultados no son muy consistentes, se ha informado del consumo de alcohol como posible factor de riesgo y en concreto el consumo de cerveza (Sharpe et al., 2002). Recientemente, varios estudios prospectivos han demostrado la asociación de consumo de carnes, especialmente rojas, grasas animales y la obesidad, con un mayor riesgo de desarrollar un tumor colorrectal. También se ha relacionado el mecanismo patogénico de las bacterias intestinales sobre los ácidos biliares y grasas produciendo sustancias carcinógenas. Enfermedades del intestino grueso como el Crohn o la colitis ulcerosa también son factores de riesgo en cáncer colorrectal (Weitz et al., 2005).

Por otro lado, se han referido como factores protectores consumo de dietas ricas en fibra, calcio, aspirina, vitamina D, ácido fólico y selenio (Meyerhardt et al., 2007; Winawer, 1990).

Tabla 2: Factores de riesgo en cáncer colorrectal. Adaptado de Weitz, J. 2005.

FACTORES DE RIESGO EN CÁNCER COLORRECTAL	
-Anastomosis ureterocólica	-Colecistectomía
-Colitis Ulcerosa	-Diabetes melitus
-Dieta baja en fibra, folato y calcio	-Dieta rica en carnes y grasas
-Edad avanzada	-Elevado consumo de alcohol
-Enfermedad de Crohn	-Estilo de vida sedentario
-Irradiación previa	-Obesidad
-Sexo masculino	-Tabaquismo
-F. hormonales: multipara, edad tardía del primer embarazo, menopausia temprana.	
-Trabajos peligrosos para la salud: exposición a asbestos	

3.2.4. TIPOS DE CÁNCER COLORRECTAL

La forma de cáncer colorrectal más frecuente es el de tipo esporádico (70-85%) existiendo casos con componentes hereditarios familiares (30-15%). Dentro de los tumores colorrectales hereditarios destacan los tumores asociados a síndromes hereditarios autosómicos dominantes (6-5%), la poliposis adenomatosa familiar (PAF) (1%) y el cáncer colorrectal hereditario no-polipósico (HNPCC) (5%)(Gatalica and Torlakovic, 2008).

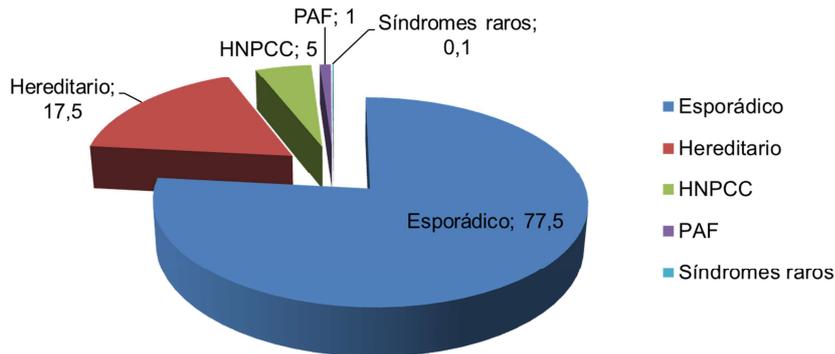


Figura 2: Distribución de los subtipos de cáncer colorrectal en la población.

3.2.5. CARCINOGENÉISIS COLORRECTAL

Los tumores aparecen por cambios genéticos o epigenéticos, que pueden dar lugar a la expresión de un oncogén o inactivación de un gen supresor de tumores(Bodmer et al., 1994). La mayoría de los tumores colorrectales aparecen sobre un pólipo existente en la mucosa del colon o recto, que por diversas circunstancias evoluciona a tumor maligno. Este tumor maligno, puede crecer de tres maneras(Fearon and Vogelstein, 1990):

- **Crecimiento local:** se produce principalmente al crecer en profundidad invadiendo todas las capas que forman la pared del tubo digestivo, es decir, crece desde la mucosa hasta la serosa pasando por la capas submucosa y muscular. Una vez que el tumor traspasa toda la pared del intestino puede invadir cualquier órgano contenido en el abdomen. Los tumores rectales, pueden afectar la vejiga, la próstata o la vagina (dependiendo del sexo), el hueso sacro y la grasa que le rodea.
- **Diseminación linfática:** El colon posee una rica red de vasos linfáticos que permiten el drenaje de la linfa a múltiples regiones ganglionares. La diseminación por esta vía se realiza de forma ordenada, afectando primero a los ganglios más próximos y, posteriormente, a los más alejados.

- **Diseminación hematológica:** Las células tumorales pasan al torrente circulatorio y a través de la sangre se diseminan preferentemente hacia el hígado, pulmón, hueso y cerebro.

El adenoma es una neoplasia benigna que tiene lugar en las criptas colónicas, caracterizada por una actividad mitótica continua, donde las células no se diferencian, de manera que el compartimiento proliferativo puede llegar a ocupar la cripta completa. Por su parte, dentro de los tipos histológicos de CCR, los adenocarcinomas son los más frecuentes, y se pueden clasificar en tres grados: bien diferenciados, moderadamente diferenciados y pobremente diferenciados. La secuencia adenoma-carcinoma se caracteriza por la acumulación de múltiples mutaciones que afectan a tres tipos diferentes de genes (Kinzler and Vogelstein, 1996) (figura 3). Estos genes pueden ser:

- Proto-oncogenes: cuya función es regular positivamente la proliferación celular y cuya activación constitutiva promueve la transformación tumoral.
- Genes supresores tumorales: regulan negativamente la proliferación celular y cuya pérdida de función también promueve la carcinogénesis.
- Genes reparadores del DNA: responsables de corregir los errores producidos durante la replicación del DNA y reparar las alteraciones inducidas en esta molécula por agentes mutagénicos externos (radiaciones UV, agentes químicos, etc...).
-

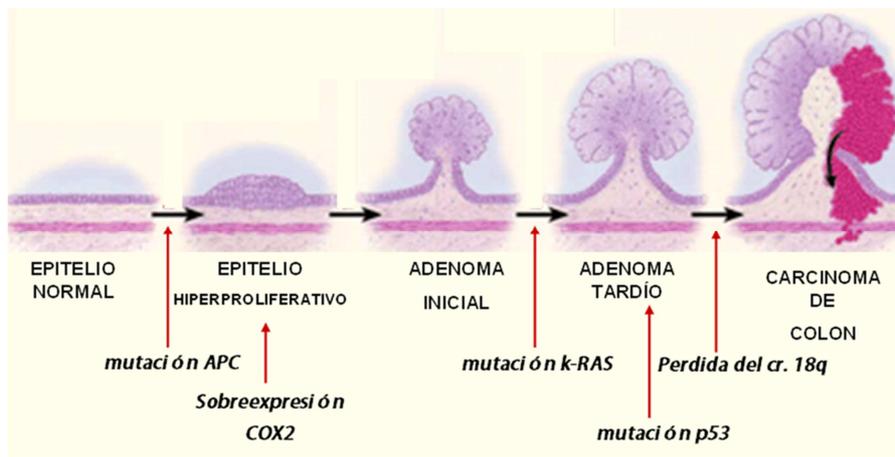


Figura 3. Representación de la carcinogénesis colorrectal, con la secuencia de alteraciones que tienen lugar en la mucosa del colon y que conllevan a la formación del tumor. Los CCR se desarrollan a través de etapas bien definidas a nivel histológico que van desde lesiones en la cripta del colon a través de la formación de pólipos o adenomas hasta manifestar el cáncer. Adaptado de Kinzler, K. 1996.

3.2.6. CLASIFICACIÓN DE TUMORES COLORRECTALES

Para poder determinar el tratamiento más adecuado y el pronóstico de pacientes en el cáncer colorrectal, es importante clasificar el tumor, es decir, determinar en qué fase se encuentra. Para ello se realiza una estadificación del tumor en base a el tamaño del tumor y su extensión, saber si el tumor se ha diseminado. Los sistemas de estadificación para el cáncer han evolucionado desde su origen, en función de los nuevos conocimientos que se han ido adquiriendo(Quirke et al., 2007).

Existen diversas clasificaciones aunque la más utilizada es la clasificación original de Dukes, modificada posteriormente por Astler y Coller. Sin embargo, el sistema de clasificación TNM (Tumor, Node, Metastasis Stage Grouping), método de clasificación de tumores establecido por la AJCC (American Joint Committee on Cancer) en colaboración con la UICC (Unión Internacional Contra Cáncer) es más correcto aunque, es bastante más complejo. Tiene en cuenta el número de ganglios afectos, factor pronóstico de gran importancia(Nelson et al., 2001).

- **Clasificación de Dukes modificada:** en esta clasificación se utilizan las letras que van desde la A hasta la D.
 - Estadio A: lesión limitada a la mucosa, sin afectación ganglionar.
 - Estadio B1: el tumor afecta a parte de la pared del colon o recto, sin atravesarla ni afectar ganglios.
 - Estadio B2: afecta a toda la pared sin invasión ganglionar.
 - Estadio C: la enfermedad puede afectar a parte o a toda la pared, con afectación ganglionar.
 - Estadio D: existe afectación de otros órganos alejados.

- **Clasificación TNM:** en esta clasificación se utilizan números romanos del 0 al IV.
 - Estadio 0 o carcinoma in situ: es la fase más temprana del cáncer de colon o recto. Las células tumorales se encuentran situadas en la parte más superficial de la mucosa y en ningún caso la traspasa. No afecta a ganglios linfáticos (GL).
 - Estadio I: el tumor afecta a la pared del colon o recto sin traspasar la capa muscular. No existe afectación de ganglios linfáticos.
 - Estadio II: el tumor ha infiltrado todas las capas de la pared del colon o recto. Puede invadir los órganos de alrededor. No se aprecia afectación ganglionar.
 - Estadio III: el cáncer ha invadido a los órganos más próximos y afecta los ganglios linfáticos.
 - Estadio IV: el cáncer se ha diseminado afectando a órganos alejados del colon o recto como hígado, pulmón o huesos.

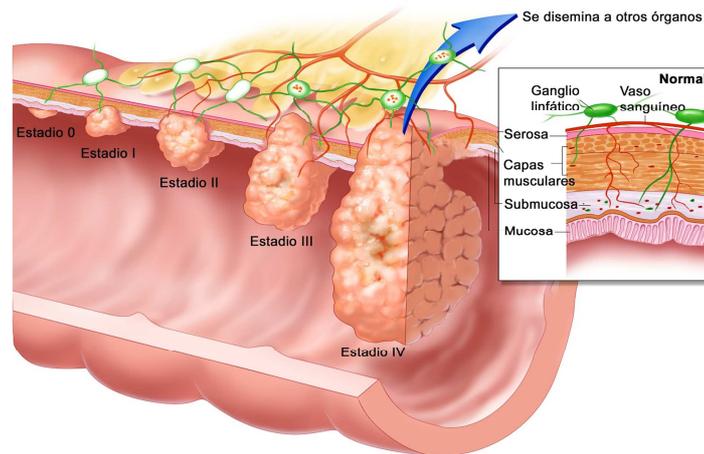


Figura 4. Representación de la cásificación de los estadios tumorales En los estadios 0, I y II el tumor está localizado y no hay afectación ganglionar ni metástasis. En el estadio III no hay metástasis pero sí afectación ganglionar. En el estadio IV la enfermedad está diseminada, presencia de metástasis.

Tabla 3: Pronóstico en cancer colorrectal

ESTADIO	SUPERVIVENCIA A LOS 5 AÑOS
0	95-100%
I	80-90%
II	50-75%
III	25-45%
IV	<5%

El modelo TNM de clasificación de tumores colorrectales ha sido criticado en diversas ocasiones, por lo que esta clasificación se ha ido modificando, con el objetivo de obtener un método de clasificación de pacientes reproducible y eficaz. Un ejemplo de las modificaciones es el análisis de un mínimo de 12 ganglios linfáticos de la zona afectada para realizar una clasificación más adecuada(Nelson et al., 2001). Las modificaciones han dado lugar a un nuevo sistema de clasificación de los tumores reflejado en la tabla 4. La tabla 5 muestra la equivalencia entre la clasificación de Dukes modificada y la clasificación TNM para el cáncer colorrectal.

Tabla 4: Clasificación TNM de tumores colorrectales. (GL = ganglio linfático)

T (infiltración del tumor primario)	N (invasión de GL)	M (metástasis a distancia)
-Tx: no se puede valorar -T0: no hay tumor primario -Tis: in situ (intraepitelial o laminar) -T1: capa submucosa -T2: capa muscular propia -T3: capa subserosa -T4: otros órganos	- Nx: no se puede valorar - N0: no hay GL afectados - N1: 1-3 GL afectados - N2: más de 4 GL afectados	- Mx: no se puede valorar - M0: no hay metástasis a distancia - M1: hay metástasis a distancia

Tabla 5: Equivalencia entre clasificación de Dukes modificada y TNM colorrectal

ESTADIO	TNM	DUKES MODIFICADA	
Estadio 0	Tis N0 M0	A	
Etadio I	T1 N0 M0	A	Tumor limitado a la mucosa.
	T2 N0 M0	B1	Tumor no atraviesa la pared. GL negativos.
Estadio II	T3 N0 M0	B2	Extensión microscópica más allá de la pared intestinal. GL negativos.
	T4 N0 M0	B3	Extensión macroscópica más allá de la pared intestinal. GL negativos.
Estadio III	T2 N1-2 M0	C1	El tumor no atraviesa la pared. GL positivos.
	T3-4 N1-2 M0	C2	Estadio B2 + GL positivos.
	T4 N1-2 M0	C3	Estadio B3 + GL positivos.
Estadio IV	M1	D	Metástasis a distancia.

3.2.7. TRATAMIENTOS EN CÁNCER COLORRECTAL

Los tratamientos más frecuentemente empleados en el cáncer colorrectal son la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia.

- **Cirugía:** La cirugía suele ser el tratamiento más importante y el primero en llevarse a cabo en la mayoría de los tumores de colon y recto. El tipo de cirugía que se puede aplicar en el cáncer colorrectal, varía en función de su localización y de la extensión a ganglios y/u órganos vecinos. La cirugía suele ser el principal tratamiento local para el cáncer de colon. La técnica consiste en la extirpación del segmento del colon en el que se asienta el tumor, así como un tramo de tejido normal a cada lado de la lesión y los ganglios linfáticos correspondientes. Posteriormente, se unen

los extremos del colon para restablecer la continuidad del tubo digestivo y mantener su función intacta.

- Radioterapia: La radioterapia es el empleo de radiaciones ionizantes para el tratamiento, local o locorregional, de determinados tumores que emplea rayos X con altas dosis de irradiación. Su objetivo es destruir las células tumorales causando el menor daño posible a los tejidos sanos que rodean dicho tumor. La radioterapia puede utilizarse de manera preoperatoria y en pacientes con enfermedad recurrente. Los potenciales beneficios de la radiación preoperatoria se aplican a la respuesta del tumor y tejido normal:
 - Reducir el tamaño tumoral puede facilitar la resección y aumentar la probabilidad de una cirugía conservadora de esfínter anal.
 - Además, radiar un tejido sin cirugía previa y por tanto, mejor oxigenado, puede resultar en mayor sensibilidad a la radioterapia.
 - Se evita radiar intestino delgado que podría quedar adherido tras la manipulación quirúrgica a estructuras pélvicas.

- Quimioterapia: La quimioterapia es una de las modalidades terapéuticas más empleada en el tratamiento del cáncer. Su objetivo es destruir, empleando una gran variedad de fármacos, las células que componen el tumor con el fin de lograr la reducción o desaparición de la enfermedad. A los fármacos empleados en este tipo de tratamiento se les denomina fármacos antineoplásicos o quimioterápicos. Estos fármacos llegan a prácticamente todos los tejidos del organismo y ahí es donde ejercen su acción tanto sobre las células malignas como sobre las sanas. Debido a la acción de los medicamentos sobre éstas últimas, pueden aparecer una serie de síntomas más o menos intensos y generalmente transitorios denominados efectos secundarios. En cuanto a los quimioterapéuticos más utilizados en cáncer colorrectal podemos destacar oxaliplatino, antimetabolitos como 5-fluorouracilo y capecitabina, agentes inhibidores de la topoisomerasa y agentes de diana molecular.
 - Oxaliplatino: Pertenece a una clase única e importante dentro de los fármacos antitumorales, con un impacto significativo en el tratamiento de una amplia variedad de tumores sólidos. Este fármaco tiene una marcada eficacia en el cáncer colorrectal. Se puede administrar en combinación con otros muchos agentes antineoplásicos, inhibidores de la topoisomerasa I, inhibidores de timidilato sintetasa y taxanos (Carrato et al., 2002). El mecanismo de acción de oxaliplatino ejerce sus efectos mediante la formación de aductos de ADN. Los datos

preclínicos indican que los aductos de ADN-platino que origina oxaliplatino podrían ser los únicos responsables de su actividad citotóxica. Sin embargo, la estructura tridimensional de los aductos de ADN y las respuestas biológicas son distintas a las obtenidas con otros platinos. Las proteínas MMR no son capaces de reconocer los aductos ADN-oxaliplatino, lo que podría ser la causa de que oxaliplatino sea el único análogo de platino que ha demostrado actividad como agente único en el cáncer colorrectal.

- Antimetabolitos: son agentes quimioterápicos que compiten con los nucleósidos fisiológicos, interaccionando con varias dianas intracelulares dando lugar a efectos citotóxicos. Es una familia con varios grupos entre lo que destacan: análogos de purinas, análogos de pirimidinas, fluoropirimidinas y nucleobases análogas de hipoxantina. Tienen globalmente un triple mecanismo de acción a través de la incorporación y alteración de las macromoléculas de ADN y ARN, por interferencia con las enzimas implicadas en la síntesis de ácidos nucleicos o por modificación del metabolismo de los nucleósidos fisiológicos. Poseen así mismo algunas características comunes como grupo, suelen ser moléculas que precisan transportadores específicos de membrana para pasar al espacio intracelular y una vez en el citoplasma se activan mediante una serie de reacciones que retienen en la célula los residuos de los nucleótidos transformándose en derivados activos fosfato (Galmarini et al., 2002).
 - 5-Fluorouracilo: Se ha demostrado útil en cáncer colorrectal, tanto en el enfoque adyuvante como metastásico. Específico de la fase S del ciclo celular. Para ejercer su acción precisa la activación intracelular de la molécula mediante una cadena de reacciones que conducen a la formación de FdUMP, su metabolito activo, en la que participan enzimas claves como la TP y la timidina quinasa. En presencia de folatos reducidos se une la PS formando un complejo estable mediante enlace covalente, e inhibe la síntesis de dTMP o timidina, interfiriendo en la síntesis y reparación del ADN. El estrés genotóxico derivado de la inhibición de la TS puede también activar mecanismos apoptóticos. Hay otros mecanismos de acción complementarios al anterior y responsables del efecto citotóxico del 5-FU: el 5-FUTP, metabolito del 5-FU que mimetiza al UTP es reconocido por ARN polimerasas incorporándose al ARN, conduciendo a alteraciones en su procesamiento y traducción; la incorporación del metabolito FdUTP al ADN da lugar a la inhibición de su síntesis y función, finalmente la incorporación de azúcares 5-FUDP a las

membranas altera su estructura en las células tratadas con 5-FU.

- Capecitabina: Ha mostrado su eficacia principalmente en cáncer colorrectal tanto en enfoque adyuvante como metastásico en monoterapia o combinación. Tras el 5-FU se han desarrollado nuevas fluoropirimidinas orales que permiten una mayor facilidad de administración y un mejor perfil farmacocinético. Se trata de un profármaco del 5-FU en forma de fluoropirimidina carbamato, que requiere un proceso bioquímico de activación. Remedia la infusión continua de 5-FU, generándolo preferentemente a nivel tumoral dada la alta concentración de TP en tejido tumoral. Se metaboliza en el hígado por la carboxiesterasa a 5-DFCR y posteriormente a 5-DFUR por las citidinas deaminasas. El paso final clave de la selectividad del fármaco es el paso a 5-FU por la TP en células tumorales. A partir de aquí su mecanismo de acción es superponible al del 5-FU, con la diferencia en la concentración de antimetabolito activo tras la administración oral. Capecitabina logra aumentar su actividad, disminuyendo la concentración en tejidos sanos y la toxicidad sistémica asociada (Budman, 2000).
- Agentes inhibidores de la topoisomerasa: los inhibidores de la topoisomerasa I son derivados hidrosolubles semisintéticos de la camptotecina, un alcaloide citotóxico extraído de la planta *Camptotheca acuminata*. La topoisomerasa I es una enzima implicada directamente en la replicación del ADN, que libera a las cadenas de la tensión torsional generada por el avance de la horquilla de replicación y permite la continuación del proceso de replicación.
 - Irinotecan (CPT-11): Irinotecan y principalmente su metabolito activo, el SN-38, actúan uniéndose al complejo topoisomerasa I-ADN; esta unión induce lesiones en las cadenas simples de ADN, produciendo el bloqueo de la replicación del ADN y la muerte celular. Su actividad citotóxica está en función del tiempo, es específica de la fase S y precisa de la expresión de topoisomerasa I en las células tumorales.
- Agentes de diana molecular: En los últimos años se han incorporado al arsenal terapéutico antineoplásico nuevos fármacos, principalmente agentes de diana molecular, cuyas indicaciones se van ampliando periódicamente, así como las de los algunos fármacos ya conocidos. En cáncer colorrectal destacan Bevacizumab, Cetuximab, Trastuzumab, Panitumumab y Sunitinib.

3.3 CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES

3.3.1. ENFERMEDAD RESIDUAL

La enfermedad mínima residual es la presencia de mínimas cantidades de células tumorales en pacientes, no detectables con técnicas convencionales, como puede ser la radiología. De esta manera, pacientes que han sido intervenidos y tratados de un tumor y que en principio, están curados en base a las pruebas radiológicas, pueden desarrollar una recaída o metástasis debido a la enfermedad mínima residual. El origen de la enfermedad mínima residual parece estar relacionado con la presencia de una subpoblación celular dentro del tumor, con propiedades de resistencia, que son molecular y fenotípicamente distintas. Estas células se conocen con el nombre de células madre tumorales (CMCs)(Ricci-Vitiani et al., 2007). Los datos de incidencia en cáncer colorrectal son muy elevados, y lo sitúan en la segunda causa de muerte por cáncer, siendo la recidiva la principal causa de muerte. La recidiva es la aparición de células tumorales procedentes del tumor primario en cualquier parte del organismo tras completar los tratamientos radicales adecuados. La explicación más razonable de que esto ocurra está en la presencia de enfermedad mínima residual microscópica. Por ello, es necesario identificar a los pacientes en riesgo de recidiva. Los principales factores relacionados con el desarrollo de una recidiva son la estadificación (penetración en la pared y ganglios linfáticos afectados), tamaño y grado de diferenciación del tumor. Por lo tanto, la frecuencia de recidivas es directamente proporcional al estadio de la lesión, siendo más frecuente en estadios avanzados y pobremente diferenciados(Church et al., 2003).

Aproximadamente, entre el 30% y el 50% de los enfermos de carcinoma colorrectal recaerán tras años de recibir el tratamiento adecuado y morirán debido a la enfermedad. Así, la diseminación microscópica de la enfermedad tiene lugar en muchos pacientes al diagnóstico(Moertel et al., 1990;Saltz and Minsky, 2002). Por este motivo, es muy importante poner en práctica diferentes pruebas capaces de detectar la enfermedad mínima residual, como por ejemplo la citometría de flujo, que nos permite detectar células tumorales circulantes en sangre (CTCs).

3.3.2. DETECCIÓN DE CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES

La detección de CTCs de pacientes es una potencial estrategia aunque, es una tarea compleja debido al bajo número de CTCs circulantes en sangre. La presencia de CTCs en sangre periférica de pacientes con CCR ha sido destacada. En la actualidad existen dos métodos para identificar CTCs en sangre periférica, por un lado se encuentran las técnicas moleculares (RT-PCR) y por otro lado, las técnicas celulares de separación magnética y/o

citometría. Las técnicas moleculares se basan en la identificación de cDNA del tumor asociado a citoqueratinas (CK 20₇) o el antígeno carcinoembrionario (CEA)(Wharton et al., 1999). Aunque las técnicas moleculares permiten la detección de una célula epitelial en 1mL de sangre, no permiten el aislamiento y caracterización de la célula. Sin embargo, las técnicas de separación magnética pueden conseguir el aislamiento y caracterización de las CTCs mejorando la sensibilidad y especificidad de la técnica. Mediante esta tecnología, las muestras de sangre periférica son incubadas con partículas magnéticas unidas covalentemente a anticuerpos que nos permiten detectar la proteína EpCAM. La proteína EpCAM permite detectar células epiteliales, por lo que no se expresa en sangre. Posteriormente estas células son separadas magnéticamente. Las células separadas pueden ser numeradas y controladas por citometría de flujo y microscopía de fluorescencia. Un nuevo sistema de búsqueda celular se ha diseñado para detectar las células tumorales en la sangre periférica que expresan la proteína EpCAM y citoqueratinas, este sistema CellSearch de Veridex, es hasta ahora, el único método de detección de CTCs aprobado por la FDA (Food and Drug Administration)(Allard et al., 2004). Este sistema tiene como objetivo la estandarización de los resultados y un aumento de la precisión de la técnica. La relación de la detección de CTC con el aumento de riesgo de recidiva y la disminución de la supervivencia, es decir, su utilidad como factor pronóstico, está siendo ampliamente estudiada. Los resultados son prometedores pero su utilidad en la clínica sigue siendo cuestionada. A pesar de estar aprobada por la FDA, la Asociación Americana de Oncología Clínica (ASCO) no la recomienda como factor pronóstico de utilidad en casos de tumores poco avanzados mientras que, para tumores metastáticos sí lo recomienda como factor indicador de progresión de la enfermedad. La utilidad clínica de la detección de CTCs fue mostrada por primera vez en un estudio con pacientes de metastásicas de cáncer de mama(Allard et al., 2004;Cristofanilli et al., 2004). Posteriormente, numerosos estudios han demostrado su significación en el pronóstico de la enfermedad en cáncer colorrectal(Cohen et al., 2006;Kuboki et al., 2013) , próstata(Shaffer et al., 2007), pulmón(Tanaka et al., 2009) y gástrico. Cohen y colaboradores demostraron en 2008 que el número de CTCs antes y durante el tratamiento es un factor pronóstico independiente de supervivencia libre de enfermedad (SLE) y supervivencia total (ST) en pacientes con carcinoma colorrectal avanzado(Cohen et al., 2008). La detección de más de 3 CTCs antes y después de iniciar un nuevo tratamiento fue asociada con una menor media de SLE y ST. Por lo tanto, la detección de CTCs puede servir como un factor pronóstico y predictivo en pacientes con neoplasia colorrectal.

3.3.3. LA PROTEÍNA EPCAM

EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule o CD326) pertenece a la familia de las proteínas CAM. Las CAMs son glicoproteínas ubicadas en la superficie celular que constituyen receptores celulares, aunque también se encuentran en la matriz tisular, y mediante las cuales se efectúan las interacciones específicas célula-célula y célula-matriz. Estas glicoproteínas tienen en un extremo un grupo carboxilo, el llamado carboxi-terminal, que se encuentra fijo en el citoplasma y en el cito-esqueleto. Inmediatamente después del carboxi-terminal se encuentra la región transmembrana, que atraviesa la membrana celular. El resto de la glicoproteína se ubica extracelularmente y termina en un grupo amino, el amino-terminal, que da la especificidad a la molécula para unirse a otras CAMs. Dentro de esta familia se han identificado cuatro subfamilias que incluyen la familia de las cadherinas, la familia de las selectinas, la familia de las integrinas, la familia de las Ig-CAM (cadherinas similares a inmunoglobulinas). Sin embargo, existen proteínas que no comparten el mismo patrón estructural de ninguna de estas familias. El ejemplo más representativo de ello es la proteína EpCAM (Baeuerle and Gires, 2007). La proteína EpCAM es una proteína de membrana tipo I, formada por 314 aminoácidos y de unos 30-40 KDa. La estructura de la proteína ha sido revisada, ya que presenta dominios tiroglobulinas y tipo EFG, de aspecto similar que fueron confundidos. La parte extracelular está formada por la secuencia señal, dos dominios tipo EFG (Epidermal Growth Factor), un dominio tiroglobulina y un dominio pobre en cisteínas. La parte intracelular de la proteína está formada por un dominio NPXY de internalización y varios sitios de unión a actinina (figura 5).

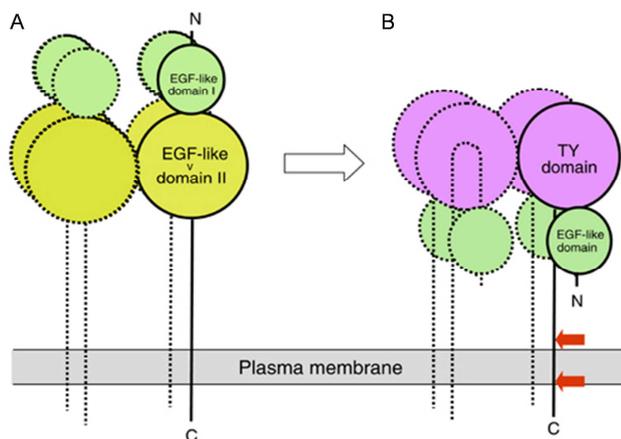


Figura 5: Modificación de la estructura de Epcam. El modelo inicial (A) fue modificado (B) debido a la confusión producida entre el dominio tiroglobulina y un dominio tipo EGF. Modificado de Baeuerle, 2007.

La proteína EpCAM fue descrita, hace unos 35 años, como el primer antígeno tumoral en tejido de carcinoma de colon, mediante la utilización de anticuerpos monoclonales, en concreto por el anticuerpo 17-1A (Koprowski et al., 1979). Inicialmente, se propuso que la proteína EpCAM era una proteína de adhesión intercelular. Sin embargo, estudios posteriores revelaron que esta

proteína estaba implicada en una multitud de funciones celulares, incluyendo procesos tan diversos como la señalización, la migración, la proliferación y la diferenciación celular. La expresión celular de EpCAM, en realidad, evita la adhesión entre células.

EpCAM comienza a expresarse en las primeras etapas del desarrollo, más concretamente en los oocitos fertilizados, así como en el estadio de dos células de la mórula. Durante el desarrollo embrionario, EpCAM se localiza tanto en precursores epiteliales, como en células que todavía no se han determinado. En etapas posteriores del desarrollo epitelial, EpCAM adquiere una expresión estrictamente epitelial, aunque no se expresa en células que están diferenciadas terminalmente (Trzpis et al., 2007). En el adulto, cabe destacar su expresión en células de colon, páncreas, pulmón, conductos biliares, así como en células del epitelio mamario. En tejido sano, EpCAM parece estar acomplejado con otras proteínas, llamadas tetraspaninas, que lo hacen difícilmente detectable (Schmidt et al., 2004).

EpCAM se suele sobreexpresar en tumores derivados de tejidos epiteliales, y aparece ausente en aquellos tumores de origen mesodérmico y ectodérmico, como lo tumores neurogénicos, los sarcomas, los melanomas y los linfomas (Munz et al., 2004; Osta et al., 2004). Generalmente, la sobreexpresión tumoral de EpCAM le libera de las uniones con las tetraspaninas, exponiéndole en la superficie de las células tumorales. Esta sobreexpresión de EpCAM se relaciona con una menor supervivencia de los pacientes neoplásicos. Se ha postulado que EpCAM podría comportarse como un oncogen que induciría la proliferación celular, regulando positivamente la expresión de las ciclinas A y E, así como el oncogen c-myc. El dominio intracelular es necesario y suficiente para generar una transducción de señal, que finalmente, activa a estas proteínas. Así mismo, el silenciamiento de EpCAM disminuye la proliferación y el metabolismo tumoral, así como la migración e invasividad de las células transformadas (Dalerba et al., 2007; Lugli et al., 2010).

EpCAM es el único marcador de este estudio validado en clínica. La identificación y cuantificación de células tumorales en sangre periférica puede ser de utilidad por constituir una evidencia inicial del proceso de metastatización y constituir un marcador de riesgo de recidiva tumoral. Un nuevo sistema de búsqueda celular (Veridex) se ha diseñado para detectar las células tumorales en la sangre periférica que expresan la proteína EpCAM y otros marcadores tumorales como las citoqueratinas (Allard et al., 2004).

3.4 CÉLULAS MADRE TUMORALES

3.4.1. PROPIEDADES DE LAS CÉLULAS MADRE TUMORALES

Las células madre tumorales presentan características generales de las células madre sanas muy importantes: la quiescencia, la autorrenovación, la división asimétrica, la regulación por las vías de señalización Wnt, Notch y Sonic Hedgehog (Shh), y la resistencia a fármacos y tóxicos(Reya et al., 2001).

Quiescencia: La quiescencia es el estado indiferenciado de la célula que le permite mantener la capacidad de división, aun estando fuera del ciclo celular, en fase G0. Este estado se define como un detenimiento temporal del ciclo celular con bajada del metabolismo sin pérdida de las capacidades de replicación (Reynolds and Weiss, 1992), por ello, se dice que las células madre somáticas realizan ciclos lentos de división, permaneciendo quiescentes en los diferentes órganos y tejidos durante gran parte de la vida del individuo(Cheng et al., 2000).

Autorrenovación: es la capacidad que tiene una célula de dar origen al menos a otra célula hija con características idénticas a las suyas, es decir, es la capacidad de pasar por múltiples ciclos de división celular manteniendo su estado indiferenciado. La autorrenovación se consigue mediante división asimétrica de la célula madre, de la que surgen una célula exactamente igual a la original, y otra con determinantes específicos, que le confieren mayor capacidad de división y que dará lugar a una gran progenie celular. Esta característica de autorrenovación es crucial para el mantenimiento de la población de células madre y así persistir durante toda la vida del organismo. Todas las células madre deben autorrenovarse y llegar a un equilibrio entre la autorrenovación y la diferenciación(Reya et al., 2001). Una característica de la autorrenovación es el alargamiento de los telómeros después de la división celular(Huntly and Gilliland, 2005).

En un estudio realizado por Till, J. E. y colaboradores, se realizó un ensayo que se llevó a cabo *in vivo* en ratones irradiados letalmente, en los que tras la inyección intravenosa de células hematopoyéticas, tiene lugar la aparición de nódulos en el bazo, en número proporcional al número de células inyectadas(Till and McCulloch, 1961). El análisis de estas colonias mostró que eran clonales, es decir, procedían de la multiplicación de una sola célula con un alto potencial proliferativo, que contenían células pertenecientes a todas las líneas de diferenciación hematopoyética, y que si eran reinyectadas en ratones secundarios, algunas de estas células daban lugar a nuevas colonias en el bazo de los receptores, confirmándose su capacidad de autorrenovación(SIMINOVITCH et al., 1963).

División asimétrica: Para asegurar la autorrenovación, las células madre se someten a dos tipos de división celular: divisiones simétricas, que crean dos células hijas idénticas, ambas dotadas con las características de la célula madre, y por otro lado, las células madre realizan un tipo de división mitótica especial conocida como división asimétrica (Rebollo et al., 2007). En este tipo de división mitótica la célula madre se divide dando lugar a otra célula madre que mantiene las características idénticas a las de la célula de origen y, por lo tanto, es capaz de repetir esta pauta de división asimétrica reiteradamente; y a otra célula hija que dará lugar a toda la progenie o linaje de un tejido, es decir, dará lugar a los progenitores de rápida amplificación. Los progenitores pierden la capacidad de dividirse asimétricamente con cada división, de autorrenovarse, por lo que los progenitores se van diferenciando progresivamente hasta ser células totalmente diferenciadas, probablemente debido al descenso de la actividad de la telomerasa (Clarke, 2005). Estas células madre, con capacidad de diferenciación restringida, que solo pueden diferenciarse en las diversas clases de células que componen un tejido (por ejemplo, las células madre hematopoyéticas sólo pueden producir la variedad de linajes que forman el sistema hematopoyético), se clasifican como células madre multipotenciales. Este es el caso de la célula madre adulta.

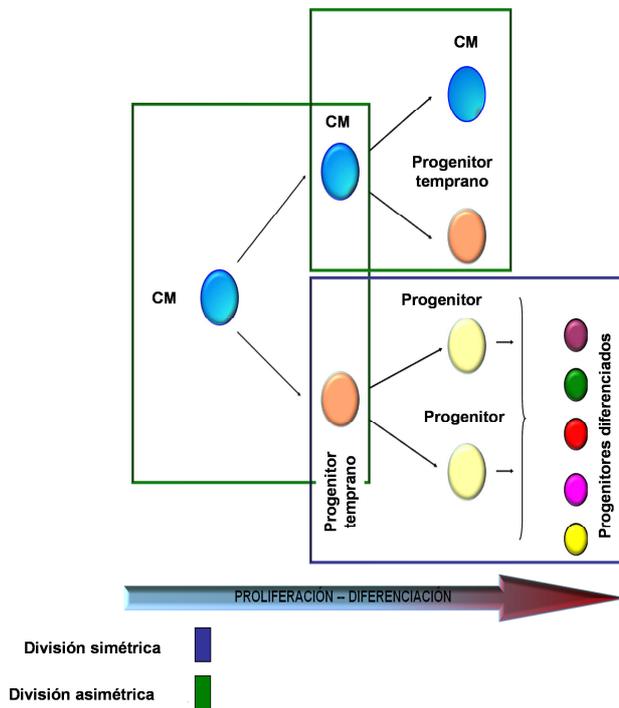


Figura 6: Representación de la división asimétrica de las células madre y la división simétrica de los progenitores. Las células madre se dividen dando lugar a otra célula madre y una célula más comprometida en el proceso de diferenciación, conocidas como progenitores multipotentes. Estas últimas células son capaces de repoblar un tejido de un modo rápido dando lugar a progenitores cada vez más comprometidos en la diferenciación, y que darán lugar a las células completamente diferenciadas que componen el tejido.

►INTRODUCCIÓN

Mediante estudios en *Drosophila melanogaster* genéticamente modificadas se ha podido observar que la mayoría de las células animales tienen dos centrosomas antes de dividirse y su posición dictamina la orientación de la división. En las células que se dividen simétricamente (dando lugar a dos células equivalentes) los dos centrosomas de cada célula son prácticamente idénticos entre sí. En el caso de la división asimétrica los dos centrosomas de las células madre analizadas son radicalmente diferentes. Uno de ellos permanece fijo en una posición definida y es muy activo durante todo el ciclo celular, mientras que el otro se desplaza a lo largo y ancho de la célula y se detiene y activa sólo en un lugar determinado momentos antes de la división. La asimetría intracelular de tener dos centrosomas funcionalmente diferentes, contribuye decisivamente a controlar la división asimétrica de las células madre y evitar su proliferación (Gonzalez, 2008). Estudios diferentes realizados con *Drosophila melanogaster* han mostrado que aberraciones en la división celular asimétrica, causadas por mutaciones en los genes que controlan la polaridad (*aps*, *mira*, *numb*, *pros*), incrementa la frecuencia de autorrenovación y es la responsable de la conversión de neuroblastos sanos a su forma similar en neuroblastoma, por lo que los genes controladores de la polaridad de la división celular juegan un importante papel en la carcinogénesis (Guo et al., 2006).

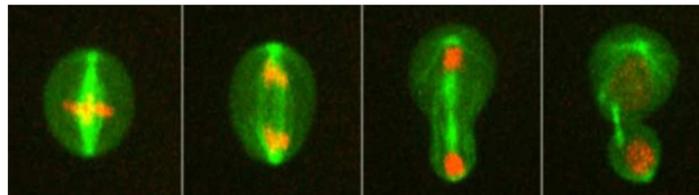


Figura 7: Cuatro fases del ciclo de división de una célula madre. (Foto: IRB Barcelona, Laboratorio de División Celular).

La división asimétrica permite la generación de un progenitor y de una célula madre. Sin embargo, en los últimos años se ha postulado una hipótesis, todavía sin confirmar, que propone la división simétrica como alternativa a la división asimétrica, en aquellos casos en que se necesite una pronta recuperación de la población de células madre (Boman et al., 2007; Morrison and Kimble, 2006).

Vías de señalización: Como vías de señalización implicadas en la autorrenovación de las células madre se han descrito, entre otras, las vías de Wnt, Sonic Hedgehog (Shh) y Notch. Estas vías están relacionadas con la embriogénesis, la oncogénesis y también con la regulación de la autorrenovación de las células madre. Actúan de manera coordinada fusionando las señales intrínsecas y extrínsecas para alcanzar un correcto equilibrio entre la autorrenovación y la diferenciación de las células madre (Reya et al., 2001). Se ha visto que la vía Notch interviene en la activación de la autorrenovación de las células madre hematopoyéticas y las células madre neurales, o al menos en el mantenimiento de la multipotencialidad (Andreu-Agullo et al., 2009; Shen et al., 2004). Además de Notch, la vía de Shh también está implicada en la regulación de la autorrenovación de CMHs (Karanu et al., 2000; Zhang and Kalderon, 2001). El papel que juegan tanto la vía Notch, como la vía Shh, en la autorrenovación de las CMHs, tiene un especial interés para el estudio de la implicación de éstas vías en la regulación de la autorrenovación de células madre procedentes de otros tejidos diferentes. La vía Wnt está implicada en la regulación de la autorrenovación y la oncogénesis en diferentes órganos (Kikuchi, 2009). Estudios realizados en progenitores epidérmicos e intestinales sugieren que la vía de señalización Wnt puede contribuir a la regulación de la autorrenovación de células madre-progenitores en otros tejidos. Wnt aumenta la cantidad de células capaces de repoblar el tejido sanguíneo en experimentos de trasplante con ratones irradiados y carentes de sistema hematopoyético (Reya et al., 2003).

La desregulación (por hiperactivación, por ejemplo) de las vías de señalización, tales como Notch, Shh, Wnt/- catenina, factor Bmi-1, y la familia de genes *Hox*, pueden transformar las células madre a CMTs, por lo que juegan un importante papel en la carcinogénesis. Si la alteración de estas vías de señalización lleva a la génesis de los tumores, entonces las propias células madre podrían ser dianas de la transformación maligna. Además de las células madre, los progenitores de rápida amplificación tienen activadas algunas de estas vías, y la adquisición de mutaciones podría llevarles más rápidamente a la transformación maligna, debido a la adquisición de mecanismos de autorrenovación unidos a la capacidad de rápida amplificación. Algunos ejemplos de la relación entre el cáncer y la desregulación de estas vías de señalización son:

- La proteína Bmi-1 también es muy importante en la regulación en los procesos de autorrenovación de las CM y las CMTs.
- La desregulación de la vía Wnt se ha relacionado con fases tempranas de cáncer de colon (Figura 8).
- Alteraciones en la ruta Shh se ha relacionado con cáncer de piel, y más recientemente con carcinoma de páncreas, gástrico, próstata y mama (Figura 8).

- Alteraciones en la vía de Notch han sido observadas en leucemia linfoblástica aguda, y cáncer de mama (Figura 8).

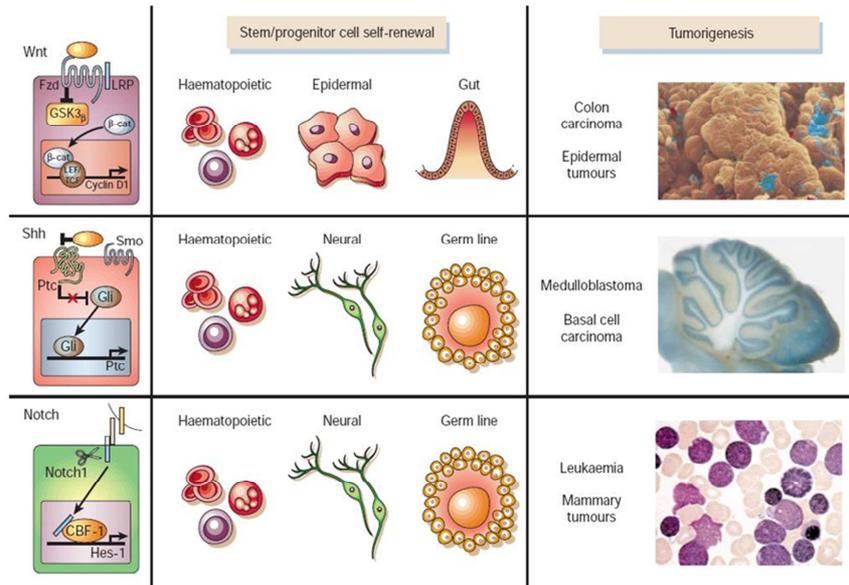


Figura 8: Vías de señalización reguladoras de la autorrenovación en células madre y tumorigénesis. La Vía de señalización Wnt, Shh y Notch, están implicadas en la autorrenovación de las células madre de diferentes tejidos. La desregularización de estas vías juega un papel importante en la carcinogénesis(Reya et al, 2001)

Resistencia: Las células madre adultas somáticas presentan una mayor resistencia a fármacos y toxinas ya que expresan varios transportadores de la familia ABC Transporter, poseen activos mecanismos de reparación del ADN y presentan un sistema de resistencia a la apoptosis más activo que el resto de células maduras(Kucia and Ratajczak, 2006). Una subpoblación de células con características de célula madre puede ser identificada mediante el fenotipo Side Population (SP), basado en la expulsión del colorante Hoechst 33342. Goodel y colaboradores fueron los primeros en mostrar esta SP, y atribuyeron la responsabilidad de este fenotipo al transportador ATP-binding cassette (ABC) MDR1, pero ha resultado ser más abundante de lo esperado según los porcentajes que componen la población SP. Posteriormente se identificó otro transportador ABC, Breast Resistance Protein (BCRP1/ABCG2), principal responsable de la SP, al menos en médula ósea. La SP ha sido identificada en numerosos tejidos, como la glándula mamaria, músculo esquelético, páncreas, pulmón, retina, hígado, testículos, corazón o epidermis. La función fisiológica de estos transportadores de membrana parece estar relacionada con la protección de la célula ante agentes citotóxicos externos o compuestos endógenos(Jonker et al., 2005).

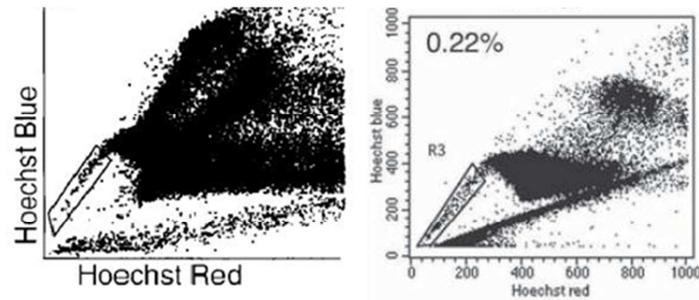


Figura 9. Análisis de la población SP en células madre por citometría de flujo. En la imagen de la izquierda aparece la población SP de médula ósea, representando un 0,1% del total de células. En la imagen de la derecha aparece la población SP de la glándula mamaria, representando un 0,22% del total de células.

El metabolismo del oxígeno, aunque es básico para la vida, produce especies reactivas de oxígeno (ROS), que han sido implicados en diversos procesos como cáncer, enfermedades cardiovasculares y envejecimiento. Recientemente se ha demostrado que células madre del sistema nervioso central y del sistema hematopoyético, así como sus progenitores tempranos, contienen niveles de ROS más bajos que su progenie de progenitores comprometidos. Al igual que las células madre del sistema nervioso central y las CMH, las células madre tumorales (CMTs) también comparten esta propiedad (Diehn et al., 2009). Este hecho se debe a que las células madre son capaces de producir una cantidad significativa de proteínas antioxidantes que les protegen del estrés oxidativo, por lo que su ADN permanece protegido frente a los daños oxidativos que deberían causarle las radiaciones y los fármacos quimioterapéuticos. La “Side Population” también ha sido relacionada con cierta resistencia a las condiciones de estrés oxidativo (Armstrong et al., 2005). En este aspecto hay dos posibles hipótesis, una de ellas propone que la resistencia se debe a la sobreexposición de este tipo celular a radicales libres, por lo que sus umbrales de susceptibilidad son superiores; La otra hipótesis plantea que los sistemas de control de radicales libres en el citoplasma de la SP están más activados que en el resto de células por lo que serían más eficaces en el control del daño celular.

Plasticidad: Las células madre adultas por lo general generan los mismos tejidos del órgano en el cual residen. Sin embargo, estudios realizados en los últimos años han demostrado que a partir de células madre de un tejido se puede dar lugar al desarrollo de células de tejidos totalmente diferentes, esta capacidad se conoce como plasticidad. Este es el caso de las células madres embrionarias, procedentes de la masa interna del embrión y, capaces de dar origen a células de las tres capas germinales que forman el organismo completo. Sin embargo, a diferencia de las células madre adultas multipotenciales, las células madre pluripotenciales existen solo de forma transitoria durante el desarrollo embrionario, desapareciendo después de las fases tempranas del desarrollo. En los últimos años se han investigado las

señales que llevan a la reprogramación de células hacia un estado pluripotencial similar al embrionario, demostrándose que la expresión ectópica en células murinas o humanas somáticas de una combinación de genes característicos de las células madre embrionarias (*Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc* y *Klf4*) pueden reprogramar células adultas diferenciadas hacia la pluripotencialidad. Estas células pluripotenciales recién generadas, producidas artificialmente a partir de una célula no pluripotencial mediante la introducción de ciertos genes, se define como células madre multipotenciales inducidas (CMPi) (figura. Sin embargo, aunque se cree que las CMPi son idénticas a las células madre pluripotenciales naturales en varios aspectos, tales como la expresión de determinados genes de células madre y proteínas o patrones de metilación de la cromatina, aún se está estudiando su relación con las células madre pluripotenciales naturales (Okita et al., 2007; Takahashi and Yamanaka, 2006; Wernig et al., 2007).

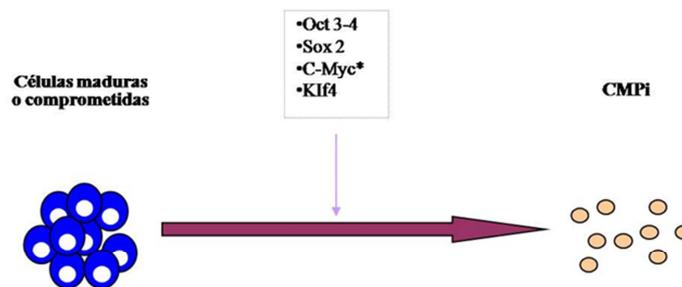


Figura 10. Células madre pluripotenciales inducidas. En los últimos años, diferentes estudios han demostrado que la introducción de una combinación de genes en células diferenciadas o comprometidas, les confiere propiedades pluripotenciales características de las células madre embrionarias. Estas células pluripotenciales producidas artificialmente se definen como células madre pluripotenciales inducidas (CMPi). * La introducción de c-Myc no es necesaria para producir CMPi.

3.4.2. HIPÓTESIS DE LAS CÉLULAS MADRE TUMORALES

La aparición de los tumores puede responder a una desregulación de la homeostasis tisular como consecuencia de la acumulación de mutaciones genéticas y epigenéticas. Las alteraciones pueden afectar a todas las células de la jerarquía celular, ya se trate de células madre, progenitores de rápida amplificación y/o células terminalmente diferenciadas, que adquirirían la capacidad de proliferar indefinidamente (figura 11). Existen diferentes hipótesis acerca del origen de los tumores. Una de ellas se basa en que las CM presentan ciclos de división largos y se encuentran en un estado de quiescencia, por lo que pueden acumular mutaciones y cambios epigenéticos, cruciales para la iniciación y progresión tumoral. De esta manera, las CM se

transformarían en CMTs (figura 11). Otra hipótesis diferente asume la existencia de una pequeña población de células, similares a las células madre embrionarias, en sangre y otros tejidos; que podrían originar las CMTs (figura 11). Otra hipótesis defiende que mutaciones en células más diferenciadas puede ser importante en el desarrollo de las CMTs (Reya et al., 2003) (figura 11). Los tumores podrían poseer células con características similares a las que poseen las células madre adultas, conocidas como células madre tumorales (CMTs). Del mismo modo, se pueden dar fenómenos de fusión celular entre células madre y células tumorales, así como trans-diferenciaciones que resultarían en la generación de células malignas con características similares a las células madres (figura 11). De acuerdo con la hipótesis de las células madre tumorales, los tumores serían tejidos complejos, donde el crecimiento y mantenimiento desorganizado del mismo se llevaría a cabo por un pequeño grupo de células tumorales patológicas, con características de célula madre (Clarke, 2005).

El papel fundamental de las células madre en la raíz del desarrollo y mantenimiento de la autorrenovación tisular se ha establecido claramente en las últimas cuatro décadas. Sin embargo, solo recientemente, los tumores también han comenzado a considerarse por sí mismos como tejidos organizados. A la luz de esta nueva visión del tejido neoplásico, se ha postulado la existencia de las células madre tumorales como las células responsables del origen, mantenimiento y propagación de los tumores. En la actualidad, se ha demostrado la veracidad de esta teoría para muchos tipos de cáncer del tejido hematopoyético y tumores sólidos en humanos. Sin embargo, poco se sabe aún del origen de la célula madre tumoral, a pesar de que recientemente se ha avanzado mucho en la comprensión de la biología de las células madre normales y los mecanismos que controlan su destino y sus atributos de diferenciación celular. Cada vez son más los datos sólidos que sugieren que las vías y propiedades asociadas con la biología de las células madre normales son importantes para el desarrollo del cáncer. Aún debe aclararse si las células madre tumorales provienen de células madre de tejido normal, de células progenitoras o incluso de células diferenciadas (por adquisición de propiedades de células madre), pero lo que se está haciendo evidente es que los cambios epigenéticos y genéticos en la célula tumoral de origen y/o su microentorno son cruciales para el inicio y la progresión del crecimiento tumoral. La comprensión de esta compleja red intrínseca y extrínseca es fundamental para identificar, tratar y eliminar definitivamente el cáncer.

► INTRODUCCIÓN

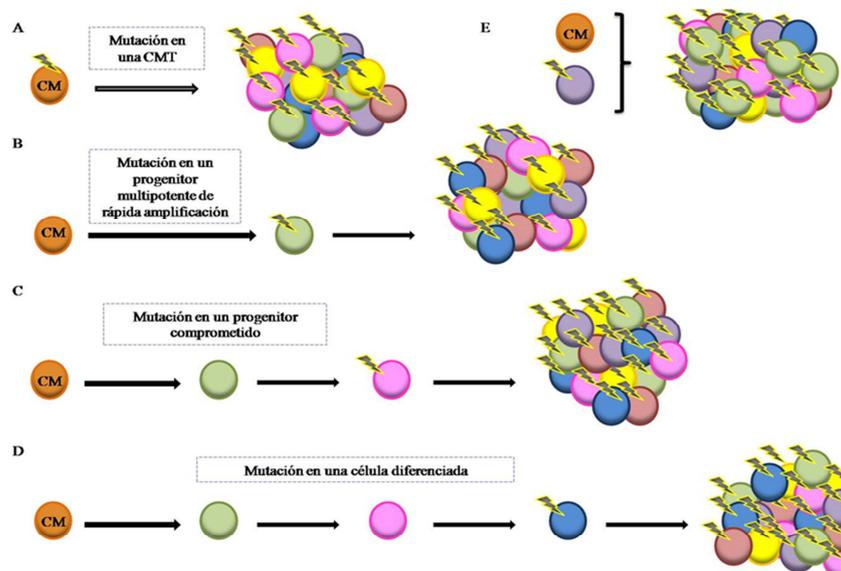


Figura 11. Hipótesis sobre el origen del cáncer. Existen diferentes tipos de tumores en cuanto a grado de diferenciación en función del tipo celular en el que se produzca la mutación, y por lo tanto los tumores tendrán diferentes grados de proliferación y regeneración. De esta manera, los tumores producidos por una mutación en una célula madre (A) o los formados por la fusión de una célula madre tumoral y una célula madre (E) estarán menos diferenciados que aquellos tumores originados por una mutación en una célula diferenciada (D) o los derivados de las mutaciones de los progenitores (ByC).

Al igual que las CM, las CMTs presentan una marcada resistencia a la quimioterapia, radioterapia y a la apoptosis. Guzman y colaboradores han mostrado que células madre tumorales de leucemia son más resistentes a la quimioterapia que el resto de células diferenciadas (Guzman et al., 2002). De forma similar, Matsui y colaboradores, han observado que células madre de mieloma son muy resistentes a diferentes terapias (Jones et al., 2004). Existen diferentes mecanismos que pueden estar involucrados en la resistencia, uno de ellos puede ser el hecho de que la mayor parte de las CMTs se encuentren en un estado de latencia, en fase G₀, por lo que disponen de tiempo para activar los mecanismos de reparación y replicación del ADN (Wicha et al., 2006). Otro mecanismo diferente de resistencia puede ser debido a un incremento de proteínas antiapoptóticas, las proteínas de la familia BCL-2, ya que las células resistentes a fármacos expresan esta proteína en su membrana, e inhibidores de la apoptosis (Al-Hajj et al., 2003). El aumento de la expresión del oncogen bcl-2 en CMH tiene un efecto antiapoptótico (Reya et al., 2001). Además, hay otras proteínas relacionadas con la quimioresistencia, como los transportadores de membrana MDR1 y ABC.

Los tratamientos oncológicos convencionales, utilizados a día de hoy, no son selectivos, es decir, afectan tanto a las células tumorales como a las células sanas. Además, son inocuos o afectan menos a células que no están en división celular, como es el caso de las células madre tumorales quiescentes, por ello es necesario que los nuevos tratamiento y terapias futuras vayan

encaminados a la eliminación de las CMTs y no afectar al resto de células, ya que la eliminación de las CMTs supone la eliminación del tumor, así como de las recidivas futuras(Reya et al., 2001) (figura 12).

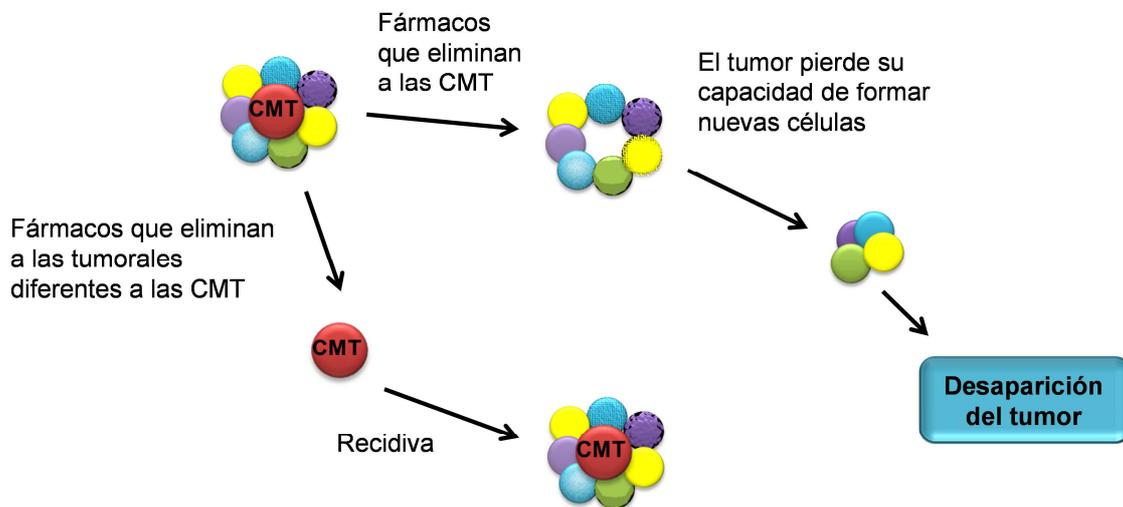


Figura 12: : **Implicaciones terapéuticas antineoplásicas de las CMTs.** Los tratamientos actuales se encargan de eliminar la población de células tumorales, pero no incluyen a las CMTs, ya que éstas debido a sus propiedades escapan a los efectos de los tratamientos, y por ello vuelven a formar un tumor. Futuras terapias deberán ir encaminadas a la eliminación de las CMTs, de esta manera el tumor desaparecerá. Adaptado de Reya T, 2001.

3.4.3. **DESCUBRIMIENTO DE LAS CÉLULAS MADRE TUMORALES**

La investigación con células madre tumorales se remonta a mediados del siglo XIX, en el año 1855, cuando Rudolf Virchow y Julius Conheim describieron una primera hipótesis de células madre tumorales con características similares a las células madre. Virchow enuncia su hipótesis de los remanentes embrionarios latentes, basándose en las similitudes encontradas entre el desarrollo de las células fetales y algunas células tumorales(Kucia and Ratajczak, 2006). Coheim postuló que los remanentes embrionarios latentes, de los cuales se formaban los tumores, se perdían durante la organogénesis. Sin embargo, la identificación de las CMTs en diferentes tumores fue gracias al progreso de las técnicas de la biología molecular. Uno de los primeros experimentos que confirmó la existencia de las CMTs fue realizado en el año 1960. Este estudio se realizó con pacientes neoplásicos, a los que se les trasplantaron una pequeña cantidad de sus células malignas en otras partes de su cuerpo. Los resultados de este experimento mostraron que un pequeño porcentaje de células trasplantadas tienen la capacidad de producir tumor. Debido a las controversias éticas suscitadas con este tipo de experimentos, se introdujo el modelo animal en este tipo de experimentos(Huntly and Gilliland, 2005). En el año 1967, Fialkow y colaboradores mostraron que ciertas células leucémicas presentaban la

proteína G-6-PD en su superficie, y se les relacionó con células malignas(Fialkow et al., 1967). Gracias a la introducción de la citometría de flujo, se pudo avanzar enormemente en estudios de células madre tumorales, ya que el estudio de marcadores de superficie en este tipo de células ha sido imprescindible para su identificación y aislamiento. En 1994, Dick J y Lapidot T identificaron la primera CMT en muestras de pacientes con leucemia mieloide aguda(Lapidot et al., 1994). En el año 1997, Bonnet y Dick describieron una subpoblación de células inmaduras y características por la expresión de los marcadores CD34 (CD34⁺) y la ausencia del marcador CD38 (CD38⁻) en pacientes con leucemia mieloide aguda. Posteriormente, estas células se aislaron y fueron trasplantadas en ratones NOD/SCID. Algunos de estos ratones desarrollaron tumores, por lo que estos autores afirmaron que una pequeña subpoblación de células CD34⁺/CD38⁻ son capaces de iniciar el desarrollo tumoral(Bhatia et al., 1997).

Al-Hajj, en el año 2003, fue el primero que describió las CMTs en cáncer de mama, encontrando que las células tumorales de este tipo de neoplasia se caracterizan por una expresión heterogénea de marcadores. La identificación de estos marcadores ayudó en la identificación del potencial carcinogénico, es decir, permitió distinguir aquellas células iniciadoras de tumores. Únicamente la población de células CD44⁺/CD24^{bajo} eran capaces de iniciar procesos tumorales en ratones inmunodeprimidos (figura 13)(Al-Hajj et al., 2003).

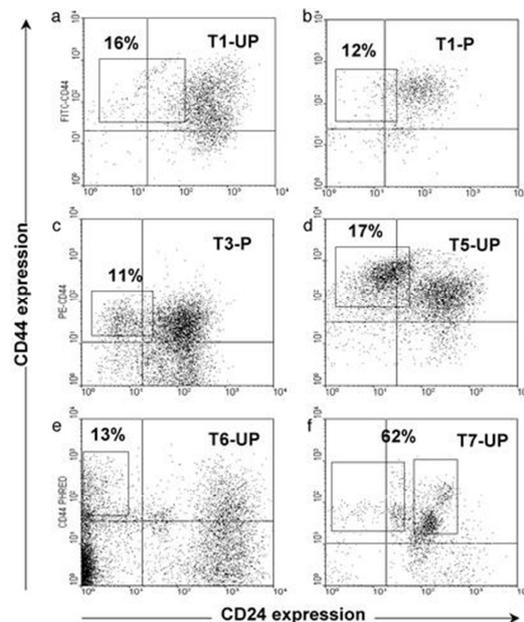


Figura 13: Análisis de células CD44⁺/CD24^{bajo} mediante citometría de flujo. Al-Hajj, 2003.

Las CMTs han sido ya identificadas, en base a marcadores específicos, en leucemia, cáncer de mama, pulmón, ovario, próstata, tumores gástricos, páncreas, colorrectal y en tumores cerebrales(Gil et al., 2008).

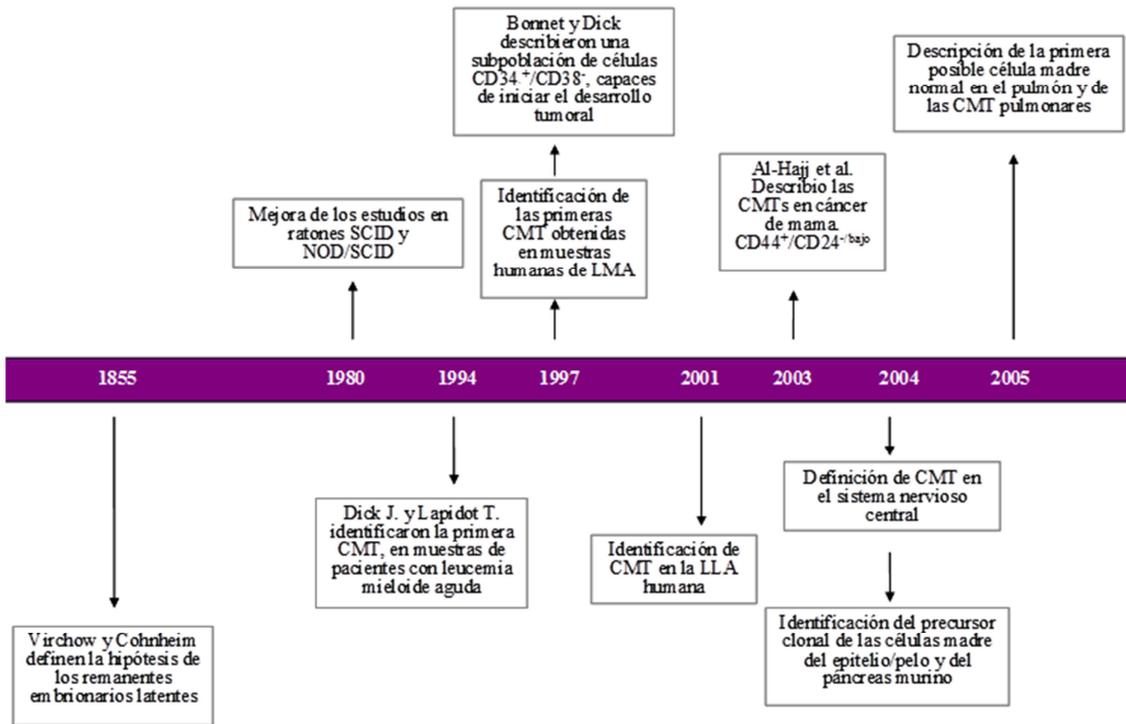


FIGURA 14: Cronología y evolución en la investigación de CMTs

3.4.4. MARCADORES DE CÉLULAS MADRE TUMORALES

Para la identificación y aislamiento de las CMTs, ha sido necesario el análisis de marcadores presentes en sus membranas. La caracterización molecular del cáncer puede aplicarse a diferentes objetivos prácticos, desde la estratificación de los pacientes hasta la vigilancia de la enfermedad. Las distintas aplicaciones requieren distintos biomarcadores, de forma que un biomarcador de la sensibilidad farmacológica que sea útil para la selección de los pacientes candidatos a un tratamiento podría no ser igual que un biomarcador que predice la supervivencia de los pacientes oncológicos o las probabilidades de sufrir cáncer que tiene un paciente sano de un grupo de riesgo alto. Es posible, y quizás e incluso probable, que cada tipo de aplicación clínica exija el desarrollo de su propio grupo de biomarcadores para cada enfermedad. Por tanto, cada enfermedad no sólo se describirá por sus manifestaciones clínicas y por su patología molecular, sino también en función de un grupo de biomarcadores para la detección, el diagnóstico, los distintos tipos de tratamientos, la predicción de la respuesta, los resultados, etc.

Cuando el cáncer se detecta temprano, los pacientes viven más tiempo, precisan menos tratamiento y, en general, evolucionan mejor que los pacientes con una enfermedad más avanzada. La mejoría de los resultados clínicos

► INTRODUCCIÓN

destaca la necesidad de detectar el cáncer temprano y de buscar biomarcadores aplicables a la detección sistemática. Teniendo en cuenta que una prueba de detección sistemática debe ser mínimamente cruenta y exacta, la elección de los medios para el análisis se limita a los líquidos biológicos (saliva, sangre, orina y lágrimas) y a células accesibles, normalmente epiteliales o sanguíneas.

Las proteínas y los péptidos son los biomarcadores sanguíneos en desarrollo más destacados actualmente. Está empezando a imponerse la tendencia de medir simultáneamente varios marcadores en lugar de proteínas individuales.

Tabla 6: Importancia de los diferentes requisitos para el desarrollo de biomarcadores

OBJETIVO	REQUISITOS						
	OBJETIVOS					SUBOBJETIVOS	
	Facilidad de uso	Coste	Exactitud	Velocidad	Capacidad	Dolor	Comodidad
Detección	****	****	****	****	****	****	****
Diagnóstico	***	**	***	**	**	**	*
Pronóstico	***	*	***	*	*	*	*
Evaluación de riesgo	***	***	***	**	**	**	**
Estratificación por tratamiento	**	**	***	*	*	*	*
Vigilancia	**	*	***	*	*	*	**
Criterio secundario de valoración	***	**	****	***	***	***	***

Las estrategias celulares para el desarrollo de biomarcadores intentan por lo general aislar las células tumorales circulantes del torrente circulatorio para detectar cambios relacionados con el tumor; no es seguro que estas células vayan a resultar útiles para la detección de un cáncer en las etapas iniciales, pero podrían ser importantes para el desarrollo de biomarcadores para el control de la enfermedad una vez detectado y diagnosticado un tumor. De acuerdo con la hipótesis de las células madre tumorales, éstas serían las responsables de la resistencia a los diferentes tratamientos y de las recidivas, mientras que el resto de las células tumorales degenerarían, por lo tanto, el diseño de los nuevos biomarcadores tumorales debería tener un enfoque más selectivo en la detección de las CMTs circulantes en sangre periférica. La baja concentración de células tumorales y CMTs circulantes en sangre, probablemente sea la principal limitación de este tipo de análisis, ya que puede producir resultados falsos negativos; sin embargo, el desarrollo de nuevas técnicas de obtención de muestras y análisis podría mitigar algunos de estos problemas.

En la actualidad se han descrito numerosos marcadores de célula madre tumoral en diferentes tumores sólidos. En la tabla 7 aparecen los marcadores de célula madre descritos en tumores cerebrales(Hemmati et al., 2003;Liu et al., 2006), mama(Al-Hajj et al., 2003), colon(O'Brien et al., 2007;Ricci-Vitiani et al., 2007), colorrectal(Dalerba et al., 2007), cabeza y cuello(Prince et al., 2007), páncreas(Li et al., 2007), próstata(Collins et al., 2005), melanoma(Schatton et al., 2008) y pulmón(Eramo et al., 2008).

Tabla 7: Marcadores de célula madre tumoral en tumores sólidos humanos

TIPO DE TUMOR	MARCADOR DE CÉLULA MADRE
Cerebrales	CD133, nestina, mushashi1, CXCR4
Mama	CD44 ⁺ /CD24 ^{bajo}
Colon	CD133
Colorrectal	EpCAM, CD44, CD166
Cabeza y cuello	CD44, BMI1
Páncreas	CD44, CD24, ESA, CXCR4
Próstata	CD44, CD133, $\alpha 2\beta 1$
Melanoma	ABC5
Pulmón	CD133

LA PROTEÍNA CD-133

La proteína CD133, también conocida como prominina 1, fue el primer miembro identificado de la familia de las proteínas promininas. Las promininas son proteínas de membrana todavía de función y ligando desconocido. En 1997, Yin y colaboradores generaron un anticuerpo contra esta proteína, que reconocía un epítipo de la molécula dependiente de glicosilación (AC133). Este anticuerpo delimitaba una subpoblación dentro de las células madre hematopoyéticas (CD34⁺CD38⁻), capaces de repoblar el sistema hematopoyético de aquellos ratones que carecían de él(Yin et al., 1997). La proteína CD133 se localiza específicamente en la zona apical de la membrana plasmática de las células madre hematopoyéticas(Corbeil et al., 2000).

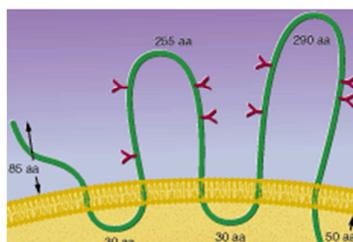


Figura 15: **Topología de membrana propuesta para la proteína CD133.** La proteína cuenta con cinco dominios transmembrana. El extremo N-terminal se encuentra en la parte extracelular, mientras que el extremo C-terminal está localizado en la parte intracelular. Los posibles sitios de glicosilación se muestran en rojo.

► INTRODUCCIÓN

El gen que codifica CD133 se localiza en 4p15, posee 27 exones que dan lugar a un transcrito de 2875 pb. El transcrito contiene hasta nueve regiones (UTR) no traducidas que resultan en al menos siete isoformas debidas al procesado alternativo. Además, se han encontrado hasta cinco promotores que se regulan mediante metilación(Shmelkov et al., 2004).

CD133 codifica una glicoproteína de 865 residuos y 120 kDa, con cinco dominios transmembrana. La estructura de la proteína cuenta con un dominio N-terminal extracelular, dos lazos cortos intracelulares, dos lazos grandes extracelulares y una cola C-terminal intracelular. La proteína contiene ocho sitios de N-glicosilación, todos ellos en los lazos extracelulares y una cremallera de leucina en el primer dominio extracelular.

Se trata de un marcador, recientemente identificado, que determina el potencial para generar poblaciones de CMTs en tumores sólidos, como cerebro(Hemmati et al., 2003;Liu et al., 2006), próstata(Collins et al., 2005), pulmón(Eramo et al., 2008) y cáncer colorrectal(O'Brien et al., 2007;Ricci-Vitiani et al., 2007). Existen numerosas evidencias que relacionan el marcador CD133 con células iniciadoras de tumores y la progresión de la enfermedad. Inicialmente, el grupo del Dr. Dirks describió una población celular CD133⁺ en muestras de meduloblastoma y glioblastoma multiforme capaces de formar tumores en ratones inmunocomprometidos(Singh et al., 2003). Este tipo celular, por tanto, era capaz de auto-renovarse, proliferar y diferenciarse a múltiples linajes *in vitro*(Collins et al., 2005). El marcador CD133 ha sido descrito como un marcador de membrana de célula madre tumoral o célula iniciadora de tumores en cáncer colorrectal, pero con diferente expresión entre pacientes y líneas celulares(Chu et al., 2009). En cáncer colorrectal el marcador CD133 se ha relacionado con un peor pronóstico y metástasis hepáticas(Chen et al., 2013;Horst et al., 2009), aunque la función de la proteína CD133 sigue siendo desconocida.

La coexpresión de la proteína CD133 con AKT en tumores sólidos se ha asociado a una subpoblación celular con una mayor resistencia a quimioterapéuticos(Ma et al., 2008;Wang et al., 2010), sin embargo los detalles de la interacción entre las dos proteínas son desconocidos. Por otro lado, una alta expresión de los biomarcadores CD133 y CD44 se ha utilizado para identificar células madre tumorales en pacientes con cáncer colorrectal, asociándose a un peor pronósticos de la enfermedad(Galizia et al., 2012). Además, una expresión CD133⁺/CD44⁺ en poblaciones de células tumorales se ha relacionado con mayor invasividad *tumoral in vitro*, y responsable de la aparición de metástasis *in vivo* en ratones(Chen et al., 2011;Haraguchi et al., 2008;Wang et al., 2012). Estudios clínicos han mostrado la importancia del marcador CD133 en la respuesta a radioterapia y quimioterapia(Butof et al., 2013).

Hay estudios que han demostrado que la proteína CD133 no es restrictiva de una pequeña subpoblación celular dentro de los tumores. Lugli y colaboradores mostraron que ni la sobreexpresión ni la pérdida de la proteína CD133 se asociaban significativamente con una progresión tumoral o supervivencia (Lugli et al., 2010).

LA PROTEÍNA BCRP1

La proteína BCRP1 (Breast Cancer Resistant Protein 1) fue descrita por primera vez en la sublínea MCF-7/AdrVp, co-cultivada con doxorubicina y verapamil (Doyle et al., 1998). La resistencia a fármacos de estas células se debía principalmente a una proteína de 663 aminoácidos, cuya sobreexpresión confería resistencia a mitoxantrone y doxorubicina. Además, reducía la acumulación de la daunorubicina y provocaba la expulsión de colorantes lipofílicos del tipo Hoechst 33342. Posteriormente se pudo comprobar que esta proteína era un miembro de la superfamilia de transportadores ABC (ATP-binding cassette). La familia de los transportadores ABC son proteínas de membranas dependientes de ATP, que se expresan principalmente en aquellos tejidos que poseen una función secretora como el hígado, el intestino, la barrera hemato-encefálica, la placenta o el riñón. En estos órganos ejercen una función de excreción y eliminación de drogas y xenobióticos así como compuestos endógenos. La familia de los transportadores ABC en humanos cuenta con 49 miembros divididos en siete subfamilias (ABC1, MDR/TAP, MRP, ALD, OABP, GCN20, White) (Huls et al., 2009).

La proteína BCRP1 es un transportador de membrana de 72 KDa. La estructura proteica cuenta con un dominio de unión intracelular (NBD), seguido por un dominio de membrana (MSD). El dominio de membrana MSD cuenta con seis hélices alfa y tres posibles sitios de glicosilación, que se encuentran en la zona extracelular de este dominio (Mao and Unadkat, 2005).

El gen que codifica BCRP1 tiene una longitud de 66 Kb, estructurado en 16 exones y 15 intrones. Los exones son pequeños y cuentan entre 60 a 532 pares de bases (pb). El lugar de inicio de la traducción se encuentra en el segundo exón. El promotor del gen *ABCG2* no posee caja TATA, pero contiene una caja CAAT y varios sitios Sp1 aguas abajo de una isla de CpG. El promotor de *ABCG2* es muy similar a otros miembros de su familia, como los genes que codifican para MDR1 (*ABCB1*), MRP1 (*ABCC1*) y *ABCG* (Bailey-Dell et al., 2001).

La función de la proteína BCRP1 reside en la expulsión de sustancias tóxicas, fármacos y compuestos generados en el metabolismo celular, al

► INTRODUCCIÓN

exterior de la célula. En la glándula mamaria, esta proteína se encarga de la excreción de nutrientes a la leche, así como la expulsión de tóxicos y algunos fármacos, como el topotecan, irinotecan y la cimetidina, que son excretados por esta vía (Huls et al., 2009; Nakatomi et al., 2001). Sin embargo, no se ha observado resistencia frente a cisplatino y paquitaxel (Doyle et al., 1998; Yuan et al., 2009).

Los ratones deficientes en la proteína BCRP1 (*BCRP1*^{-/-}) no tienen comprometido su desarrollo normal, y únicamente presentan problemas en el metabolismo de los productos derivados de la clorofila (Jonker et al., 2002). A pesar de que esta proteína no es necesaria en el desarrollo normal del ratón, no se puede excluir la posibilidad de que el transportador esté implicado en la regeneración de los tejidos bajo condiciones extremas (Israeli et al., 2005), puesto que la proteína BCRP1 confiere mayor supervivencia bajo condiciones de hipoxia (Sarkadi et al., 2004).

Por otro lado, estudios demuestran que la proteína BCRP1 es necesaria para la aparición de la población SP (Zhou et al., 2002) (figura 16). La llamada SP (*Side Population*) es una pequeña población de células capaz de expulsar colorantes fluorescentes lipofílicos (Spangrude and Johnson, 1990; Wolf et al., 1993). Esta población se ha relacionado principalmente con las células madre de la médula ósea, así como de otros muchos tejidos. La población SP se reduce considerablemente en aquellos ratones que no expresan BCRP1 (Jonker et al., 2005).

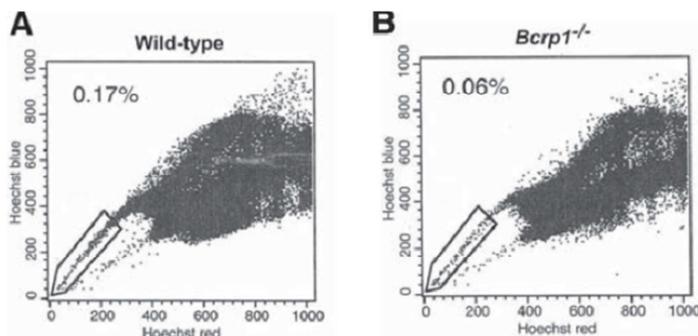


Figura 16: La proteína BCRP1 es la responsable de la aparición de la SP. La población SP (A) disminuye en ratones que no poseen expresión de Bcrp1 (B). (Jonker et al., 2005)

La proteína BCRP1 ha sido identificada en el epitelio del intestino delgado y colon, hígado, conductos y lóbulos mamarios, en el endotelio venoso y capilar, en la barrera hematoencefálica y en la barrera testicular, sugiriendo una función protectora y reguladora ante fármacos (Maliepaard et al., 2001; Natarajan et al., 2012; Yuan et al., 2009).

En algunos tipos de tumores, una alta expresión de ABCG2 parece tener un mayor valor pronóstico, en leucemia y cáncer de pulmón, y se ha relacionado con una mayor resistencia al tratamiento (Kim et al., 2009; Natarajan et al., 2012).

LA PROTEÍNA CD44

La proteína CD44 es una glicoproteína de membrana celular caracterizada por ser el principal receptor de ácido hialurónico a nivel de superficie celular.

La proteína es codificada en un único gen, que contiene 20 exones de los cuales, los 10 exones centrales pueden sufrir splicing alternativo, mientras que la isoforma CD44 estándar no presenta ninguno de estos 10 exones variables. Teóricamente podrían existir numerosas isoformas de la proteína CD44 aunque parece ser que no todas se expresan. La variabilidad estructural de CD44 se ve aumentada debido a las modificaciones post-traduccionales.

La proteína CD44 puede dividirse en cuatro partes, el dominio N-terminal, región extracelular próxima a la membrana plasmática, la región transmembrana y dominio C-terminal. El dominio N-terminal es la parte extracelular por la que la proteína puede unirse al ácido hialurónico. La región extracelular más próxima a la membrana plasmática es la zona de exones variables. El dominio C-terminal es la región intracelular por la cual CD44 puede establecer interacciones con otras proteínas citoplasmáticas (Ponta et al., 2003).

Las funciones de CD44 son muy variadas debido a que la proteína puede establecer diversas interacciones con diferentes moléculas: ácido hialurónico, colágeno, fibronectina o fibrinógeno entre otras. Además, CD44 es capaz de establecer interacciones con otras proteínas de membrana y del citoesqueleto. Las principales funciones de CD44 son la participación en las interacciones célula-célula, crecimiento, adhesión, diferenciación y motilidad celular (Ponta et al., 2003). Otra de las funciones de CD44 es la participación en los procesos tumorales.

La involucración de CD44 en los procesos tumorales ha sido descrita en numerosas ocasiones (Marhaba and Zoller, 2004; Naor et al., 2002). La proteína CD44 ha sido relacionada con la formación de metástasis y un mayor crecimiento tumoral. Un estudio demostró que en dos líneas celulares de melanoma humano pertenecientes a un mismo paciente, la línea derivada de un nódulo metastásico expresaba CD44, mientras que la línea derivada del tumor primario no expresaba la proteína. Se observó que la línea celular CD44⁺ presentaba una mayor capacidad de crecimiento tumoral y de formación de metástasis que la línea CD44⁻ (Guo et al., 1994).

CD44 también ha sido descrito como marcador de célula madre tumoral en tumores colorrectales debido a que una única célula de un carcinoma colorrectal CD44⁺ es capaz de formar una esfera en cultivo *in vitro* con características de célula madre, y además es capaz de generar un tumor xenograft *in vivo* con las propiedades del tumor de origen (Dalerba et al., 2007; Du et al., 2008). Además, CD44 también ha sido descrito como marcador

de CMT en diferentes tumores como en tumores gástricos(Takaishi et al., 2009).

3.4.5. EVIDENCIA DE CÉLULAS MADRE TUMORALES EN CÁNCER COLORRECTAL

La teoría tradicional de carcinogénesis colorrectal defiende que alguna célula en la mucosa colónica puede acumular mutaciones genéticas y eventualmente originan transformaciones malignas, esta teoría se conoce como la teoría de mutación somática de cáncer. Sin embargo recientemente se está cuestionando esta teoría.

El cáncer de colon, al igual que en leucemia mieloide aguda, cáncer de mama y cerebro, está organizado como una jerarquía en la que una pequeña población de células madre tumorales sustentan el tumor. Dos estudios recientes(O'Brien et al., 2007;Ricci-Vitiani et al., 2007) han demostrado la existencia de células iniciadoras de tumores de cáncer de colon, o células madre tumorales colónicas. En cáncer de colon, igualmente que en cáncer de cerebro y mama, las CMTs pueden ser identificadas y aisladas mediante la utilización de marcadores celulares de superficie. La expresión de diferentes marcadores de célula madre en tumores distintos refleja la heterogeneidad genética de esta enfermedad. En un primer estudio se utilizó la proteína CD133 para la identificación de células iniciadoras de tumores. En este estudio llevado a cabo por O'Brien y colaboradores utilizaron la proteína CD133 para aislar células de siete tumores primarios de colon y de diez metástasis. Las células tumorigénicas se implantaron en la capsula renal de ratones NOD/SCID. Los porcentajes de células CD133⁺ fue de un 3,2-24,5% de la población total de células del tumor, mientras que en tejido sano los porcentajes de células CD133⁺ oscila entre un 0,4-2,1%(O'Brien et al., 2007). En un segundo estudio mediante la utilización del marcador CD133 se identificaron y aislaron células iniciadoras de tumores en cáncer de colon. En este estudio las células se cultivaron *in vitro* como colonias flotantes, o "tumoresferas". Las esferas CD133⁺ generaron una población heterogénea de células CD133⁺ y CD133⁻, de las cuales solo la población CD133⁺ presentaba capacidad tumorigénica. Este estudio demostró la capacidad pluripotente de esta subpoblación(Ricci-Vitiani et al., 2007).

Aunque actualmente se han estudiado mucho las CMTs colónicas, el papel de estas células en la biología de la carcinogénesis de colon no se ha determinado, por lo que un mejor estudio de las células madre colónicas sanas puede ayudarnos y aportarnos más información. La cripta colónica humana sana contiene alrededor de 2000 células y se piensa que solo 19 son células madre. El análisis de las mutaciones de ADN mitocondrial en estas células de la cripta han revelado que las criptas colónicas sanas humanas se expanden mediante mecanismos de fisión (Greaves et al., 2006). La fisión de la cripta se produce por la formación de una fisura en el medio de la base de la cripta que asciende longitudinalmente, dando lugar a dos criptas hijas idénticas. Otro estudio que evidenció la existencia de las células madre colónicas, demostró que el epitelio del colon se renueva aproximadamente cada cinco días, y que las células hijas más diferenciadas migran a la porción superior de la cripta (Boman et al., 2008).

La Teoría Unitaria plantea que todos los tipos celulares dentro de la cripta derivan de una única célula madre (McDonald et al., 2006). En la vida adulta las criptas son monoclonales, es decir, una célula madre funcional por cripta, mientras que en el desarrollo fetal las criptas son policlonales (Radtke and Clevers, 2005).

Las células diferenciadas de la mucosa colónica tienen una vida media corta de días y se encuentran en las porciones superiores de la cripta, mientras que las células madre de la mucosa colónica tienen una vida media mucho más larga y por lo tanto más oportunidades para acumular mutaciones, éstas se encuentran en la base de la cripta, dando lugar al resto de células de la cripta (McDonald et al., 2006).

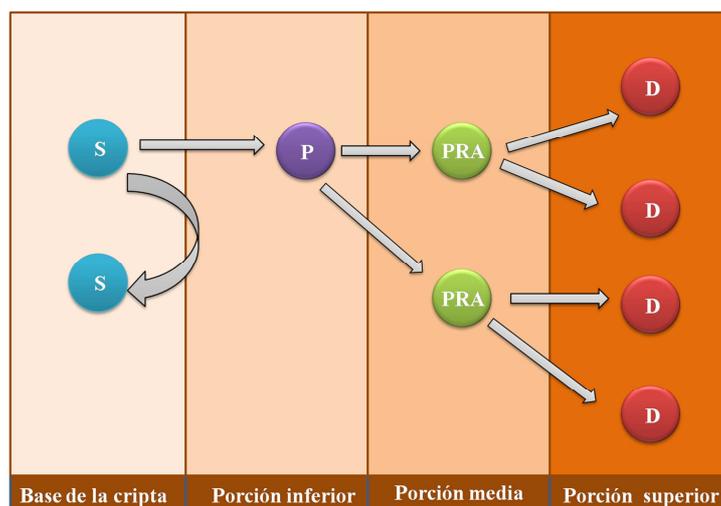


Figura 17: Patrón de división en las criptas colónicas. S, célula madre. P, progenitor. PRA, progenitor de rápida amplificación. D, célula diferenciada. Adaptado (Salama and Platell, 2009).

La teoría de la mutación somática del cáncer plantea que las mutaciones se acumulan en una célula hasta la proliferación celular descontrolada, dando lugar a un tumor (Sonnenschein and Soto, 2008). Actualmente hay un gran interés en la hipótesis de que células madre de un órgano específico pueden ser las responsables del origen del desarrollo de un tumor. Estas células madre se caracterizan por su capacidad de quiescencia y autorrenovación. Las células madre colónicas generan la mucosa del colón, que tiene un increíble ratio de producción y recambio celular. Por tanto, el cáncer puede desarrollarse como el resultado de la alteración de este proceso a través de la acumulación de mutaciones y daños dentro del control de las células madre (Salama and Platell, 2009). En el colon, la carcinogénesis ocurre a través de una serie de cambios moleculares en las células colónicas.

En el colon las células madre adultas residen en la base de la cripta, en un nicho compuesto de miofibroblastos subepiteliales intestinales, aquí las células madre proliferan y dan lugar al conjunto de células que forman las criptas colónicas (figura 18) (Brittan and Wright, 2004; Spradling et al., 2001). Hay una gran evidencia que sugiere que las interacciones celulares con su ambiente es muy importante en el desarrollo del cáncer, por lo tanto es esencial conocer muy bien el nicho de la célula madre, el efecto del ambiente y su papel en el origen de las enfermedades neoplásicas (Bissell and Labarge, 2005). El nicho de la célula madre es el microambiente que rodea a la célula madre y controla su actividad de autorrenovación y generación de tejidos. Su actividad está fuertemente regulada por células adyacentes, la matriz extracelular y factores solubles, de hecho si las células son separadas de su ambiente característico pierden su función y diferenciación. El nicho de las células madre es necesario para una correcta diferenciación de las células madre y para su propiedad de plasticidad. En el colón, como ya se ha explicado anteriormente, las células madre residen en la base de la cripta. Cada cripta esta encajada por miofibroblastos subepiteliales intestinales que forman un sincitio dentro de la lámina propia que se extiende a lo largo del tracto intestinal (figura 18) (McDonald et al., 2006). Existe una evidencia que sugiere que este sincitio controla la proliferación y diferenciación de las células epiteliales, además contribuyen por un lado en la absorción de electrolitos y agua, y por otro lado, en un estado patológico, contribuyen a la fibrosis y neoplasia (Powell et al., 1999). De esta manera, la manipulación del microambiente a través de modificaciones genéticas puede dar lugar al desarrollo del cáncer. El cáncer derivado de la inflamación crónica demuestra el efecto de un ambiente defectivo. Del mismo modo, un microambiente sano puede prevenir el crecimiento tumoral incluso la presencia de células madre con mutaciones oncogénicas (Bissell and Labarge, 2005).

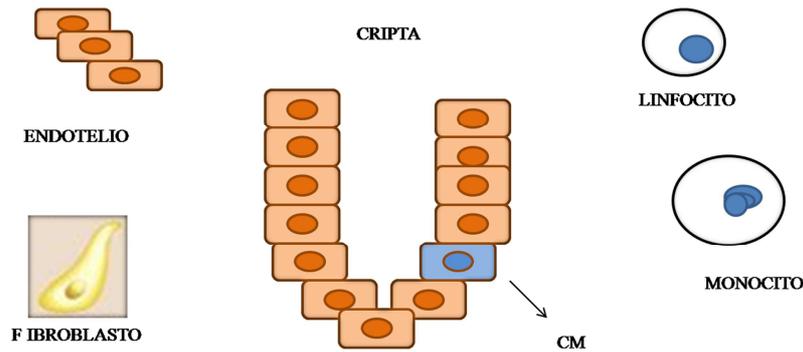


Figura 18: **Modelo de célula madre en el colon.** Cada cripta cuenta con una pequeña cantidad de células madre localizadas en la base de la cripta, influenciadas por su nicho, formado por células endoteliales, fibroblastos y células inmunes, monocitos y linfocitos.

Las similitudes entre la ontogénesis colorrectal y carcinogénesis han llevado a algunos investigadores a creer que las CMT proceden de su célula madre adulta o su remanente fetal. En primer lugar, ambos procesos presentan una morfología y estructura similares, como las glándulas. En segundo lugar, los marcadores de la ontogénesis intestinal aparecen en la carcinogénesis, pero no aparecen en el intestino sano (Citoqueratina 7, β -catenina nuclear). Y en tercer y último lugar, los reguladores de la ontogénesis intestinal se encuentran sobreexpresados en cáncer colorrectal (Sonic Hedgehog, Notch 1-3 y β -catenina nuclear). En resumen, la célula madre colónica sana parece ser el origen del cáncer, sin embargo, esto no ha sido demostrado (Douard et al., 2006; Gostjeva et al., 2006; Neureiter et al., 2006).

CD133 se ha considerado marcador importante en la identificación de una población de células enriquecidas con CMTs colorrectales. Otros marcadores de superficie celular importantes para la identificación de sus poblaciones celulares que contienen una alta densidad de CMTs colorrectal son CD166 y el fenotipo EpCAM HIGH/CD44⁺. CD166 es también un marcador de célula madre mesenquimal y se asocia con un peor pronóstico en cáncer colorrectal (Dalerba et al., 2007). EpCAM y CD44 fueron identificados en primer lugar como marcadores de células madre en cáncer de mama. Es importante saber que estos marcadores de superficie no identifican CMTs, sino que identifican un grupo de células tumorales enriquecidas con células con características similares a las células madre.

Tabla 8: Marcadores propuestos para caracterizar células madre intestinales y utilizados para aislar células madre tumorales colónicas (Ricci-Vitiani et al., 2009).

Célula madre intestinal	<i>Musashi-1</i>	Proteína de unión ARN
	<i>Hes-1</i>	Represor transcripcional
	<i>Receptor EphB</i>	Receptor superficie celular
	<i>Bmi-1</i>	Proteína represora Polycom
	<i>Lgr5</i>	Gen diana WNT
	<i>Aldh-1</i>	Enzima
Célula madre tumoral colónica	CD133	Desconocida
	CD44	Receptor ácido hialurónico
	CD166	Molécula de adhesión
	<i>Aldh-1</i>	Enzima

Como ya ha sido explicado en el apartado 3.2.4 de este trabajo, el cáncer de colon hereditario constituye entre el 5 o 10% de todos los casos de cáncer de colon. Sin embargo, esta enfermedad ha contribuido en gran parte al conocimiento de la patogénesis esporádica de cáncer de colon. La Poliposis Adenomatosa Familiar (PAF) es un síndrome autosómico dominante de cáncer colorectal causado por una mutación en el gen supresor de tumores APC. El fenotipo se caracteriza por la formación de cientos de pólipos en el colon, que sin un tratamiento adecuado darán lugar a un cáncer colorectal. En el proceso de patogénesis de esta enfermedad una mutación germinal en el gen APC tiene como resultado una proteína defectuosa. Esta proteína es parte de un complejo de unión a β -catenina, en su ausencia o degradación de β -catenina por el proteosoma, β -catenina se transloca al núcleo donde activa múltiples factores de transcripción, responsables de la proliferación, diferenciación, migración y apoptosis celular (figura 19) (Fearon and Vogelstein, 1990).

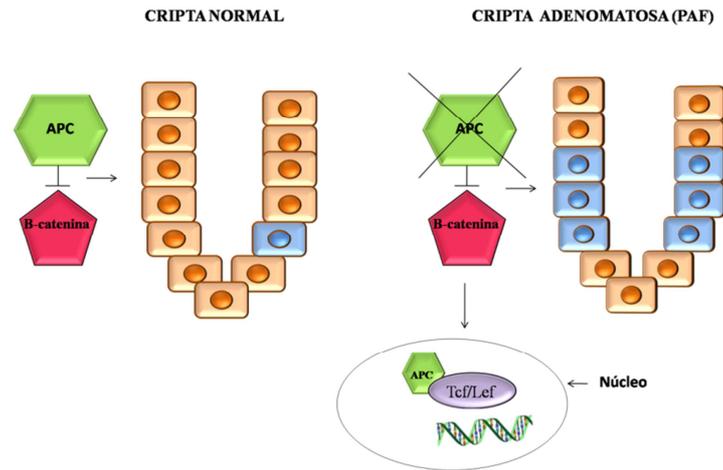


Figura 19: Vía de señalización WNT en una cripta normal y en poliposis adenomatosa familiar (PAF). En PAF el gen APC está mutado por lo que β -catenina se transloca al núcleo activando una multitud de factores de transcripción. Adaptado(Huang and Wicha, 2008).

Además la translocación de β -catenina al núcleo disminuye la expresión de E-cadherina, por lo tanto las uniones célula-célula disminuyen, permitiendo así la migración celular de células del epitelio al mesénquima, este proceso es conocido como la transmisión epitelio mesénquima (TEM)(Brabletz et al., 2005). En células epiteliales la pérdida de la proteína E-cadherina provoca la disminución del contacto celular, permitiendo la motilidad y migración celular. En cáncer colorrectal, la mayor concentración de β -catenina nuclear se encuentra en las células de los márgenes libres de tumor que han perdido la expresión de E-cadherina(Brabletz et al., 2005). La presencia de estas células se ha asociado con metástasis y peor supervivencia(Ueno et al., 2002). Menores niveles de β -catenina se encuentran en adenomas y dentro del tumor(Brabletz et al., 2005). Brabletz propuso que las CMTs colorrectales del margen del tumor llegan a ser células móviles debido a su alta concentración de β -catenina nuclear y su consecuente supresión de moléculas de adhesión(Brabletz et al., 2005). El 50% de los tumores colorrectales están asociados con una mutación en el gen APC, estas mutaciones se han relacionado con los eventos iniciales en la patogénesis en cáncer de colon(Fearon and Vogelstein, 1990). Además, APC y β -catenina son miembros centrales de la vía de señalización WNT, la cual regula la autorrenovación de la célula madre. En la mucosa sana, la vía de señalización Wnt controla la proliferación dentro de la cripta colónica, sin embargo esta vía presenta errores en el cáncer colorrectal(Radtke and Clevers, 2005). En pacientes con PAF no se ha visto un incremento de la fisión de las criptas colónicas. Debido a que la fisión de la cripta es un proceso que involucra la división de la célula madre de la cripta, el aumento de la fisión implica un aumento en el número o actividad de las células madre(Moser et al., 1990).

La existencia de células tumorigénicas y no tumorigénicas en cáncer de colon implica que no todas las células de un tumor son capaces de iniciar y sostener el crecimiento neoplásico. Este concepto tiene importantes implicaciones terapéuticas y podría explicar la observación de que pequeñas cantidades de células tumorales diseminadas pueden ser detectadas en el torrente sanguíneo y nunca desarrollarán una enfermedad metastásica(Reya et al., 2001). El modelo de célula madre tumoral tiene importantes implicaciones en la prevención y terapia del cáncer. Debido a que los tumores pueden originarse en células madre de tejido sano, la eliminación o reducción de estas células madre iniciadoras puede constituir una estrategia de prevención(Al Hajj et al., 2004;Dick, 2003). Puesto que las células madre son las células iniciadoras de tumores y responsables de las recidivas, es necesario un cambio de las terapias antineoplásicas, crear nuevos fármacos específicos de la célula madre tumoral, para ello es imprescindible conocerlas perfectamente para poder identificarlas y eliminarlas sin afectar al resto de células. Su erradicación pasa por el estudio de su capacidad de autorrenovación, gracias a la cual son capaces de autoperpetuarse a la vez que dar lugar a una gran progenie de células que componen los tumores. El tratamiento de las células tumorales circulantes en sangre o procedentes de ascitis, con inhibidores de la autorrenovación de la célula madre permitirá desarrollar posibles protocolos capaces de eliminar las células madre tumorales, evitando así la aparición de recidivas y metástasis de los tumores. La caracterización de las células que modifican su comportamiento tras estos tratamientos, permitirá encontrar nuevos marcadores para identificarlas eficientemente en sangre de pacientes.

3.5 PROTEÍNAS REGULADORAS DE LA AUTORRENOVACIÓN: PEDF

Una proteína que ha sido relacionada con la regulación de la autorrenovación de la célula madre es la proteína PEDF. El gen de *PEDF* (Pigment epithelium-derived factor o factor derivado del epitelio pigmentado) pertenece a la familia de las serpinas inhibidoras de serin-proteasas, sin embargo no posee esa función (Steele et al., 1993). El gen mapea en el cromosoma 17p13.1 y tiene una longitud de 16 kb y 9 exones que generan un solo transcrito de 1200pb (Tombran-Tink et al., 1994). Este gen codifica una glicoproteína de 418 aa de 50 kDa. La proteína contiene una señal hidrofóbica característica de las proteínas secretadas. La estructura cristalina de la proteína revela una distribución de cargas asimétrica. Probablemente, este tipo de estructura podría tener un papel en la función proteica (Simonovic et al., 2001). La proteína posee tres sitios susceptibles de fosforilación en los residuos Ser24, Ser114 y Ser227, un dominio de unión a heparina y un dominio de unión a colágeno (figura 20) (Ek et al., 2006).



Figura 20: Estructura de la proteína PEDF. La proteína posee tres serinas susceptibles de ser fosforiladas (Ser24, Ser 114, Ser227). Adaptado de Moser et al., 1990.

PEDF fue inicialmente aislada en el medio condicionado de células epiteliales de la retina fetal humana (Tombran-Tink et al., 1994). La proteína se expresa en una gran variedad de tejidos incluyendo el cerebro adulto, el plasma, el hígado, los huesos, los ojos, el corazón y los pulmones (Ek et al., 2006). Esta proteína se ha implicado en diferentes procesos celulares. Es la única proteína secretada conocida que estimula la auto-renovación de las células madre, sin afectar a la proliferación del sistema. Esta estimulación se puede inhibir de forma competitiva por el dominio C-terminal de la proteína (figura 21), provocando una disminución del número de células madre presentes en el cultivo (Ramirez-Castillejo et al., 2006).

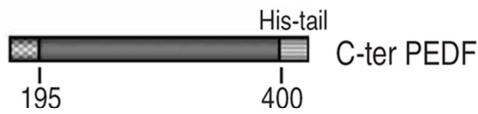


Figura 21: **Figura 8 Proteína PEDF C-terminal.** El extremo C-terminal (aa 195-418) se fusionó con el péptido señal del factor α de *Saccharomyces cerevisiae* y con una cola de histidinas, que facilitaba la purificación de la proteína (Ramírez-Castillejo et al., 2006).

Todavía no se conocen las vías de señalización por las que se induce la autorrenovación de las células madre. Hasta el momento, se han descrito modificaciones post-traduccionales que dan lugar a diferentes efectos de la proteína. Estas modificaciones comprenden la fosforilación de distintos residuos de serina (S24, S114 y S227) por las proteínas CK2 (Casein Kinasa 2) y PKA (Proteín Kinasa A), que le confieren un papel neurotrófico o anti-angiogénico, dependiendo de la combinación de residuos que se fosforilen (Maik-Rachline et al., 2005; Maik-Rachline and Seger, 2006).

PEDF presenta diferentes efectos en la progresión de los tumores, inductores e inhibitorios. Los principales efectos antitumorales de la proteína PEDF aparecen recogidas en la figura 22. Por un lado, la proteína PEDF induce la diferenciación celular y la apoptosis tumoral, mientras que por otro lado, la proteína PEDF, inhibe la proliferación tumoral, la vascularización, la migración celular, la invasión y la metástasis. La proteína PEDF ha sido descrita en numerosos estudios como agente antineoplásico (Becerra and Notario, 2013), en diferentes tipos de tumores como se muestra en la tabla 9.

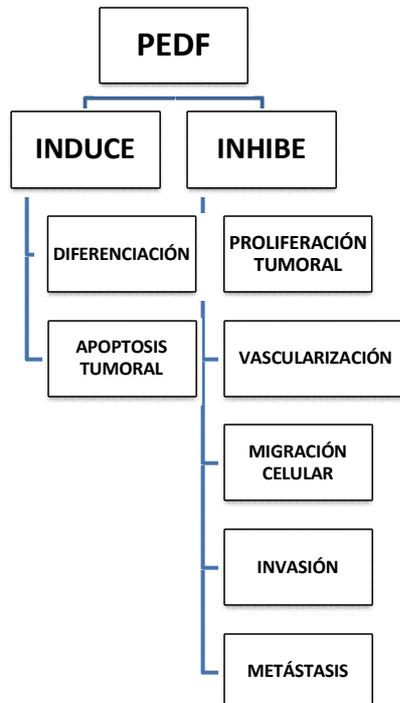


Figura 22: Efectos de PEDF en la progresión tumoral.

Tabla 9: Tumores que responden a PEDF. Adaptado de Becerra et al., 2013.

TUMOR	ACCIÓN DE PEDF
Retinoblastoma	Diferenciación neuronal Antiangeogénesis Disminución de microvasos tumorales Disminución de la expresión de VEGF Retraso en el crecimiento del tumor
Neuroblastoma	Diferenciación a un fenotipo menos maligno Antiangeogénesis
Próstata	Antiangeogénesis Diferenciación neurocrina Inhibición de la proliferación de células tumorales Apoptosis de las células epiteliales tumorales Antimetastásico Incremento de la densidad macrófaga
Melanoma	Antiangeogénesis Disminución de microvasos tumorales Antimetastásico
Nefroblastoma	Antiangeogénesis Apoptosis de células tumorales
Adenocarcinoma pancreático	Antiangeogénesis Apoptosis de células epiteliales tumorales Antimetastásico (para metástasis de hígado) Asociado a pacientes de larga supervivencia Menor adiposidad
Hepatoblastoma	Antiangeogénesis Disminución de la expresión de VEGF
Osteosarcoma	Antiangeogénesis Antimetastásico Inhibición de la invasividad de células tumorales
Condrosarcoma	Inhibición de la invasividad de células tumorales Apoptosis de células tumorales

► INTRODUCCIÓN

TUMOR	ACCIÓN DE PEDF
Carcinoma cervical humano	Disminución de microvasos tumorales Disminución de la expresión de VEGF Inhibición de la proliferación celular endotelial Inducción de la apoptosis de células endoteliales
Carcinoma gástrico	Antiangeogénesis Baja regulación de HIF1a y VEGF
Carcinoma nasofaríngeo	Antiangeogénesis Disminución de la expresión de VEGF
Carcinoma pulmonar de Lewis	Reducción del crecimiento tumoral Antimetastásico Asociado a ratones de larga supervivencia Disminución de microvasos tumorales Apoptosis de células tumorales
Carcinoma Colorrectal- peritoneal	Inhibición del crecimiento tumoral Antiangeogénesis Disminución de microvasos tumorales Apoptosis de células tumorales Inhibición de metástasis
Glioma	Disminución del crecimiento tumoral Muerte de células tumorales Apoptosis de células tumorales Inhibición de la invasividad de células tumorales Antiangeogénesis
Melanoma intraocular	Disminución del tamaño del tumor primario Antimetastásico (para metástasis de hígado) Reducción de la proliferación, migración e invasión Proapoptótico
Xenograft de cáncer mamario	Antiangeogénico Antimigratorio
Metástasis cerebrales de tumor primario mamario	Muerte celular Antimetastásico (para metástasis de cerebro) Neurotrófico para neuronas

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El cáncer colorrectal es una de las neoplasias con mayor incidencia y mayor tasa de mortalidad en los países desarrollados. Los tratamientos actuales para el cáncer colorrectal son en muchas ocasiones incapaces de eliminar la población tumoral, debido a una subpoblación celular resistente a los tratamientos convencionales, la población de CMTs. Esta subpoblación no es afectada por los tratamientos y es capaz de formar un tumor. A día de hoy no disponemos de un sistema de detección ni de combate de la población de CMTs. Por ello es prioritario y fundamental encontrar marcadores fiables para localizar la población de células madre tumorales y nuevos fármacos o terapéuticos capaces de eliminar esta población. La detección de pacientes con CMTs nos permitirá además realizar una mejor clasificación de pronóstico y de tratamiento de estos pacientes, ya que en la actualidad, están única y exclusivamente basados en criterios clínicos y anatomopatológicos, que no son capaces de reflejar toda la heterogeneidad de una enfermedad tan compleja.

La presente Tesis Doctoral tiene dos objetivos principales:

1. Búsqueda de un nuevo método de detección de poblaciones de CMTs en sangre periférica de pacientes con carcinoma colorrectal relacionado con el pronóstico y evolución de la enfermedad.
2. Analizar el efecto del extremo C-terminal de la proteína PEDF en combinación con quimioterapéuticos sobre la población de CMT. Se pretende aumentar la efectividad de los tratamientos inhibiendo la autorrenovación de las células madre.

MATERIAL Y MÉTODOS

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 LÍNEAS CELULARES, MUESTRAS DE PACIENTES Y ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Para la ejecución de los objetivos del presente trabajo hemos empleado por un lado cultivos de líneas celulares y cultivos primarios, y por otro lado, se han utilizado animales de experimentación.

5.1.1. LÍNEAS CELULARES

Las líneas celulares derivadas de cáncer colorrectal han proporcionado una herramienta muy útil para el estudio de genes reguladores de la diferenciación intestinal y su implicación en el cáncer, en gran parte debido a la dificultad de obtener cultivos primarios a partir de células epiteliales normales de intestino. En particular, algunas líneas celulares colorrectales tienen conservadas partes del programa de diferenciación epitelial del intestino, expresando muchos de los genes característicos de las células del epitelio colónico diferenciado (por ejemplo de células absortivas o mucosecretoras), y manteniendo la capacidad de formar monocapas de células polarizadas una vez que han alcanzado la confluencia en cultivos in vitro. Por otra parte, muchas de estas líneas celulares presentan mutaciones genéticas, así como inestabilidad cromosómica y de microsatélites, similar a lo que ocurre en tumores colorrectales, lo cual es muy interesante a la hora de estudiar la conservación o pérdida de mecanismos de diferenciación celular durante la progresión tumoral. En consecuencia, estas líneas celulares son muy útiles como modelos de diferenciación celular, normal y tumoral. Las líneas celulares de cáncer colorrectal empleadas en este estudio han sido:

- **DLD-1:** Se trata de una línea celular de adenocarcinoma de colon humano de estadio C de dukes. Línea tumoral fue aislada de un paciente de 50 años de edad. Se caracteriza por la producción de CEA (Antígeno Carcinoembrionario) y gran capacidad tumorigénica. Presenta una mutación en p53, y además es positiva para la expresión de los siguientes oncogenes: myc +; myb +; ras +; fos +; sis +; p53 +; mientras que la expresión fue negativa para los oncogenes abl -, ros - y src -.
- **HT-29:** La línea celular HT-29 fue establecida en 1975 y deriva de células de adenocarcinoma de colon humano (Fogh J, 1975). A nivel morfológico, los cultivos de esta línea celular son heterogéneos y contienen subpoblaciones de células con diversa capacidad de

diferenciación. Así pues, en condiciones estándar de cultivo, la población HT-29 contiene más de un 95% de células morfológicamente indiferenciadas. Durante el crecimiento hacia la postconfluencia, las células se van apilando y no se polarizan, formando multicapas, y no expresan marcadores de diferenciación característicos de células del epitelio intestinal adultas. Sin embargo, el 5-10% restante de la población total desarrolla características diferenciadas. Estas células expresan enzimas como la aminopeptidasa N (APN), dipeptidilpeptidasa IV (DPPIV), Antígeno Carcinoembrionario (CEA), la glicoproteína de membrana MUC1, así como otras mucinas. A nivel genético, las células HT-29 presentan alteraciones típicas de tumores colorrectales, como son mutaciones en APC y Tp53 con la consiguiente pérdida de sus funciones.

- **SW-480:** Se trata de una línea celular de adenocarcinoma de colon humano. En base a su morfología, se trata de células epiteliales muy utilizadas en cultivos in vitro como modelo de cáncer colorrectal para el estudio de marcadores tumorales, producción de CEA (Antígeno carcinoembrionario), bioquímica de tumorigenicidad, farmacodinámica, sensibilidad hormonal y como un control positivos de proteína nuclear β -catenina.
- **SW-620:** Línea tumoral fue aislada de un paciente de 51 años de edad, de carcinoma de colon metastásico. Esta línea derivó del mismo tumor primario que la línea celular SW-480. Se caracteriza por la producción de CEA (Antígeno Carcinoembrionario) y gran capacidad tumorigénica. Presenta una mutación en p53, y además es positiva para la expresión de los siguientes oncogenes: K-ras, H-ras, N-ras, Myb, sis y fos.

Tabla 10. Características de las líneas celulares incluidas en el estudio. Se muestra el nombre de la línea, y datos del paciente de origen: tipo de tumor, grado de diferenciación del tumor y, por último género y edad.

LÍNEA CELULAR	DATOS DEL PACIENTE DE ORIGEN			
	TIPO DE TUMOR	DIFERENCIACIÓN	GÉNERO	EDAD
DLD-1	Primario	Medianamente diferenciado	Hombre	50
HT-29	Primario	Medianamente diferenciado	Mujer	44
SW-480	Primario	Medianamente diferenciado	Hombre	50
SW-620	Metástasis	Pobrementemente diferenciado	Hombre	51

5.1.2. MUESTRAS DE PACIENTES

Obtuvimos muestras de pacientes con las que realizamos cultivos primarios de sangre periférica. Las muestras de sangre periférica fueron voluntariamente donadas por pacientes del Servicio de Oncología y del Banco de Sangre del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete (CHUA). Los donantes fueron previamente informados mediante consentimiento escrito e informado (aprobado por el comité ético del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete).

Las muestras de sangre provienen de pacientes con neoplasia, formando el grupo de muestras de estudio, así como de donantes sanos sin evidencia de neoplasia, formando el grupo de controles.

– CRITERIOS DE INCLUSIÓN DE PACIENTES

- Pacientes mayores de 18 años con cáncer de colon o recto.
- Firma del consentimiento informado de acuerdo con el protocolo del estudio autorizado por el Comité de Ética local.
- Disponibilidad para la recogida de muestras de sangre y seguimiento.
- No presencia de cualquier otra neoplasia diferente.

En total obtuvimos 258 muestras de sangre periférica de 56 pacientes y 51 muestras de controles. Las muestras controles pertenece a personas sanas que no han sufrido ninguna neoplasia, se trata de personas donantes de sangre.

► MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 11. Características patológicas de los pacientes incluidos en el estudio. Se muestra la localización y estadio de tumor, tipo de metástasis al diagnóstico, tiempo de la primera, segunda recaída y supervivencia, estado actual, resistencia a oxaliplatino y por último edad y género.

PACIENTE	LOCALIZACIÓN	ESTADÍO AL DIAGNÓSTICO	METÁSTASIS AL DIAGNÓSTICO	1ª RECAÍDA	2ª RECAÍDA	SUPERVIVENCIA	ESTADO ACTUAL	RESISTENCIA A OXALIPLATINO	EDAD	GÉNERO
21	Recto-sigma	IV	Suprarrenal	17 meses	No	99 meses	LE	No	51	Mujer
55	Recto	III	No	No	No	68 meses	LE	No	69	Hombre
56	Recto	III	No	No	No	12 meses	Exitus	No	66	Hombre
57	Recto	III	No	No	No	46 meses	Exitus	No	78	Mujer
58	Recto	II	No	43 meses	No	68 meses	LE	No	59	Hombre
62	Recto-sigma	III	No	16 meses	22 meses	74 meses	Exitus	Si	53	Hombre
63	Recto	IV	No	32 meses	15 meses	72 meses	Exitus	No	48	Hombre
65	Sigma	II	No	32 meses	14 meses	88 meses	Exitus	Si	74	Mujer
77	Colon	IV	Hepáticas y ganglionares	8 meses	6 meses	21 meses	Exitus	Si	75	Hombre
78	Sigma	III	No	No	No	68 meses	LE	No	59	Hombre
81	Recto	III	No	No	No	61	LE	No	68	Hombre
82	colon	IV	Hepáticas y óseas	No	No	9 meses	Exitus	No	45	Hombre
83	Colon	IV	Hepáticas y pulmonares	40 meses	No	79 meses	EE	No	77	Mujer
94	Sigma	IV	Epiplon	10 meses	11 meses	37 meses	Exitus	Si	85	Hombre
95	Colon-recto	III	No	19 meses	8 meses	49 meses	Exitus	Si	65	Hombre
96	Sigma	III	No	51 meses	No	81 meses	Exitus	No	60	Hombre
110	Colon-recto	III	No	24 meses	41 meses	90 meses	Exitus	No	54	Hombre
119	Recto	III	No	11 meses	No	14 meses	Exitus	No	73	Hombre
120	Recto-sigma	III	No	No	No	61 meses	LE	No	66	Hombre
123	C. descendente	IV	Hepáticas	22 meses	10 meses	50 meses	Exitus	No	61	Hombre
124	Colon transverso	IV	Peritoneal	10 meses	No	18 meses	Exitus	Si	42	Hombre
129	Recto	II	No	13 meses	11 meses	97 meses	Exitus	No	62	Mujer
135	Recto	III	No	No	No	64 meses	LE	No	45	Hombre
149	Sigma	III	No	No	No	99 meses	LE	No	70	Hombre
158	C. ascendente	IV	Hepáticas	31 meses	8 meses	68 meses	Progresión	No	60	Hombre
159	C. transverso	IV	Pulmonar, hepática y ganglionar	8 meses	3 meses	13 meses	Exitus	Si	69	Mujer
162	C. ascendente	III	No	7 meses	14 meses	18 meses	Exitus	Si	69	Hombre
164	Sigma	II	No	10 meses	2 meses	19 meses	Exitus	No	60	Hombre
165	Recto	III	No	No	No	65 meses	LE	No	69	Hombre
169	Recto	II	No	16 meses	22 meses	60 meses	Exitus	Si	71	Hombre
171	Recto	III	No	5 años	43 meses	141 meses	Exitus	No	72	Hombre
173	Recto	III	Pulmonares	11 meses	8 meses	19 meses	Exitus	No	74	Mujer
177	Ciego	III	No	No	No	61 meses	LE	No	73	Mujer
193	Recto	IV	Hepáticas	12 meses	4 meses	24 meses	Exitus	Si	53	Mujer
196	Recto	IV	Hepáticas y suprarrenales	31 meses	No	55 meses	EE	No	55	Hombre
197	C. descendente	IV	Hepáticas y pulmonares	8 meses	2 meses	16 meses	Exitus	No	77	Hombre
199	C. ascendente	IV	Peritoneal	27 meses	No	49 meses	Exitus	No	71	Hombre
209	Sigma	IV	Ósea	4 meses	2 meses	10 meses	Exitus	Si	48	Hombre
217	Colon	IV	Hepática	11 meses	No	16 meses	Exitus	No	58	Mujer
220	Recto	IIIC	No	No	No	52 meses	LE	No	55	Mujer
232	Sigma	III	No	No	No	49 meses	LE	No	60	Hombre
233	C. descendente	IV	Hepáticas	14 meses	25 meses	49 meses	EE	No	50	Hombre
237	Sigma	IV	Hepáticas	15 meses	No	18 meses	Exitus	No	59	Hombre
241	Recto-sigma	III	No	18 meses	19 meses	81 meses	PL	Si	76	Hombre
244	Ciego	IV	Pulmonares	13 meses	9 meses	44 meses	CP	No	79	Hombre
247	Recto	IV	Pulmonares	13 meses	15 meses	45 meses	Progresión	No	67	Mujer
248	Recto	III	No	No	No	48 meses	LE	No	47	Mujer
258	Sigma	IV	Peritoneal y ganglionar	17 meses	9 meses	42 meses	Exitus	No	72	Mujer
266	C. descendente	IV	Hepáticas y pulmonares	No	No	2 meses	Exitus	No	77	Mujer
280	Recto	IIIB	No	5 meses	4 meses	25 meses	Exitus	No	70	Hombre
281	Ciego	IV	Hepáticas y peritoneales	10 meses	4 meses	35 meses	CP	Si	63	Hombre
283	Ángulo esplénico	IV	Hepáticas y ganglionares	6 meses	No	10 meses	Exitus	Si	45	Mujer
284	Recto	IV	Pulmonares	2 meses	6 meses	15 meses	Exitus	Si	45	Mujer
286	Ángulo esplénico	IIIB	No	22 meses	13 meses	40 meses	Exitus	Si	43	Mujer
287	Ángulo esplénico	IV	Ovárica y peritoneal	12 meses	22 meses	43 meses	CP	No	43	Mujer
288	Sigma	IV	Ovárica, uterina, cervix, peritoneal y hepáticas	13 meses	2 meses	14 meses	Exitus	si	56	Mujer

5.1.3. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Todos los animales utilizados en este estudio fueron mantenidos bajo condiciones libres de patógenos en el animalario de la Facultad de Medicina de Albacete de la UCLM, bajo la normativa vigente. Para la realización de este trabajo utilizamos ratones inmunodeprimidos, ratones atímicos FOXⁿ1nu, de los laboratorios Charles River International, Inc. Estos ratones presentan una mutación que origina un fenotipo inmunodeficiente, mutación nude (nu), que origina la ausencia de pelo y del timo. Estos ratones no presentan rechazo de injerto, por lo que resultan de gran utilidad en los trasplantes de tumores, incluso para trasplante de tumores humanos.

5.2 RECOGIDA DE DATOS, INSTRUMENTACIÓN Y METODOLOGÍA

5.2.1. AISLAMIENTO DE LA FRACCIÓN DE CÉLULAS NUCLEADAS EN SANGRE PERIFÉRICA

La fracción de células nucleadas de sangre periférica fue aislada mediante gradiente de densidad con ficoll (Ficoll-Paque PLUS, GE Healthcare Life Sciences). En la separación se aprovecha la diferencia de densidad entre las células nucleadas y los eritrocitos, que aumenta al mezclarse con el ficoll, debido a la presión osmótica de éste. Además, el ficoll aumenta la agregación eritrocitaria, provocando una sedimentación de los eritrocitos. Para ello, la sangre periférica fue diluida en tampón fosfato salino (PBS, Phosphate Buffer Saline, Lonza Walkersville, Inc) a pH 7.4 y molaridad 1M en dilución 1:1. La sangre diluida se vertió sobre Ficoll, en volumen 1:1, y se centrifugó a 300 G durante 25 minutos. La fracción intermedia fue separada y lavada con tampón fosfato y se centrifugó a 300G durante 7 minutos. Posteriormente se realizaron dos lavados hasta obtener la fase celular nucleada libre de plaquetas.

5.2.2. CULTIVOS CELULARES

Para la realización de este estudio se han realizado por un lado cultivos primarios y, por otro lado, cultivos de líneas celulares.

- **Cultivos primarios:** Los cultivos primarios se cultivaron en medio de Dubelco modificado (DMEM-F12, Lonza Waldersville, Inc) con L-glutamina 200nM (Lonza Waldersville, Inc) y antibióticos al 1% – penicilina y estreptomycin- (Biowhittaker), suplementados con EGF al 0.5% y FGF al 0.04%, en atmósfera al 5% de CO₂ y a 37°C.
- **Cultivos de líneas celulares:** Los cultivos celulares se hicieron de las líneas celulares de cáncer de colon DLD-1, HT-29, SW-480 y la línea SW-620. Las células se cultivaron en medio de Dubelco modificado (DMEM-F12, Lonza Waldersville, Inc) con 10% de suero bovino fetal (FBS, Lonza Waldersville, Inc), L-glutamina 200nM (Lonza Waldersville, Inc) y antibióticos al 1% –penicilina y estreptomycin- (Biowhittaker) en una atmósfera al 5% CO₂ y a 37°C.

5.2.3. OBTENCIÓN DE MEDIOS CONDICIONADOS CON EL EXTREMO C-TERMINAL DE LA PROTEÍNA PEDF

Para la obtención de medios condicionados con el dominio C-terminal de la proteína PEDF se transfretaron células HEK-293t con fosfato cálcico (Solución A: dH₂O, CaCl₂ 2M; Solución B: HN pH 7.1, PO₄) empleando 15µg de ADN plasmídico. La transfección fue monitorizada mediante el seguimiento de otra transfección paralela con un ADN plasmídico-GFP. Las células transfectadas permanecieron en cultivo entre 3 y 5 días a 30°C.

5.2.4. WESTERN BLOT

La presencia y cuantificación de la proteína recombinante presente en el medio de cultivo se realizó mediante western blot. Para ello las muestras de los medios condicionados obtenidas fueron cargadas y migradas en geles al 10% de SDS-PAGE. A continuación, las muestras fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa y bloqueadas con leche. Posteriormente, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario anti-c-myc (Mouse monoclonal IgG1, Santa Cruz) a una dilución 1:500 toda la noche a 4°C. La mañana siguiente, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con HKP (Goat anti-mouse IgG-HKP, Santa

Cruz). Las membranas fueron reveladas mediante el kit Inmobilon Western (Millipore) y visualizadas mediante análisis digital en un equipo LAS 4000 (Fujifilm).

Para la cuantificación de las proteínas se utilizó una curva patrón con la referencia comercial de la proteína PEDF a 100ng/ml (Bio Vendor R&D), con distintos valores de proteína: 75, 150, 300 y 600ng de proteína. Los medios condicionados fueron cargados para su cuantificación (15 y 30µl), mediante interpolación matemática.

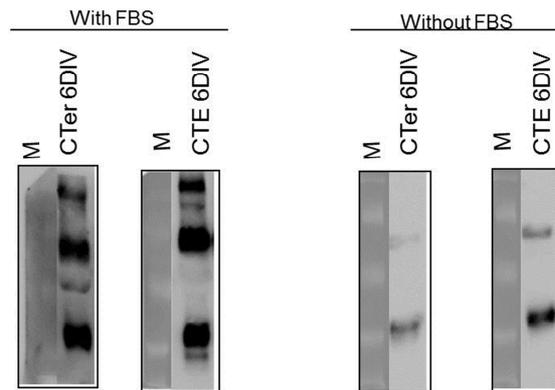


Figura 23: Resultado obtenido de un western blot donde se observa el extremo carboxilo (CTer) de la proteína PEDF y la proteína mutante del extremo carboxilo de PEDF (CTE). Para ello se ha utilizado como control un anticuerpo Anti-Myc, con el que se demuestra que la proteína está presente. El tiempo de exposición de revelado del anticuerpo Anti-Myc fue de 20 segundos con FBS y 60 segundos sin FBS. La cantidad de muestra cargada en el western fue de 30 µL.

5.2.5. TRATAMIENTOS CON PÉPTIDOS DERIVADOS DE LA PROTEÍNA PEDF

Las líneas celulares fueron tratadas con el extremo carboxílico de PEDF, C-ter y la proteína mutante CTE, obtenidas de medios condicionados de transfecciones en células 293T. La proteína inhibitorias, C-ter y CTE se añadieron hasta una concentración final de 200ng/mL en el medio de cultivo. Los tratamientos fueron de dos tipos:

- **Agudos:** Se realizó un único tratamiento.
- **Crónicos:** Se realizaron hasta un total de seis tratamientos consecutivos con cada pase celular realizado.

5.2.6. CITOMETRÍA DE FLUJO Y SORTING

La inmunofenotipificación celular se basa en la reacción antígeno-anticuerpo, donde el anticuerpo está marcado con un fluoróforo que posteriormente se excita y detecta mediante un equipo de citometría de flujo, en nuestro caso utilizamos un equipo MacsQuant. La separación celular requiere un equipo de citometría-sorter (In-flux™, Citopeia) que, mediante la aplicación de un campo magnético, es capaz de separar una célula del resto.

Para la preparación de las muestras, las células se centrifugaron y el botón celular se diluyó en un tampón suplementado con 0,5% de suero de albumina fetal (BSA, Sigma Aldrich Co) y ácido etilendiaminotetracético (EDTA) a 2mM, y cuyo pH final es 7.5. Este tampón permite bloquear las uniones inespecíficas del anticuerpo y mantener las células disgregadas, para facilitar la unión específica de los anticuerpos. Las muestras se incubaron con anticuerpos específicos para los receptores de las regiones constantes de las inmunoglobulinas, evitando falsos positivos (FcR blocking Reagent human, Milteny Biotec). Seguidamente, las células se incubaron con los anticuerpos de estudio durante el tiempo recomendado por la casa comercial, en oscuridad y a 4°C. Tras esta incubación, las muestras se lavaron con PBS para eliminar el exceso de anticuerpo no unido a su antígeno, se resuspendieron en tampón fosfato suplementado con BSA-EDTA y se tiñeron con el colorante nuclear DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) a una concentración de 10 µg/ml. El DAPI detecta células cuya membrana celular está dañada. El análisis citométrico y separación de las muestras se realizó mediante citometría-sorter (In-flux, Citopeia). El posterior análisis informático se realizó mediante el paquete informático MACSQuantify.

Tabla 12. Anticuerpos utilizados para el estudio de la inmunofenotipificación.

ANTICUERPO	CLON	CASA COMERCIAL	DILUCIÓN	TIEMPO DE INCUBACIÓN	λ ABSORCIÓN-EMISIÓN
Anti-BCRP1-FITC	5D3	Chemicon	1:10	10 min	409-591
Anti-BCRP1-PE	5D3	Chemicon	1:10	10 min	563-576
Anti-EpCAM-PE	HEA-125	Miltenyic Biotec	1:10	10 min	563-576
Anti-CD133-PE	293C3	Miltenyic Biotec	1:10	10 min	563-576
Anti-CD133-APC	293C3	Miltenyic Biotec	1:10	10 min	650-660
Anti-AC133-PE	AC133	Miltenyic Biotec	1:10	10 min	563-576
Anti-AC133-APC	AC133	Miltenyic Biotec	1:10	10 min	650-660
Anti-CD44-APC	G44-26	BD Biosciences	1:10	10 min	650-660

5.2.7. INYECCIONES EN RATONES INMUNODEPRIMIDOS

Las inyecciones en ratones se realizaron con un volumen final de 200µl de una dilución 1:1 de matrigel (BD MAtrigel™ Basement Membrane Matrix, BD) y células suspendidas en PBS. Para la realización de las inyecciones utilizamos una jeringa de 1ml y una aguja 25G. Las inyecciones fueron todas subcutáneas en ambos flancos del ratón.

A los ratones inyectados les realizamos un seguimiento semanal en el que eran pesados y además se medía el volumen de los tumores mediante un calibre. El volumen de los tumores fue calculado mediante la fórmula:

$$V = 2 \times L_1 \times L_2 \times 0.52$$

Siendo L_1 la longitud mayor y L_2 la longitud menor, ambas en milímetros.

Las inyecciones en ratones las realizamos en dos ensayos diferentes:

- Efecto de los marcadores de estudio en la formación de tumores. Para ello se inyectaron células separadas mediante citometría-sorting.
- Efecto de los péptidos derivados del extremo carboxilo terminal de la proteína PEDF en la formación de tumores. Para ello se inyectaron células tratadas con los péptidos.

5.2.8. ESTUDIO DE LA DIVISIÓN CELULAR MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

Los ensayos de seguimiento de división celular mediante citometría de flujo están basados en la utilización de sondas fluorescentes. Estas sondas quedan atrapadas en el interior celular emitiendo fluorescencia que se segrega a la descendencia celular con las divisiones celulares. El uso de este tipo de sondas es idóneo puesto que, a día de hoy, no se han descrito proteínas de membrana que se asocien con el ciclo lento y por tanto, no se puede localizar esta población por inmunotinción.

El trazador utilizado en este estudio es Cell Trace® Far-Red DDAO-SE (DDAO-SE). Se trata de una sonda fluorescente que atraviesa pasivamente la membrana celular mediante difusión. Una vez en el interior celular, la sonda es procesada de manera que emite fluorescencia y queda atrapada en el interior celular. Este tipo de sondas fluorescentes permiten monitorizar la cinética de división celular, así como la progenie resultante, que también será fluorescente. La fluorescencia original se va perdiendo a medida que las células se dividen. Las células que se dividen más lentamente o que no se dividen poseen fluorescencias mayores que aquellas células que se dividen muy rápidamente, permitiendo distinguir diferentes poblaciones de acuerdo a la longitud de sus ciclos de división celular. Las células madre, al ser células quiescentes que

entran en división en menor grado que su progenie, retienen mayor colorante y por tanto presentan una mayor fluorescencia.

Las células fueron teñidas con el colorante DDAO-SE en dilución 1:10 con PBS suplementado con BSA-EDTA. Se incubaron a 37°C durante 10 minutos. Posteriormente se lavaron con PBS y se centrifugaron a 180G durante 5 minutos. El pellet celular se resuspendió en PBS-BSA-EDTA-DAPI y se analizó la homogeneidad del marcaje mediante citometría de flujo, con un citómetro MAQSCuant (Miltenyic Biotec.). Las células marcadas fueron sembradas y se analizó su fluorescencia los días posteriores.

5.2.9. CURVA DOSIS-RESPUESTA

Las células se sembraron a una densidad de 5.000 células/pocillo en placas multipocillo de 24 pocillos en un volumen de 250µL. Al día siguiente se realizó el tratamiento con quimioterapéuticos hasta conseguir un volumen final de 500µL en cada pocillo. Los fármacos utilizados fueron oxaliplatino e irinotecan.

Realizamos dos tipos de ensayos diferentes:

- Curvas dosis-respuesta con tratamiento quimioterapéutico en combinación aguda con los péptidos derivados del extremo carboxilo de la proteína PEDF. En este caso el día posterior a la siembra se añadía el fármaco y los péptidos CT o CTE a una concentración de 200ng/ml.
- Curvas dosis-respuesta con tratamiento quimioterapéutico en células tratadas de manera crónica con los péptidos CT o CTE a una concentración de 200ng/ml.

Los fármacos utilizados fueron Oxaliplatino e Irinotecan, ambos empleados en la clínica para tratar tumores colorrectales.

La concentración de los fármacos utilizada fue diferente para cada línea.

Tabla 13. Concentraciones de oxaliplatino e irinotecan empleadas en cada línea celular.

Línea celular	Oxaliplatino (ug/ml)	Irinotecan (uM)
DLD-1	0; 1,5; 3; 6; 12; 18 y 24	0; 6; 12; 18 y 24
HT-29	0; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2 y 6,4	0; 2; 4; 8; 16 y 32
SW-480	0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 y 1,6	0; 3; 6; 12; 18 y 24
SW-620	0; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6 y 3,2	0; 6; 12; 18 y 24

En la determinación de la viabilidad celular se utilizó el método Cristal Violeta o violeta de genciana. Esta tinción está basada en la afinidad del colorante por los ácidos nucleicos. Las células se fijaron con glutaraldehído 0,5% (Sigma) durante 10 minutos. A continuación, se tiñeron con cristal violeta (Sigma) al 0,1% durante 20 minutos. Transcurrida la incubación se sumergieron en agua, agitando vigorosamente para eliminar el exceso de colorante. La tinción se solubilizó con ácido acético al 10%, y se midió mediante lectura espectrofotométrica a una longitud de onda de 590 nm.

5.2.10. ANÁLISIS DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

Para el análisis de la validez de nuestra prueba diagnóstica hemos realizado el cálculo de la sensibilidad y la especificidad de la técnica. Además, hemos cuantificado su seguridad mediante el cálculo de los valores predictivos positivos y negativos.

- **Cálculo de la sensibilidad:** Para el cálculo de la sensibilidad calculamos la proporción de pacientes enfermos que obtuvieron un resultado positivo en la prueba diagnóstica:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN}$$

Por lo tanto, podemos decir que la sensibilidad es la probabilidad de clasificar correctamente a un paciente enfermo o dicho en otras palabras, es la capacidad del test para detectar la enfermedad.

- **Cálculo de la especificidad:** Para el cálculo de la especificidad calculamos la proporción de pacientes sanos que obtuvieron un resultado negativo en la prueba diagnóstica:

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN + FP}$$

La especificidad es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo sano, es decir, es la capacidad para detectar a los sanos.

- **Valor predictivo positivo:** puede calcularse como la proporción de pacientes con un resultado positivo en la prueba, que finalmente resultaron estar enfermos:

$$VPP = \frac{VP}{VP + FP}$$

El valor predictivo positivo es la probabilidad de padecer la enfermedad si se obtiene un resultado positivo en el test.

- **Valor predictivo negativo:** puede calcularse como la proporción de pacientes con un resultado negativo en la prueba que finalmente resultaron sanos:

$$VPN = \frac{VN}{FN + VN}$$

El valor predictivo negativo es la probabilidad de que un sujeto con un resultado negativo en la prueba esté realmente sano.

5.2.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó mediante la utilización de diferentes pruebas

- **Regresión estadística:** Para el cálculo del IC50 y del IC0 fue necesario realizar una regresión lineal. Para ello utilizamos el programa informático ED.50Plus v1.0. En algunos casos fue necesaria una transformación logarítmica.
- **Prueba de U de Mann-Whitney:** es una prueba no paramétrica aplicada a dos muestras independientes. Es, de hecho, la versión no paramétrica de la habitual prueba t de Student. Fue propuesto inicialmente en 1945 por Frank Wilcoxon para muestras de igual tamaño y extendido a muestras de tamaño arbitrario como en otros sentidos por Henry B. Mann y D. R. Whitney en 1947. La prueba de Mann-Whitney se usa para comprobar la heterogeneidad de dos muestras ordinales.
- **Prueba de Kolmogórov-Smirnov:** se trata de una prueba no paramétrica utilizada para determinar si una muestra sigue una distribución normal. Consiste en un procedimiento de bondad de ajustes.
- **Prueba Chi cuadrado:** Esta prueba puede utilizarse incluso con datos medibles en una escala nominal. La hipótesis nula de la prueba Chi-cuadrado postula una distribución de probabilidad totalmente especificada como el modelo matemático de la población que ha generado la muestra. Para realizar este contraste se disponen los datos en una tabla de frecuencias. Para cada valor o intervalo de valores se indica la frecuencia absoluta observada o empírica (O_i). A continuación, y suponiendo que la hipótesis nula es cierta, se calculan para cada valor o intervalo de valores la frecuencia absoluta que cabría esperar o frecuencia esperada ($E_i = n \cdot p_i$, donde n es el tamaño de la muestra y p_i la probabilidad del i -ésimo valor o intervalo de valores según la hipótesis

nula). El estadístico de prueba se basa en las diferencias entre la O_i y E_i y se define como:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^k \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}.$$

RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS CMTS EN LÍNEAS CELULARES TUMORALES DE CÁNCER DE COLON Y EFECTO DEL EXTREMO CARBOXILO DE LA PROTEÍNA PEDF SOBRE LA POBLACIÓN DE CMTS.

Debido a la dificultad de encontrar marcadores específicos de la población de las CITs nos planteamos la posibilidad de utilizar una batería de marcadores relacionados con las propiedades básicas atribuidas a las CITs, como son la resistencia a tóxicos, movilidad y autorrenovación. Por ello utilizamos las proteínas BCRP-1, EpCAM, CD133, y su epítipo AC133. Además utilizamos el marcador CD44.

6.1.1. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE CMTS EN LÍNEAS CELULARES

Analizamos, mediante citometría de flujo, los porcentajes de células que expresan los marcadores anteriormente citados en las líneas celulares de estudio, DLD-1, HT-29, SW-480 y SW-620. Observamos que cada línea celular presenta un patrón característico de expresión de los marcadores, incluso en las dos líneas que proceden del mismo paciente, SW-480 (tumor primario) y SW-620 (tumor metastásico) como se observa en la figura 24. El marcador BCRP-1 se detecta en tres de las líneas analizadas, pero en porcentajes que no superan en ningún caso el 0.35%. El porcentaje de expresión de BCRP1 es de $0.33\% \pm 0.18$ para la línea DLD-1, $0.34\% \pm 0.11$ en HT-29, $0.02\% \pm 0.01$ en SW-480 y $0.13\% \pm 0.04$ en SW-620 (figura 24A). El marcador EpCAM es detectado en las cuatro líneas celulares en la mayoría de la población, los porcentajes de células que expresan el marcador EpCAM son: $99.87\% \pm 0.10$, $99.92\% \pm 0.04$, $99.77\% \pm 0.08$ y $99.97\% \pm 0.02$ en las líneas DLD-1, HT-29, SW-480 y SW-620 respectivamente (figura 24A). Los marcadores CD133 y AC133 son más heterogéneos. Por un lado, la línea DLD-1 y SW-480 presentan porcentajes muy bajos de expresión de la proteína CD133 y AC133. La concentración media de células que expresen estos marcadores son, $0.33\% \pm 0.13$ CD133⁺ y $0.31\% \pm 0.08$ AC133⁺ en la línea DLD-1 y $0.20\% \pm 0.06$ CD133⁺ y $0.09\% \pm 0.04$ AC133⁺ en la línea SW-480. Por otro lado, las líneas HT-29 y SW-620 tienen un elevado porcentaje de células que sí los expresan, $94.25\% \pm 0.32$ CD133⁺ y $92.98\% \pm 0.22$ AC133⁺ en la línea HT-29 y $93.65\% \pm 1.21$ CD133⁺ y $92.25\% \pm 1.37$ AC133⁺ en la línea SW-620, (figura 24A). El marcador CD-44 es expresado en la mayoría de las células de las líneas SW-480 ($99.42\% \pm 0.07$), HT-29 ($95.68\% \pm 0.18$) y DLD-1 ($99.74\% \pm 0.02$), mientras que en la línea SW-620 (tumor metastásico) la expresión del marcador CD-44 es notoriamente inferior ($6.76\% \pm 0.28$) (figura 24B). En la

► RESULTADOS

figura 24 se muestra un ejemplo de las citometrías realizadas de los marcadores en las cuatro líneas de estudio y la cuantificación obtenida de al menos cuatro experimentos independientes ($n \geq 4$).

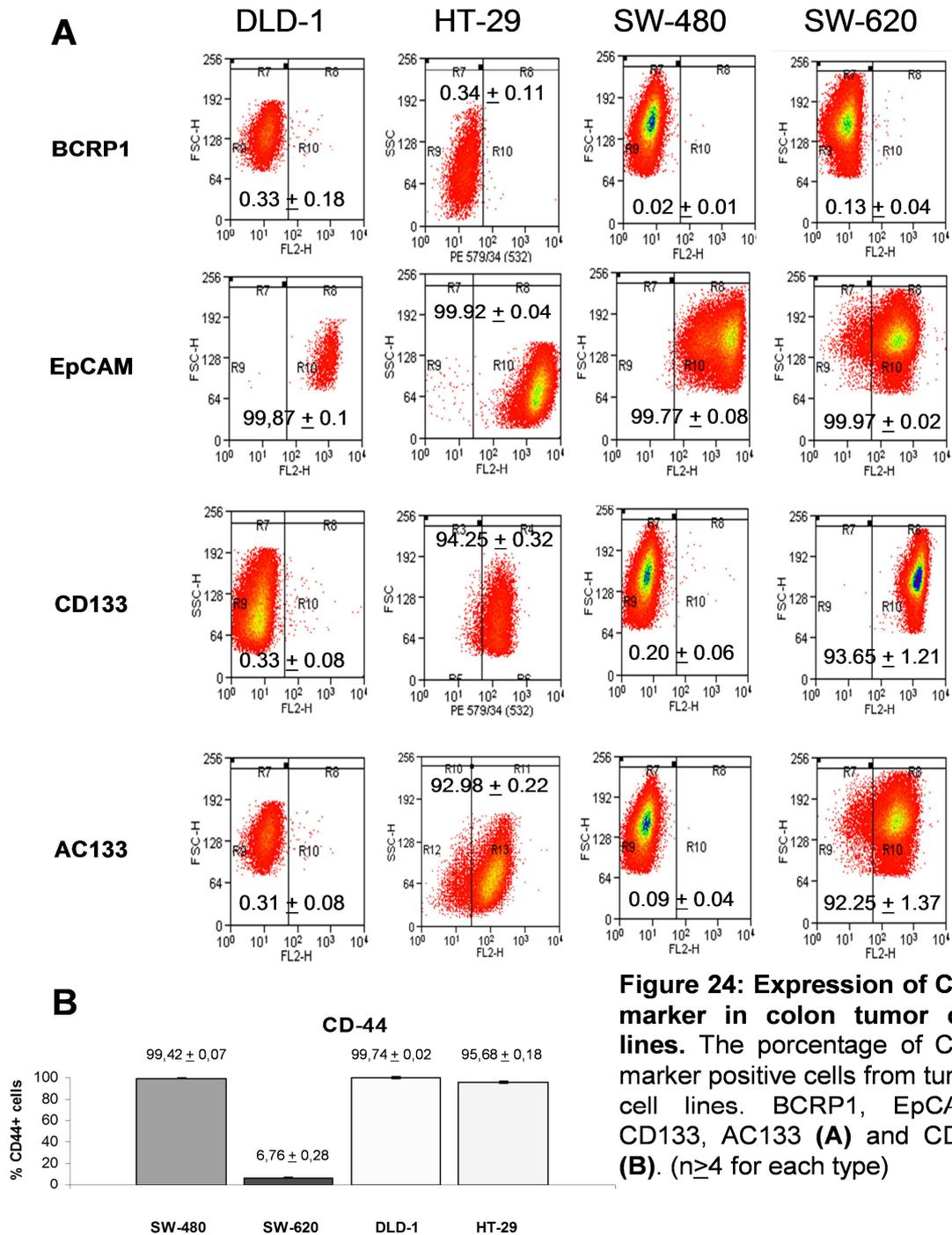


Figure 24: Expression of CSC marker in colon tumor cell lines. The percentage of CSC marker positive cells from tumor cell lines. BCRP1, EpCAM, CD133, AC133 (A) and CD44 (B). ($n \geq 4$ for each type)

Destacar que la línea celular SW-620 presentó patrones diferentes de expresión para las proteínas CD133 y AC133 no representados en la figura 24. En tres de las ocho citometrías realizadas obtuvimos porcentajes muy bajos para dichas proteínas, 0.10% para la proteína CD133 y 0.06% para la proteína AC133.

La siguiente tabla recoge el porcentaje de expresión de los marcadores de estudio en las líneas celulares DLD-1, HT-29, SW-480 y SW-620.

Tabla 14: Porcentaje de marcadores relacionados con CMTs en líneas celulares tumorales de carcinoma de colon. Se muestra la media de células positivas para cada marcador junto con el error estándar.

LÍNEA CELULAR	MARCADOR				
	BCRP1	EPCAM	CD133	AC133	CD44
DLD-1	0,33 ± 0,18	99,87 ± 0,10	0,33 ± 0,13	0,31 ± 0,08	99,74 ± 0,02
HT-29	0,34 ± 0,11	99,92 ± 0,04	94,25 ± 0,32	92,98 ± 0,22	95,68 ± 0,18
SW-480	0,02 ± 0,01	99,77 ± 0,08	0,20 ± 0,06	0,09 ± 0,04	99,42 ± 0,07
SW-620	0,13 ± 0,04	99,97 ± 0,02	93,65 ± 1,21	92,25 ± 1,37	6,76 ± 0,28

Estos marcadores podrían verse modificados por la exposición de estas células a la proteína PEDF, debido a su efecto sobre la autorrenovación, como se ha demostrado tanto en células madre sanas como en CMTs. Para comprobar el efecto del extremo carboxilo de la proteína PEDF (Cter) sobre estos marcadores en las líneas celulares de estudio, diseñamos dos tipos de experimentos. Por un lado pretendemos estudiar el efecto agudo del péptido sobre la expresión de los marcadores y por otro lado, estudiar el efecto crónico del péptido sobre la expresión de los marcadores, ambos mediante citometría de flujo.

6.1.2. EFECTO DEL EXTREMO CARBOXILO TERMINAL DE LA PROTEÍNA PEDF SOBRE MARCADORES DE CMTS

Se ha estudiado el efecto del extremo carboxilo terminal de la proteína PEDF de manera aguda y crónica sobre los niveles de la expresión de los marcadores relacionados con las CMTs: BCRP1, EpCAM, CD133 y AC133 en las líneas celulares DLD-1, HT-29, SW-480 y SW-620. En ambos experimentos la concentración de la proteína fue 200 ng/ml y fue añadida al medio de las placas de cultivo el día cero (0 DIV). En los experimentos realizados de manera aguda, los niveles de expresión de los marcadores fueron analizados mediante citometría de flujo tras 24 horas en cultivo (1 DIV). En el caso de los experimentos crónicos, se suministraron 6 dosis o tratamientos de la proteína

► RESULTADOS

cada dos días, coincidiendo el tratamiento con el pase celular. Los resultados han sido obtenidos de al menos tres experimentos independientes ($n > 3$).

- **Agudos:** medición 24 horas después al tratamiento unidosis. En los tratamientos agudos realizados a las diferentes líneas celulares no observamos diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de los marcadores BCRP1, EpCAM, CD133 y AC133 tras el tratamiento agudo de los fragmentos CTE y CT.
- **Crónicos:** medición 13 DIV después de 6 dosis de tratamiento. Hemos realizado un seguimiento de la modificación de la expresión de los marcadores tras una exposición crónica de las líneas celulares de estudio con dos péptidos derivados de la proteína PEDF, el fragmento CTE y CT (explicado en el apartado de material y métodos). Los tratamientos han consistido en la adicción de 6 dosis de la proteína purificada a los medios de cultivo de las distintas líneas a una concentración de 200ng/ml. Tras los tratamientos, los resultados obtenidos han sido los siguientes: la línea HT-29 muestra un aumento notable del marcador BCRP1 y una marcada disminución de los marcadores CD-133 y AC-133 tras los tratamientos con los péptidos CTE ($n=3$) y CT ($n=3$) (figura 25) mostrando diferencias significativas respecto el grupo control ($n=4$) (test de Mann Whitney). Observamos una disminución en el número de células CD133⁺ desde el $94.2\% \pm 0.3$ en las células controles hasta un $66.8\% \pm 1.0$ y $72.2\% \pm 1.6$ en los tratamientos con CT y CTE respectivamente, con un p-valor de 0.013 para ambos casos. Para las células AC133⁺ observamos un efecto similar, hay una disminución desde el $93.0\% \pm 0.2$ en la muestra control hasta un $69.8\% \pm 2.0$ y un $68.7\% \pm 0.9$ en los tratamientos con CT y CTE respectivamente, con un p-valor de 0.017 en ambos casos (figura25A).

Respecto al marcador BCRP1, observamos un aumento, de diez veces, de la población BCRP1⁺ tras los tratamientos con CT y CTE respecto la población control, desde un $0.3\% \pm 0.1$ de células BCRP1⁺ en los controles hasta un $3.0\% \pm 0.5$ de células BCRP1⁺ en las muestras tratadas de manera crónica con los péptidos CT y CTE, con un p-valor de 0.013 en ambos casos (figura 25B).

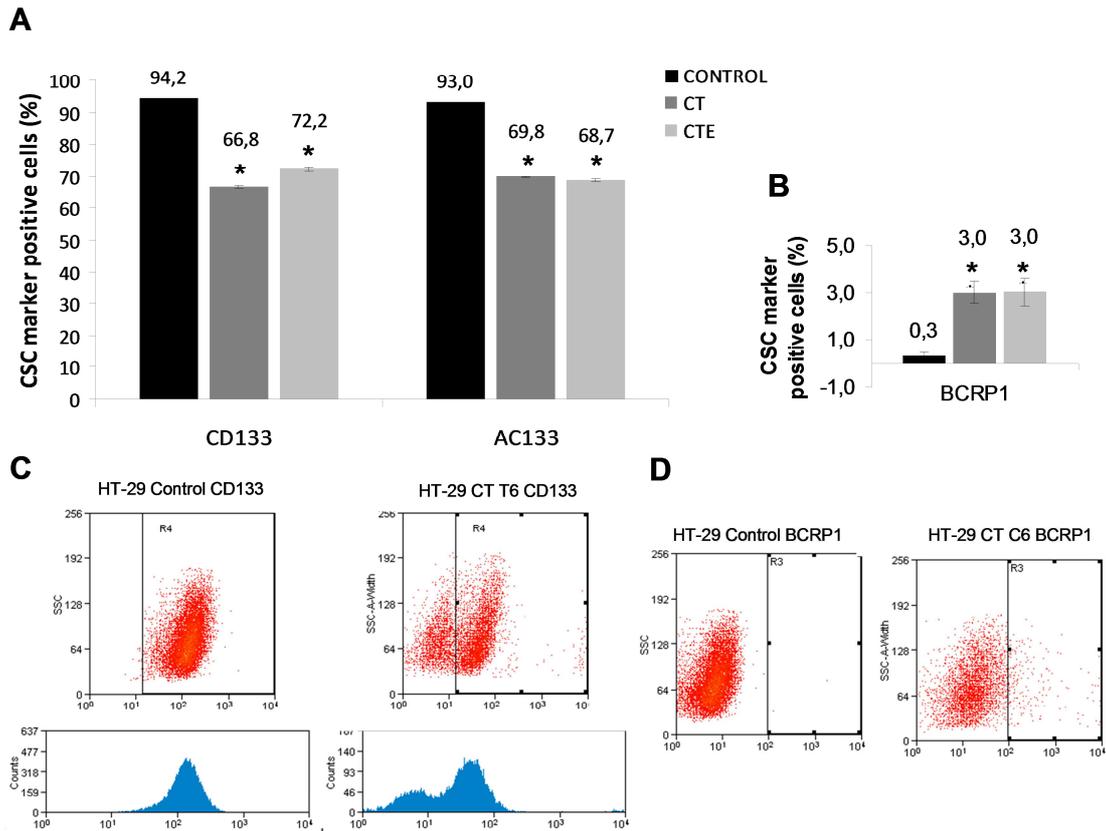


FIGURE 25: CSC marker in HT-29 cell line after CT and CTE PEDF chronic treatment. Histograms show the changes in the percentage of CD133+, AC133+ (**A**) and BCRP1+ (**B**) cells analyzed by flow cytometry. U-Mn test has been used for statistical analysis: * p<0,05. The number of analyzed samples was 4 for controls and 3 for each treatment. **C** shows CD133 density plot and histogram of control and CT T6 HT-29 cells. **D** shows a BCRP1 dot plot of control and CT t6 HT-29 cells.

En la línea DLD-1 observamos diferencias significativas tras el tratamiento con el péptido CTE en el marcador AC-133, presentando una disminución, de seis veces, en la expresión del marcador respecto la línea control desde un 0.31% + 0.08 de células AC133⁺ en el control a 0.05% ± 0.01 ce células AC133⁺ tras el tratamiento crónico con la proteína CTE, con un p-valor de 0.010. En el resto de marcadores no hay diferencias estadísticamente significativas tras los tratamientos con las proteínas CT y CTE (figura 26).

► RESULTADOS

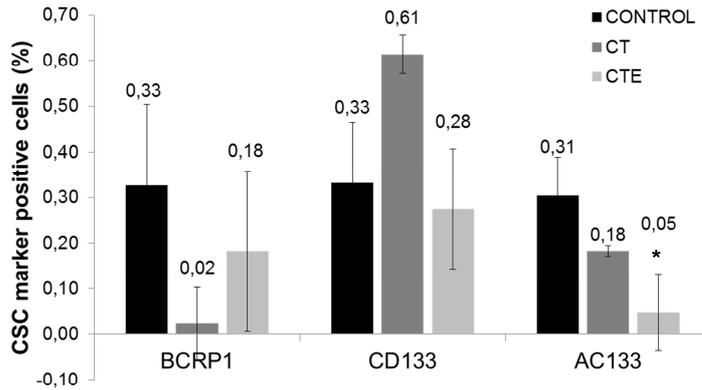


FIGURE 26: CSC marker in DLD-1 cell line after CT and CTE PEDF chronic treatment. Histograms show the changes in the percentage of BCRP1+, CD133+, AC133+ cells analyzed by flow cytometry. U-Mn test has been used for statistical analysis.

En la línea SW-480 no observamos diferencias significativas en los niveles de la expresión de los marcadores de estudio tras los tratamientos crónicos con los péptidos CT y CTE a la concentración de 200 ng/ml utilizada. Las medias obtenidas de los niveles de marcadores son para BCRP1 $0.02\% \pm 0.01$ en el control, $0.03\% \pm 0.02$ en células tratadas con CT y $0.06\% \pm 0.03$ en células tratadas con CTE. Para CD133 los porcentajes obtenidos son $0.20\% \pm 0.01$ en las células control, $0.18\% \pm 0.01$ en las células tratadas con CT y $0.24\% \pm 0.07$ en células tratadas con CTE. Para el marcador AC133 los porcentajes obtenidos son $0.09\% \pm 0.04$ en las células control, $0.12\% \pm 0.06$ en las células tratadas con CT y $0.05\% \pm 0.03$ en células tratadas con CTE, (figura 27).

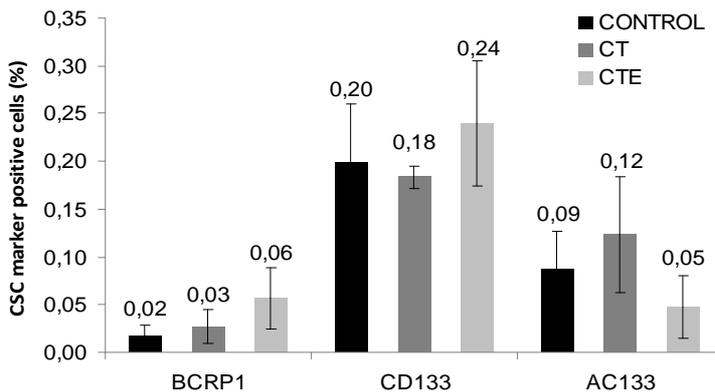


FIGURE 27: CSC marker in SW-480 cell line after CT and CTE PEDF chronic treatment. Histograms show the changes in the percentage of BCRP1+, CD133+, AC133+ cells analyzed by flow cytometry. U-Mn test has been used for statistical analysis.

La línea celular SW-620 no presenta diferencias significativas para el marcador BCRP1 tras los tratamientos crónicos con CT y CTE. Sin embargo, sí observamos un cambio en la expresión de las proteínas de estudio en la propia línea control para los marcadores CD-133 y AC-133. Por un lado hemos obtenidos marcajes muy altos y, por otro lado, marcajes muy bajos en esta línea, para los marcadores CD133 y AC133, como se ha explicado anteriormente. Hay que destacar el hecho de que las células control presentan un mayor número de citometrías con marcajes altos, 5/8, mientras que las células tratadas presentan un menor número de experimentos con marcajes altos, 2/6 para CTE y 2/6 para CT. Debido a estas diferencias hemos analizado los resultados obtenidos de las citometrías de flujo por separado. Por un lado, hemos analizado aquellas citometrías en las que los marcadores CD133 y AC133 aparecen muy elevados. En este primer caso, los experimentos realizados han sido 5 para las muestras control, y 2 para las células tratadas con CT y CTE. No hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en la expresión de los marcadores obteniendo unos porcentajes medios de células CD133⁺ de $93.6\% \pm 1.2$ para las células control, $77.3\% \pm 15$ para las células tratadas con CT y $73.3\% \pm 16$ para las tratadas con CTE. Los porcentajes medios de células AC133⁺ son $92.3\% \pm 1.4$ en las células control, $74.2\% \pm 15.0$ en las células tratadas con CT y un $70.1\% \pm 18.2$ en las células tratadas con CTE (figura 28A).

En el segundo caso, análisis de la expresión de los marcadores CD133 y AC133 cuando aparecen en porcentajes muy bajos (figura 28B), hemos encontrado un aumento significativo de la expresión del marcador CD133 en las células tratadas respecto las células sin tratar. Se trata de un aumento desde el $0.10\% \pm 0.02$ de células CD133⁺ en el control a un $0.22\% \pm 0.03$ en las células tratadas con CT y a un $0.33\% \pm 0.07$ en las células tratadas con CTE, con un p-valor de 0.017 en ambos casos. Para el marcador AC133 no observamos diferencias significativas en su expresión, siendo los porcentajes de células AC133⁺ de $0.06\% \pm 0.03$ en el control, $0.08\% \pm 0.02$ en las tratadas con la proteína CT y $0.10\% \pm 0.04$ en las tratadas con CTE.

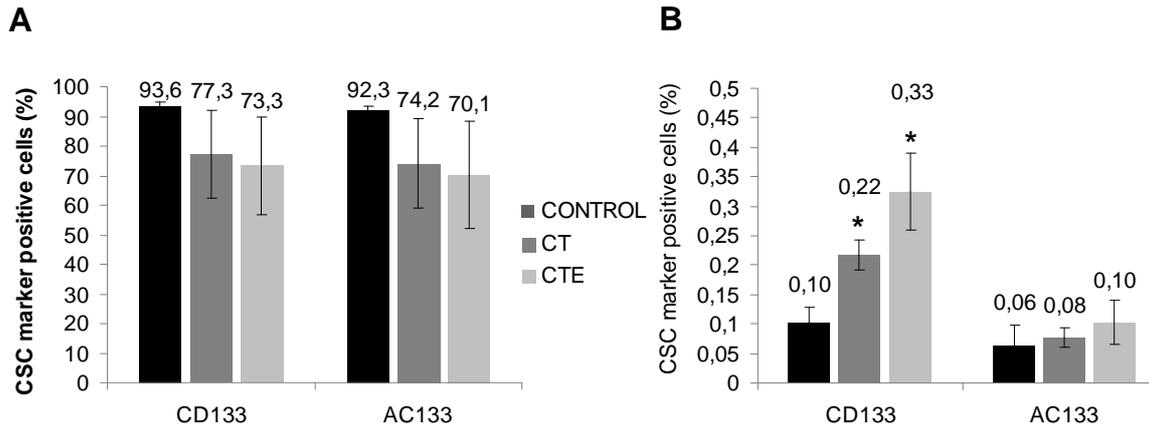


FIGURE 28: CSC marker in SW-620 cell line after CT and CTE PEDF cronic treatment. Histograms show the changes in the percentage of BCRP1⁺, CD133⁺, AC133⁺ cells analyzed by flow cytometry. U-Mn test has been used for statistical analysis: * p<0,05.

6.1.3. ESTUDIO DE LA POBLACIÓN DE CICLO LENTO Y EFECTO DEL EXTREMO CARBOXILO TERMINAL DE LA PROTEÍNA PEDF

Una característica de las células iniciadoras de tumores es que presentan ciclos de división lentos, por ello hemos analizado el efecto de las proteínas CT y CTE en los ciclos de división de las líneas celulares. La técnica utilizada para este análisis es el marcaje de nuestras células con la molécula DDAO (Invitrogen). Se trata de una sonda vital que, entra al interior celular de forma pasiva e inocua para las células, emitiendo fluorescencia. Esta fluorescencia se va segregando a la población hija con las distintas divisiones celulares de manera que aquellas células que se dividen con mayor frecuencia perderán más rápidamente la fluorescencia que aquellas células que presenten ciclos de división celular más lentos. El seguimiento de la fluorescencia se realiza mediante citometría de flujo, el día del marcaje y durante los días sucesivos. Los tratamientos con las proteínas de interés los hemos realizado de nuevo, de dos maneras: tratamientos agudos y crónicos. Los resultados mostrados son la media de al menos tres experimentos independientes (n>3).

- **Agudos:** El tratamiento agudo consiste en sembrar las células marcadas con DDAO con las proteínas CT y CTE a una concentración de 200 ng/ml y observar la tasa de división de cada línea celular. En los tratamientos agudos no hemos obtenido grandes diferencias aunque hemos observado una disminución estadísticamente significativa de células DDAO⁺ a los 4div en la línea SW-620 con la proteína CTE respecto la línea SW-620 control (figura 29). En las líneas HT-29, DLD-1 y SW-480 no apreciamos diferencias estadísticamente significativas en los tratamientos en fase aguda.

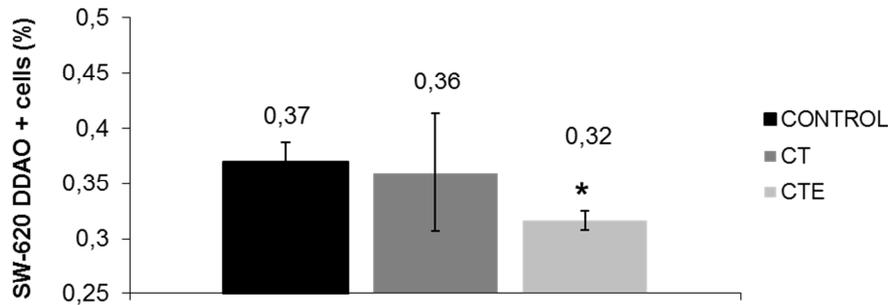
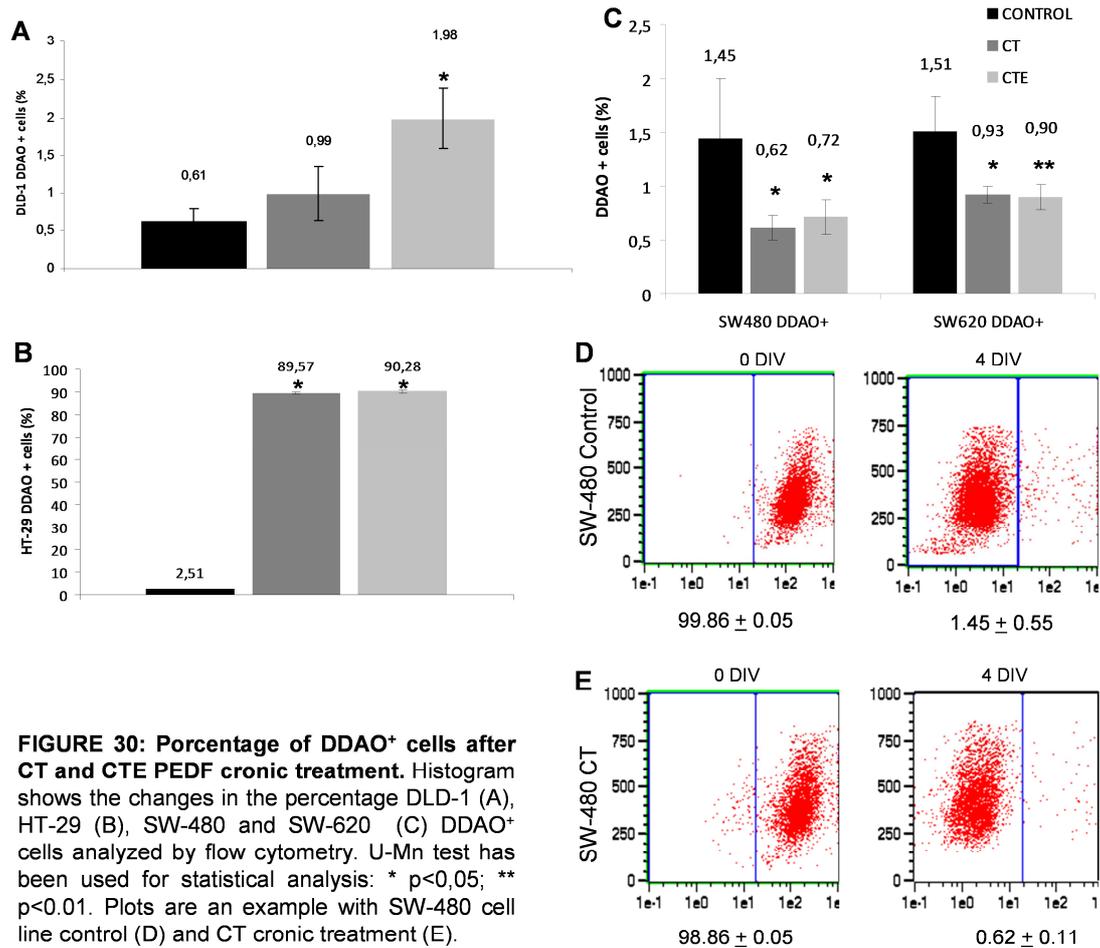


FIGURE 29: Percentage of SW-620 DDAO⁺ cells after CT and CTE PEDF acute treatment. Histogram shows the changes in the percentage SW-620 DDAO⁺ cells analyzed by flow cytometry. U-Mn test has been used for statistical analysis: * p<0,05.

- Crónicos:** El tratamiento crónico consiste en marcar células que han sido tratadas con las proteínas previamente (6 tratamientos a 200 ng/ml) con la sonda DDAO y posteriormente estudiar la intensidad del marcaje mediante citometría de flujo. En las células tratadas de manera crónica hemos observado diferencias significativas en las cuatro líneas de estudio. En la línea DLD-1 observamos un aumento estadísticamente significativo, de más de tres veces, en el porcentaje de células que presentan ciclos de división lentos en las células tratadas crónicamente con la proteína CTE, $1.98\% \pm 0.40$, respecto a las células control, $0.61\% \pm 0.17$, con un p-valor de 0.014 (figura 30A). Para la línea HT-29 también hemos observado un aumento en el porcentaje de células con ciclos de división lentos en células tratadas con CT ($89.57\% \pm 0.57$) y CTE ($90.28\% \pm 0.93$) respecto las células control ($2.51\% \pm 0.36$) con un p-valor de 0.025 en ambos casos. En este caso, un aumento en el porcentaje de la población celular, lo que supone que casi todas las células se ralentizan. Sin embargo, en las líneas SW-480 y SW-620 el efecto observado ha sido el contrario apreciando una disminución significativa de la población DDAO⁺ tras los tratamientos crónicos con las proteínas CT y CTE (figura 30 C y D). Las células SW-480 sin tratar presentan un $1.47\% \pm 0.48$ de población con ciclos de división lenta, las células tratadas con CT un $0.62\% \pm 0.11$ y con CTE $0.72\% \pm 0.16$ con un p-valor de 0.025 para los tratamientos con la proteína CT, y 0.024 para los tratamientos con la proteína CTE. Las células SW-620 sin tratar presentan un $1.51\% \pm 0.37$ de población con ciclos de división lenta, las células tratadas con CT un $0.93\% \pm 0.08$ y con CTE $0.90\% \pm 0.12$ con un p-valor de 0.025 para los tratamientos con la proteína CT, y 0.009 para los tratamientos con la proteína CTE.

▶ RESULTADOS



6.1.4. ESTUDIO DEL EFECTO AGUDO DEL EXTREMO CARBOXILO TERMINAL DE LA PROTEÍNA PEDF SOBRE LA RESISTENCIA EN LÍNEAS CELULARES

Para evaluar el efecto de PEDF sobre la resistencia a quimioterapéuticos en las células tumorales realizamos curvas dosis-respuesta con las líneas celulares DLD-1, HT-29, SW-480 y SW620 con dos fármacos diferentes, oxaliplatino e irinotecan. Para cada una de las líneas celulares con ambos fármacos, oxaliplatino e Irinotecan, realizamos tres curvas diferentes, curva control, en la que tratamos las células con dosis crecientes de los fármacos, curva CT, en la que tratamos las células con dosis crecientes de los fármacos y una dosis constante, 200 ng/ml, de la proteína CT-PEDF, y por último, una curva CTE, en la que tratamos las células con dosis crecientes de los fármacos y una dosis constante, 200 ng/ml, de la proteína CTE-PEDF. Además de realizar las curvas dosis respuestas, evaluamos el IC₅₀, concentración necesaria de fármaco para eliminar el 50% de la población celular, el IC₀,

concentración necesaria de fármaco para eliminar el total de la población celular, y en último lugar, el efecto de la dosis máxima utilizada, comparando en los tres casos las curvas control con las curvas CT y CTE.

En la línea DLD-1 no observamos diferencias significativas en la curva dosis-respuesta de oxaliplatino (figura 31A) entre las células control (n=3) y las tratadas con CT (n=3) y CTE (n=3). Sin embargo, observamos diferencias significativas en la curva de irinotecan, entre las células control (n=4) y las células CT (n=3) y CTE (n=3) (figura 31B). En el cálculo del IC50 no observamos diferencias estadísticamente significativas en las células tratadas con oxaliplatino (figura 31C) mientras que con el fármaco irinotecan observamos diferencias estadísticamente significativas entre las células control y las células tratadas con CT y CTE. Las células control presentan una mayor resistencia, al tratamiento con irinotecan, respecto a las células tratadas con CT y CTE. El valor del IC50 de los controles es de 10.9 ± 0.5 uM, mientras que para las células tratadas con CT encontramos un IC de 8.5 ± 0.6 , y de 7.8 ± 0.5 uM para las tratadas con CTE, con un p-valor de 0.017 en ambos casos (figura 31D). En el cálculo del IC0 no observamos, de nuevo, diferencias estadísticamente significativas en las células tratadas con oxaliplatino (figura 31E) mientras que con el fármaco irinotecan observamos diferencias estadísticamente significativas entre las células control y las células tratadas con CT y CTE. Las células control presentan una mayor resistencia al tratamiento con irinotecan, respecto a las células tratadas con CT y CTE. El valor del IC0 de los controles es de 42.0 ± 5.6 uM mientras que para las células tratadas con CT es de casi la mitad, con valores de 24.6 ± 2.4 y de 20.1 ± 2.1 uM para las tratadas con CTE, con un p-valor de 0.017 en ambos casos (figura 31F). Por último, para la dosis máxima utilizada en oxaliplatino (24 ug/ml) no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad de la población resistente entre las células control y las células tratadas con CT y CTE (figura 31G), sin embargo, hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad celular de la población resistente con la dosis máxima utilizada de irinotecan (24 uM) entre las células control y las células tratadas con CT y CTE. La viabilidad a una dosis de 24 uM de irinotecan es del $46\% \pm 3.6$ en las células control, $29.4\% \pm 3.3$ para las células tratadas con CT y $34.4\% \pm 1.3$ para las tratadas con CTE, con un p-valor de 0.017 y 0.007 respectivamente (figura 31H). Esto significa un descenso del 16% y un 18% de la población resistente.

► RESULTADOS

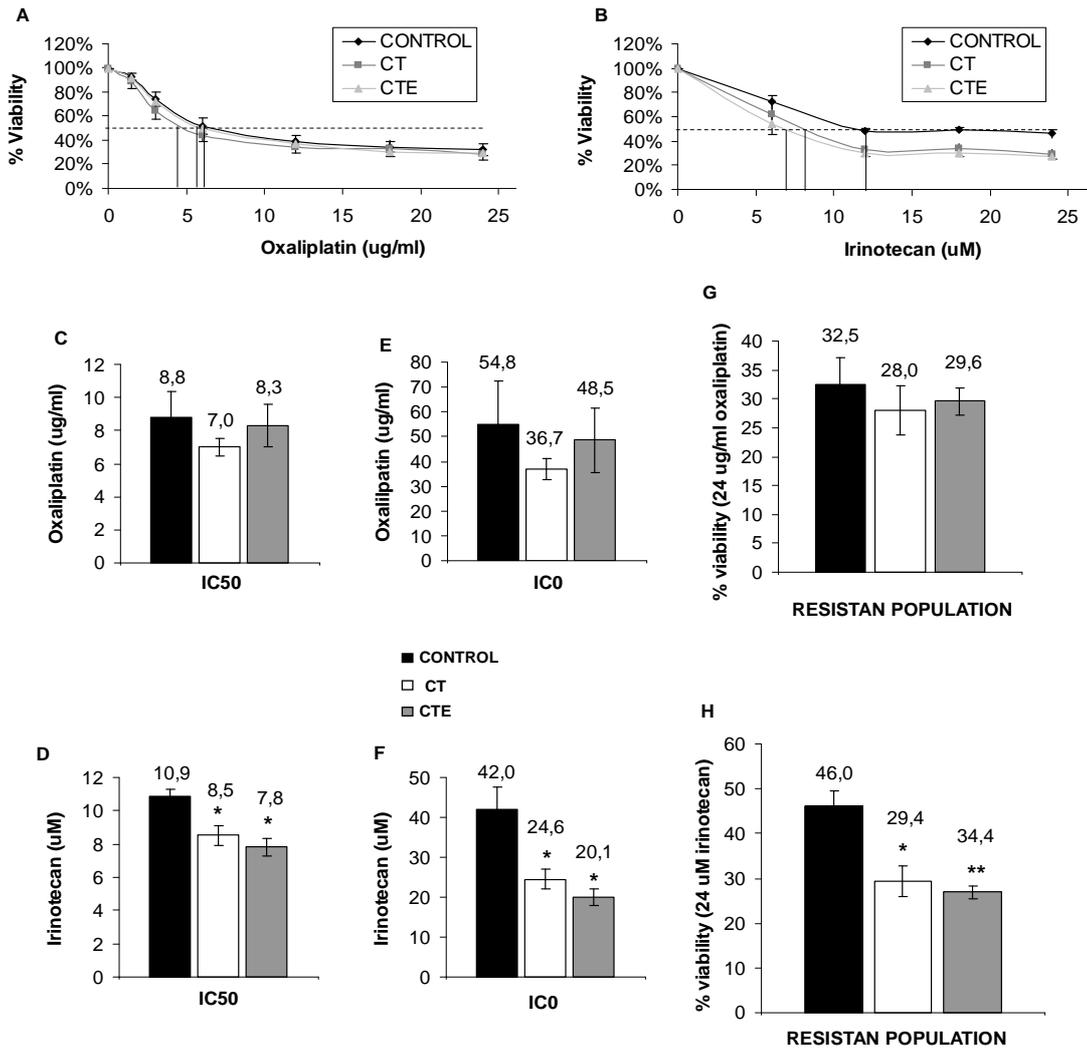


FIGURE 31: PEDF protein acute effect in DLD-1 cell line. A and B: control behavior of line DLD-1 (diamonds) compared with carboxy-ter PEDF treatment (squares) CT and (triangles) CTE. **C and D:** detected decrease in IC50 observed after treatments with oxaliplatin (C) and irinotecan (D) in combination with PEDF proteins. **E and F:** detected decrease in IC0 (drug concentration to remove total cell population) observed after treatments with oxaliplatin (E) and irinotecan (F) in combination with PEDF proteins. **G and H:** detected decreased in the number of resistant cells to the treatments with oxaliplatin (G) and irinotecan (H) in combination with PEDF proteins. U-Mn test has been used for statistical analysis: * p<0,05 ; **p<0,01.

En la línea HT-29 observamos diferencias tanto en los tratamientos con oxaliplatino (figura 32A) como con irinotecan (figura 32B) entre las células control (n=3) y las tratadas con CT (n=3) y CTE (n=3). En el cálculo del IC50 observamos diferencias estadísticamente significativas en las células tratadas con oxaliplatino (figura 32C) con un descenso del IC50, alrededor de un 40% menos de droga necesaria. Las células control presentan un IC50 de 5.4 ± 0.3 ug/ml y las células tratadas con CT y CTE tienen valores de IC50 de 3.1 ± 0.1 y 3.4 ± 0.2 ug/ml respectivamente, y un p-valor de 0.025 en ambos casos. Con el fármaco irinotecan observamos diferencias estadísticamente significativas entre las células control, con un IC50 de 13.7 ± 0.5 uM y las células tratadas con CTE con un IC50 de 11.9 ± 0.2 uM y un p-valor de 0.025 (figura 32D).

En el cálculo del IC0 observamos diferencias estadísticamente significativas en las células tratadas con oxaliplatino (figura 32E) e irinotecan (figura 32F) entre las células control y las tratadas con CTE. El IC0 calculado en los experimentos de oxaliplatino es de $75.5 + 9.7$ ug/ml en las células control y de 37.2 ± 4.8 ug/ml en las células tratadas con CTE, con un p-valor de 0.025. El IC0 calculado en los experimentos de irinotecan es de 50.4 ± 3.5 uM en las células control y de 65.8 ± 4.0 uM en las células tratadas con CTE, con un p-valor de 0.025. Por último, para la dosis máxima utilizada en oxaliplatino (24 ug/ml) hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad entre las células control y las células tratadas con CT y CTE. El porcentaje de viabilidad de las células resistentes control es de $43.4\% \pm 1.5$, para las células CT $33.4\% \pm 0.6$ y para las células CTE $36.5\% \pm 0.6$, con un p-valor de 0.025 en ambos casos (figura 32G). Sin embargo, para la dosis máxima utilizada del fármaco irinotecan (32 uM), no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad celular de las células resistentes entre las células control y las células tratadas con CT y CTE (figura 32H).

► RESULTADOS

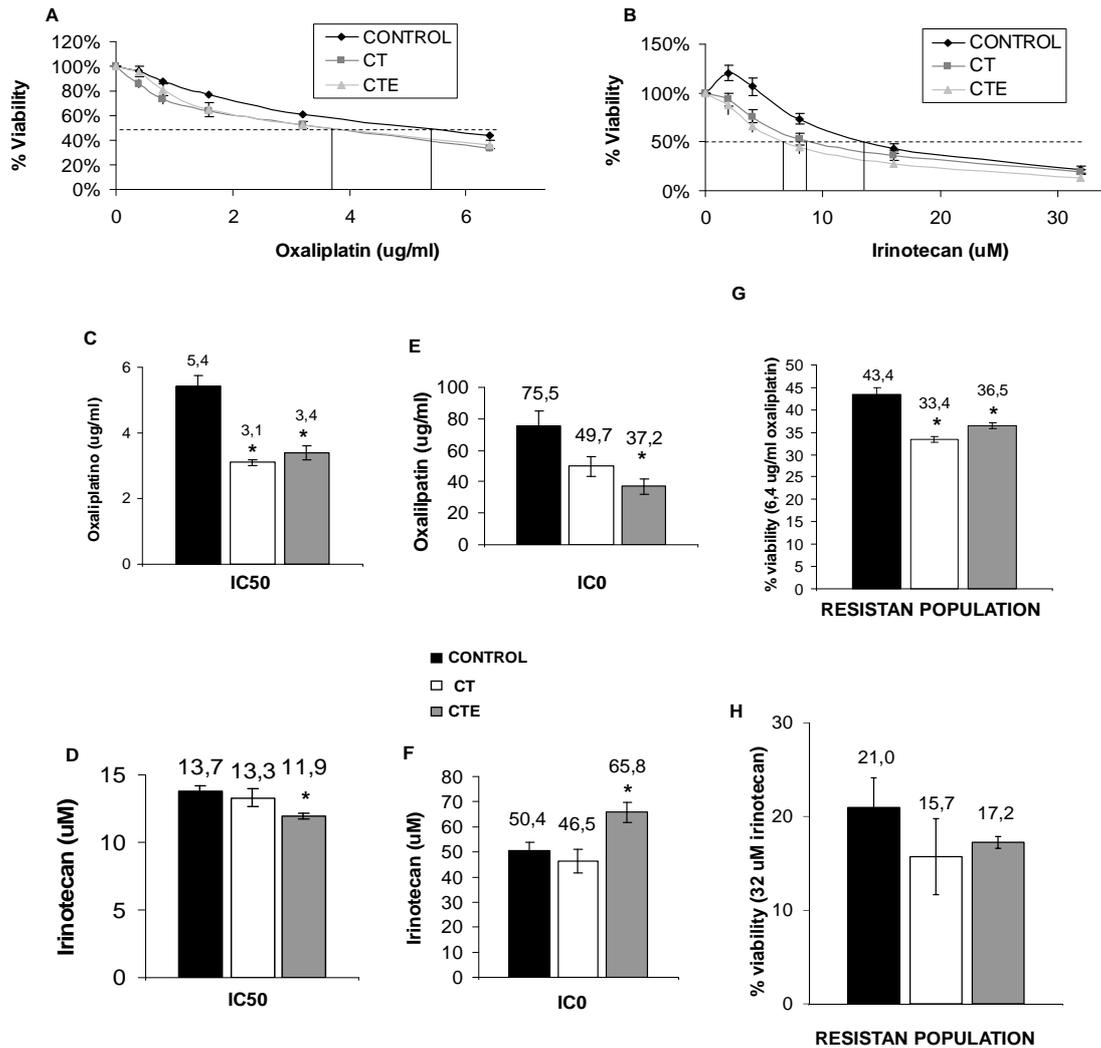


FIGURE 32: PEDF protein acute effect in HT-29 cell line. A and B: control behavior of line HT-29 (diamonds) compared with carboxy-ter PEDF treatment (squares) CT and (triangles) CTE. **C and D:** detected decrease in IC50 observed after treatments with oxaliplatin (C) and irinotecan (D) in combination with PEDF proteins. **E and F:** detected decrease in IC0 (drug concentration to remove total cell population) observed after treatments with oxaliplatin (E) in combination with PEDF proteins and irinotecan (F) in combination with CT-PEDF protein. **G and H:** detected decreased in the number of resistant cells to the treatments with oxaliplatin (G) and irinotecan (F) in combination with PEDF proteins. U-Mn test has been used for statistical analysis: * p<0,05.

En la línea SW-480 observamos diferencias en la curva dosis-respuesta de oxaliplatino (figura 33A) entre las células control (n=5) y las tratadas con CT (n=4) y CTE (n=5), y en la curva de irinotecan, entre las células control (n=5) y las células CT (n=3) y CTE (n=4) (figura 33B). En el cálculo del IC50 en células tratadas con oxaliplatino (figura 33C), al igual que con el fármaco irinotecan, observamos diferencias estadísticamente significativas entre las células control y las células tratadas con CT y CTE. Las células tratadas con oxaliplatino presentan un valor para el IC50 de 1.4 ± 0.1 ug/ml, mientras que las células expuestas a CT presentan un valor de IC50 0.7 ± 0.1 ug/ml y las células expuestas a CTE un valor de IC50 1.1 ± 0.1 ug/ml, con un p-valor de 0.007 y 0.014 respectivamente. Esta disminución en el valor de la concentración de oxaliplatino necesaria para eliminar el 50% de la población tumoral es de un 50% en la exposición a CT y de un 21% en la exposición a CTE. Las células control (irinotecan) presentan una mayor resistencia respecto a las células tratadas con CT y CTE, puesto que el valor del IC50 de los controles es de 14.4 ± 2.4 uM, mientras que para las células tratadas con CT es de 9.3 ± 0.3 y de 9.7 ± 0.5 uM para las tratadas con CTE, con un p-valor de 0.013 y 0.025 respectivamente (figura 33D). En el cálculo del IC0 observamos diferencias estadísticamente significativas en las células tratadas con oxaliplatino (figura 33E) e irinotecan (figura XF) entre las células control y las células tratadas con CT y CTE. Las células control (oxaliplatino) presentan un IC0 de 10.1 ± 1.9 ug/ml, mientras que las células CT presentan un IC0 de 5.2 ± 1.6 ug/ml y las CTE un IC0 de 6.1 ± 0.8 ug/ml con un p-valor de 0.025 y 0.014 respectivamente. Las células control presentan una mayor resistencia, al tratamiento con irinotecan, respecto a las células tratadas con CT y CTE, puesto que el valor del IC0 de los controles es de 78.2 ± 21.7 uM mientras que para las células tratadas con CT es de 33.8 ± 0.6 y de 37.1 ± 2.8 uM para las tratadas con CTE, con un p-valor de 0.013 y 0.025 respectivamente (figura 33F). Por último, para la dosis máxima utilizada en oxaliplatino (1.6 ug/ml) y la dosis máxima utilizada de irinotecan (24 uM) hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de células resistentes entre las células control y las células tratadas con CT y CTE (figura 33G y 33H), La viabilidad a una concentración 1.6ug/ml de oxaliplatino es del $42.6\% \pm 1.6$ en las células control, $25.9\% \pm 8.4$ en las células CT y $31.0\% \pm 6.1$ en las células CT, con un p-valor de 0.013 y 0.025 respectivamente. La viabilidad de las células resistentes a una dosis de 24 uM de irinotecan es del $30.7\% \pm 5.8$ en las células control, $14.3\% \pm 1.8$ para las células tratadas con CT y $15.0\% \pm 1.7$ para las tratadas con CTE, con un p-valor de 0.043 y 0.025 respectivamente.

► RESULTADOS

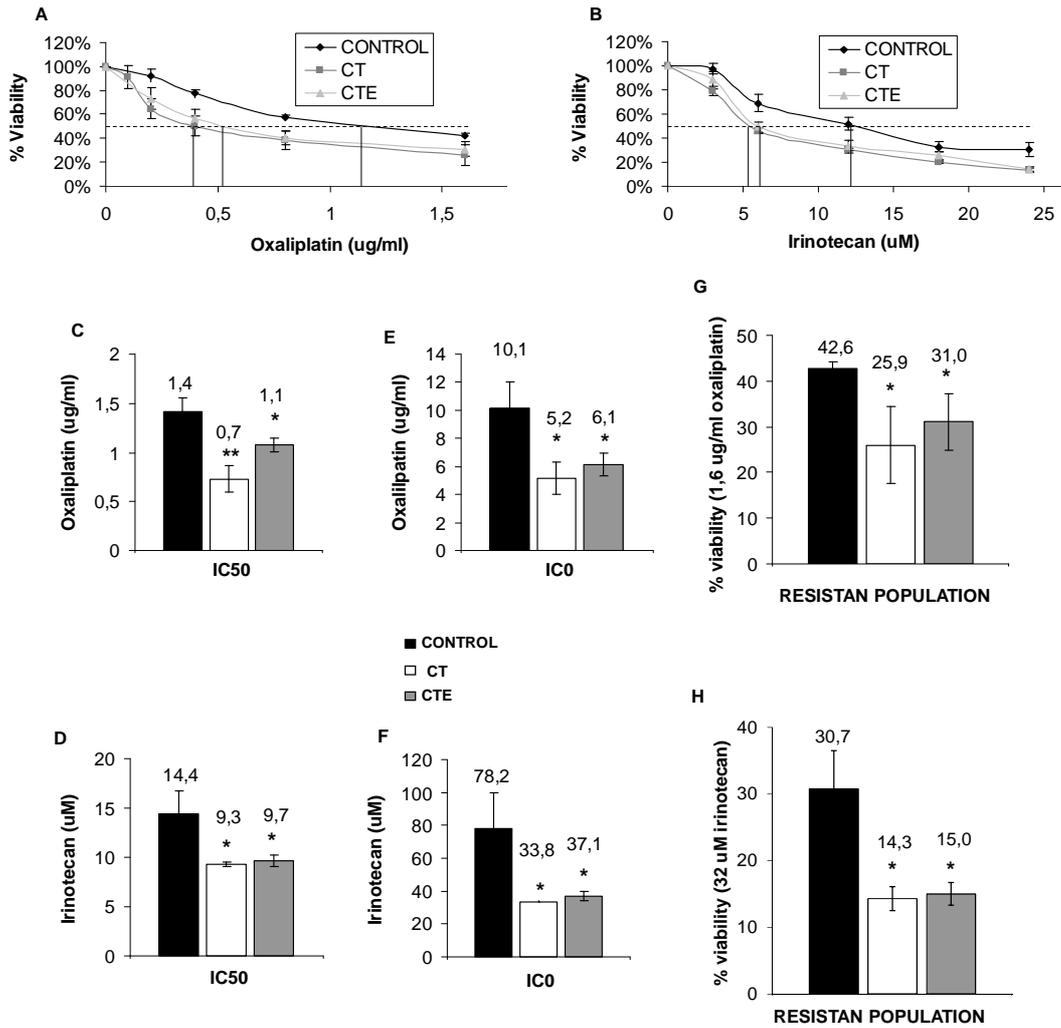


FIGURE 33: PEDF protein acute effect in SW-480 cell line. A and B: control behavior of line SW-480 (diamonds) compared with carboxy-ter PEDF treatment (squares) CT and (triangles) CTE. **C and D:** detected decrease in IC50 observed after treatments with oxaliplatin (C) and irinotecan (D) in combination with PEDF proteins. **E and F:** detected decrease in IC0 (drug concentration to remove total cell population) observed after treatments with oxaliplatin (E) and irinotecan (F) in combination with PEDF proteins. **G and H:** detected decreased in the number of resistant cells to the treatments with oxaliplatin (G) and irinotecan (F) in combination with PEDF proteins. U-Mn test has been used for statistical analysis: * p<0,05 ; **p<0,01.

En la línea SW-620 observamos diferencias en la curva dosis-respuesta de oxaliplatino (figura 34A) e irinotecan (figura 34B) entre las células control (n=3) y las tratadas con CT (n=3) y CTE (n=5 oxaliplatino; n=3 irinotecan). En el cálculo del IC50 y del IC0 no observamos diferencias estadísticamente significativas en las células tratadas con oxaliplatino (figura 34C y 34E) ni irinotecan (figura 34D y 34F) entre las células control y las células tratadas con CT y CTE. Para la dosis máxima utilizada en oxaliplatino (3.2 ug/ml) hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de células resistentes entre las células control y las células tratadas con CT y CTE, siendo el porcentaje de viabilidad de un $50.1\% \pm 1.3$ en células control, $31.0\% \pm 4.9$ en células tratadas con CT y $31.1\% \pm 3.6$ con CTE, con un p-valor de 0.025 y 0.017 respectivamente (figura 34G). Al igual que lo ocurrido en los experimentos realizados con oxaliplatino, hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad de las células resistentes con la dosis máxima utilizada de irinotecan (24 uM) entre las células control y las células tratadas con CT y CTE, siendo el porcentaje de viabilidad de un $64.7\% \pm 5.2$ en células control, $40.9\% \pm 4.6$ en células tratadas con CT y $34.0\% \pm 2.7$ con CTE, con un p-valor de 0.025 en ambos casos (figura 34H).

► RESULTADOS

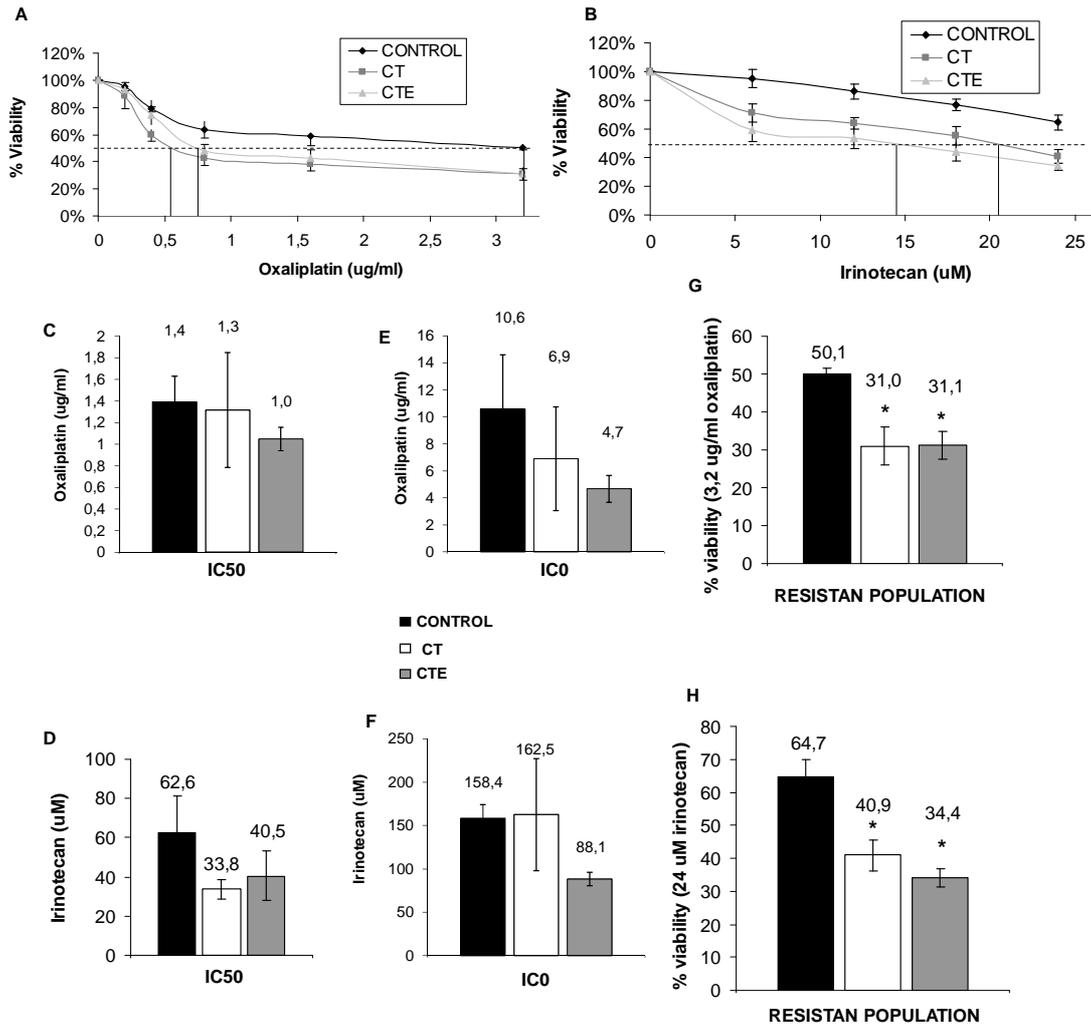


FIGURE 34: PEDF protein acute effect in SW-620 cell line. **A and B:** control behavior of line SW-620 (diamonds) compared with carboxy-ter PEDF treatment (squares) CT and (triangles) CTE. **C and D:** we don't find significant differences in IC50 observed after treatments with oxaliplatin (C) and a decrease with irinotecan (D) in combination with PEDF proteins. **E and F:** we don't find significant differences in IC0 (drug concentration to remove total cell population) observed after treatments with oxaliplatin (E) and irinotecan (F) in combination with PEDF proteins. **G and H:** detected decreased in the number of resistant cells to the treatments with oxaliplatin (G) and irinotecan (F) in combination with PEDF proteins. U-Mn test has been used for statistical analysis: * p<0,05.

6.1.5. ESTUDIO DEL EFECTO CRÓNICO DEL EXTREMO CARBOXILO TERMINAL DE LA PROTEÍNA PEDF SOBRE LA RESISTENCIA EN LÍNEAS CELULARES

Para evaluar el efecto de PEDF sobre la resistencia a quimioterapéuticos en las células tumorales realizamos curvas dosis-respuesta con las líneas celulares DLD-1, HT-29, SW-480 y SW620 con dos fármacos diferentes, oxaliplatino e irinotecan en células tratadas de forma crónica con PEDF-Cter previamente. Para cada una de las líneas celulares, con ambos tratamientos, realizamos tres curvas diferentes con dosis crecientes de los fármacos, oxaliplatino e irinotecan, curva control, curva CT y curva CTE. En la curva control se utilizaron células sin tratar, mientras que en las curvas CT y CTE se utilizaron células que habían recibido seis tratamientos de las proteínas CT-PEDF y CTE-PEDF a una concentración de 200 ng/ml. Además de realizar las curvas dosis respuestas, evaluamos de nuevo el IC₅₀, concentración necesaria de fármaco para eliminar el 50% de la población celular, el IC₀, concentración necesaria de fármaco para eliminar el total de la población celular, y el efecto de la dosis máxima utilizada, comparando en los tres casos las curvas control con las curvas CT y CTE.

En la línea DLD-1 no observamos diferencias en la curva dosis-respuesta de oxaliplatino (figura 35A) entre las células control (n=3) y las tratadas con CT (n=3) y CTE (n=3). No se han apreciado diferencias estadísticamente significativas en el valor del IC₅₀ (figura 35C), ni en el IC₀ (figura 35E), ni en la población resistente (figura 35G) con oxaliplatino.

Sin embargo, sí observamos diferencias en la curva dosis respuesta de irinotecan, entre las células control (n=4) y las células CT (n=3) y CTE (n=3) (figura 35B). En el cálculo del IC₅₀ observamos diferencias estadísticamente significativas en las células tratadas con el fármaco irinotecan entre las células control y las células tratadas con CT y CTE. Las células control (irinotecan) presentan una mayor resistencia respecto a las células tratadas con CT y CTE, puesto que el valor del IC₅₀ de los controles es de 11.2 ± 0.5 uM, mientras que para las células tratadas con CT es de 8.9 ± 0.6 , y de 9.9 ± 0.4 uM para las tratadas con CTE, con un p-valor de 0.017 y 0.039 respectivamente (figura 35D). Esta disminución supone un 20% menos de dosis de irinotecan en combinación con CT y un 10% con CTE. En el cálculo del IC₀ observamos diferencias estadísticamente significativas en las células tratadas con el fármaco irinotecan entre las células control y las células tratadas con CT. Las células control (irinotecan) presentan una mayor resistencia a irinotecan respecto a las células tratadas con CT, puesto que el valor del IC₀ de los controles es de 41.4 ± 4.5 uM mientras que para las células tratadas con CT es de 27.8 ± 3.2 uM, con un p-valor de 0.039 (figura 35F). Por último, para la dosis máxima utilizada de irinotecan (24 uM) hemos encontrado diferencias

► RESULTADOS

estadísticamente significativas en la cantidad de células resistentes entre las células control y las células tratadas con CT y CTE. La viabilidad a una dosis de 24 uM de irinotecan es del 45.1% \pm 1.4 en las células control, 31.3% \pm 1.9 para las células tratadas con CT y 34.4% \pm 1.5 para las tratadas con CTE, con un p-valor de 0.017 en ambos casos respectivamente (figura 35H).

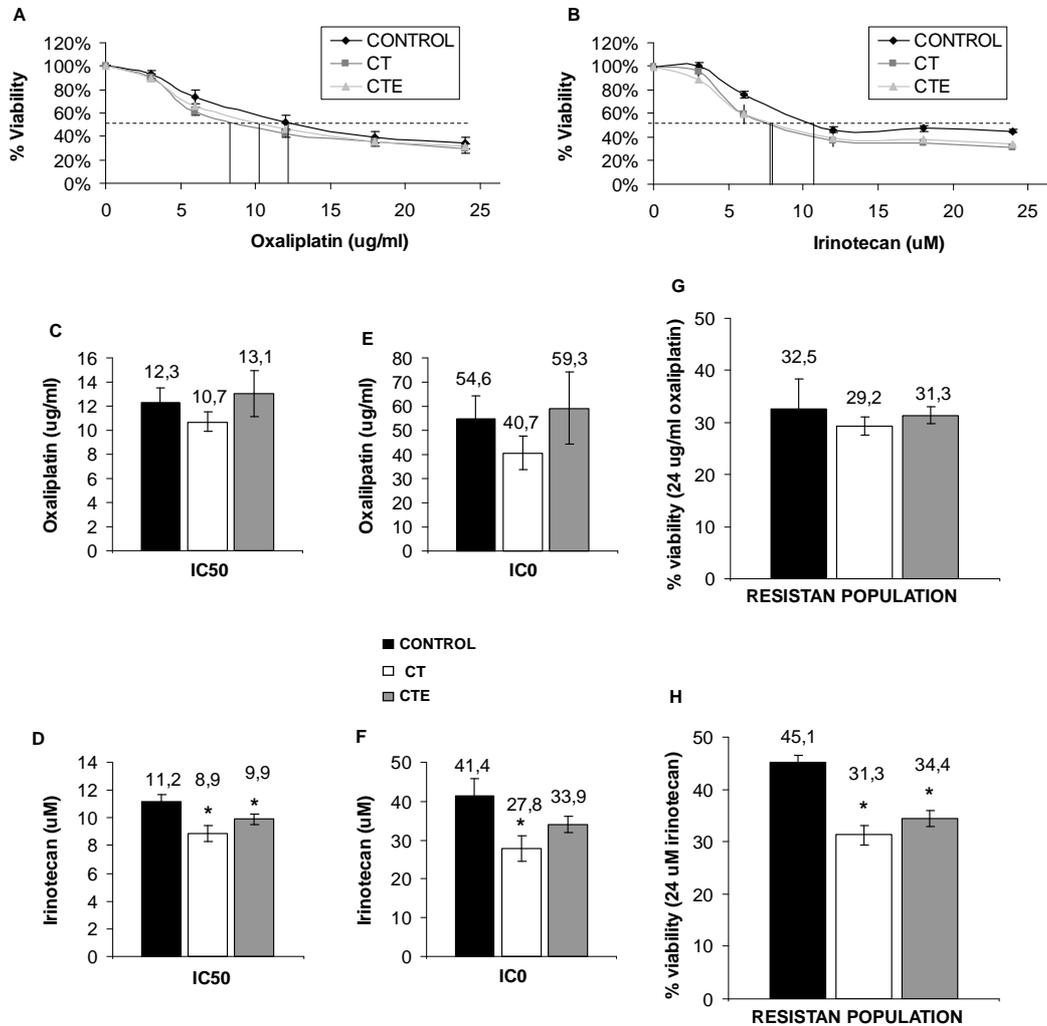


FIGURE 35: PEDF protein chronic effect in DLD-1 cell line. A and B: control behavior of line DLD-1 (diamonds) compared with carboxy-ter PEDF treatment (squares) CT and (triangles) CTE. **C and D:** IC50 observed after treatments with oxaliplatin (C) and irinotecan (D) in combination with PEDF proteins. **E and F:** IC0 (drug concentration to remove total cell population) observed after treatments with oxaliplatin (E) and irinotecan (F) in combination with PEDF proteins. **G and H:** detected number of resistant cells to the treatments with oxaliplatin (G) and irinotecan (F) in combination with PEDF proteins. U-Mn test has been used for statistical analysis: * p<0,05.

En la línea HT-29 observamos comportamientos diferentes entre las curvas dosis-respuesta de oxaliplatino (figura 36A) e irinotecan (figura 36B) entre las células control (n=3) y las tratadas con CT (n=3 oxaliplatino; n=4 irinotecan) y CTE (n=3 oxaliplatino; n=4 irinotecan). En el cálculo del IC50 observamos diferencias estadísticamente significativas en las células tratadas con oxaliplatino (figura 36C) entre las células control con un IC50 de 5.7 ± 0.2 ug/ml, y las células tratadas con CTE con un valor para el IC50 de 5.1 ± 0.1 ug/ml, y un p-valor de 0.025, suponiendo una disminución del 10% de oxaliplatino. Con el fármaco irinotecan observamos diferencias estadísticamente significativas entre las células control, con un IC50 de $11.2 \mu\text{M} \pm 0.6$ y las células tratadas con CTE con un IC50 de $9.4 \pm 0.3 \mu\text{M}$ y un p-valor de 0.017, suponiendo una disminución del 16% de irinotecan (figura 36D). En el cálculo del IC0, por un lado, no observamos diferencias estadísticamente significativas en las células tratadas con oxaliplatino (figura 36E), y por otro lado, observamos diferencias estadísticamente significativa irinotecan (figura 36F) entre las células control y las tratadas con CTE. El IC0 calculado en los experimentos de irinotecan es de $55.8 \pm 5.3 \mu\text{M}$ en las células control y de $47.6 \pm 1.1 \mu\text{M}$ en las células tratadas con CTE, con un p-valor de 0.039. Por último, para la dosis máxima utilizada en oxaliplatino (6.4 ug/ml) hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad de las células resistente entre las células control y las células tratadas con CT y CTE. El porcentaje de viabilidad en las células control es de $44.0\% \pm 1.1$, para las células CT $35.1\% \pm 1.7$ y para las células CTE $33.8\% \pm 1.9$, con un p-valor de 0.025 en ambos casos (figura 36G). Para la dosis máxima utilizada del fármaco irinotecan (32 μM), hay diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad celular entre las células control y las células tratadas con CTE. El porcentaje de viabilidad en las células control es de $21.6\% \pm 3.4$ y para las células CTE $13.6\% \pm 0.8$, con un p-valor de 0.039 (figura 36H).

► RESULTADOS

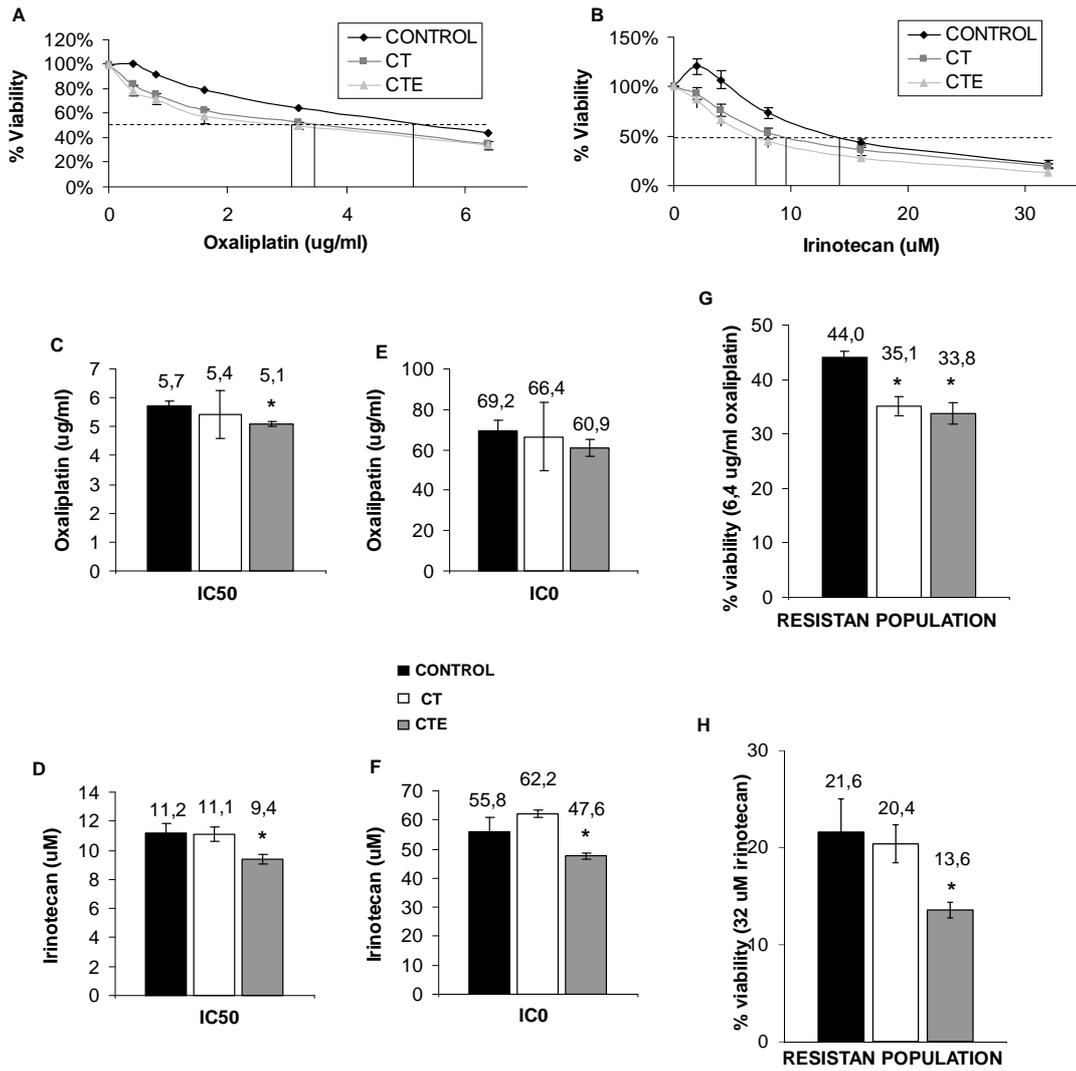


FIGURE 36: PEDF protein chronic effect in HT-29 cell line. A and B: control behavior of line HT-29 (diamonds) compared with carboxy-ter PEDF treatment (squares) CT and (triangles) CTE. **C and D:** IC50 observed after treatments with oxaliplatin (C) and irinotecan (D) in combination with PEDF proteins. **E and F:** IC0 (drug concentration to remove total cell population) observed after treatments with oxaliplatin (E) and irinotecan (F) in combination with PEDF proteins. **G and H:** detected number of resistant cells to the treatments with oxaliplatin (G) and irinotecan (F) in combination with PEDF proteins. U-Mn test has been used for statistical analysis: * p<0,05.

En la línea SW-480 observamos diferencias en la curva dosis-respuesta de oxaliplatino (figura 37A) entre las células control (n=3) y las tratadas con CT (n=4) y CTE (n=4), y en la curva de irinotecan, entre las células control (n=3) y las células CT (n=3) y CTE (n=3) (figura 37B). En el cálculo del IC50 en células tratadas con oxaliplatino (figura 37C), al igual que con el fármaco irinotecan, observamos diferencias estadísticamente significativas entre las células control y las células tratadas con CT y CTE. Las células control tratadas con oxaliplatino presentan un valor para el IC50 de 9.0 ± 1.4 ug/ml, mientras que las células tratadas con CT presentan un valor de 4.0 ± 0.6 ug/ml, un 55% menos del fármaco oxaliplatino, y las células tratadas con CTE un valor de 2.7 ± 0.8 ug/ml, un 70% menos de concentración de la droga, con un p-valor de 0.039 en ambos casos. Las células control tratadas con irinotecan presentan una mayor resistencia respecto a las células tratadas con CT y CTE, puesto que el valor del IC50 de los controles es de 42.7 ± 2.9 uM, mientras que para las células tratadas con CT es de 25.3 ± 7.3 y de 18.3 ± 1.8 uM para las tratadas con CTE, con un p-valor de 0.025 en ambos casos (figura 37D). Los datos obtenidos en el valor del IC50 suponen una reducción en la concentración de oxaliplatino del 41% en combinación con CT, y del 57% con CTE. En el cálculo del IC0 observamos diferencias estadísticamente significativas en las células tratadas con oxaliplatino (figura 37E) e irinotecan (figura 37F) entre las células control y las células expuestas a CT y CTE. Las células control tratadas con oxaliplatino presentan un IC0 de 388.4 ± 129.0 ug/ml, mientras que las células CT presentan un IC0 de 102.0 ± 25.0 ug/ml y las CTE un IC0 de 53.9 ± 30.0 ug/ml con un p-valor de 0.039 y 0.017 respectivamente. Las células control presentan una mayor resistencia a irinotecan que las células tratadas con CT y CTE, puesto que el valor del IC0 de los controles es de 577.6 ± 72.2 uM mientras que para las células tratadas con CT es de 231.1 ± 116.2 y de 112.4 ± 20.9 uM para las tratadas con CTE, con un p-valor de 0.025 en ambos casos (figura 37F). Por último, para la dosis máxima utilizada en oxaliplatino (3.2 ug/ml) y la dosis máxima utilizada de irinotecan (24 uM) hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad de la población resistente entre las células control y las células tratadas con CT y CTE (figura 37G y 37H), La viabilidad a una concentración 3.2 ug/ml de oxaliplatino es del $66.3\% \pm 3.8$ en las células control, $51.4\% \pm 1.8$ en las células CT y $47.1\% \pm 4.4$ en las células CTE, con un p-valor de 0.034 y 0.025 respectivamente. La viabilidad a una dosis de 24 uM de irinotecan es del $64.7\% \pm 5.2$ en las células control, $40.9\% \pm 4.6$ para las células tratadas con CT y $34.4\% \pm 2.7$ para las tratadas con CTE, con un p-valor de 0.025 en ambos casos.

► RESULTADOS

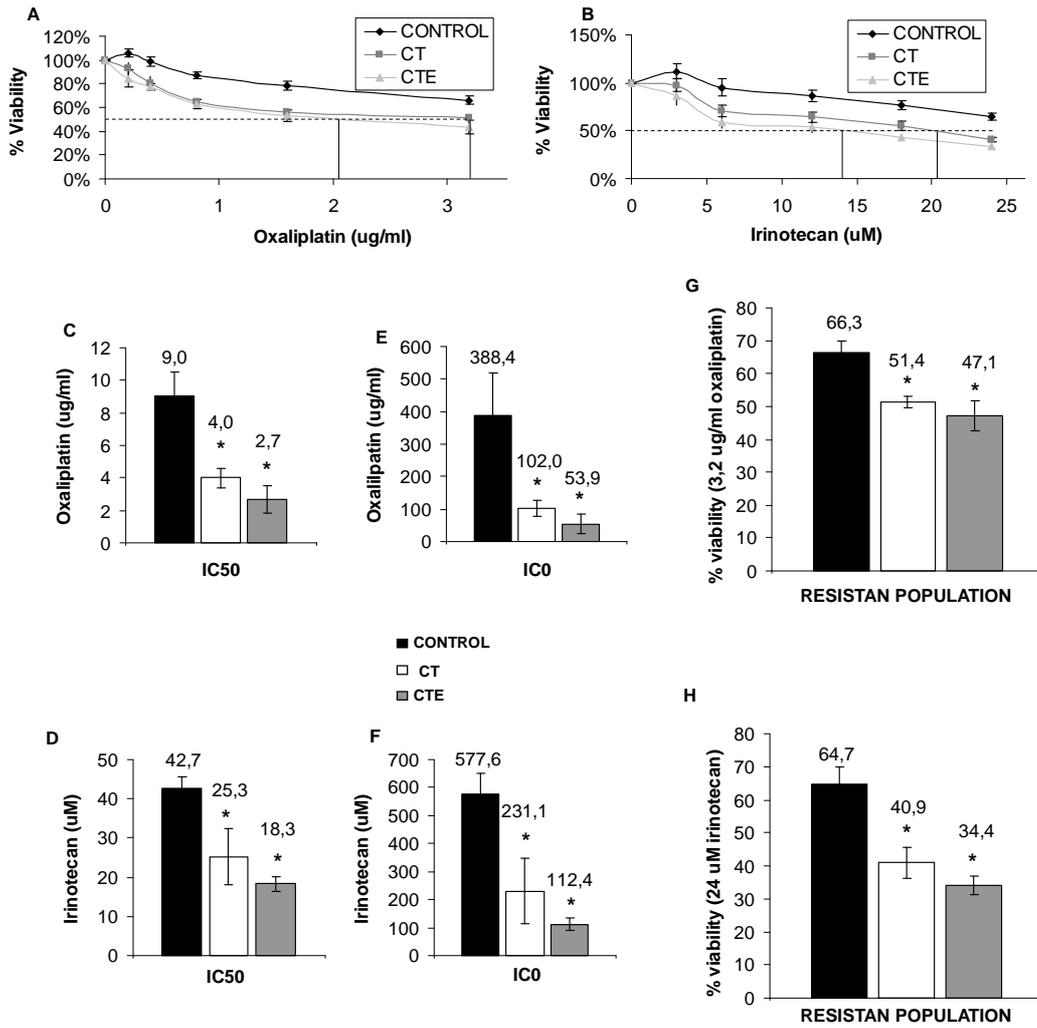


FIGURE 37: PEDF protein chronic effect in SW-480 cell line. A and B: control behavior of line SW-480 (diamonds) compared with carboxy-ter PEDF treatment (squares) CT and (triangles) CTE. **C and D:** IC50 observed after treatments with oxaliplatin (C) and irinotecan (D) in combination with PEDF proteins. **E and F:** IC0 (drug concentration to remove total cell population) observed after treatments with oxaliplatin (E) and irinotecan (F) in combination with PEDF proteins. **G and H:** detected number of resistant cells to the treatments with oxaliplatin (G) and irinotecan (F) in combination with PEDF proteins. U-Mn test has been used for statistical analysis: * p<0,05.

En la línea SW-620 (metástasis) observamos diferencias en la curva dosis-respuesta de oxaliplatino (figura 38A) e irinotecan (figura 38B) entre las células control (n=3) y las tratadas con CT (n=4 oxaliplatino; n=3 irinotecan) y CTE (n=6 oxaliplatino; n=3 irinotecan). En el cálculo del IC50 en células con ambos tratamientos, oxaliplatino e irinotecan, observamos diferencias estadísticamente significativas entre las células control y las células tratadas con CT y CTE (figuras 38 C y D). Las células tratadas control (oxaliplatino) presentan un valor para el IC50 de 6.3 ± 1.0 ug/ml, mientras que las células tratadas con CT presentan un valor de 2.9 ± 0.8 ug/ml y las células tratadas con CTE un valor de 1.5 ± 0.3 ug/ml, con un p-valor de 0.039 y 0.010 respectivamente. Los datos obtenidos en los valores de IC50 indican una disminución en la concentración de oxaliplatino del 50% en combinación con CT, y del 76% con CTE. Las células control presentan una mayor resistencia a irinotecan que las células tratadas con CT y CTE, puesto que el valor del IC50 de los controles es de 29.8 ± 2.8 uM, mientras que para las células tratadas con CT es de 18.4 ± 1.4 y de 19.7 ± 1.0 uM para las tratadas con CTE, con un p-valor de 0.025 en ambos casos (figura 38D). Los datos obtenidos en los valores de IC50 suponen una reducción del fármaco irinotecan del 30% en combinación con CT, y del 38% con CTE. En el cálculo del IC0 observamos diferencias estadísticamente significativas en las células tratadas con oxaliplatino (figura 38E) e irinotecan (figura 38F) entre las células control y las células tratadas con CT y CTE. Las células control (oxaliplatino) presentan un IC0 de 201.2 ± 76.7 ug/ml, mientras que las células CT presentan un IC0 de 59.3 ± 30.1 ug/ml y las CTE un IC0 de 14.7 ± 4.8 ug/ml con un p-valor de 0.039 y 0.010 respectivamente. Las células control presentan una mayor resistencia a irinotecan que las células tratadas con CT y CTE, puesto que el valor del IC0 de los controles es de 67.7 ± 4.2 uM mientras que para las células tratadas con CT es de 52.9 ± 3.2 y de 51.6 ± 5.5 uM para las tratadas con CTE, con un p-valor de 0.025 en ambos casos (figura 38F). Para la dosis máxima utilizada en oxaliplatino (3.2 ug/ml) hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en la concentración de la población resistente entre las células control y las células tratadas con CT y CTE, siendo el porcentaje de viabilidad de un $57.4\% \pm 2.5$ en células control, $41.2\% \pm 4.4$ en células tratadas con CT y $32.7\% \pm 5.5$ con CTE, con un p-valor de 0.025 y 0.017 respectivamente (figura 38G). Al igual que lo ocurrido en los experimentos realizados con oxaliplatino, hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad celular de la población resistente con la dosis máxima utilizada de irinotecan (24 uM) entre las células control y las células tratadas con CT y CTE, siendo el porcentaje de viabilidad de un $63.5\% \pm 2.2$ en células control, $47.6\% \pm 2.9$ en células tratadas con CT y disminuyendo a prácticamente la mitad con un $34.4\% \pm 5.9$ de células viables en combinación con CTE, con un p-valor de 0.025 en ambos casos (figura 38H).

► RESULTADOS

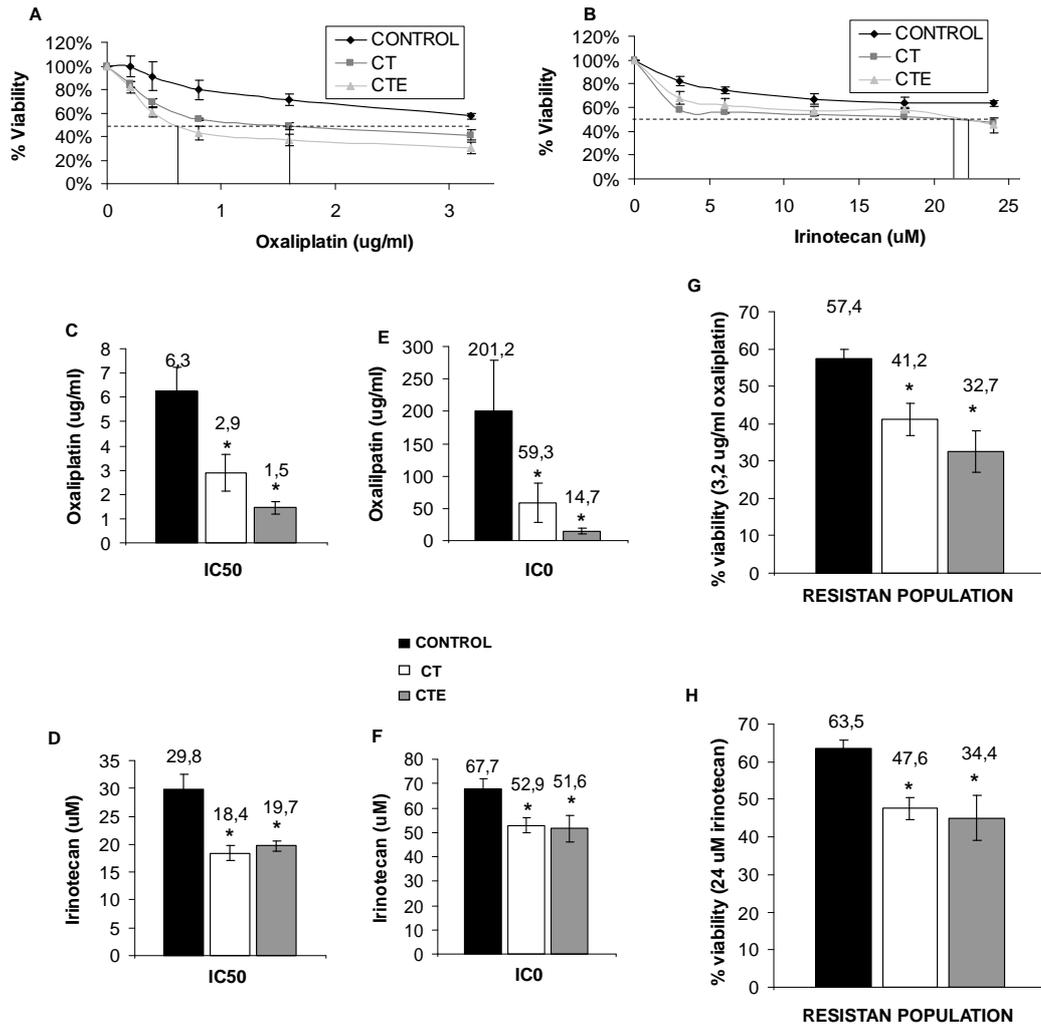


FIGURE 38: PEDF protein chronic effect in SW-620 cell line. A and B: control behavior of line SW-620 (diamonds) compared with carboxy-ter PEDF treatment (squares) CT and (triangles) CTE. **C and D:** IC50 observed after treatments with oxaliplatin (C) and irinotecan (D) in combination with PEDF proteins. **E and F:** IC0 (drug concentration to remove total cell population) observed after treatments with oxaliplatin (E) and irinotecan (F) in combination with PEDF proteins. **G and H:** detected number of resistant cells to the treatments with oxaliplatin (G) and irinotecan (F) in combination with PEDF proteins. U-Mn test has been used for statistical analysis: * p<0,05.

6.1.6. ESTUDIO DEL EFECTO CRÓNICO DEL EXTREMO CARBOXILO TERMINAL DE LA PROTEÍNA PEDF SOBRE LA TUMOROGENEIDAD EN LÍNEAS CELULARES

Para evaluar el efecto del extremo carboxilo terminal de la proteína PEDF sobre la capacidad de formación de tumores, realizamos inyecciones de las líneas celulares DLD-1, SW-480 y SW-620 en el flanco de ratones nude inmunodeprimidos. Además, las células fueron tratadas previamente, de forma crónica, con dosis constantes de las proteínas mutantes de PEDF, CT y CTE (200 ng/ml) hasta un total de seis tratamientos. De esta manera, inyectamos células que denominamos control (no han recibido tratamiento), células CT y células CTE.

Utilizamos un total de diecisiete animales (tabla 15), y cada uno de ellos recibió una inyección en ambos flancos. Se realizaron un total de treinta y cuatro inyecciones, tal y como se muestra en la tabla 16. Las inyecciones fueron de 5000 y 500 células para cada una de las líneas celulares utilizadas (tabla 16). Una vez realizadas las inyecciones se realizó un seguimiento a los ratones tanto de peso (tabla 15) como de volumen de tumor (tabla 16). En cuanto al peso de los animales no se observaron cambios drásticos debido a las inyecciones. Además, ningún animal perdió peso de forma alarmante por el tumor inducido e incluso, algún ratón alcanzó un 10-15% de sobrepeso.

Obtuvimos un total de treinta y un tumores, once de ellos de la línea DLD-1, otros once de la línea SW-480, y 9 de la línea SW-620. En la línea DLD-1 no observamos diferencias en la formación de tumores entre las inyecciones de cinco mil células y las de quinientas células, entre las células tratadas y las células control, aunque observamos que una de las inyecciones control no formó tumor (tabla 17). Este hecho puede deberse a los problemas encontrados a la hora de realizar dicha inyección, en la que se perdió parte de la muestra de la inyección de un total de 500 células. En los tumores obtenidos a partir de las inyecciones de la línea SW-480 no observamos diferencias entre las inyecciones control y las CT, sin embargo vemos una disminución del 25% en la frecuencia de aparición de tumor en las inyecciones de células CTE del total de inyecciones realizadas (tabla 17). Respecto a las inyecciones de la línea SW-620 observamos diferencias en las inyecciones de 500 células, una disminución del 50% en la frecuencia de formación de tumor de las inyecciones de las células SW-620 tratadas con CT. Además observamos también una disminución del 50% en las inyecciones de 5000 células SW-620 CT y CTE (tabla 17). En resumen, observamos una disminución del 25% en la frecuencia de formación de tumores en las inyecciones de células CTE en la línea celular SW-480 y en su metástasis, la línea celular SW-620, una disminución del 25%

en la frecuencia de formación de tumores en las inyecciones CT y del 50% en las CTE (tabla 17).

Tabla 15: Seguimiento del peso de los ratones inyectados por semanas tras las inyecciones. Se muestra el tipo y número de células inyectadas, tumores formados y el peso del ratón por semanas desde la inyección.

Ratón	Células	Tumor	Peso de ratones inyectados (gr)																
			Numero de semanas																
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
4	SW620 Control	T7, T8 Y T9	40.9	41.5	42.1	41	41.3	41	40.2	40.9									
5	SW480 control	T10 Y T11	41.3	42.0	42.6	42.9	42.8	42.8	42.8	43.2	43.7	43.5	43.2	43.0					
6	SW480 CTE T6	T13	40.5	41.1	41.7	41.1	42	41.7	41.5	42.1	41.7	42	42.2	42.5					
7	SW480 CTE T6		39.1	39.5	39.8	39	40.2	40.2	40.2	40	40.2	40	40.5	40.7					
8	SW620 Control	T14 Y T15	34.6	35	32.2	35													
9	SW620 CT T6	T16	33.5	33.8	34.4	35.5													
10	SW620 CTE T6	T17 Y T18	30.9	31.7	31.9	32.6	32.6	32.6	32.6										
11	SW480 control	T19 Y T20	32.5	33	32.2	35.2	34	33.9	33.9										
12	SW480 CTE T6	T21 Y T22	32	32.4	32.9	33	34	34.7	34.7	35	35.2	35.8	36.1						
13	SW480 CT T6	T23 Y T24	36.4	38.5	39.1	39.4	40.2	41.2	41.8	42.2	42.6	43.0	43.3	41.8	41.8	42	42.1	42.5	43
14	SW620 CT T6	TUMOR 25 (5000 células)	31.8	32.3	32.8	33.2	33.5	33.8	34.0	34.1	34.5								
15	DLD-1 CTE T6	TUMOR 27 (5000 células)	32.5	32.9	33.4	33.8	33.9	34.3	34.7	34.9	34.9								
16	DLD-1 CT T6	TUMOR 29 (500 células)	27.1	27.2	27.2	27.4	27.6	27.9	27.9	28.0	28.2								
17	SW620 CT T6	TUMOR 31 (500 células)	32.6	32.7	32.9	33.1	33.1	33	33	33	33.2								
18	DLD-1 Control	TUMOR 34 (5000 células)	37	37.2	37.2	37.1	37	37.1	36.9	36.9	37.0								
19	DLD-1 CTE T6	TUMOR 36 (500 células)	34.6	34.8	34.7	34.6	34.7	34.5	34.3	34.2	34.4								
20	DLD-1 CT T6	TUMOR 38 (5000 células)	34.4	34.2	34.0	33.9	33.9	33.8	33.5	33.1	33.1								
21	DLD-1 Control	TUMOR 39 (500 células)	37.2	37.5	37.9	38.2	38.7	39.4	40.7	41.4	41.7								

Tabla 16: Seguimiento del volumen de los tumores formados por semanas tras las inyecciones. Se muestra el tipo de células inyectadas, tumores formados y el volumen del tumor por semanas desde la inyección.

Línea	Tratamiento	Tumor	Volumen tumores (cm ³)															
			Numero de semanas															
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
DLD-1	Control	TUMOR 33 (5000 células)	0	0.01	0.04	0.09	1.15	1.29	1.59	1.83	1.98							
		TUMOR 34 (5000 células)	0	0	0	0.01	0.04	0.09	0.17	0.26	0.56							
		TUMOR 39 (500 células)	0	0	0	0	0.01	0.06	0.08	0.10	0.12							
	CT T6	TUMOR 29 (500 células)	0	0	0	0	0	0.03	0.06	0.09	0.21							
		TUMOR 30 (500 células)	0	0	0	0.01	0.09	0.19	0.31	0.51	0.75							
		TUMOR 37 (5000 células)	0	0.01	0.05	0.12	0.19	0.25	0.30	2.12	2.81							
		TUMOR 38 (5000 células)	0	0	0	0.01	0.04	0.06	0.19	0.26	0.62							
	CTF T6	TUMOR 27 (5000 células)	0	0	0.04	0.23	0.68	1.10	1.76	1.99	2.03							
		TUMOR 28 (5000 células)	0	0	0	0.01	0.08	0.15	0.20	0.26	0.56							
		TUMOR 35 (500 células)	0	0	0.01	0.04	0.15	0.79	0.91	1.04	2.50							
		TUMOR 36 (500 células)	0	0	0	0	0	0.01	0.03	0.04	0.07							
	SW-480	Control	TUMOR 10 (5000 células)	0	0	0	0	0.26	0.51	0.21	0.34	0.54	0.73	1.09	1.37			
TUMOR 11 (500 células)			0	0	0	0	0.17	0.26	0.31	0.37	0.44	0.44	0.49	0.5				
TUMOR 19 (5000 células)			0	0	0	0	0.08	0.33	2.62									
TUMOR 20 (500 células)			0	0	0	0	0.04	0.17	0.56									
CT T6		TUMOR 23 (5000 células)	0	0	0	0	0	0	0.04	0.06	0.09	0.12	0.17	0.52	0.52	0.52	0.52	1.97
		TUMOR 24 (500 células)	0	0	0	0	0	0	0	0	0.04	0.04	0.04	0.22	0.30	0.44	0.58	0.67
		TUMOR 26 (5000 células)	0	0	0	0	0	0	0	0.01	0.25							
		TUMOR 32 (500 células)	0	0	0.01	0.01	0.01	0.09	0.12	0.18	0.52							
CTE T6		TUMOR 13 (500 células)	0	0	0	0	0	0.01	0.02	0.04	0.09	0.16	0.22	0.37				
		TUMOR 21 (500 células)	0	0	0	0	0	0	0.01	0.04	0.09	0.17	0.26					
		TUMOR 22 (500 células)	0	0	0	0	0.01	0.04	0.09	0.25	0.47	0.81	1.25					
		TUMOR 7 (500 células)	0	0	0	0	0	0.02	0.09	0.2								
SW-620	Control	TUMOR 8 (5000 células)	0	0	0	0	0.17	0.17	0.67	1.49								
		TUMOR 14 (500 células)	0	0	0.04	0.17												
		TUMOR 15 (5000 células)	0	0.04	0.36	0.73												
		TUMOR 16 (5000 células)	0	0	0.26	1.25												
	CT T6	TUMOR 25 (5000 células)	0	0.08	0.16	0.46	0.89	1.19	1.35	1.56	2.25							
		TUMOR 31 (500 células)	0	0.02	0.08	0.25	0.75	1.21	2.53	3.18	3.37							
		TUMOR 17 (5000 células)	0	0	0	0.06	0.21	0.62	1.77									
	CTE T6	TUMOR 18 (500 células)	0	0	0	0.02	0.16	0.33	2.16									

► RESULTADOS

Tabla 17: Tabla de frecuencia de formación de tumores en ratones inmunodeprimidos a partir de células tratadas con el extremo C-terminal de PEDF. Se muestra el número de células inoculadas y el número de tumores formados para cada línea celular y para cada tratamiento.

INJECTED CELLS	DLD-1			SW-480			SW-620		
	CONTROL	CT T6	CTE T6	CONTROL	CT T6	CTE T6	CONTROL	CT T6	CTE T6
500 cells	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2	1/2
5000 cells	1/1	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2	1/2
Total	3/3	4/4	4/4	4/4	4/4	3/4	4/4	3/4	2/4
Total frequency	1	1	1	1	1	0,75	1	0,75	0,5

De manera global, obtuvimos un total de 11/12 tumores controles y tumores CT, y 9/12 tumores CTE. La frecuencia de formación de tumor fue de 0.92 en los tumores controles y tumores CT, y de 0.75 en los tumores CTE.

Tabla 18: Tabla de frecuencia global de formación de tumores en ratones inmunodeprimidos a partir de células tratadas con el extremo C-terminal de PEDF. Se muestra el tratamiento recibido, el número de tumores formados y la frecuencia.

CELLS	NUMBERS OF TUMORS	FREQUENCY
Control	11/11	1
CT	11/12	0,92
CTE	9/12	0,75
Tratadas	20/24	0,83

En la figura 39 aparece reflejado el tiempo de aparición y formación de los diferentes tumores a partir de células tratadas de manera crónica con la diferentes fragmentos c-terminales de la proteína reguladora de la autorrenovación PEDF (figura 39A, C y D). Además, muestra la evolución del tamaño medio de los tumores en el tiempo (figura 39B, D y F) hasta la semana 8 para los tumores DLD-1 y SW-620, y semana 9 para los tumores SW-480. Por otro lado, para la línea DLD-1 hemos analizado el incremento del tamaño de los tumores (figura 39G) tomando para este caso semana 1 como la primera semana en la que detectamos los tumores. Con este nuevo análisis observamos que, aunque el tamaño medio de los tumores DLD-1 control no son los mayores, sí observamos un mayor crecimiento medio de estos comparado con su crecimiento inicial, lo que nos indica que los tumores DLD-1 controles aparecen con un menor tamaño que los tumores DLD-1 tratados.

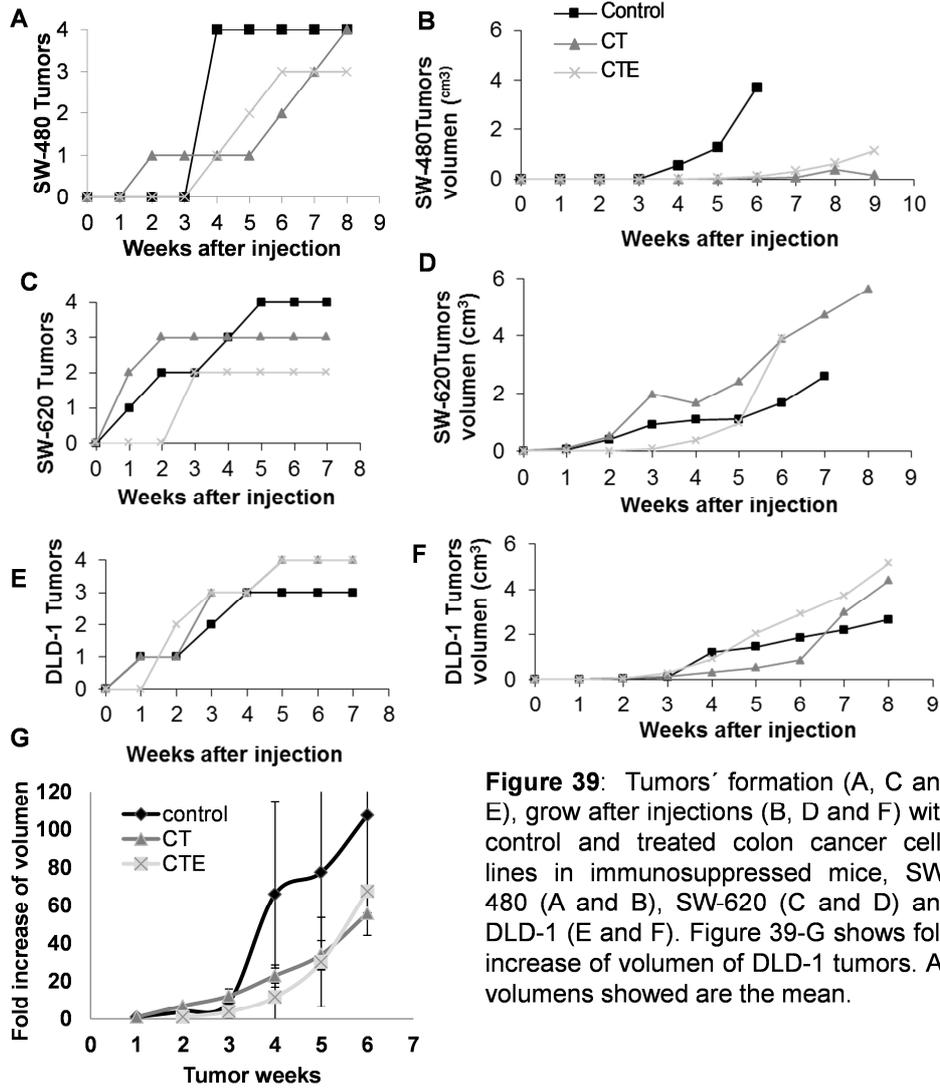


Figure 39: Tumors' formation (A, C and E), grow after injections (B, D and F) with control and treated colon cancer cells lines in immunosuppressed mice, SW-480 (A and B), SW-620 (C and D) and DLD-1 (E and F). Figure 39-G shows fold increase of volumen of DLD-1 tumors. All volumens showed are the mean.

Los tumores obtenidos han sido estudiados al igual que las líneas celulares utilizadas en este trabajo. Hemos estudiado la expresión de marcadores relacionados con CMTs, la población que presenta ciclos de división lentos, la resistencia a quimioterapéuticos y la capacidad para formar nuevos tumores en ratones inmunodeprimidos.

6.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS CMTS EN TUMORES XENOGRAFTS Y EFECTO DEL EXTREMO CARBOXILO TERMINAL DE LA PROTEÍNA PEDF.

6.2.1. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE CMTS EN TUMORES XENOGRAFTS

Se ha comparado el patrón de los marcadores BCRP1, EpCam, CD-133 y AC-133 en los tumores formados a partir de células DLD-1, SW-480 y SW-620 mediante citometría de flujo. Los resultados de los marcadores obtenidos en los tumores han sido comparados con la expresión de la línea celular de la que proceden. Además se han comparado los tumores CT y CTE con los tumores controles. Los resultados han sido obtenidos de al menos tres experimentos independientes ($n > 3$).

En los tumores formados a partir de células DLD-1 observamos un aumento en la expresión del marcador BCRP1 estadísticamente significativo en los tumores control ($2.20\% \pm 0.85$) respecto la línea celular DLD-1 ($0.33\% \pm 0.18$), con un p-valor de 0.01 (figura 40A). No observamos diferencias estadísticamente significativas en la expresión de la proteína BCRP-1 entre la línea DLD-1 y los tumores CT y CTE (figura 40A). Por otro lado, observamos diferencias estadísticamente significativas en la expresión de la proteína BCRP1 entre los tumores controles y los tumores tratados, tumores CT y CTE. El porcentaje de expresión de los tumores controles es de $2.20\% \pm 0.85$; $0.64\% \pm 0.18$ en los tumores CT y $0.70\% \pm 0.05$ en los tumores CTE, con un p-valor de 0.02 y 0.03 respectivamente (figura 40A).

En la expresión del marcador EpCam observamos una disminución estadísticamente significativa entre la línea DLD-1 ($99.87\% \pm 0.10$) y los tumores control ($96.24\% \pm 1.89$) y CTE ($97.87\% \pm 0.91$), con un p-valor de 0.02 en ambos casos (figura 40B).

En la expresión del marcador CD133 observamos un aumento estadísticamente significativo entre la línea DLD-1 ($0.33\% \pm 0.13$) y los tumores control ($1.01\% \pm 0.22$), con un p-valor de 0.007 (figura 40C). Por otro lado, observamos diferencias estadísticamente significativas en la expresión de la proteína CD133 entre los tumores controles y los tumores tratados, tumores CT y CTE. El porcentaje de expresión de los tumores controles es de $1.01\% \pm 0.22$; $0.46\% \pm 0.14$ en los tumores CT y $0.68\% \pm 0.32$ en los tumores CTE, con un p-valor de 0.014 y 0.03 respectivamente (figura 40C).

En la expresión del marcador AC133 observamos un aumento estadísticamente significativo entre la línea DLD-1 ($0.31\% \pm 0.09$) y los tumores control ($0.52\% \pm 0.15$), con un p-valor de 0.03 (figura 40D). Por otro lado, observamos diferencias estadísticamente significativas en la expresión de la

proteína AC133 entre los tumores controles ($0.52\% \pm 0.15$) y los tumores CTE ($0.22\% \pm 0.18$), con un p-valor de 0.008 (figura 40D).

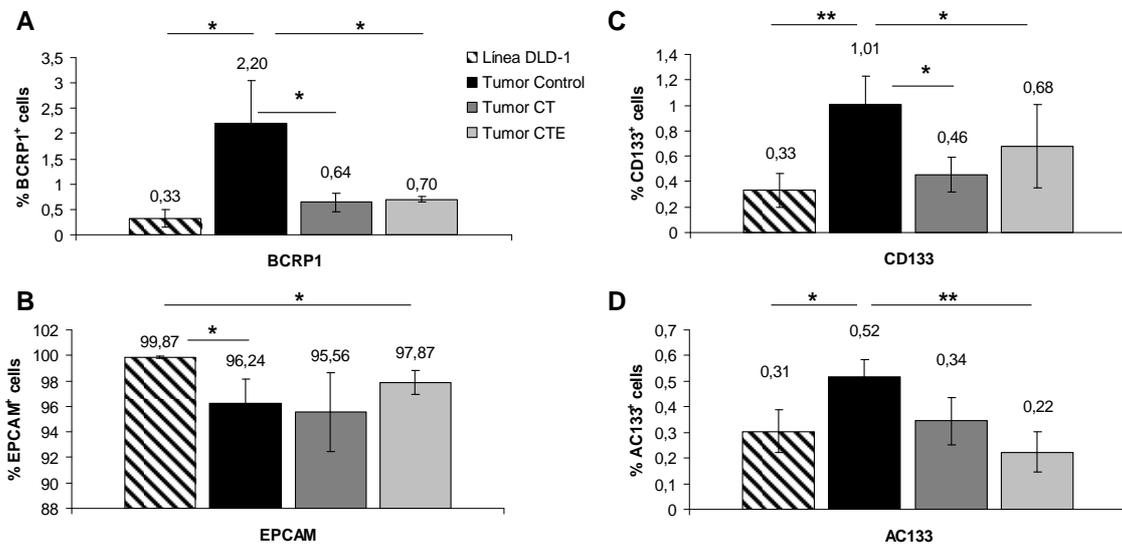


FIGURA 40: Percentage of cells expressing the putative CSC surface markers selected in DLD-1 cell line and DLD-1 tumours. The figure shows percentage of positive cells on DLD-1 xenografts compared with DLD-1 cell line. Expression of BCRP-1 (A), Epcam (B), CD133 (c) and AC133 (D). U-Mn test has been used for statical analysis: * p<0.05; ** p<0.01.

En los tumores formados a partir de células SW-480 observamos un aumento en la expresión del marcador BCRP1 estadísticamente significativo en los tumores control ($0.71\% \pm 0.15$) y en los tumores CTE (0.36 ± 0.09) respecto la línea celular SW-480 ($0.02\% \pm 0.01$), con un p-valor de 0.02 y 0.007 respectivamente (figura 41A). Por otro lado, observamos diferencias estadísticamente significativas en la expresión de la proteína BCRP1 entre los tumores controles y los tumores CT. El porcentaje de expresión de los tumores controles es de $0.71\% \pm 0.15$ y $0.10\% \pm 0.06$ en los tumores CT, con un p-valor de 0.04 (figura 41A).

En la expresión del marcador EpCam observamos una disminución estadísticamente significativa entre la línea DLD-1 ($99.77\% \pm 0.08$) y los tumores control ($94.94\% \pm 2.77$), tumores CT ($77.88\% \pm 3.64$) y tumores CTE ($98.42\% \pm 0.24$), con un p-valor de 0.009, 0.0009 y 0.01 respectivamente (figura 41B). Por otro lado, observamos una disminución estadísticamente significativa entre los tumores control ($99.94\% \pm 2.77$) y los tumores CT ($77.88\% \pm 3.64$) en la expresión de la proteína EpCam, con un p-valor de 0.04.

En la expresión del marcador CD133 y AC133 no observamos diferencias estadísticamente significativas (figura 41C y 41D).

▶ RESULTADOS

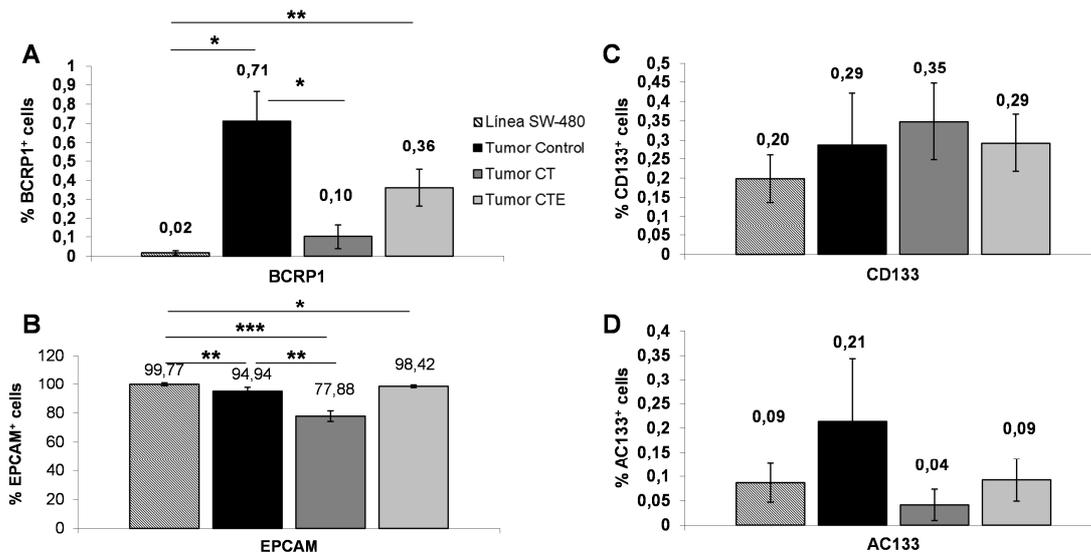


FIGURA 41: Percentage of cells expressing the putative CSC surface markers selected in SW-480 cell line and SW-480 tumours. The figure shows percentage of positive cells on SW-480 xenografts compared with SW-480 cell line. Expression of BCRP-1 (A), Epcam (B), CD133 (c) and AC133 (D). U-Mn test has been used for statical analysis: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

En los tumores formados a partir de células SW-620 observamos un aumento en la expresión del marcador BCRP1 estadísticamente significativo en los tumores CTE ($0.44\% \pm 0.17$) respecto la línea celular SW-620 ($0.13\% \pm 0.04$), con un p-valor de 0.04 (figura 42A). Por otro lado, observamos diferencias estadísticamente significativas en la expresión de la proteína BCRP1 entre los tumores controles y los tumores CT. El porcentaje de expresión de los tumores controles es de $0.27\% \pm 0.08$ y $1.20\% \pm 0.37$ en los tumores CT, con un p-valor de 0.049 (figura 42A).

En la expresión del marcador EpCam observamos una disminución estadísticamente significativa entre la línea SW-620 ($99.97\% \pm 0.02$) y los tumores control ($96.54\% \pm 1.40$), CT ($95.96\% + 3.36$) y CTE ($99.70\% \pm 0.17$), con un p-valor de 0.003, 0.03 y 0.01 respectivamente (figura 42B).

Al igual que lo ocurrido con la línea SW-620, los tumores procedentes de esta línea presentan una conversión de los marcadores CD133 y AC133, por lo que hemos realizado dos tipos de análisis para estos dos marcadores: marcadores altos y marcadores bajos.

En la expresión del marcador CD133, expresión elevada, observamos una disminución estadísticamente significativa entre la línea SW-620 ($93.65\% \pm 1.21$) y los tumores CTE ($35.17\% \pm 8.57$), con un p-valor de 0.007 (figura 42C). Por otro lado, observamos diferencias estadísticamente significativas en la expresión de la proteína CD133, expresión elevada, entre los tumores controles y los tumores CTE. El porcentaje de expresión de los tumores controles es de

83.89% \pm 7.05 y 35.17% \pm 8.57 en los tumores CTE, con un p-valor de 0.007 (figura 42C).

En la expresión del marcador AC133, expresión elevada, observamos una disminución estadísticamente significativa entre la línea SW-620 (92.25% \pm 1.37) y los tumores CTE (31.25% \pm 8.83), con un p-valor de 0.007 (figura 42D). Por otro lado, observamos diferencias estadísticamente significativas en la expresión de la proteína CD133 entre los tumores controles y los tumores CTE. El porcentaje de expresión de los tumores controles es de 81.20% \pm 8.10 y de 31.25% \pm 8.83 en los tumores CTE, con un p-valor de 0.01 (figura 42D).

En la expresión del marcador CD133, baja expresión, observamos un aumento estadísticamente significativo entre la línea SW-620 (0.10% \pm 0.02) y los tumores control (6.76% \pm 1.76), CT (4.75% \pm 0.90) y CTE (0.62% \pm 0.03), con un p-valor de 0.01, 0.02 y 0.04 respectivamente (figura 42E). Por otro lado, observamos diferencias estadísticamente significativas en la expresión de la proteína CD133, baja expresión, entre los tumores controles y los tumores CTE. El porcentaje de expresión de los tumores controles es de 6.76% \pm 1.76 y 0.62% \pm 0.03 en los tumores CTE, con un p-valor de 0.01 (figura 42E).

En la expresión del marcador AC133, baja expresión, observamos un aumento estadísticamente significativo entre la línea SW-620 (0.06% \pm 0.03) y los tumores control (5.93% \pm 1.54), tumores CT (4.75% \pm 1.00) y tumores CTE (0.62% \pm 0.09), con un p-valor de 0.007 (figura 42D).

▶ RESULTADOS

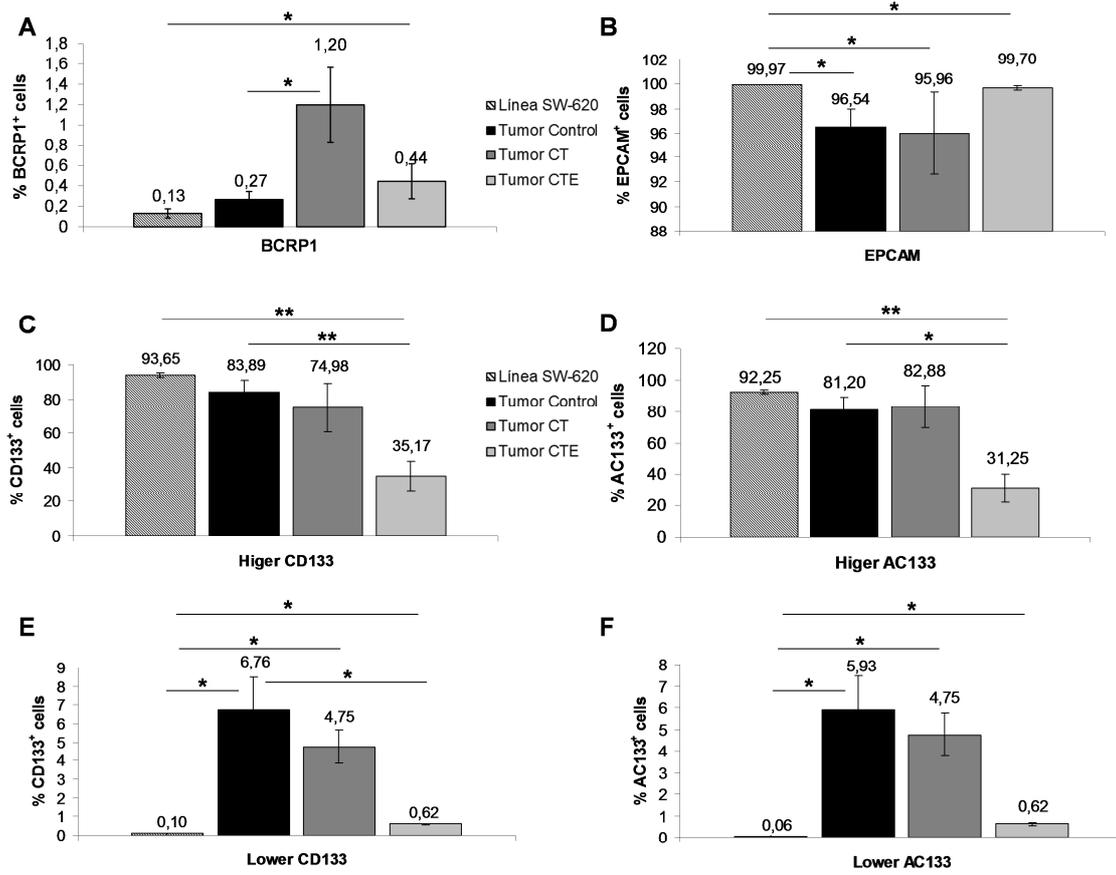


FIGURA 42: Percentage of cells expressing the putative CSC surface markers selected in SW-620 cell line and SW-620 tumours. The figure shows percentage of positive cells on SW-480 xenografts compared with SW-480 cell line. Expression of BCRP-1 (A), Epcam (B), higer CD133 (C), higer AC133 (D), lower CD133 (E) and lower AC133 (F). U-Mn test has been used for statical analysis: * p<0.05; ** p<0.01.

6.2.2. ESTUDIO DE LA POBLACIÓN DE CICLO LENTO Y EFECTO DEL EXTREMO CARBOXILO DE LA PROTEÍNA PEDF EN TUMORES XENOGRAFTS

Para estudiar la población de ciclo lento se ha utilizado la sonda vital DDAO, que se segrega a la descendencia mediante las divisiones celulares. La cuantificación de células que presentan ciclos lentos de división se cuantificó mediante citometría de flujo. El estudio se ha realizado comparando el porcentaje de células DDAO⁺ de los tumores controles respecto los tumores obtenidos a partir de las líneas celulares tratadas y, además, se han comparado los tumores con la línea original. Se han realizado al menos un mínimo de tres experimentos independientes ($n \geq 3$).

Los tumores obtenidos a partir de la línea celular DLD-1 no presentan diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de células DDAO⁺, respecto a la línea celular. Sin embargo, presentan diferencias estadísticamente significativas los tumores control ($0.8\% \pm 0.03$) y los tumores CT ($0.34\% \pm 0.05$) siendo el p-valor de 0.04 (figura 43A).

Los tumores obtenidos a partir de la línea SW-480 presentan menores porcentajes de células DDAO⁺ respecto a la línea SW-480, encontrando diferencias estadísticamente significativas entre el porcentaje de células de ciclo lento de la línea SW-480 ($1.45\% \pm 0.47$) y los tumores control ($0.21\% \pm 0.03$) con un p-valor de 0.03, los tumores CT ($0.41\% \pm 0.09$) y CTE ($0.21\% \pm 0.04$) con un p-valor de 0.01 en ambos casos (figura 43B). Además hemos encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los tumores controles y los tumores CT con un p-valor de 0.04 (Figura 43B).

En el estudio de la población de ciclo lento en los tumores obtenidos a partir de la línea SW-620 hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre la línea SW-620 ($1.51\% \pm 0.25$) y los tumores control ($0.34\% \pm 0.06$) y CT ($0.51\% \pm 0.26$), con un p-valor de 0.003 y 0.02 respectivamente (figura 43C). Además hay diferencias estadísticamente significativas entre los tumores control (0.34 ± 0.06) y los tumores CTE ($1.15\% \pm 0.30$), con un p-valor de 0.02 (figura 43C).

De manera global, las líneas celulares de estudio presentaron un mayor nivel de células con ciclos de división lentos que los tumores xenografts.(figura 43D) Las diferencias fueron estadísticamente significativas entre las líneas celulares ($1.15\% \pm 0.4$) y los tumores control (0.43 ± 0.08) y tumores CT (0.42 ± 0.1) siendo el p-valor de 0.003 en ambos casos.

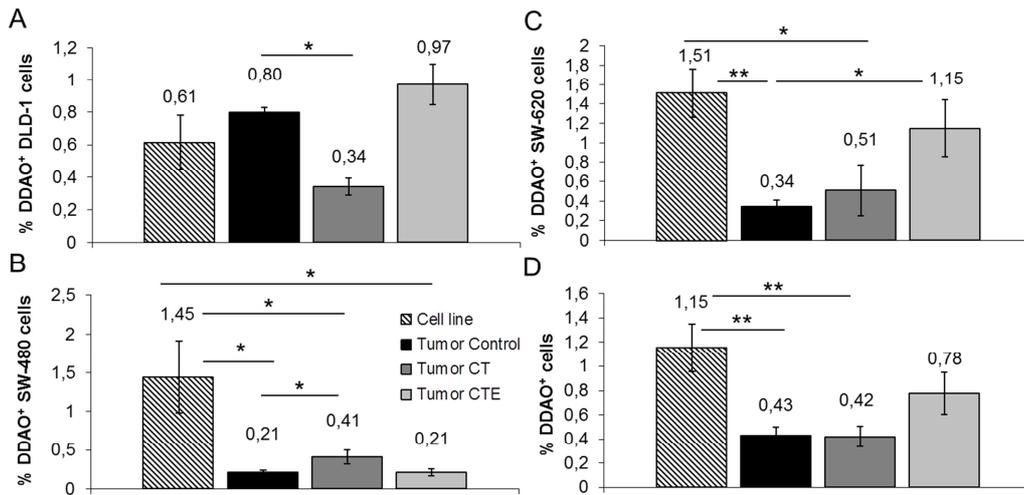


Figure 43: Percentage of DDAO+ cells in DLD-1 (A), SW-480 (B), SW-620 (C) and global colon cell lines (D) and their xenografts. U-Mn test has been used for statistical analysis: * p<0,05; **p<0,01.

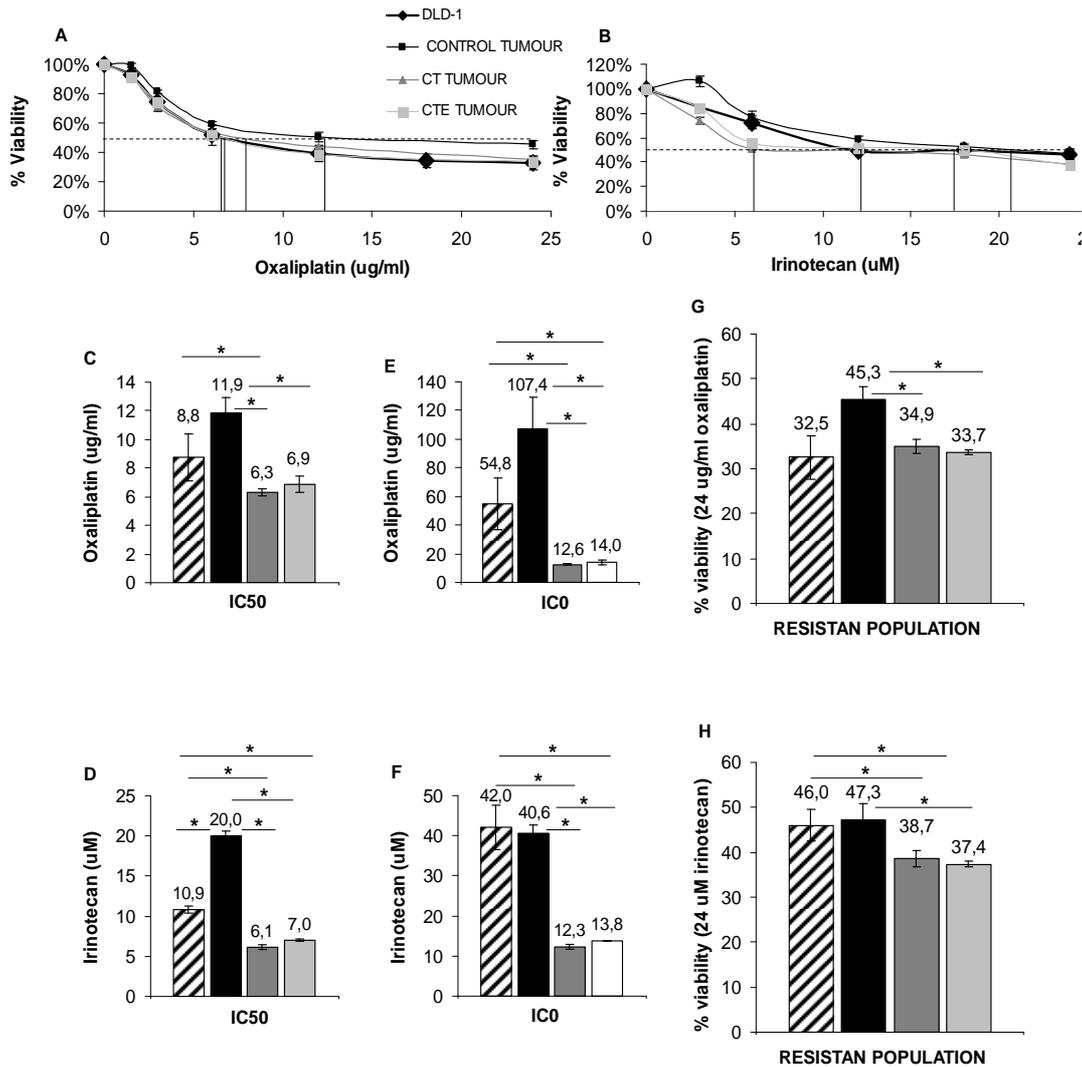
6.2.3. ESTUDIO DEL EFECTO AGUDO DEL EXTREMO CARBOXILO DE LA PROTEÍNA PEDF SOBRE LA RESISTENCIA EN TUMORES XENOGRAFTS

Para estudiar la resistencia de los diferentes tipos de tumores obtenidos hemos realizado curvas dosis-respuesta con dos quimioterapéuticos utilizados a día de hoy en el tratamiento de cáncer colorrectal, irinotecan y oxaliplatino. Además hemos calculado el IC50, el IC0 y la población residual de los fármacos, para los distintos tumores. El estudio se ha realizado por separado para los tumores obtenidos de cada línea, comparando los resultados de los tumores con los de la línea celular original y los tumores tratados (CT y CTE) con los tumores control.

En el estudio de los tumores DLD-1 observamos una mayor resistencia a oxaliplatino en tumores control respecto a la línea (n=3) y los tumores tratados (n=3) (figura 44A). Por otro lado, observamos una mayor resistencia a irinotecan de la línea DLD-1 (n=4) y el tumor control (n=3) que los tumores obtenidos a partir de células tratadas (n=3) (figura 44B). En el estudio del IC50 con el fármaco oxaliplatino observamos diferencias estadísticamente significativas entre la línea DLD-1 (8.78 ± 1.62 ug/ml) y los tumores procedentes de células tratadas crónicamente con CT (6.32 ± 0.23 ug/ml), con un p-valor de 0.02. Comparando los tumores entre sí, encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los tumores controles (11.87 ± 1.09 ug/ml) y los tumores obtenidos a partir del tratamiento crónico de células DLD-1 con CT (6.32 ± 0.23 ug/ml) y CTE (6.87 ± 0.58 ug/ml), con un p-valor de 0.02 en ambos casos (figura 44C). El cálculo del valor del IC50 con el fármaco

irinotecan muestra por un lado, diferencias estadísticamente significativas entre la línea celular DLD-1 (10.86 ± 0.45 uM) y los distintos tumores control (20.02 ± 0.61 uM), CT (6.11 ± 0.32 uM) y CTE (7.03 ± 0.10 uM), con un p-valor de 0.02 en los tres casos. Por otro lado, observamos diferencias estadísticamente significativas entre los tumores control y los tumores y los tumores CT y CTE, con un p-valor de 0.02 en ambos casos (figura 44D). En el estudio del IC₀ con el fármaco oxaliplatino observamos diferencias estadísticamente significativas entre la línea DLD-1 (54.77 ± 17.86 ug/ml) y los tumores procedentes de células tratadas crónicamente con CT (12.58 ± 0.30 ug/ml), con un p-valor de 0.02, y los tumores procedentes de células tratadas crónicamente con CTE (13.97 ± 1.45 ug/ml), con un p-valor de 0.02. Comparando los tumores entre sí, encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los tumores controles (107.37 ± 22.00 ug/ml) y los tumores obtenidos a partir del tratamiento crónico de células DLD-1 con CT y CTE, con un p-valor de 0.02 en ambos casos (figura 44E). El cálculo del valor del IC₀ con el fármaco irinotecan muestra, por un lado, diferencias estadísticamente significativas entre la línea celular DLD-1 (42.00 ± 5.58 uM) y tumores CT (12.28 ± 0.55 uM) y CTE (13.75 ± 0.12 uM), con un p-valor de 0.02 en ambos casos. Por otro lado, observamos diferencias estadísticamente significativas entre los tumores control (40.64 ± 2.05 uM) y los tumores y los tumores CT y CTE, con un p-valor de 0.02 en ambos casos (figura 44F). Por último, para la dosis máxima utilizada en oxaliplatino (24 ug/ml) no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad de las células resistentes entre la línea DLD-1 y los tumores. Hemos observado una disminución estadísticamente significativa en el número de células resistentes a oxaliplatino en los tumores CT (34.95 ± 1.49 %) y CTE (33.65 ± 3.94 %) respecto a los tumores control (45.27 ± 2.97 %) con un p-valor de 0.025 en ambos casos (figura 44G). Para la dosis máxima utilizada del fármaco irinotecan (24 uM), por un lado hay diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad celular entre la línea DLD-1 (45.98 ± 3.55 %) y los tumores formados a partir de células tratadas con CT (38.71 ± 1.82 %) y CTE (37.41 ± 0.58 %) con un p-valor de 0.04 (figura 44H). Por otro lado observamos diferencias estadísticamente significativas entre los tumores control (47.34 ± 3.64 %) y los tumores CTE, con un p-valor de 0.02 (figura 44H).

► RESULTADOS

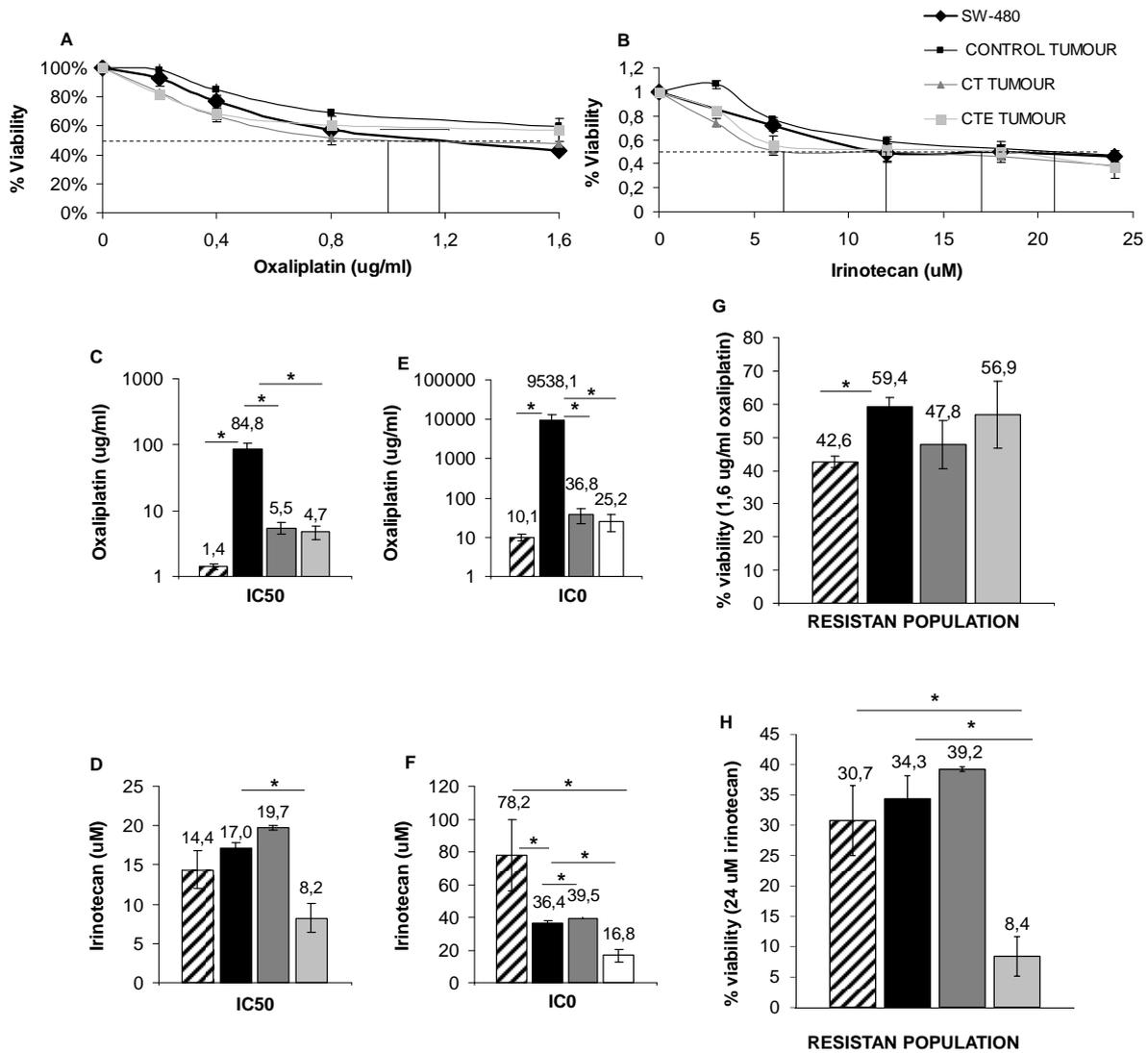


◆ DLD-1
 ■ CONTROL TUMOUR
 ▲ CT TUMOUR
 ▫ CTE TUMOUR

FIGURE 44: PEDF protein chronic effect in DLD-1 cell line on tumours formation. A and B: control behavior of line DLD-1 (diamonds) compared with control, carboxy-ter PEDF treatment (squares) CT and (triangles) CTE tumours. **C and D:** IC50 observed on tumours after treatments with oxaliplatin (C) and irinotecan (D) in combination with PEDF proteins. **E and F:** IC0 (drug concentration to remove total cell population) observed on tumours after treatments with oxaliplatin (E) and irinotecan (F) in combination with PEDF proteins. **G and H:** detected number of resistant cells on tumours to the treatments with oxaliplatin (G) and irinotecan (F) in combination with PEDF proteins. U-Mn test has been used for statistical analysis: * p<0,05.

En el estudio de los tumores SW-480 podemos observar la evolución de los tumores tratados (n=3) y la línea SW-480 (n=5) con el fármaco oxaliplatino (figura 45A) y con el fármaco irinotecan (figura 45B). Los resultados del IC50 con el fármaco oxaliplatino observamos diferencias estadísticamente significativas entre la línea SW-480 (1.42 ± 0.14 ug/ml) y los tumores procedentes de células sin tratar, control, (84.81 ± 21.92 ug/ml) con un p-valor de 0.01 (figura 45C). Comparando los tumores entre sí, encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los tumores controles y los tumores obtenidos a partir del tratamiento crónico de células SW-480 con CT (5.51 ± 1.02 ug/ml) y CTE (4.70 ± 1.08 ug/ml), con un p-valor de 0.02 en ambos casos (figura 45C). El cálculo del valor del IC50 con el fármaco irinotecan no muestra diferencias estadísticamente significativas entre la línea celular SW-480 y los distintos tumores control, CT y CTE (figura 45D). Por otro lado, observamos diferencias estadísticamente significativas entre los tumores control (17.05 ± 0.76 uM) y los tumores CTE (8.21 ± 1.81 uM), con un p-valor de 0.02 (figura 45D). En el estudio del IC0 con el fármaco oxaliplatino observamos diferencias estadísticamente significativas entre la línea SW-480 (10.12 ± 1.94 ug/ml) y los tumores procedentes de células no tratadas, tumores control (9538.12 ± 3817.19 ug/ml) con un p-valor de 0.01 (figura 45E). Comparando los tumores entre sí, encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los tumores controles y los tumores obtenidos a partir del tratamiento crónico de células SW-480 con CT (36.83 ± 15.35 ug/ml) y CTE (25.23 ± 11.69 ug/ml), con un p-valor de 0.02 en ambos casos (figura 45E). El cálculo del valor del IC0 con el fármaco irinotecan muestra, por un lado, diferencias estadísticamente significativas entre la línea celular SW-480 (78.18 ± 21.70 uM) y tumores control (36.42 ± 1.26 uM) y tumores CTE (16.75 ± 3.83 uM), con un p-valor de 0.02 y 0.01 respectivamente (figura 45F). Por otro lado, observamos diferencias estadísticamente significativas entre los tumores control y los tumores CT (39.52 ± 0.20 uM) y CTE, con un p-valor de 0.02 en ambos casos (figura 45F). Por último, para la dosis máxima utilizada en oxaliplatino (1.6 ug/ml) hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad de las células resistente entre la línea SW-480 (42.62 ± 1.60 %) y los tumores control (59.39 ± 2.49 %) con un p-valor de 0.01 (figura 45G). Para la dosis máxima utilizada del fármaco irinotecan (24 uM), hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre la línea celular SW-480 (30.7 ± 5.8 uM) y los tumores CTE (8.39 ± 3.27 uM), con un p-valor de 0.03 por un lado y, por otro lado, entre los tumores controles (34.26 ± 3.80 uM) y los tumores CTE con un p-valor de 0.04 (figura 45H).

RESULTADOS



■ SW-480
 ■ CONTROL TUMOUR
 ■ CT TUMOUR
 □ CTE TUMOUR

FIGURE 45: PEDF protein chronic effect in SW-480 cell line on tumours formation. A and B: control behavior of line DLD-1 (diamonds) compared with control, carboxy-ter PEDF treatment (squares) CT and (triangles) CTE tumours. C and D: IC50 observed on tumours after treatments with oxaliplatin (C) and irinotecan (D) in combination with PEDF proteins. E and F: IC0 (drug concentration to remove total cell population) observed on tumours after treatments with oxaliplatin (E) and irinotecan (F) in combination with PEDF proteins. G and H: detected number of resistant cells on tumours to the treatments with oxaliplatin (G) and irinotecan (F) in combination with PEDF proteins. U-Mn test has been used for statistical analysis: * p<0,05.

En el estudio de los tumores SW-620 no observamos una mayor resistencia del tumor control (n=5) respecto la línea (n=3) y los tumores tratados CT(n=4) y CTE (n=5) con el fármaco oxaliplatino (figura 46A), por otro lado, observamos una mayor resistencia a irinotecan de la línea SW-620 (n=3) que los tumores control (n=3), los tumores obtenidos a partir de células tratadas con CT (n=4) y CTE (n=3) (figura 46B). En el estudio del IC50 con el fármaco oxaliplatino observamos diferencias estadísticamente significativas entre la línea SW-620 (1.40 ± 0.24 ug/ml) y los tumores procedentes de células sin tratar, control, (3.06 ± 0.36 ug/ml) con un p-valor de 0.005 (figura 46C). Comparando los tumores entre sí, encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los tumores controles y los tumores obtenidos a partir del tratamiento crónico de células SW-620 con CT (1.59 ± 0.21 ug/ml) y CTE (1.91 ± 0.23 ug/ml), con un p-valor de 0.005 y 0.02 respectivamente (figura 46C). El cálculo del valor del IC50 con el fármaco irinotecan no muestra diferencias estadísticamente significativas entre la línea celular SW-480 y los distintos tumores ni en la comparación entre los tumores control con los tumores CT y CTE (figura 46D). En el estudio del IC0 con el fármaco oxaliplatino observamos diferencias estadísticamente significativas entre la línea SW-620 (41.25 ± 30.78 ug/ml) y los tumores procedentes de células no tratadas, tumores control (56.87 ± 13.91 ug/ml), con un p-valor de 0.003 (figura 46E). Comparando los tumores entre sí, encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los tumores controles y los tumores obtenidos a partir del tratamiento crónico de células DLD-1 con CT (14.63 ± 3.35 ug/ml) y CTE (23.10 ± 5.46 ug/ml), con un p-valor de 0.007 y 0.014 respectivamente (figura 46E). El cálculo del valor del IC0 con el fármaco irinotecan muestra diferencias estadísticamente significativas entre la línea SW-620 (158.43 ± 15.51 uM) y los tumores control (2180.76 ± 467.98 uM) y los tumores CT (4258.78 ± 3340.35 uM) con un p-valor de 0.04 en ambos casos (figura 46F). Por último, para la dosis máxima utilizada en oxaliplatino (3.2 ug/ml) hemos encontrado, por un lado, diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad de las células resistente entre la línea SW-620 (50.12 ± 1.37 %) y los tumores CTE (36.88 ± 1.87 %) con un p-valor de 0.01 (figura 46G). Por otro lado, hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los tumores control (45.61 ± 1.85 %) y los tumores CTE, con un p-valor de 0.01 (figura 46G). Para la dosis máxima utilizada del fármaco irinotecan (24 uM), por una lado hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre la línea SW-620 (64.70 ± 5.15 %) y los tumores procedentes de células sin tratar, tumores control, (29.25 ± 1.52 %) con un p-valor de 0.0005 (figura 46H). Por otro lado, hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los tumores control y los tumores procedentes de células tratadas previamente con CTE (52.09 ± 1.59 %), con un p-valor de 0.02 (figura 46H).

▶ RESULTADOS

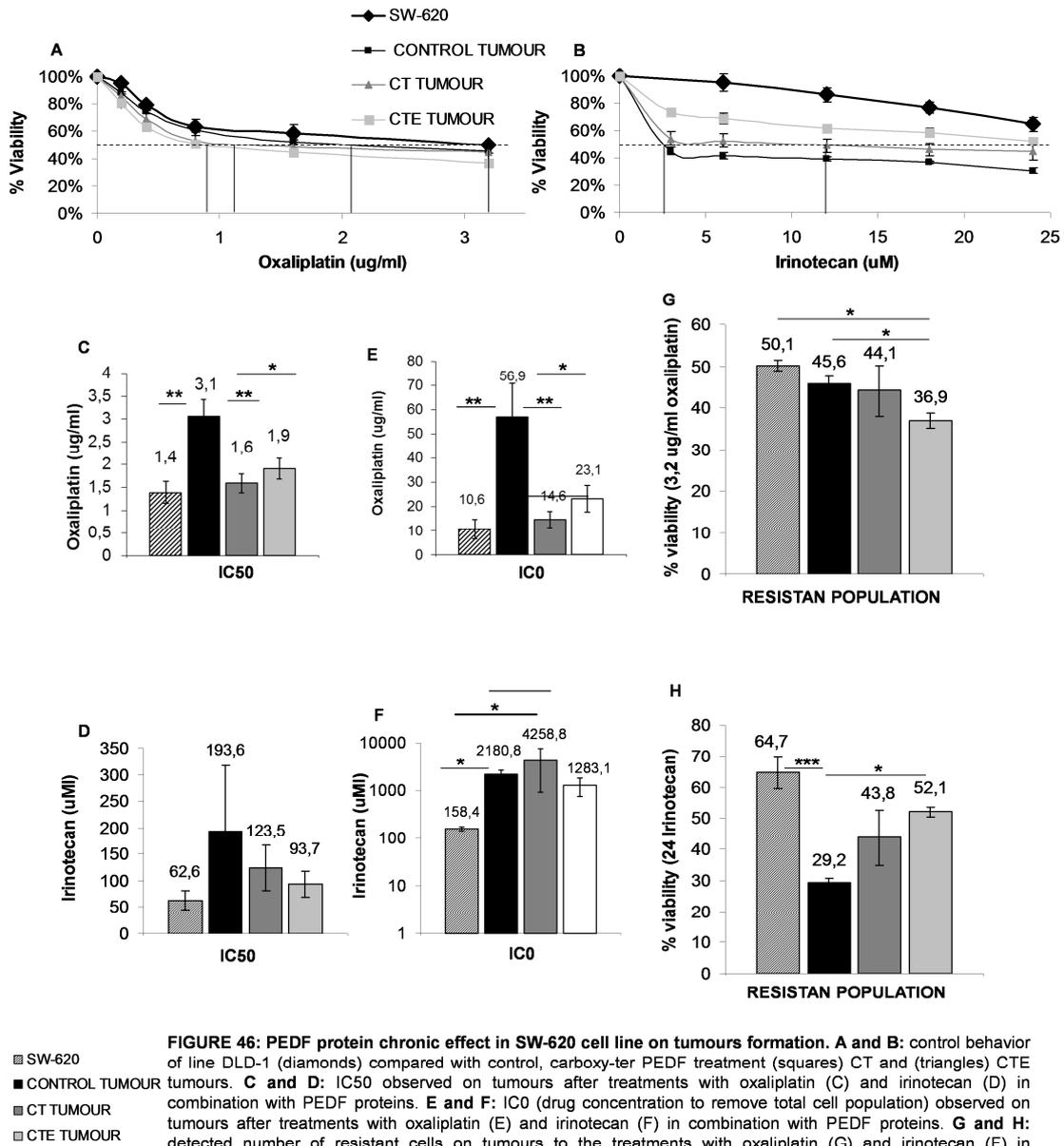


FIGURE 46: PEDF protein chronic effect in SW-620 cell line on tumours formation. A and B: control behavior of line DLD-1 (diamonds) compared with control, carboxy-ter PEDF treatment (squares) CT and (triangles) CTE tumours. **C and D:** IC50 observed on tumours after treatments with oxaliplatin (C) and irinotecan (D) in combination with PEDF proteins. **E and F:** IC0 (drug concentration to remove total cell population) observed on tumours after treatments with oxaliplatin (E) and irinotecan (F) in combination with PEDF proteins. **G and H:** detected number of resistant cells on tumours to the treatments with oxaliplatin (G) and irinotecan (F) in combination with PEDF proteins. U-Mn test has been used for statistical analysis: * p<0,05.

6.2.4. ESTUDIO DE LA TUMOROGENICIDAD DE LOS TUMORES XENOGRAFTS

Para estudiar la capacidad de formar tumores de los tumores obtenidos a partir de las inyecciones de células no tratadas (tumores control) y las inyecciones de células tratadas previamente de manera crónica con el extremo carboxilo terminal de la proteína PEDF (tumores CT y tumores CTE) realizamos nuevas inyecciones de células procedentes de estos tumores. En todos los casos las inyecciones fueron de 5000 células en ratones inmunodeprimidos. Los tumores formados se reflejan en la tabla 19. Obtuvimos un total de 13 tumores de un total de 19 inyecciones realizadas, 6 formados a partir de tumores DLD-1, 2 formados a partir de tumores SW-480 y 5 de tumores SW-620. De las 19 inyecciones realizadas, 7 fueron de tumores DLD-1, 3 inyecciones de tumores DLD-1 control, formando 3 tumores con una frecuencia de 1; 2 inyecciones de tumores DLD-1 CT, formando 2 tumores con una frecuencia de 1; y dos inyecciones de tumores DLD-1 CTE, formando 1 tumor con una frecuencia de 0.5. Del total de inyecciones realizadas 5 fueron de tumores SW-480, 2 inyecciones de tumores SW-480 control, formando 1 tumor con una frecuencia de 0.5; 1 inyección de tumor SW-480 CT, formando 1 tumor siendo la frecuencia de 1; y 2 inyecciones de tumores SW-480 CTE, no formando ningún tumor con una frecuencia de 0. Del total de inyecciones realizadas 7 fueron de tumores SW-620, 2 inyecciones de tumores SW-620 control, formando 2 tumores con una frecuencia de 1; 2 inyecciones de tumores SW-620 CT, formando 2 tumores con una frecuencia de 1; y 3 inyecciones de tumores SW-620 CTE, de las cuales se formó un único tumor, siendo la frecuencia de formación de tumores de 0.33.

TABLA 19: Tabla de frecuencia de formación de tumores en ratones inmunodeprimidos a partir de tumores procedentes de la inoculación de células tratadas con el extremo C-terminal de PEDF y células sin tratar (control). Se muestra el número de células inoculadas y el número de tumores formados para cada uno de los tumores inyectados.

INJECTED TUMOR	DLD-1 TUMOR			SW-480 TUMOR			SW-620 TUMOR		
	Control	CT	CTE	Control	CT	CTE	Control	CT	CTE
5000 cells	3/3	2/2	1/2	1/2	1/1	0/2	2/2	2/2	1/3
Total frequency	1	1	0,5	0,5	1	0	1	1	0,3333

De manera global, obtuvimos un total de 6/7 tumores controles, 5/5 tumores CT, y 2/7 en tumores CTE (tabla 20). La frecuencia de formación de tumor fue de 0.86 en los tumores controles, 1 en tumores CT, y de 0.29 en los tumores CTE (tabla 20).

► RESULTADOS

TABLA 20: Tabla de frecuencia global de formación de tumores en ratones inmunodeprimidos a partir de tumores procedentes de la inoculación de células tratadas con el extremo C-terminal de PEDF y células sin tratar. Se muestra el tratamiento recibido, el número de tumores formados y la frecuencia.

TUMOR	NUMBER OF TUMORS	FRECUENCY
CONTROL	6/7	0,86
CT	5/5	1
CTE	2/7	0,29

Del total de inyecciones realizadas, el 37% fueron de tumores controles. De éstos, el 32% formaron tumores (T), mientras que el 5% no formaron tumores (NT) (figura 47 A). El 26% de las inyecciones realizadas fueron de tumores CT, y todos ellos formaron tumores (T) (figura 47A). Por último, el 37% de las inyecciones realizadas fueron de tumores CTE. De éstas, el 11% formaron tumores (T), mientras que el 26% no formaron tumores (NT) (figura 47A).

Los tamaños de los tumores no mostraron diferencias estadísticamente significativas, aunque de manera global, vemos menores volúmenes medios en los tumores formados a partir de tumores CT y CTE que aquellos tumores formados de tumores control (figura 47B).

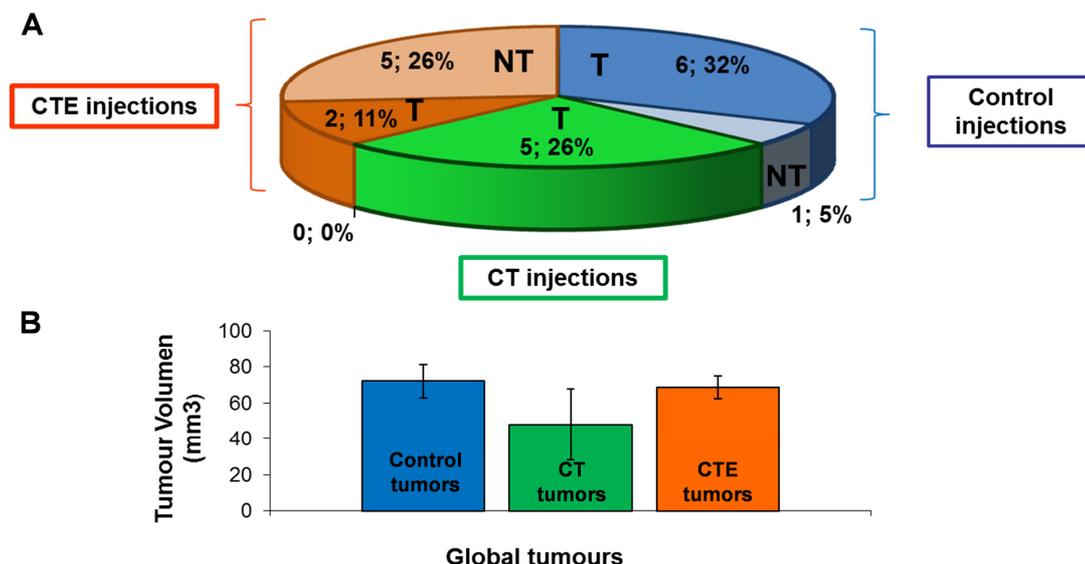


Figure 47: Tumors' formation and volumen. The sector shows the injections produced by each treatment and the formed and no formed tumors for each one (A). The histogram shows the different tumors' volumen (mm³) (B).

6.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS CMTS EN LOS TUMORES FORMADOS A PARTIR DE INYECCIONES DE TUMORES XENOGRATS Y EFECTO DEL EXTREMO CARBOXILO DE LA PROTEÍNA PEDF SOBRE LA POBLACIÓN DE CMTS.

6.3.1 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES DE ESTUDIO EN RE-XENOGRATS

El último paso que realizamos con los tumores obtenidos fue la cuantificación de los marcadores asociados a las propiedades de células madre tumorales. Los resultados obtenidos fueron muy diferentes entre los distintos tumores, incluso en aquellos que proceden de tumores obtenidos a partir de similares inyecciones, poniendo de manifiesto la gran heterogeneidad celular existente en los tumores (figura 48).

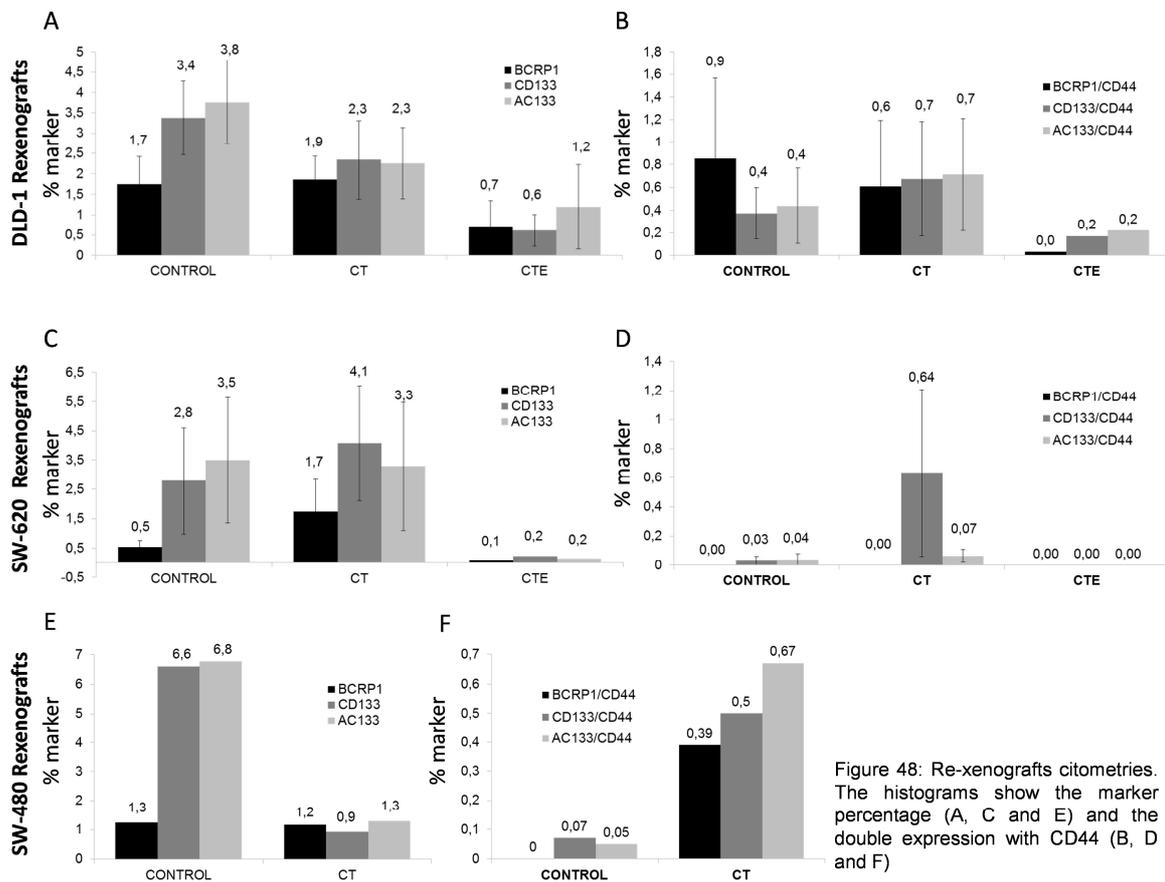


Figure 48: Re-xenografts cytometries. The histograms show the marker percentage (A, C and E) and the double expression with CD44 (B, D and F)

6.4 ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS BIOMARCADORES AC133 Y BCRP1 EN LA FORMACIÓN DE TUMORES

Para evaluar el efecto de nuestros marcadores en el proceso de formación de tumores separamos la línea celular HT-29 en subpoblaciones celulares AC133⁺, BCRP1⁺ y AC133⁻/BCRP1⁻ utilizando para ello un citómetro-sorter. Las subpoblaciones separadas fueron inyectadas en ratones inmunodeprimidos tal y como se muestra en la tabla 21. Además, se realizó una inyección control en la que únicamente se inoculó matrigel, para verificar que éste no era responsable de la formación de tumores en los ratones. La frecuencia de la formación de tumores observada fue de 1 en las subpoblaciones AC133⁺, BCRP1⁺ y AC133⁻/BCRP1⁻, no observando ninguna diferencia entre las inyecciones de población positiva y la doblemente negativa.

TABLA 21: Tabla de frecuencias de formación de tumores en ratones inmunodeprimidos a partir de subpoblaciones celulares de la línea HT-29. Se muestra el número de tumores formados, las inyecciones realizadas y la frecuencia.

1500 INJECTED CELLS	TUMORS/INJECTIONS MICE	FREQUENCY
HT-29 AC133 ⁺	2/2	1
HT-29 BCRP1 ⁺	1/1	1
HT-29 AC133 ⁻ /BCRP1 ⁻	2/2	1

Los ratones inyectados fueron controlados semanalmente tras la realización de las inyecciones en peso y también en la aparición de tumor, además los tumores eran medidos semanalmente hasta el sacrificio del animal (tabla 22 y 23). Los ratones no presentaron diferencias en los pesos y tampoco observamos diferencias en el tamaño de los tumores formados.

TABLA 22: Tabla de evolución semanal de los pesos de los ratones inyectados. Muestra la subpoblación inyectada, tumores formados y la medida de los pesos desde la semana 0 hasta la semana 12.

Ratón	Células	Tumor	Peso ratones inyectados (gramos)												
			Número de semanas												
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	HT-29 AC133/ BCRP1 ⁻	T1, T2 Y T3	34,7	32.6	34	33.4	33.5	34.6	35	35.1	35.3	35.4			
2	HT-29 AC133 ⁺	T4 y T5	34,8	34	35.6	36	36.3	36.5	38	37.6	37.8	37.7			
3	HT-29 BCRP1 ⁺	T6	31,4	31.9	33	33.8	33	33.9	33.3	33.2	33.3	35	35.2	35	35.1
4	Control No células	No Tumor	30,7	30.9	34.7	32.8	32.7	33.2	33.3	34	34	34.1	34.3	34.5	35

TABLA 23: Tabla de evolución semanal de los volúmenes de los tumores. En la tabla se muestra la subpoblación inyectada, número de tumor formado y el volumen de los tumores en cm^3 desde la semana 0 hasta la semana 12.

Ratón	Células	Tumor	Volumen tumores (cm^3)												
			Número de semanas												
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	HT-29 AC133/ BCRP1 ⁻	1	0	0	0	0	0.26	0.2741	0.2916	0.624	0.832	1.664			
		2	0	0	0	0.0416	0.0416	0.2496	0.364	0.728	0.9984	1.2162			
		3	0	0	0	0	0.0416	0.0416	0.0416	0.0936	0.0972	0.4992			
2	HT-29 AC133 ⁺	4	0	0	0	0.0416	0.26	0.468	0.52	0.832	0.9984	1.1232			
		5	0	0	0	0.2106	0.3328	0.5824	0.6656	0.832	0.832	1.248			
3	HT-29 BCRP1 ⁺	6	0	0	0	0	0	0	0.0208	0.0832	0.1664	0.2912	0.5616		
4	Control No células	No tumor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Los ratones fueron sacrificados transcurridas 9 ó 10 semanas tras la realización de las inyecciones, a excepción del ratón control, en el que únicamente se inyectó el matrigel, que fue sacrificado la semana 12. En el ratón 1 (HT-29 AC133⁻/BCRP1⁻) se observaba la formación de tres tumores, dos de ellos muy juntos (tumor 1 y tumor 2) debido probablemente a la inyección (figura 49). La última medida de los tumores se realizó con los tumores extraídos de los ratones (figura 49).

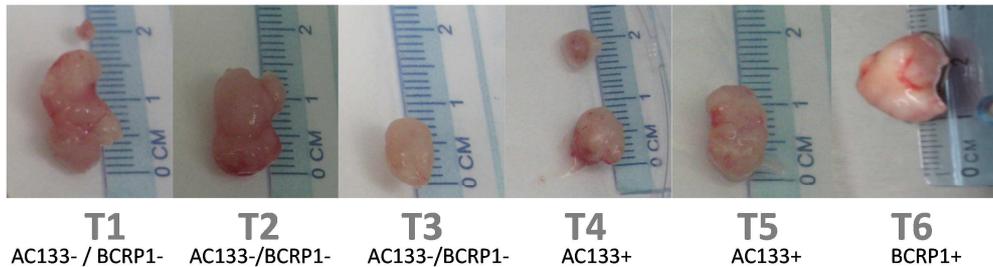


Figure 49: Tumours formation from HT-29 cell line subpopulation injections. AC133⁻/BCRP1⁻, AC133⁺ and BCRP1⁺ cells form tumours in Foxⁿ1nu mice. The tumours were measured last time after extraction (B)

Una vez extraídos los tumores, éstos fueron procesados para la cuantificación de marcadores asociados a las propiedades de las CMTs y puestos en cultivo. Cabe destacar que las células del tumor 3 (tumor HT-29 BCRP1⁻/AC133⁻) no fueron viables en cultivo.

6.4.1. CUANTIFICACIÓN DE LOS MARCADORES DE ESTUDIO EN LOS TUMORES FORMADOS A PARTIR DE SUBPOBLACIONES CELULARES DE LA LÍNEA HT-29

Los tumores obtenidos fueron analizados mediante citometría de flujo para cuantificar los marcadores asociados a las características de las células madre tumorales el día de la extracción (0 DIV) (figura 50). Los resultados obtenidos fueron muy heterogéneos, incluso para aquellos tumores que proceden de subpoblaciones celulares idénticas. Por ejemplo, los tres tumores doblemente negativos, presentaron expresiones de CD133 y AC133 muy diferentes (figura 50)

► RESULTADOS

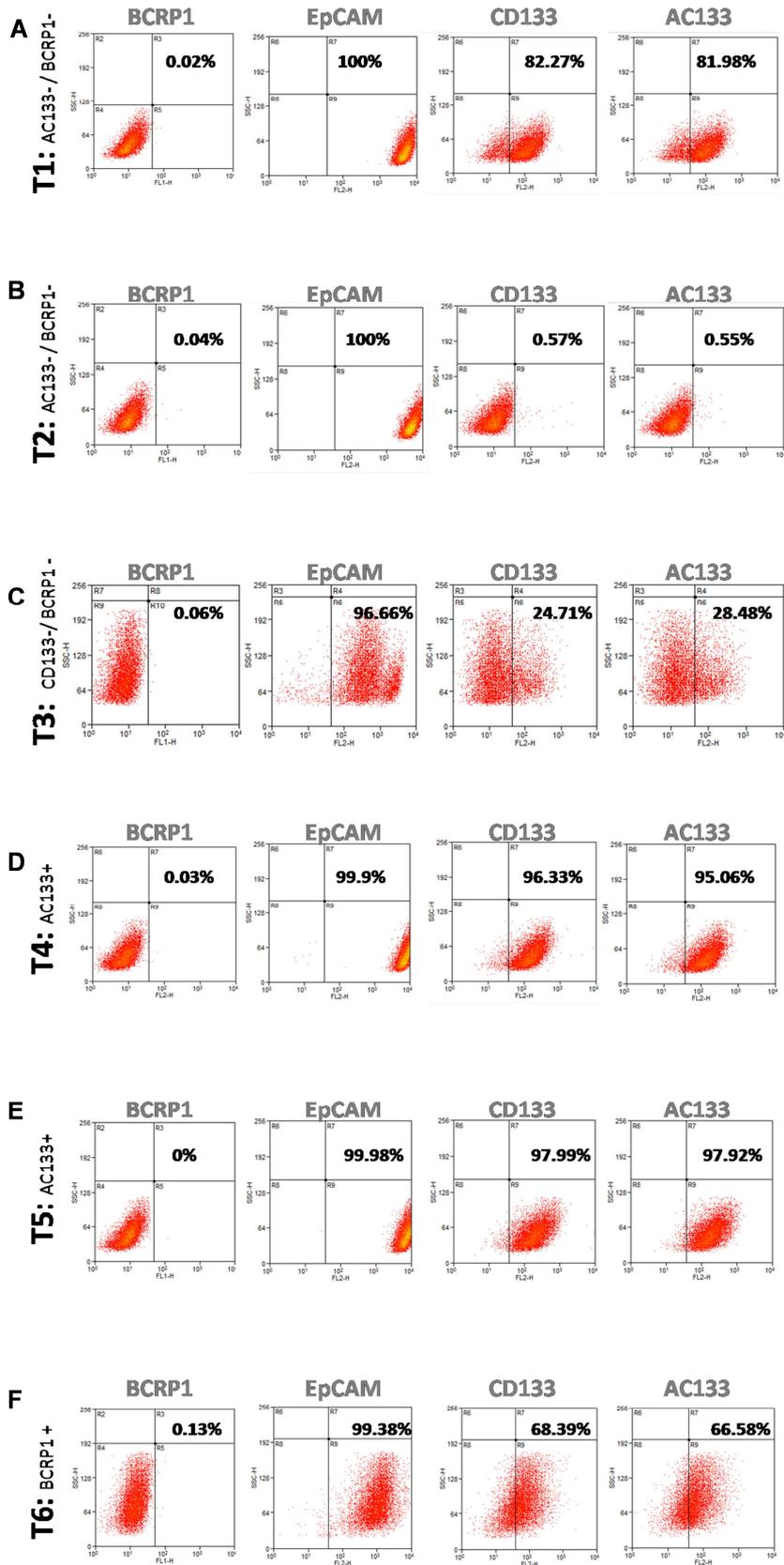


Figure 50: Expression of CSC marker in HT-29 AC133/BCRP1⁻ tumours (A, B and C), HT-29 AC133⁺ tumours (D and F), HT-29 BCRP1⁺ tumour (G).

Los resultados obtenidos de las citometrías realizadas a los xenografts a 0DIV se analizaron estadísticamente mediante el test t-student comparando las citometrías realizadas a los tumores procedentes de inyecciones de células HT-29 BCRP1⁻/AC133⁻, tumores doble negativos, (n=7), tumores procedentes de inyecciones de células HT-29 BCRP1⁺ (n=4) y tumores procedentes de inyecciones de células HT-29 AC133⁺ (n=6). En cuanto al marcador Epcam no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos de tumores (figura 51A), sin embargo si observamos diferencias estadísticamente en el resto de marcadores. El marcador CD133 presenta diferencias estadísticamente significativas entre los tumores doble negativos (28.59% ± 11.05) y los tumores BCRP1⁺ (85.71% ± 6.16), con un p-valor de 0.001 (figura 51A). El marcador AC133 también presenta diferencias estadísticamente significativas entre los tumores doblemente negativos (25.40% ± 11.16) y los tumores positivos, BCRP1⁺ (83.54% ± 6.35) y AC133⁺ (63.11% ± 14.41), con un p-valor de 0.001 y 0.03 respectivamente (figura 51A). Por último, el marcador BCRP1 muestra una expresión más elevada estadísticamente significativa en el tumor formado a partir de células HT-29 BCRP1⁺ (0.88% ± 0.04) respecto a los otros dos grupos de tumores, los doblemente negativos (0.06% ± 0.02) y los AC133⁺ (0.09% ± 0.04), con un p-valor de 0.025 en ambos casos (figura 51B).

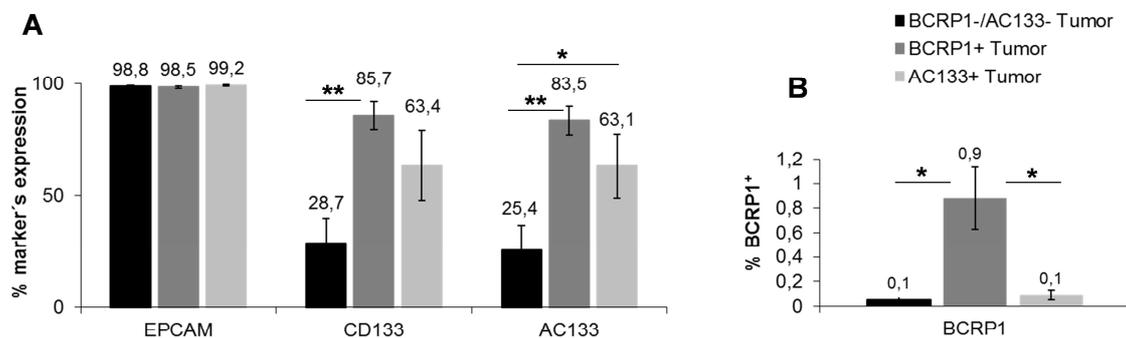


Figure 51: The CSC marker in 0 DIV HT-29 xenografts. The histograms show the expression of EPCAM, CD133, AC133 (A) and BCRP1 (B) of BCRP1⁻/AC133⁻ tumors (n=7), BCRP1⁺ tumors (n=4) and AC133⁺ tumors (n=6). U-Mn test has been used for statistical analysis: * p<0,05; ** p<0,005.

Hemos comprobado que la expresión de los diferentes marcadores utilizados en este estudio cambia con los días del cultivo de los tumores. La siguiente figura (figura 52) muestra la variación de expresión de los marcadores observada entre el día de la extracción de los tumores (0 DIV) con el tercer y sexto día de cultivo, para cada uno de los tumores obtenidos, a excepción del tumor 3 que, como ya se ha explicado anteriormente, no fue viable en cultivo. Respecto al marcador BCRP1 podemos destacar el aumento del marcador en el tumor 6, tumor procedente de la inyección de células HT-29 BCRP1⁺ (figura 52A). Para los marcadores CD133 y AC133 observamos un aumento de la expresión con el paso de los días, sin embargo los tumores 2 y 5 presentan un

► RESULTADOS

nivel máximo de expresión a los 3DIV (figura 52B y C). El estudio del marcador Epcam no mostró cambios de expresión con el tiempo.

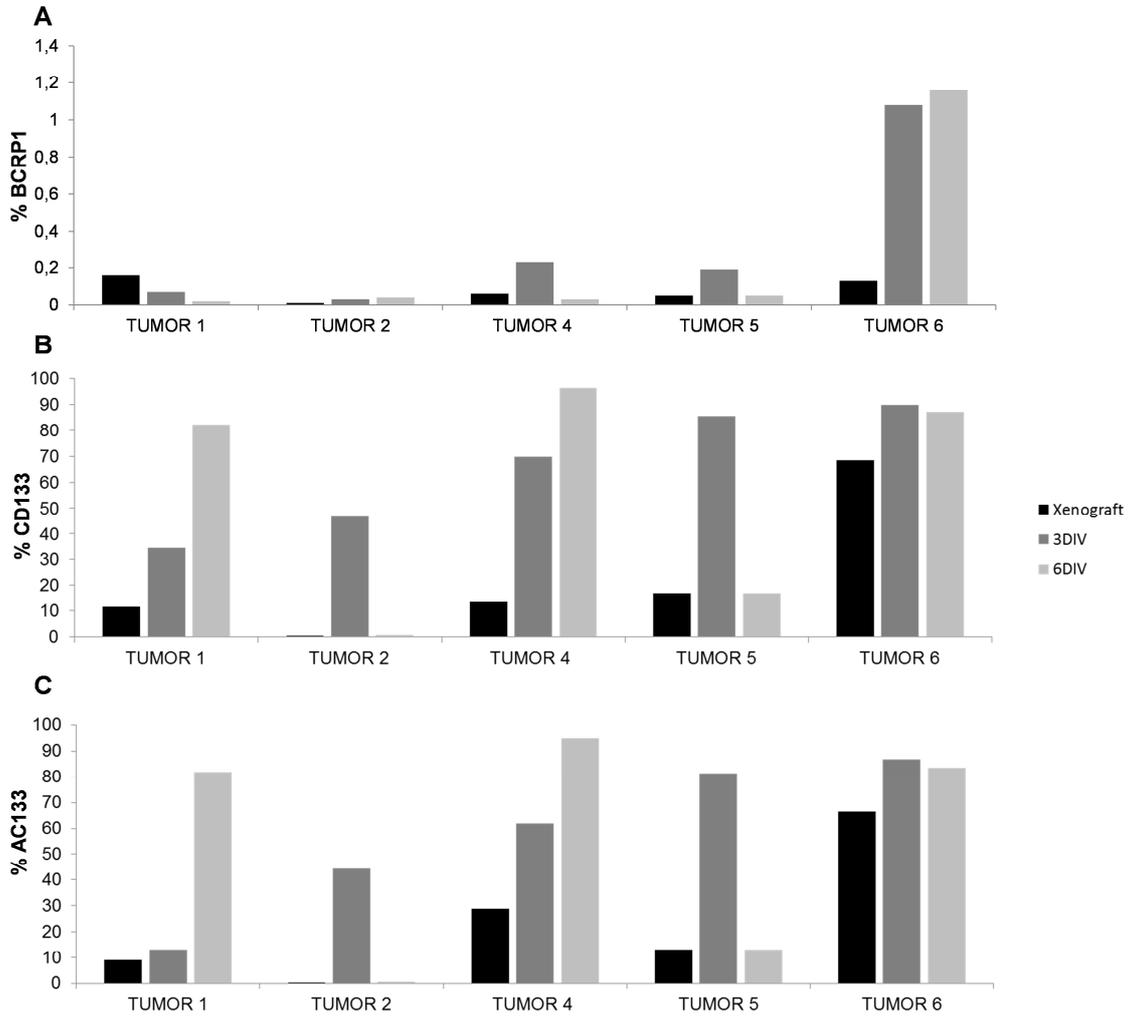


Figure 52: The CSC marker expressions change in the time in tumours. The histograms show the expression of BCRP1 (A), CD133 (B), AC133 (C) and AC133 (D) in xenografts and their cultures at 3DIV and 6DIV.

6.5 DETECCIÓN DE CMT EN SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON ENFERMEDAD NEOPLÁSICA COLORRECTAL

EL cáncer colorrectal presenta diferentes tasas de recaída en función del estadio de la enfermedad. En la actualidad no se han encontrado factores pronóstico que nos ayuden a predecir con exactitud el riesgo individual de los pacientes. Debido al elevado índice de recaída de los pacientes es necesario encontrar, rápidamente, un factor pronóstico, que nos ayude a detectar qué pacientes están en riesgo de recaída, para anticiparnos a la enfermedad y poder controlarla lo antes posible.

En la actualidad existe un método de detección de células tumorales en sangre, Veridex®, aprobado por la FDA, pero no implementado en la mayoría de los centros sanitario debido a su alto coste y también a su baja especificidad. Por ello, en el presente trabajo, hemos tratado de caracterizar células iniciadoras de tumores, con marcadores de superficie que han sido relacionados con las características de la célula madre y/o la célula madre tumoral. En este trabajo, las proteínas BCRP1, EpCAM y CD133 han sido seleccionadas por sus implicaciones en resistencia a quimioterapéuticos, transición epitelio-mesénquima y autorrenovación respectivamente. Estas células han sido localizadas en sangre periférica de pacientes diagnosticados de adenocarcinoma colorrectal. El porcentaje de células que expresan los marcadores de estudio se determinó mediante citometría de flujo. Para ello, se aisló la fracción de células nucleadas a partir de 6 mL de sangre periférica. Las células se incubaron con anticuerpos anti-BCRP1 (conjugado con fluoresceína tiosocianato, FITC, o conjugado a ficoeritrina PE), anticuerpos anti-EpCAM (conjugado con ficoeritrina PE), anticuerpos anti-CD133 (conjugado con ficoeritrina PE) y anticuerpos anti-AC133 (conjugado con ficoeritrina PE). Finalmente, la presencia de estos marcadores se analizó mediante citometría de flujo.

6.5.1. CLASIFICACIÓN DE LOS PACIENTES DE ESTUDIO

Se han analizado 258 muestras de un total de 56 pacientes con neoplasia colorrectal. En la tabla 24 aparece un resumen de los pacientes que donaron sus muestras de sangre para el estudio. Se muestra la edad, género y supervivencia media de los pacientes, así como datos de los tumores: localización, estadio y metástasis.

► RESULTADOS

Tabla 24: Resumen de las características de los pacientes (n=56). Se muestra la edad, género, localización del tumor, estadio del tumor, tipo de metástasis y la supervivencia media.

INFORMACIÓN CLÍNICA	RESULTADO	FRECUENCIA N (%)	INFORMACIÓN CLÍNICA	RESULTADO	FRECUENCIA N (%)
EDAD (n=56)	Media (rango)	62 (42-85)	ESTADIO (n=56)	II	5 (9%)
GÉNERO (n=56)	Hombre	36 (64%)		III	24 (43%)
	Mujer	20 (36%)		IV	27 (48%)
LOCALIZACIÓN (n=56)	Sigma	11 (19,6%)	METÁSTASIS (n=56)	Sin metástasis	29 (52%)
	Colon ascendente	3 (5,4%)		Hepática	6 (10,7%)
	Colon transverso	2 (3,6%)		Ósea	1 (1,8%)
	Colon descendente	4 (7,1%)		Suprarrenal	1 (1,8%)
	Ciego	3 (5,4%)		Pulmonar	4 (7,1%)
	Ángulo esplénico	3 (5,4%)		Peritoneal	3 (5,3%)
	Recto	20 (35,7%)		Hepática + otro	8 (14,3%)
	Colon (extendido)	4 (7,1%)		Peritoneo + otro	2 (3,5%)
	Colon-recto	2 (3,6%)		Multiorgánica	2 (3,5%)
	Recto-sigma	4 (7,1%)		SUPERVIVENCIA (meses)	Media (rango)

Los niveles de marcadores relacionados con CMTs de las muestras de los pacientes oncológicos fueron comparados con un total de 51 muestras de sujetos control. Los sujetos control son donantes de sangre, por lo que no han padecido ninguna enfermedad neoplásica. El resto de muestras pertenece a pacientes procedentes del servicio de oncología del CHUA.

6.5.2. CLASIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE MUESTRAS DE PACIENTES

Las diferentes muestras analizadas fueron clasificadas en tres grupos, en función del estado del paciente de origen. Los grupos establecidos fueron pacientes libre de enfermedad, enfermedad controlada y por último, el grupo de enfermedad activa.

El análisis de los biomarcadores Bcrp1, EpCam, CD133 y AC133 en los diferentes grupos de muestras aparece en la figura 53, donde se observa que el grupo de muestras control no presenta una expresión diferente de los marcadores que el resto de grupos, al igual que lo ocurrido con el grupo de muestras libres de enfermedad. El análisis obtenido no presenta diferencias significativas entre los grupos, así clasificados, para los marcadores Bcrp1 (figura 53A), EpCam (figura 53B), CD133 (figura 53C) y AC133 (figura 53D). En la figura 53 se observan similitudes entre la expresión de los marcadores EpCam (figura 53 B) y AC133 (figura 53 D).

Tras el análisis de los resultados observamos que nuestra técnica, planteada de esta manera, no nos permitía diferenciar entre pacientes enfermos de cáncer y pacientes sanos mediante una analítica de sangre.

Además, observamos dos efectos en los niveles de marcadores a tener en cuenta en posteriores análisis. Por un lado, observamos que los pacientes libres de enfermedad en tratamiento quimioterapéutico adyuvante mostraban un aumento en el nivel de marcadores. Por otro lado, pacientes neoplásicos, con enfermedad muy avanzada y tras varias líneas de quimioterapia, mostraban niveles muy bajos en la expresión de marcadores.

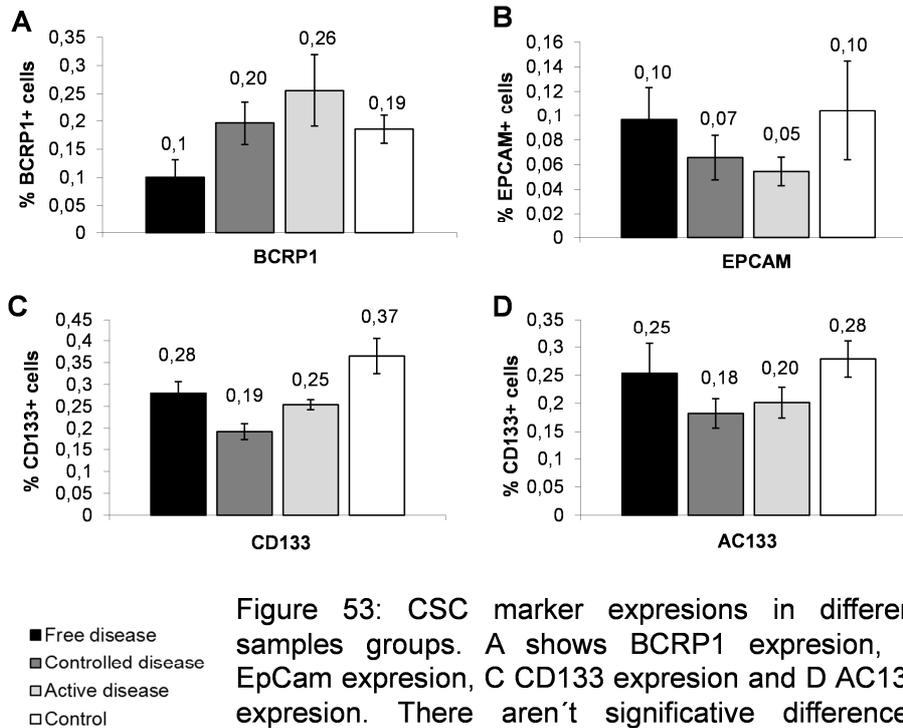


Figure 53: CSC marker expressions in different samples groups. A shows BCRP1 expression, B EpCam expression, C CD133 expression and D AC133 expression. There aren't significant differences between the groups.

6.5.3. PUNTO DE CORTE DE LOS MARCADORES Y CARACTERÍSTICAS DE LA TÉCNICA

Tras las observaciones anteriores, decidimos realizar de nuevo un análisis de los niveles de marcadores teniendo en cuenta los grupos candidatos a ser evaluados mediante nuestra técnica, es decir, eliminando las muestras de los pacientes controles, las muestras de pacientes libres de enfermedad en adyuvancia y las muestras de los pacientes aplásicos.

De los grupos inicialmente establecidos comparamos las muestras de pacientes libres de enfermedad con aquellas muestras pertenecientes a pacientes con enfermedad controlada y con enfermedad activa. En primer lugar realizamos una curva ROC, para establecer los valores límites de nuestros marcadores conociendo su sensibilidad y su especificidad. Los resultados de la

► RESULTADOS

curva ROC mostraron mejores resultados al trabajar con la suma de los niveles de todos los marcadores analizados, por lo que decidimos analizar nuestras muestras en base a las diferencias encontradas en la suma de los niveles de los marcadores de estudio. El valor de la curva ROC realizada seleccionado como punto de corte de la suma de nuestros marcadores fue 0.2450, cuya sensibilidad y especificidad son 84% y 71% respectivamente (tabla 25). Con este punto de corte diferenciamos pacientes como marcadores altos, aquellos que presentaban un valor igual o mayor a 0.2450 en la suma de sus marcadores, y pacientes con marcadores bajos aquellos que presentaban valores menores de 0.2450 en la suma total de los valores de marcadores obtenidos.

Tabla 25.Coordenadas obtenidas en la curva ROC. El valor seleccionado como punto de corte para diferenciar muestras con niveles altos de marcadores y muestras con niveles bajos de marcadores fue 0.2450. El valor seleccionado como punto de corte de nuestro análisis presenta una sensibilidad de 83.7% y una especificidad de 71.4%.

Coordinates COR curve		
Positive if greater than or equal to	Sensitivity	Specificity
-1,0000	1,000	1,000
,0050	1,000	,929
,0150	,980	,929
,0400	,959	,929
,0900	,939	,929
,1250	,939	,857
,1350	,939	,786
,1600	,918	,786
,1850	,898	,786
,2050	,857	,786
,2300	,857	,714
.2450	.837	.714
,2550	,816	,714
,2650	,796	,714
,2750	,776	,714
,2900	,755	,714
,3000	,714	,714

Con el punto de corte podemos clasificar a nuestros pacientes en función del nivel de marcadores, por lo que realizamos una tabla cruzada para cuantificar las muestras con marcadores altos y bajos dentro de cada grupo de pacientes del estudio, pacientes libres de enfermedad, pacientes con enfermedad controlada y pacientes con enfermedad activa.

En el momento de clasificar los pacientes observamos las muestras que no se ajustaban a lo esperable de nuestro análisis. Por un lado, de un total de 18 muestras de pacientes libres de enfermedad con un nivel en la suma de marcadores de estudio alto (≥ 0.2450), 13 pertenecían a muestras de pacientes en adyuvancia (figura 54 A). Es decir, un 72% de las muestras analizadas a

pacientes libres de enfermedad que presentan un nivel expresión de marcadores alto, pertenecen a muestras de pacientes que reciben tratamiento de prevención en el momento del análisis. Por otro lado, de un total de 17 muestras de pacientes con enfermedad activa y que presentan un nivel alto en la suma de marcadores de estudio (≥ 0.2450), 4 pertenecían a muestras de pacientes aplásicos (figura 54 B). Es decir, un 24% de las muestras analizadas a pacientes con enfermedad activa que presentan un nivel expresión de marcadores bajo, pertenecen a muestras de pacientes aplásicos.

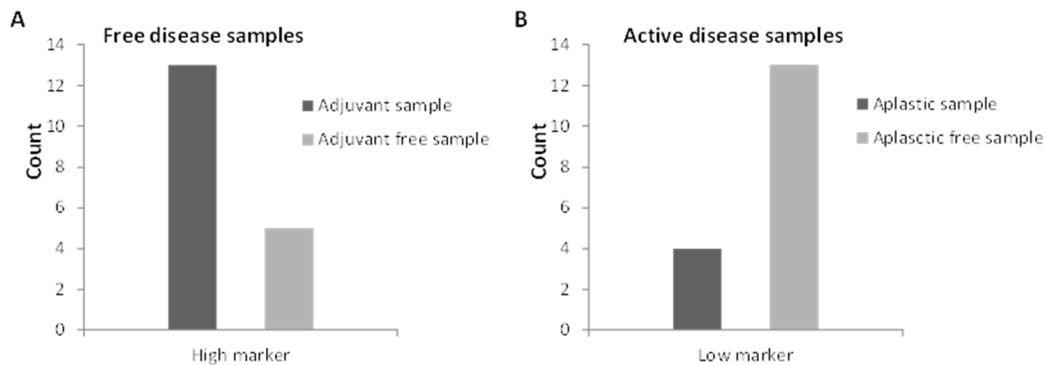


Figure 54: Technical limitations. A histogram shows samples of disease-free patients with high levels of markers. Histogram B shows samples from patients with active disease and low level of markers.

De un total de 236 muestras, 74 pertenecían a pacientes con enfermedad activa, 151 muestras a pacientes con enfermedad controlada y 11 a pacientes libres de enfermedad. De todas las muestras analizadas 76 presentaron el nivel de marcadores bajo, 13 de las cuales pertenecían a pacientes con enfermedad activa, 56 muestras a pacientes con enfermedad controlada y 7 muestras a pacientes libres de enfermedad. Por otro lado, 160 muestras del total presentaron niveles altos de marcadores, 61 de las cuales pertenecían a pacientes con enfermedad activa, 95 a pacientes con enfermedad controlada y 4 a pacientes libres de enfermedad. Todos estos datos aparecen recogidos en la tabla 26 y representando gráficamente en la figura 55.

► RESULTADOS

Tabla 26. Tabla cruzada entre grupos de pacientes y niveles de marcadores.

		Nivel suma marcadores bajo (<0,2450)	Nivel suma marcadores alto (≥0,2450)	Total
Enfermedad Activa	Recuento	13	61	74
	%	17,6%	82,4%	100%
Enfermedad controlada	Recuento	56	95	151
	%	37,1%	62,9%	100%
Libre de enfermedad	Recuento	7	4	11
	%	63,6%	36,4	100%
Total	Recuento	76	160	236
	%	32,2%	67,8%	100%

En la figura 55 aparece un diagrama de barras con el recuento de pacientes de cada uno de los grupos y su nivel de macadores (altos o bajos). El porcentaje de muestras analizadas con marcadores altos (≥0.2450) es muy superior (82.43%) al porcentaje de muestras con marcadores bajos (<0.2450) (17.57%) en pacientes con enfermedad activa, esta marcada diferencia es algo menor en pacientes con enfermedad controlada. En este grupo, el porcentaje observado de muestras con nivel alto de marcadores fue de 62.91% y, 37.09% muestras presentaron un nivel de marcadores bajo. Sin embargo, en pacientes libres de enfermedad el porcentaje de muestras que presentaron los niveles de marcadores bajo fue notablemente superior (66.64%) respecto al porcentaje obtenido de muestras con niveles de marcadores bajo (36.36%). El estadístico del chi-cuadrado obtenido entre la comparación de muestras libres de enfermedad con las muestras en enfermedad activa fue de 11.296 y la significación fue de 0.03.

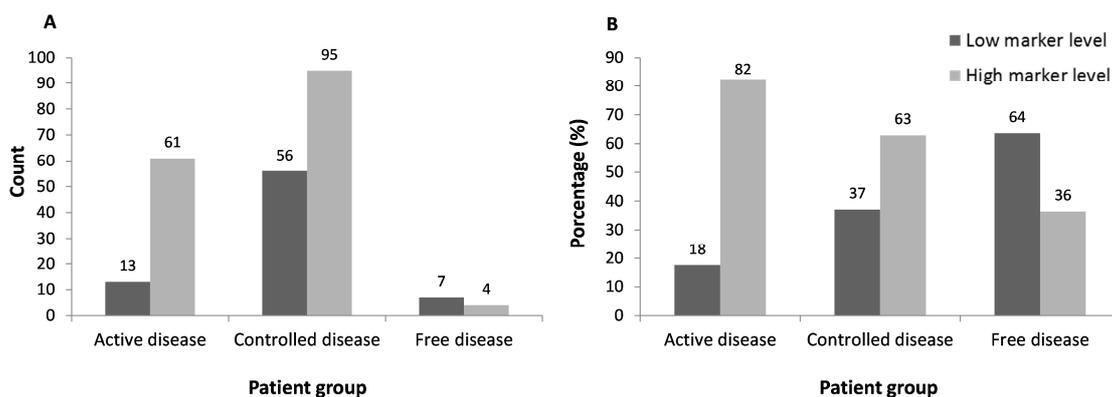


Figure 55: Level of de sum of markers in differents groups of patients. Low level <0,2450 and high level ≥ 0,2450. A shows the samples number in each group and B shows the samples percentage.

Además, calculamos el valor predictivo positivo (VPP) y el valor predictivo negativo (VPN) con ayuda de la tabla cruzada de los distintos grupos de pacientes y el nivel de sus marcadores, alto o bajo. Para ello trabajamos con

los grupos enfermedad activa y pacientes libres de enfermedad. En total 85 muestras, 74 de ellas pertenecientes a pacientes con enfermedad activa y 11 a pacientes libres de enfermedad. De las 85 muestras, 20 mostraron niveles bajos de la suma de marcadores (<0.2450) y 65 muestras niveles altos. De las muestras con niveles bajos de marcadores, 13 eran de pacientes con enfermedad activa y 7 muestras procedían de pacientes libres de enfermedad. Por otro lado, de las 65 muestras con niveles altos de la suma de marcadores, 61 pertenecían a pacientes con enfermedad activa, y 4 muestras fueron de pacientes libres de enfermedad (tabla 26). De esta manera pudimos evaluar nuestra técnica obteniendo los resultados reflejados en la tabla 27. Los valores de especificidad y sensibilidad con un punto de corte de 0.2450 fueron calculados con la curva ROC y los valores de VPP y VPN con las fórmulas que aparecen en el apartado de material y métodos.

Tabla 27: Características de la técnica. La tabla muestra la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y el valor predictivo negativo (VPN).

TÉCNICA	ESPECIFICIDAD	SENSIBILIDAD	VPP	VPN
Detección CMT	71%	84%	69%	78%

6.5.4. RELACIÓN DE LOS BIOMARCADORES DE ESTUDIO CON LA PREDICCIÓN DE RECAÍDA DE LA ENFERMEDAD Y LA SUPERVIVENCIA

Para comprobar la relación entre nuestros marcadores de estudio y las recaídas de los pacientes, realizamos unas tablas cruzadas para los pacientes con enfermedad controlada y enfermedad activa. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 56. En el gráfico 56 A aparecen recogidos el número de muestras obtenidos en cada caso, y en el gráfico 56 B los mismos resultados en porcentaje. En el grupo de enfermedad activa observamos que el 82% de las muestras con marcadores altos (≥ 0.2450) sufren una recaída. Sin embargo, en el grupo de enfermedad controlada, el porcentaje de los pacientes que presentan marcadores altos y sufren una recaída es algo menor, un 63%.

► RESULTADOS

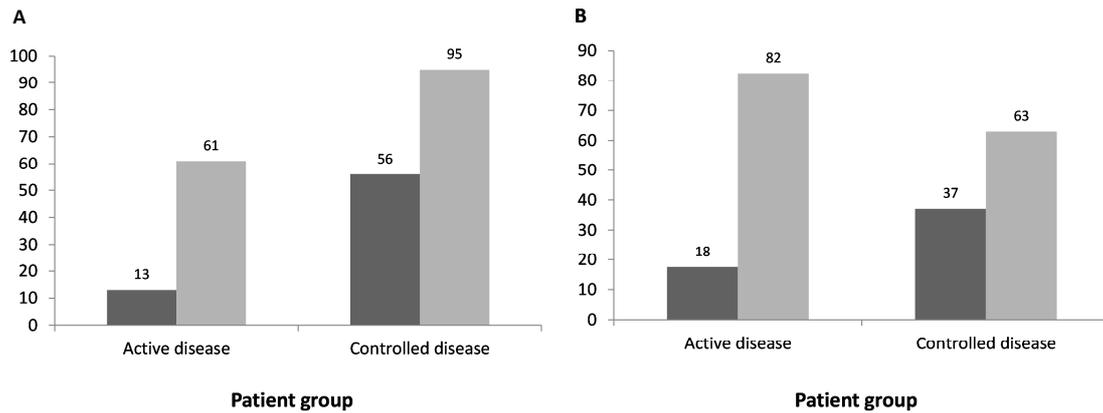


Figure 56: Marker level in patients who relapse. In active disease patient group and controlled disease patient group there are more samples with high marker level than low.

Para evaluar el efecto que presentaban estos marcadores sobre la supervivencia a los 5 años y la supervivencia libre de enfermedad, realizamos una estimación Kaplan-Meier. Para ello evaluamos, por un lado, la supervivencia a los cinco años desde el diagnóstico de la enfermedad en pacientes con marcadores altos (> 0.2450) y pacientes con marcadores bajos (< 0.2450) (figura 57 A). Observamos una diferencia estadísticamente significativa en la supervivencia entre los dos grupos con una significancia de 0.036 (figura 57 B). Además, calculamos la supervivencia media a los cinco años para cada uno de los grupos establecidos, siendo de 50.307 ± 1.624 meses en pacientes con marcadores bajos y de 44.569 ± 1.419 meses en pacientes con marcadores altos (figura 57 C), estos datos mostraron diferencias estadísticamente significativas, siendo el p-valor 0.0016. Por último, comparamos los las medianas siendo 60.00 ± 1.574 meses en pacientes con marcadores bajos, y 50.00 ± 1.295 meses en pacientes con marcadores altos (figura 57 C), estos datos mostraron diferencias significativas, siendo el p-valor 0.0009.

Por otro lado, evaluamos la supervivencia libre de enfermedad en pacientes con marcadores altos (> 0.2450) y en pacientes con marcadores bajos (< 0.2450) (figura 57 D). Observamos una diferencia estadísticamente significativa en la supervivencia libre de enfermedad entre los dos grupos con una significancia de 0.004 (figura 57 E). Además, calculamos, por un lado, la supervivencia libre de enfermedad media para cada uno de los grupos establecidos, siendo de 13.933 ± 1.947 en pacientes con marcadores bajos y de 8.585 ± 1.034 meses, siendo la significancia de 0.03. Por otro lado, comparamos las medianas de supervivencia libre de enfermedad entre los dos grupos de pacientes, y no se encontraron diferencias significativas.

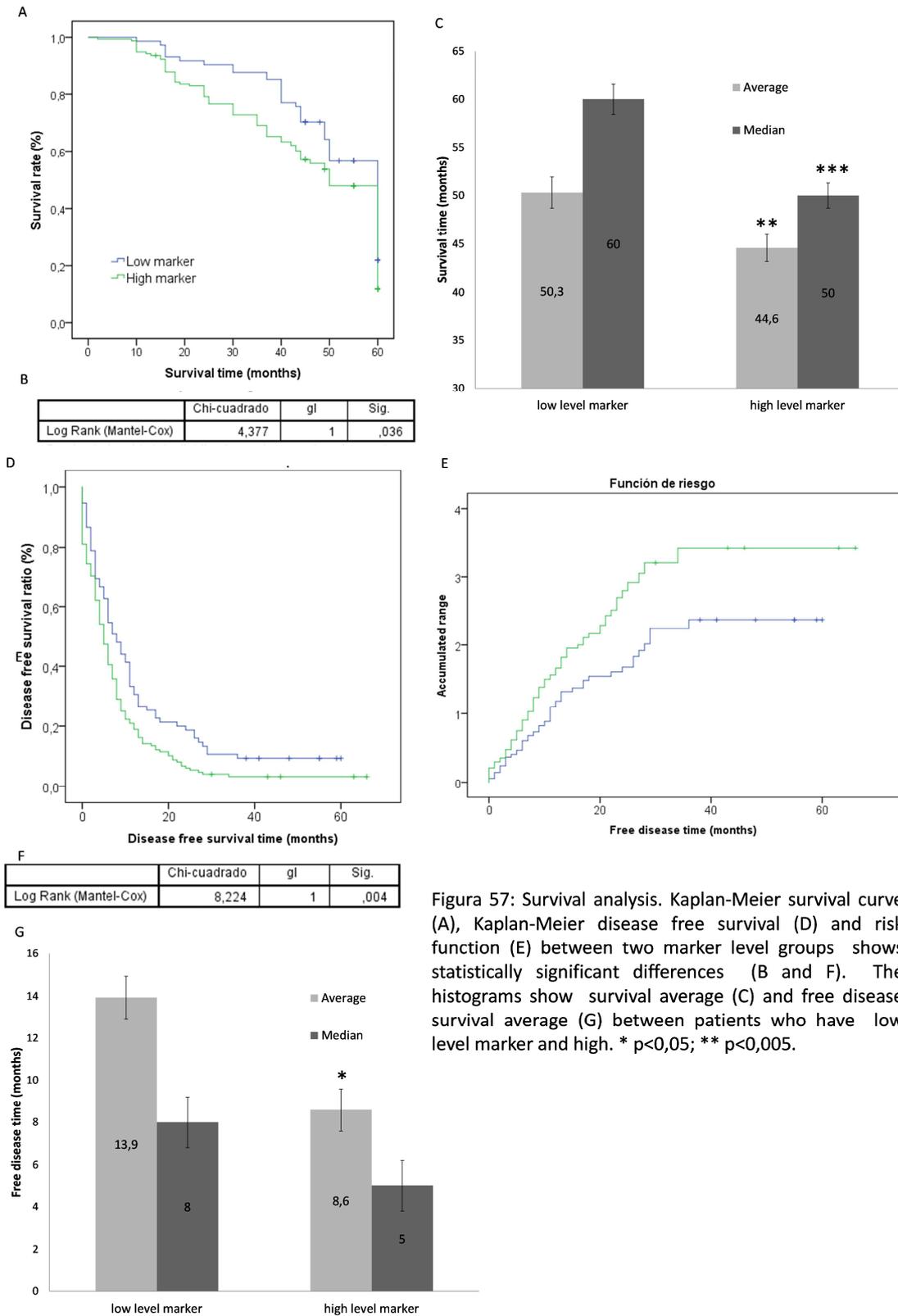


Figura 57: Survival analysis. Kaplan-Meier survival curve (A), Kaplan-Meier disease free survival (D) and risk function (E) between two marker level groups shows statistically significant differences (B and F). The histograms show survival average (C) and free disease survival average (G) between patients who have low level marker and high. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$.

6.5.5. CLASIFICACIÓN DE MUESTRAS POR PACIENTES

Hasta ahora todos los análisis mostrados han sido del total de muestras analizadas, en la figura siguiente (figura 58) aparece una clasificación de todas las muestras en función del tipo de paciente del que proceden.

El total de muestras libres de enfermedad (11) (figura 58 A), pertenecen a 10 pacientes. De los pacientes que presentaron un nivel en la suma de marcadores igual o superior a 0.2450, un 25% sufrió una recaída mientras que el 75% siguió libre de enfermedad (figura 58 B). El estudio de este grupo, libre de enfermedad con nivel de marcadores alto y que no sufre recaída, reveló que se trataba de pacientes en adyuvancia (figura 58 B). Por otro lado, los pacientes libres de enfermedad con niveles en la suma de marcadores inferior a 0.2450, no sufrieron recaída (figura 58 C).

El total de muestras en estado enfermedad controlada (151) (figura 58 A), pertenecen a 31 pacientes. De los pacientes que presentaron un nivel en la suma de marcadores igual o superior a 0.2450, un 96% sufrió una recaída mientras que el 4% no sufrió recaídas (figura 58 D). El estudio de este grupo, enfermedad controlada con nivel de marcadores alto y que no sufre recaída, reveló que se trataba de pacientes que no habían sido operados en el momento de recogida de la muestra para el análisis de marcadores (figura 58 D). Por otro lado, de los pacientes con enfermedad controlada con niveles en la suma de marcadores inferior a 0.2450, un 75% no sufrieron recaída mientras que el 25% sufrieron recaída (figura 58 E). El estudio de este grupo, enfermedad controlada con nivel de marcadores bajo y que sufre recaída, reveló que se trataba de pacientes aplásicos (figura 58 D).

El total de muestras en estado enfermedad activa (74) (figura 58 A), pertenecen a 39 pacientes. De los pacientes que presentaron un nivel en la suma de marcadores igual o superior a 0.2450, un 85% sufrió una recaída mientras que el 15% no sufrió recaídas (figura 58 F). El estudio de este grupo, enfermedad activa con nivel de marcadores alto y que no sufre recaída, reveló que el 80% de estos pacientes no habían sido operados en el momento de recogida de la muestra para el análisis de marcadores (figura 58 F). Por otro lado, de los pacientes con enfermedad activa con niveles en la suma de marcadores inferior a 0.2450, un 20% no sufrieron recaída mientras que el 85% sufrieron recaída (figura 58 G). El estudio de este grupo, enfermedad activa con nivel de marcadores bajo y que sufre recaída, reveló que se trataba de pacientes aplásicos (figura 58 G).

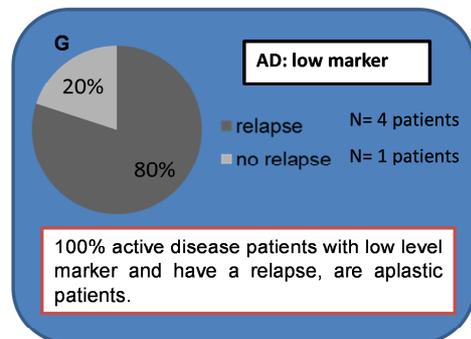
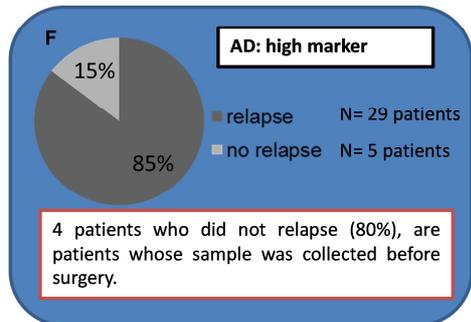
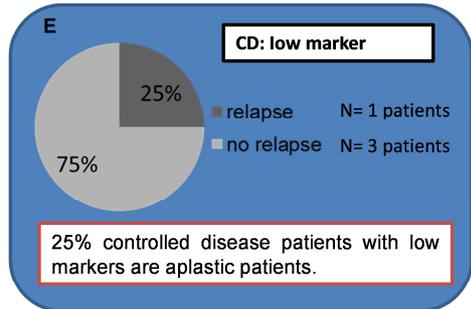
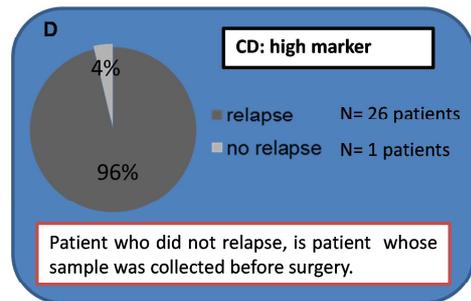
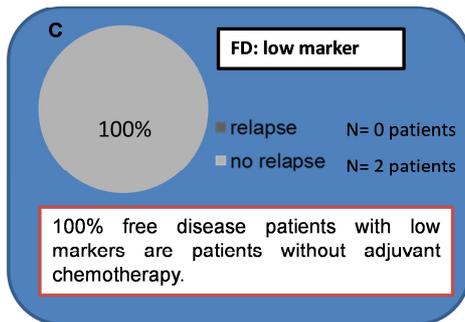
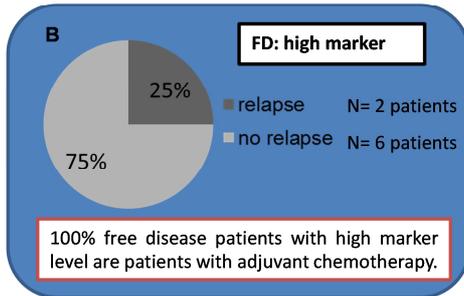
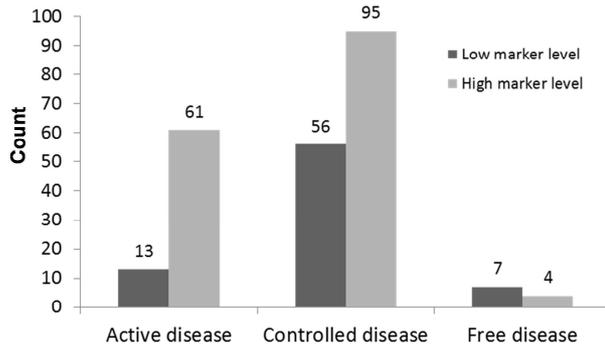


Figure 58: Samples classification. The samples were classified in two groups: samples high level of markers and samples with low level of markers and patients were classified in three groups: free disease (FD), controlled disease (CD) and active disease (AD) (A). 100% of FD patients with high level marker are patients with adjuvant chemotherapy, who 75% didn't have a relapse and 25% have a relapse (B). 100% of FD patients with low markers did not relapse (C). 96% of CD patients with high level marker had a relapse, while 4% of this group did not relapse (D). 75% of CD with low level marker did not have a relapse, while 25% have a relapse, being this group aplastic patients (E). 85% of AD patients with high level marker had a relapse, while 15% of this group did not relapse (F). 80% of AD patients with low marker had a relapse, while 20% of this group did not relapse (G). This problem in the identification of cancer stem cell population may be produced by the patient status aplastic.

6.5.6. COMPARACIÓN DE LA DETECCIÓN DE CMTs MEDIANTE MARCADORES DE SUPERFICIE Y VERIDEX

Para comparar nuestra técnica de detección de CMTs circulantes en sangre periférica, con la técnica Veridex, única técnica aprobada por la FDA, analizamos 44 muestras por los dos métodos.

Tras los análisis de las distintas muestras de pacientes con los marcadores BCRP1, EpCam y CD133, se han comparado con los resultados obtenidos mediante la técnica de Veridex y la evolución del paciente. En la figura 59 se pueden ver los resultados obtenidos de los análisis en los distintos pacientes. En prácticamente la mitad de los pacientes analizados (47.7%), coincide el resultado obtenido mediante la técnica de Veridex con la detección de nuestros marcadores de estudio por citometría de flujo (figura 59 A). Dentro de este grupo de muestras coincidentes para ambas técnicas, el porcentaje de aciertos ha sido del 95.2% del total de muestras analizadas (20/21) y un 4.8% de errores (1/21) (figura 59 A). El 52.3% de las muestras analizadas han presentado resultados diferentes para las dos técnicas utilizadas (23/44) (figura 59 A). El análisis de estas muestras diferentes para ambos métodos ha mostrado que la técnica Veridex presentó un menor porcentaje de aciertos que la técnica de detección de CMTs en sangre periférica mediante marcadores de superficie, siendo el número de aciertos 7/23 y 16/23 respectivamente (figura 59 A). De manera global, la técnica Veridex ha presentado un 56.9% de aciertos y un 43.10% de errores, mientras que la técnica basada en la detección de la población de CMTs por citometría de flujo ha presentado un 79.4% de aciertos y un 20.6% de errores (figura 54 b).

El análisis de los resultados reveló que la técnica Veridex presentaba un 34.09% de verdaderos positivos, 27.27% de verdaderos negativos, 2.27% de falsos positivos y un 36.36% de falsos negativos. De la misma manera, la detección de CMTs en sangre periférica mostró un 68.18% de verdaderos positivos, 13.64% de verdaderos negativos, 15.91 falsos positivos y 2.27% de falsos negativos (figura 59 B)

El análisis de todos los resultados obtenidos nos ayudó a caracterizar las dos técnicas. La tabla 28 recoge la especificidad, sensibilidad, valor predictivo negativo y valor predictivo positivo para las técnicas a partir de las muestras analizadas por las dos técnicas. Además también recoge las características obtenidas para la técnica de detección de CMTs circulante en sangre periférica de todas las muestras analizadas en este estudio. Así, podemos ver que la especificidad es mayor para la técnica de Veridex mientras que la sensibilidad, valor predictivo negativo y valor predictivo positivo fueron superiores en la detección de CMTs.

Por último, la figura 60, compara las dos técnicas utilizadas. Se observa un mayor índice de errores cometidos con la técnica de Veridex que con la detección de CMTs (figura 60 A, B, E y F). El número de aciertos realizados con la técnica Veridex fue inferior que con la técnica de detección de CMTs (figura 60 D y H). De todas las muestras analizadas mediante las dos técnicas, hubo 20 casos en los que las dos técnicas coincidían de manera correcta, 6 muestras fueron de pacientes con buen pronóstico y 14 fueron de pacientes con mal pronóstico (figura 60 I). De las que no coincidían, Veridex obtuvo un total de 7 aciertos, 6 muestras fueron de pacientes con buen pronóstico y 1 de las muestras procedía de un pacientes de mal pronóstico (figura 60 I). Por otro lado, la técnica de detección de CMTs obtuvo un total de 16 aciertos de muestras que provenían de pacientes de mal pronóstico (figura 60 I).

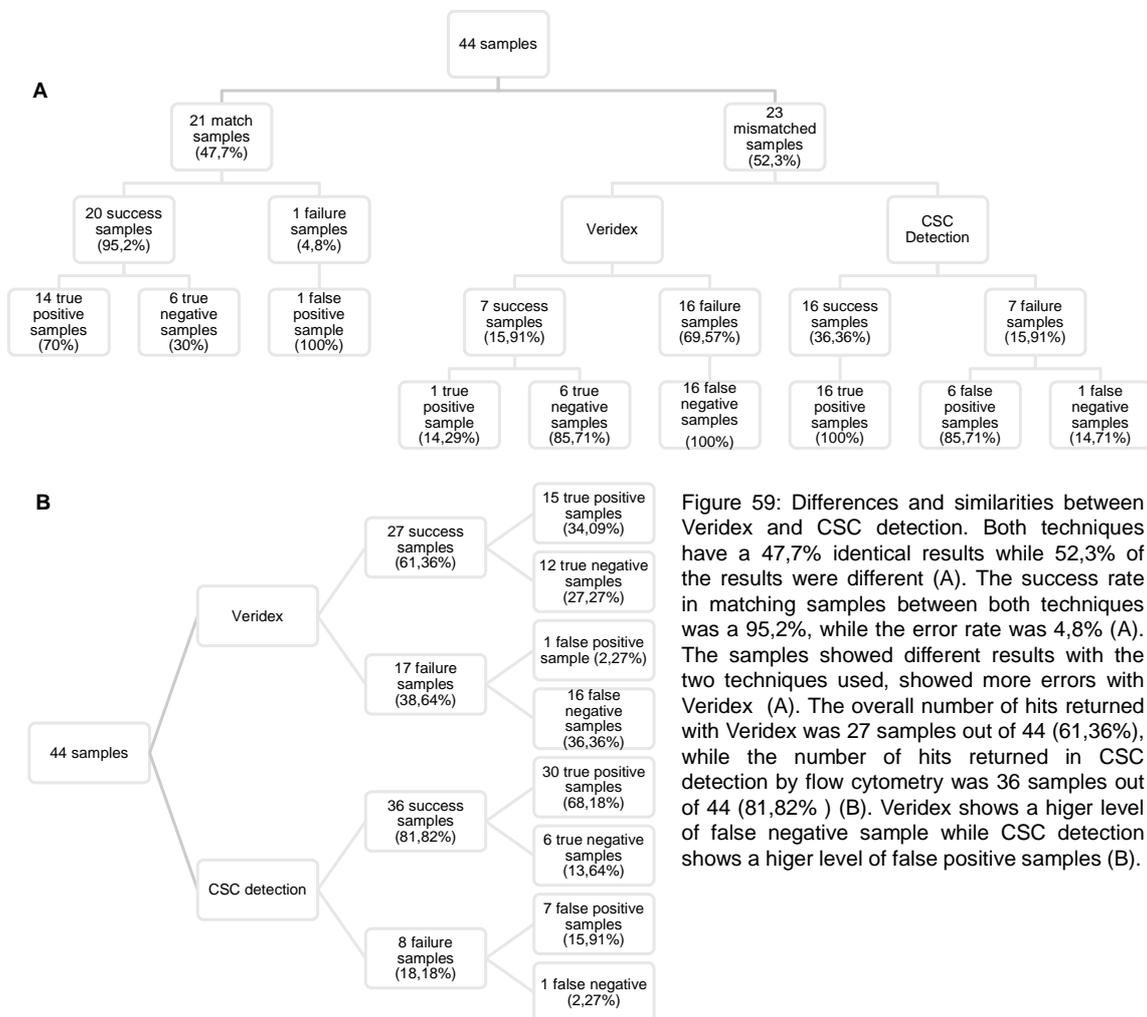


Figure 59: Differences and similarities between Veridex and CSC detection. Both techniques have a 47,7% identical results while 52,3% of the results were different (A). The success rate in matching samples between both techniques was a 95,2%, while the error rate was 4,8% (A). The samples showed different results with the two techniques used, showed more errors with Veridex (A). The overall number of hits returned with Veridex was 27 samples out of 44 (61,36%), while the number of hits returned in CSC detection by flow cytometry was 36 samples out of 44 (81,82%) (B). Veridex shows a higher level of false negative sample while CSC detection shows a higher level of false positive samples (B).

► RESULTADOS

Tabla 28: Comparación de las características de las técnicas. La tabla muestra la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y el valor predictivo negativo (VPN).

TÉCNICA	ESPECIFICIDAD	SENSIBILIDAD	VPP	VPN
Detección CMT (global)	71%	84%	69%	78%
Detección CMT (muestras comparadas con veridex)	86%	97%	97%	86%
Veridex	92%	48%	94%	43%

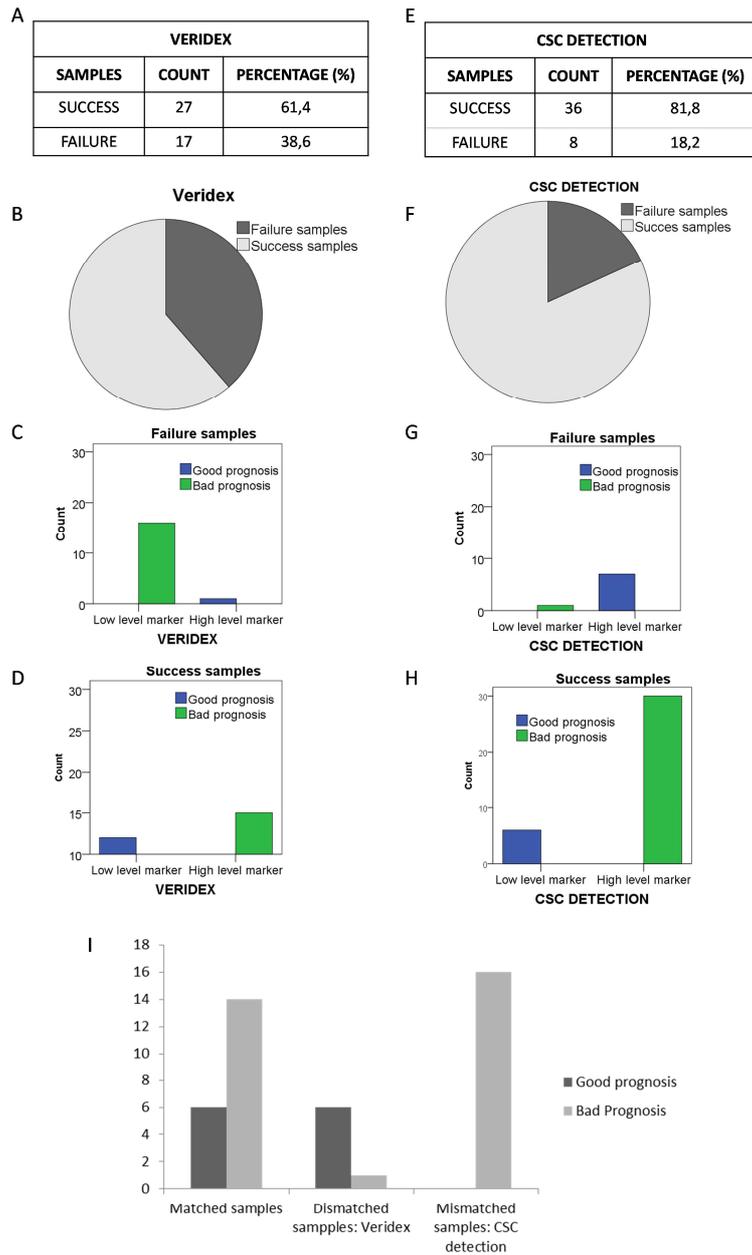


Figure 60: Comparison of techniques for predicting relapse : Veridex and CSC detection.

DISCUSIÓN

7. DISCUSIÓN

7.1 CÉLULAS MADRE TUMORALES

7.1.1. HIPÓTESIS DE LAS CÉLULAS MADRE TUMORALES

Los tumores son definidos como tejidos con poblaciones heterogéneas de células que difieren en sus características biológicas y en su potencial de autorrenovación (Reya et al., 2001). De acuerdo con el modelo estocástico de la evolución de los tumores, el cáncer se forma a partir de la acumulación de cambios genéticos en las células y la selección natural. La mayoría de las terapias convencionales para la eliminación de los tumores están basadas en esta teoría (Clarke and Becker, 2006).

Muchos han sido los progresos desde que en el año 1961 fue declarada la “guerra contra el cáncer”, nuevas terapias, detección temprana de la enfermedad, así como avances en la prevención. Sin embargo, en el caso de los cuatro tumores más comunes, pulmón, mama, próstata y colon, la supervivencia de pacientes metastásicos no ha cambiado significativamente desde entonces (Wicha et al., 2006). Los efectos limitados de estas terapias y el peor pronóstico para pacientes en estado avanzado de la enfermedad, principalmente en tumores sólidos, sugiere que el conjunto de células tumorales incluye una población de células responsable de la iniciación del tumor, crecimiento, metástasis y recurrencia. Debido a las similitudes encontradas entre esta población y la población de las células madre, han sido nombradas como células iniciadoras del tumor (CIT) o células madre tumorales (CMT). El modelo de las CMT postula que la heterogeneidad encontrada en los tumores radica en la existencia de poblaciones celulares con características similares a las de las células madre somáticas (tabla 28), resistentes a las terapias de quimio y radioterapia, y por lo tanto capaces de formar de nuevo el tumor. Estas células presentan una mayor capacidad invasora y tumorigénica. Además, se ha comprobado que esta población de células madre tumorales podría dar lugar a células diferenciadas y fenotípicamente no tumorales (Ricci-Vitiani et al., 2010).

No necesariamente todos los tumores presentan población de CMT (Shackleton et al., 2009), existen tumores que pueden explicarse mediante diferentes modelos propuestos de recurrencia, como los mecanismos sobreprotectores en cerebro.

La hipótesis de las células madre tumorales asume que las CMTs presentan las propiedades características de las células madre, descritas anteriormente, como la división asimétrica, autorrenovación, quiescencia,

similitudes en las vías de señalización y resistencia (Gil et al., 2008) (tabla 28). Estas células mantendrían los tumores gracias a la capacidad de regenerarse indefinidamente, mientras que la proliferación de sus progenitores daría lugar al resto de células que componen el tumor, y por ende, a la heterogeneidad encontrada en la vasta mayoría de los tumores (Campbell and Polyak, 2007). Es decir, los tumores podrían contener una jerarquía celular donde las células con capacidad de autorrenovación serían las responsables del mantenimiento, mientras que el resto de células derivadas contribuirían a generar la masa del tumor (Lobo et al., 2007). Dentro de las posibles células con capacidad de autorrenovación, posiblemente también se encuentren algunas que se quedan en la zona de origen (stationary cancer stem cell), y otras que migran a colonizar nuevas zonas (migrating cancer stem cells) ocasionando las metástasis a distancia, como se esquematiza en la figura 61 (Doudard et al., 2006).

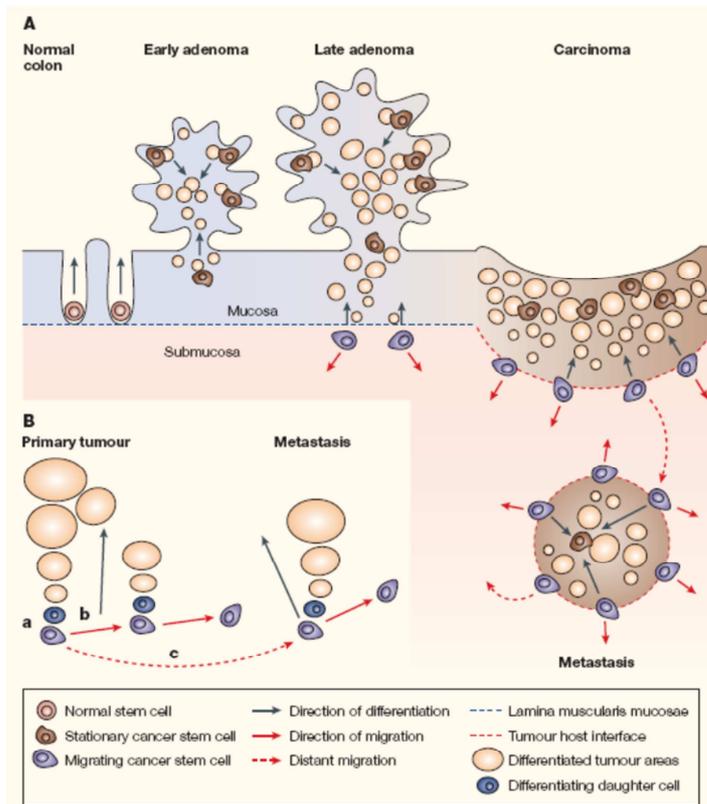


Figura 61: Esquema de la posible función de las células madre migradoras (Migrating stem cells MSC) en carcinomas y metástasis. MSC se dividen asimétricamente, una célula hija comienza la proliferación y otra la diferenciación. La MSC migra una corta distancia antes de sufrir una nueva división, añadiendo así potenciales progenitores que irán incrementando la masa del tumor además de mantener la autorrenovación de la célula madre tumoral. Eventualmente la MSC puede recorrer largas distancias contribuyendo a la diseminación del tumor y las metástasis a través de vasos sanguíneos y linfáticos. Se van produciendo metástasis después de subsiguientes divisiones asimétricas en las nuevas localizaciones. De esta forma los autores proponen este similar mecanismo para carcinomas primarios y metástasis. (Doudard, R. et al. 2006.)

Según este modelo las células madre tumorales son una pequeña población dentro de la masa tumoral, menor a un 5% del total de las células del tumor (Ponti et al., 2005). Se ha demostrado la existencia de la conocida *side population* (SP) en líneas tumorales establecidas, basándose en su capacidad de expulsión del fluoróforo Hoechst medida por citometría de flujo (Kondo et al., 2004). La SP era capaz de formar tumores heterogéneos en ratones inmunodeprimidos.

Tabla 28: Características comunes entre células madre y células madre tumorales

CARACTERÍSTICAS COMUNES ENTRE CÉLULAS MADRE Y CÉLULAS MADRE TUMORALES
Capacidad de autorrenovación que les permite autopropagarse
Poseen largos telómeros y gran actividad de la telomerasa
Elevada expresión de proteínas de transporte ABC responsable de la quimiotesis
Secreción de factores de crecimiento, citoquinas y factores angiogénicos
Similares vías de señalización involucradas en su autorrenovación: Wnt, Shh y Notch
Expresión de marcadores de superficie: CXCR4, CD133, $\alpha 6$ integrina, c-kit, c-met, LIF-R

Debido a que las CMTs son resistentes a los tratamientos convencionales, bien por sus ciclos celulares lentos o por la presencia de proteínas detoxificantes y reparadoras de ADN, el resultado es que estas células no se ven afectadas por los tratamientos quimioterápicos. Además estas células tienen la capacidad de iniciar nuevos tumores y parecen ser las responsables de las recaídas tras los tratamientos en pacientes con neoplasia (Gil et al., 2008). A pesar de aparecer en un pequeño porcentaje, conocer la implicación de las CMT en la formación de los tumores permitirá el desarrollo de nuevos fármacos antineoplásicos y fármacos capaces de evitar las recaídas de los pacientes inhibiendo la población de CMT.

Uno de los principales problemas planteados en la hipótesis de las células madre tumorales deriva de los métodos empleados para la purificación de estas poblaciones. Los dos criterios aceptados científicamente para establecer la definición experimental de CMT son por un lado, la capacidad de formar esferas en medios de cultivo no diferenciados y, por otro lado la capacidad de formar tumores a partir de población celulares muy pequeñas (Stingl and Caldas, 2007).

En el presente estudio, se han buscado inicialmente células con características de célula madre tumoral o célula iniciadora de tumores, en líneas celulares, xenografts y muestras de sangre periférica de pacientes con metástasis avanzada. Dado que la descripción de marcadores de células madre tumorales o célula iniciadora de tumores es controvertida, en este estudio se han seleccionado algunos de los más utilizados y validados clínicamente (EpCAM), o bien, aquellos relacionados con algunas de las características de células madre tumorales, como la resistencia (BCRP1) y la autorrenovación (CD133 y AC133). Las CMT también presentan una cinética de división mucho más lenta, por ello hemos utilizado como marcador, la sonda DDAO. Las células identificadas como posibles CMTs retienen, en su citoplasma, este marcador vital después de 4-5 DIV, cuya fluorescencia puede

ser cuantificada, así como el porcentaje de células que no han perdido esa intensidad de fluorescencia.

Para la realización de este estudio hemos analizado la expresión de los marcadores seleccionados en cuatro líneas celulares de cáncer colorrectal (DLD-1, HT-29, SW-480 y SW-620) y en xenografts. Destacar que la línea SW-480 y SW-620 provienen del mismo paciente, la diferencia consiste en que SW-480 es derivada del tumor primario y SW-620 derivada de la metástasis. Además, en el presente trabajo, se ha estudiado la correlación de las distintas proteínas seleccionadas, con la evolución de los pacientes, su respuesta al tratamiento y su tendencia a la recaída. Los resultados obtenidos muestran una mayor expresión de todos estos marcadores en pacientes con neoplasia activa, mientras que pacientes libres de enfermedad o en respuesta al tratamiento presentan disminuciones continuadas de la expresión de estos marcadores de interés. Para analizar más en detalle la validez de estos marcadores como indicadores de la progresión de la enfermedad y la recidiva, los analizaremos uno a uno en los siguientes apartados de la discusión.

7.1.2. MARCADORES DE CÉLULAS MADRE TUMORALES

CD133/AC133

El marcador CD133 fue uno de los primeros biomarcadores identificados en cáncer colorrectal, y otros tumores sólidos como mama o cerebro. Este marcador ha sido relacionado en numerosos estudios con el nivel de agresividad de los tumores y con células iniciadoras de tumores en numerosos tipos de tumores (Burkert et al., 2006). Recientemente se ha elaborado una huella metabólica de las células iniciadoras de tumores en colon, que incluye la expresión de dicho marcador (Chen et al., 2014).

En cáncer de colon se ha identificado una pequeña población de células, como células iniciadoras de tumores en ratones desnudos, EpCAM(high)/CD44⁺ (Powell et al., 1999). Sin embargo, las células CD133⁻ no presentan esta capacidad. El marcador CD133 pueden llegar a expresarse en grandes porcentajes de la población por lo que claramente, la mayoría de las células CD133⁺ no son células iniciadoras de tumores, al igual que se ha descrito para la expresión de CD34 en células madre en leucemia mieloide aguda, por lo que CD133 parece expresarse tanto en células madre tumorales como en progenitores (O'Brien et al., 2007). Por otro lado, las características de células madre han sido descritas en células CD133⁻. Sin embargo, cada vez son más las pruebas objetivas que apuntan a la vinculación de este marcador

CD133, con marcadores como ESA (epithelial-specific antigen), que los localizan en sangre periférica, aunque no en la masa tumoral, postulándolos como indicadores útiles para la predicción de la recurrencia y como marcadores pronóstico en pacientes con cáncer colorrectal (Tseng et al., 2015). Del mismo modo, también la doble expresión de CD133⁺/CD44⁺ ha sido relacionada con la proliferación celular y las propiedades metastásicas de células en sangre o en metástasis hepáticas y no en el tumor original (Bellizzi et al., 2013).

También, recientemente se ha visto como las células CD133⁺ difieren de sus homólogas negativas en la expresión de la proteína Oct-4, implicada en la autorrenovación de las células madre embrionarias. El silenciamiento mediante RNA de interferencia de Oct-4 inhibe la capacidad de las células CD133⁺ de formar colonias unicelulares e invadir tejidos (Chen et al., 2008).

Por otro lado, algunos autores han negado que las células CD133⁺ delimiten una población pura de células madre tumorales puesto que en carcinoma de colon las células CD133⁺ dan lugar a células CD133⁻, que son mucho más agresivas, y que también son capaces de formar tumores en ratones inmunocomprometidos (Shmelkov et al., 2008). El hecho de que las células CD133⁻ puedan formar tumores ha sido comprobada en este estudio mediante la realización de un ensayo en el que inyectamos a ratones inmunodeprimidos células HT-29 AC133⁺ por un lado y, AC133⁻/bcrp1⁻ por otro lado, separadas mediante citometría sorter. Los resultados del ensayo ponen de manifiesto que las células que no expresan AC133 son capaces de formar tumores, aunque hay que destacar que de las dos inyecciones realizadas una de ellas dio origen a un tumor que no fue capaz de crecer en cultivo. Sorprendentemente, en este estudio hemos observado cómo a partir de la inyección de células AC133⁻ hemos obtenido xenografts, con altos porcentajes de células AC133⁺, hasta un 82% en el tumor 1, mientras que las inyecciones de células AC133⁺ formaron en todos los casos xenografts principalmente AC133⁺, siendo la población AC133⁻ en estos xenografts de un 3-5% aproximadamente (figura 50). Por lo tanto, podemos decir que existe un equilibrio entre las poblaciones con distinta expresión de la proteína CD133 que podría explicar las discrepancias en la bibliografía.

A pesar de que las células CD133 positivas no sean una población pura, y no todas ellas sean capaces de producir tumores, podría relacionarse la presencia de algunas de estas células CD133 positivas en sangre periférica, con células iniciadoras de tumor con movilidad y capacidad de transición epitelio-mesénquima y con la evolución de la enfermedad, como las que describen Brabletz y colaboradores en su teoría complementaria de las células madre tumorales migradora (Brabletz et al., 2005).

Existe una gran discrepancia en la utilidad de este marcador como factor pronóstico de la enfermedad. Por un lado, numerosos estudios han demostrado

su valor y utilidad como marcador independiente de pronóstico en cáncer colorrectal (Horst et al., 2008; Li et al., 2009; Vaz et al., 2014; Zhang et al., 2012), y por otro lado, hay algún estudio donde no se observó ninguna relación de la expresión de CD133 como marcador pronóstico (Kojima et al., 2008). Sin embargo, este último estudio se realizó analizando muestras de tumores rectales y tumores de colon, incluyendo diferentes estadios del tumor (I-IV) al igual que nuestro análisis. La discrepancia entre los diferentes estudios puede estar derivada de una cantidad inadecuada de pacientes analizados y a los diferentes estadios de los mismos. La mayoría de estudios han sido realizados analizando muestras de tumores, donde las poblaciones que expresan CD133 son mayores que las que nosotros podemos encontrar en muestras de sangre periférica. Como ya hemos señalado, recientemente se ha propuesto de nuevo la población CD133⁺/ESA⁺ presente en sangre periférica, y no en la masa tumoral, como indicador predictivo de recurrencia y factor pronóstico en pacientes con cáncer colorrectal (Tseng et al., 2015).

Respecto a la presencia de esta proteína en las líneas tumorales de cáncer colorrectal utilizadas en este estudio, destacar que las líneas HT-29 y SW-620 presentan niveles de expresión de la proteína CD133 y su epítipo AC133 muy elevados (figura 24). La línea HT-29 presenta aproximadamente un 94% de células que expresan la proteína CD133 y un 6% de células CD133⁻. La expresión de AC133 es ligeramente menor, presentando aproximadamente un 92% de células AC133⁺ y un 8% AC133⁻. La línea SW-620 también presenta la mayoría de su población CD133⁺ (94%) y AC133⁺ (92%). Los altos porcentajes de estas dos líneas celulares para la proteína prominina, pone de manifiesto que no se trata de un marcador exclusivo de CMT sino que también incluye a progenitores de rápida amplificación u otras células tumorales derivadas. Sin embargo, es también destacable que estas dos líneas son precisamente las de mayor agresividad en los ensayos tanto in vivo como in vitro llevados a cabo, y tienen una serie de características comunes. Entre las características comunes encontramos una alta expresión de la proteína KLF4, doble que el resto de líneas analizadas, una expresión de la proteína snail media-alta o poseer la proteína APC nativa. También en la bibliografía, se refleja que estas dos líneas tumorales presentan IC50 a Erlonitinb superiores a 10nM, con porcentajes de inhibición de su crecimiento muy bajos comparados con las líneas del estudio, como se puede ver en la tabla 29.

Por otro lado las líneas DLD-1 y SW-480 presentan porcentajes inferiores al 0.5% de células CD133⁺ y AC133⁺. Estas líneas celulares tienen además en común (tabla 29) una mutación en la proteína APC, y baja expresión de las proteínas KLF4 y snail, así como una mayor sensibilidad a Erlonitinb, alrededor de 2-3 nM para una inhibición del 50% del crecimiento celular. Llama la atención la diferencia de expresión tan acusada entre la línea

SW-480 y la línea SW-620, ya que, como se explicó al principio, la línea SW-620 proviene de la metástasis producida por el tumor del que deriva la línea SW-480. Además de la diferencia de expresión de la proteína CD-133 entre las líneas SW-480 y SW-620, observamos que SW-620 presenta una mayor resistencia a oxaliplatino e irinotecan que la línea SW-480 (figura 33 y 34). Esta resistencia se refleja en la tabla 30, en la que se muestra los valores medios obtenidos de IC50, IC0 y población resistente en las dos líneas celulares. Con el fármaco oxaliplatino observamos mayores valores de IC0 y % población resistente en la línea metastásica SW-620, indicando una mayor resistencia. Esta resistencia ofrecida por la línea SW-620 es más notable con el tratamiento irinotecan, donde el valor IC50 es 3 veces mayor, mientras que el IC0 y el % de población resistente son el doble para la línea SW-620 comparada con la SW-480

Tabla 29: Características específicas de las líneas celulares de estudio. Se muestra el estado de APC, la expresión de KLF4 (proteína y RNA), efecto de Erlotinib, formación de esferas, expresión de CIMP y cinética de crecimiento celular.

Línea celular	APC	Expresión de snail	Expresión relativa de KLF4 RNA	Expresión relativa proteína KLF4	EC ₅₀ (umol/L) ERLOTINIB	% INHIBICIÓN ERLOTINIB	Formación de esferas	CIMP	Crecimiento rápido
HT-29	wt	Media	0,2	0,3	>10	25	Sí	+	Sí
DLD-1	Mutante	Baja	0,01	0,1	3	61	Sí	+	Sí
SW-480	Mutante	Media	0,1	0,2	2,2	44	No	-	No
SW-620	wt	Alta	0,05	0,4	>10	10	Sí	-	No

Tabla 30: Valores de IC50, IC0 y % población resistente a oxaliplatino e irinotecan en las líneas celulares SW-480 y SW-620.

TRATAMIENTO	OXALIPLATINO (uG/ML)		IRINOTECAN (Um)	
LÍNEA CELULAR	SW-480	SW-620	SW-480	SW-620
IC50	1,4	1,4	18,4	62,6
IC0	10,1	10,6	78,2	163
% población resistente	42,6	50,1	30,7	65

La diferencia en la resistencia frente a tóxicos puede deberse, en parte, a la diferente expresión de CD133, entre otras proteínas como veremos a continuación. Algunos estudios han demostrado que las células radioresistentes expresan en su membrana la proteína prominina, es decir, células radioresistentes son células CD133⁺(Sahlberg et al., 2014). Estas células CD133⁺ pueden formar un nuevo tumor, el cual estará formado por una población celular heterogénea. Además, estudios complementarios han demostrado que las células CD133⁺ presentan una gran resistencia a la quimioterapia, carboplatino, paclitaxel y etopósido (VP16). Esta resistencia es debida a la expresión combinada de la proteína BCRP1, y proteínas inhibidoras de la apoptosis en estas células(Liu et al., 2006) que se analizarán en los apartados siguientes.

En las muestras de nuestros pacientes, el análisis de la proteína prominina, con los anticuerpos que reconocen CD133 y AC133, de manera individual no es predictivo del estado, evolución y pronóstico del paciente, aunque sí contribuye en el análisis realizado en base a la expresión de los 4 marcadores de estudio: BCRP1, EpCAM, CD133 y AC133. Es necesaria una combinación de marcadores de membrana para la correcta identificación de células madre tumorales colorrectales, debido a la gran heterogeneidad de la población de CMT y la variabilidad existente en los niveles de expresión, en función del estado de la enfermedad en cada paciente.

EPICAM

Epcam es una proteína de membrana que se expresa en la mayoría de los carcinomas. Las líneas analizadas en este trabajo presentan prácticamente un 100% de células EpCam⁺. La proteína EpCAM no se expresa en el tejido sanguíneo sano, pero si en el de pacientes con carcinomas metastásicos(Allard et al., 2004), por lo tanto, la presencia de esta proteína en sangre se debe a la aparición de una población de células tumorales circulantes en sangre (CTCs). La presencia de la proteína EpCam en pacientes con carcinomas metastásicos se asocia a una corta supervivencia. La identificación y cuantificación de

células tumorales en sangre periférica puede ser de utilidad por constituir una evidencia inicial del proceso de metastatización y constituir un marcador de riesgo de recidiva tumoral. Un nuevo sistema de búsqueda celular (Veridex) se ha diseñado para detectar las células tumorales en la sangre periférica. El sistema es capaz de cuantificar las células epiteliales (EpCam⁺) presentes en sangre, que son separadas de la sangre con técnicas de bandas inmunomagnéticas marcadas con anticuerpos específicos, e identificar las células mediante anticuerpos marcados fluorescentemente anti-citoqueratinas y tinción fluorescente del núcleo. Allard y colaboradores (Allard et al., 2004) han evaluado la precisión, reproductibilidad y linealidad de este nuevo sistema de detección y concluyeron que la técnica es reproducible en diferentes laboratorios. Realizaron el aislamiento y cuantificación de las CTC en sujetos sanos y establecieron la detección de > 2CTC en 7,5 ml de sangre como anormal. En cáncer colorrectal, Cohen y colaboradores (Cohen et al., 2006), mediante la misma técnica, han observado que la cuantificación de CTC > 2/7,5 ml sangre estaba presente en el 31% de los pacientes con cáncer colorrectal metastásico, constituyendo un factor pronóstico de la enfermedad, por lo que dicha tecnología ha sido recientemente aprobada por la FDA en el cáncer colorrectal (Cohen et al., 2006). El Sistema CellSearch (Veridex LLC, Raritan, NJ) ha sido aprobado por la FDA (Administración de Alimentos y Fármacos) de EE.UU para la detección de células tumorales circulantes (CTC) en sangre periférica de los pacientes con cáncer de mama metastático, también ha sido validado por tres centros en los Estados Unidos y Europa (Riethdorf et al., 2007). Datos obtenidos en el hospital clínico San Carlos de Madrid, con el que hemos colaborado en este trabajo, demuestran que las CTC pueden aislarse de pacientes intervenidos de carcinoma de colon, observándose en el 24% de los pacientes en estadio III antes del inicio de la quimioterapia adyuvante, lo cual podría constituir un subgrupo de mal pronóstico para la recidiva (Vidaurreta et al., 2007).

La tecnología de Veridex se ha utilizado para identificar células tumorales circulantes en sangre de pacientes metastásicos con cáncer de pulmón, próstata, páncreas, mama y carcinoma de colon (Nagrath et al., 2007). Ensayos similares han confirmado que estas células derivan del propio tumor (Fehm et al., 2002). Sin embargo, esta técnica tiene todavía un elevado número de falsos negativos, además de haber sido demostrada su ineficacia para algunos tipos de tumores, como por ejemplo el estudio del grupo de Foekens que demostró que el sistema de Veridex no es capaz de reconocer células tumorales mamarias en los carcinomas mamarios *normal-like*, que generalmente suelen ser más los más agresivos (Siewerts et al., 2009). Debido a la necesidad de implementación de la técnica para disminuir el porcentaje de falsos negativos que se escapan al análisis (van Baren et al., 2005), en este trabajo nos propusimos realizar un estudio comparativo con los mismos pacientes entre la técnica de Veridex y la detección de células madre

tumorales por citometría con los marcadores seleccionados en este estudio. Además se estableció una colaboración con el Hospital San Carlos, que trabaja con esta técnica, en concreto con el Dr Diaz Rubio y la Dra Maestro de las Casas. Los datos preliminares de este estudio aquí mostrados indican una buena correlación entre los resultados de ambos métodos, pero además encontramos una mayor sensibilidad en la detección de las proteínas BCRP1 y CD133, que la registrada para la proteína EpCAM, tanto en citometría de flujo como en el análisis de Veridex donde consideran positiva una muestra con dos células por 7,5 ml de sangre periférica. El estudio con más pacientes de esta comparativa, podría permitir la implementación de la detección de la metodología Veridex con nuevos marcadores, que ayudaría al descenso del porcentaje de falsos negativos analizados. Además el empleo de un único marcador con la técnica veridex, marcador EpCam, puede ser limitado, debido a que en ocasiones la expresión de la proteína EpCam puede verse disminuida por las propias condiciones del tumor, e incluso durante el proceso de transición epitelio mesénquima (EMT)(Ota et al., 2009), que se ha relacionado con el incremento de la formación de metástasis a distancia.

BCRP1

La población de CIT debe ser una población resistente a las terapias antineoplásicas utilizadas en clínica, quimioterapia y radioterapia. Así, estas células podrán formar de nuevo el tumor o metástasis a distancia una vez terminados los tratamientos. La familia de los transportadores ABC constituye uno de los mecanismos de resistencia descritos en CIT, concretamente ABCGB1 y ABCG2, relacionadas con la quiescencia y la capacidad de formar tumores(Dean et al., 2005). ABCG2 codifica la proteína BCRP1, sobreexpresada en ciertos tumores, delimitando la población de CIT(Hirschmann-Jax et al., 2004). Como previamente se dijo en el apartado de introducción, la proteína BCRP1 se ha relacionado con la población SP. Ésta ha sido descrita en líneas tumorales estables, con las que se lleva trabajando durante años en los laboratorios, basándose en la capacidad para expulsar el fluoróforo Hoechst, mediante citometría de flujo. La presencia de esta población en las líneas está relacionada con la expresión de la proteína BCRP1(Kondo et al., 2004). Así mismo, se ha relacionado la SP con la formación de tumores muy agresivos en ratones inmunodeficientes(Polyak and Hahn, 2006).

La inserción génica de BCRP1, en células que habitualmente no lo expresan, les confiere una mayor resistencia a una amplia variedad de fármacos(Mao and Unadkat, 2005). Además, los pacientes que expresan esta proteína presentan un peor pronóstico debido a la peor respuesta a los tratamientos con resultado de un menor tiempo de vida libre de enfermedad.(Yoh et al., 2004) De hecho, recientes estudios han demostrado la

implicación de las terapias antineoplásicas en la activación de esta proteína (Israeli et al., 2005). Asimismo, se ha podido constatar que la proteína, aunque se ubica habitualmente en la membrana plasmática, podría expresarse también en compartimentos intracelulares tales como vesículas de secreción. Se cree que la expresión en estos compartimentos podría actuar como secuestrador de fármacos dentro de la propia célula, manteniendo los fármacos lejos de su diana de acción (Aust et al., 2004). La sobre expresión de esta proteína, combinada con otros marcadores de la superficie celular de las células madre, han sido relacionadas colectivamente con el fallo en muchos casos de las técnicas quimioterapéuticas, de la recurrencia del tumor, la recidiva del paciente y la invasión a distancia en cáncer colorrectal (Xie et al., 2014). Con toda esta información, se decidió incorporar la detección de la proteína BCRP1 en el presente estudio.

Sin embargo, la mayor capacidad de formar tumores de estas células ha sido cuestionable en ciertos estudios. En un estudio se demostró la existencia de la SP en tejido sano de colon y líneas de cáncer de colon, pero esta población no coincidió con la población de células madre. En numerosos estudios se ha relacionado la SP con transportadores de membrana tipo ABCG2 y Mdr-, sin embargo, en este estudio estos transportadores parecen no ser específicos de la SP, ya que aparece en la misma proporción tanto en la SP como en el resto de la población. De la misma manera, marcadores de célula madre (CD133, CD44, *Hes-1*, β -catenina, *Mushashi-1*, *Oct-4* y CD117) aparecen en toda la población, no siendo específicos de la SP. Por lo tanto, el concepto de SP como marcador de población de célula madre no es directamente aplicable en células gastrointestinales tumorales (Burkert et al., 2008). Por otro lado, un estudio demostró que las células SP⁺ de la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231, no presentaron una mayor capacidad de formar tumores en ratones inmunodeprimidos que la población SP⁻. Este hecho abre la puerta a la existencia de una subpoblación celular diferente implicada en la formación de tumores.

En las líneas celulares utilizadas en este estudio hemos obtenidos poblaciones muy reducidas de células BCRP1⁺, los porcentajes son de 0.33% en la línea DLD-1, 0.34% en la línea HT-29, 0.02% en la línea SW-480 y 0.13% en la línea SW-620. Sin embargo, la mayor expresión, aunque moderada, de BCRP1 en las líneas HT-29 y DLD-1 coincide con unas tasas de crecimiento mayores en estas líneas, y la mayor capacidad para formar esferas en cultivo (tabla 29). Además estas dos líneas comparten la expresión de la proteína CIMP.

Debido a las pequeñas poblaciones encontradas no parecen haber diferencias entre la línea SW-480 y SW-620, tumor primario y metástasis respectivamente, sin embargo en análisis estadístico indica una mayor

expresión estadísticamente significativa del marcador BCRP1 en la línea metastásica (figura 62).

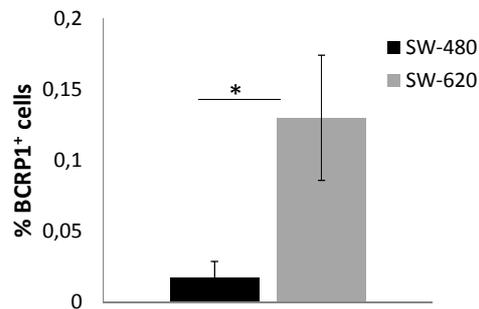


Figure 62: BCRP1 protein expression in sw-480 and sw-620 cell lines . BCRP1 expression showed statistically significant differences between the two cell lines , with the p- value of 0.010

Por lo tanto, la línea SW-620 presenta una mayor población celular resistente a fármacos. Este hecho puede ser el responsable de que la línea celular SW-620 presente una mayor resistencia que la línea SW-480 a oxaliplatino e irinotecán.

Respecto a la capacidad de formación de tumores, los experimentos realizados han sido insuficientes para tener datos estadísticamente significativos y conclusiones fiables, pero los resultados obtenidos han demostrado que inyecciones tanto de células BCRP1⁺ como BCRP1⁻ son capaces de formar tumores en ratones inmunodeprimidos. Además, en contra de lo esperable, el tumor originado de células BCRP1⁺ tiene un desarrollo posterior con respecto a los tumores originados de inyecciones BCRP1⁻. Sin embargo, a pesar de tener un desarrollo más lento, el análisis de los marcadores del tumor BCRP1⁺ respecto a los tumores BCRP1⁻/AC133⁻ refleja un aumento estadísticamente significativos de los marcadores BCRP1, CD133 y AC133 en los tumores BCRP1⁺, lo que podría indicar que se trata de tumores más resistentes y agresivos.

Dentro de los límites que aporta la detección de células madre tumorales en sangre periférica, la expresión diferencial de esta proteína en pacientes con enfermedad metastásica activa avanzada respecto a pacientes libres de enfermedad ha sido la más alta de todo el estudio. Además, el aumento de la expresión de la proteína BCRP1 en las distintas muestras analizadas en este estudio correlaciona con el desarrollo de las distintas resistencias a los tratamientos y recaídas que los pacientes han ido sufriendo durante la evolución de la enfermedad en el 80.6% de los pacientes. En los pacientes de reciente detección, no se ha podido comprobar todavía que la presencia de niveles elevados o subidas progresivas de este marcador esté relacionado con una recaída o resistencia al tratamiento que todavía no ha ocurrido, por lo que

el seguimiento de estos pacientes y el trabajo en común con los clínicos del Hospital General Universitario de Albacete es una asignatura continuada que se debe seguir empleando para validar los resultados de este estudio. Además la colaboración con el Hospital San Carlos de Madrid, donde la proteína BCRP1 no se analiza, está siendo de utilidad para confirmar los resultados allí obtenidos e incluso su anticipación ya que la detección de BCRP1 está resultando más sensible que la del resto de marcadores utilizados. Sin embargo, como se discutirá más adelante, no es el estudio de un único marcador el que nos permitirá adelantarnos a las recidivas, sino la combinación de múltiples marcadores, como por ejemplo los tres analizados en este estudio.

7.2 TRATAMIENTO CON PÉPTIDOS DERIVADOS DE LA PROTEÍNA PEDF

En el presente trabajo se han aplicado distintos tratamientos con péptidos derivados de la proteína neurotrófica y anti-angiogénica PEDF (Becerra, 2006; Bilak et al., 2002; Notari et al., 2006). Se han diseñados dos tipos de estrategias de tratamiento en base a los conocimientos previos, tanto de estabilidad de la proteína como de mecanismo de acción y posibles receptores implicados. Si bien es cierto que, aunque hay descritos hasta tres receptores para la proteína PEDF nativa, nada se sabe del posible mecanismo de acción de los péptidos correspondientes a su extremo carboxilo terminal, a excepción de la inhibición competitiva que se produce al combinar el tratamiento de PEDF exógeno con dosis crecientes de su extremo carboxilo terminal en células madre neuronales (Ramirez-Castillejo et al., 2006).

Todo ello nos llevó a diseñar dos tipos de tratamientos, como se describe en el apartado de material y métodos. El primero, un tratamiento agudo, en una sola dosis, temporalmente coincidente con el tratamiento con quimioterapia, tanto con oxaliplatino como con irinotecan. Estos ensayos están diseñados para poder observar interacciones entre el modo de acción del fármaco quimioterapéutico y el péptido derivado de PEDF. En estos casos hemos visto un efecto parcial que no es extrapolable a todas las líneas ni a todos los tratamientos de quimioterapia. Aunque en un 75% de los casos de tratamientos agudos se vio efecto sobre la resistencia a quimioterapia combinando el tratamiento con los péptidos, sin embargo, no se ve en ninguna de las líneas un efecto sobre la expresión de los marcadores moleculares y solamente un 12% de los tratamientos tuvo efecto sobre la población celular de ciclo lento. Esto puede ser debido a una falta de concentración suficiente de los péptidos, ya que hemos puesto en todos los ensayos una concentración constante en base a la bibliografía. Para poder averiguar este efecto, habría que hacer ensayos a distintas concentraciones de péptidos, para ver si

aumentamos la eficacia del efecto en tratamiento agudo en todos los parámetros en los que hemos cuantificado el efecto. Aunque estos tratamientos agudos han demostrado menor eficacia que los tratamientos crónicos, es importante también su efecto sobre una futura y posible aplicación, ya que un tratamiento agudo tiene más fácil aplicación y es menos tedioso para los pacientes e incluso, menores problemas de coste económico, por lo que los resultados positivos obtenidos, aunque no sean de efecto completo, deben tenerse en cuenta para posibles aplicaciones futuras.

En cambio, en los tratamientos con CT y CTE diseñados de forma crónica, con células de las distintas líneas celulares tumorales tratadas previamente con dosis constantes de los péptidos CT y CTE de 200ng/ml durante un total de seis tratamientos coincidentes con los días de pase celular de los cultivos, el efecto ha sido más generalizado. En estos ensayos se buscaba estudiar la posible implicación de los péptidos derivados de PEDF en la capacidad de las células de cambiar sus patrones celulares tanto de división celular como de activación de rutas de señalización en respuesta al estrés de tóxicos, expresión de proteínas de membrana y proteínas implicadas en la protección a la muerte celular. Tras los tratamientos crónicos aplicados, se ha visto un resultado estadísticamente significativo en el 100% de los casos tratados en cuanto a cambios en la población de ciclo celular lento, y más de un 80% de los tratamientos crónicos realizados registran cambios en cuanto a la bajada de resistencia de la población tumoral a ser tratada con quimioterapéuticos. Observamos también que, cerca de la mitad de estos tratamientos crónicos, un 42%, reflejan cambios estadísticamente significativos en cuanto al descenso en la expresión de marcadores en las células tratadas, así como un 50% de los ensayos reflejan un descenso significativo en el porcentaje de formación de tumores tras estos tratamientos crónicos. Además, en el 100% de los tumores formados tras el tratamiento, los marcadores de las proteínas relacionadas con la malignidad experimentan un descenso estadísticamente significativo.

Todos estos datos en conjunto, aportan nuevas pruebas sobre la posible eficacia de los tratamientos realizados en este trabajo, y abren las puertas a posibles ensayos pre-clínicos, y ensayos clínicos fase uno donde demostrar la baja toxicidad del tratamiento ya experimentada en los animales de experimentación y su posible futura aplicación en combinaciones terapéuticas.

7.2.1. EFECTO DEL EXTREMO CARBOXILO DE PEDF EN LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE SUPERFICIE

El tratamiento agudo diseñado en este estudio con los péptidos derivados de PEDF no produce un efecto visible sobre la expresión de los

marcadores de la superficie celular BCRP1, CD133 y AC133. La concentración de péptidos utilizadas o el tiempo de exposición deben ser insuficientes para observar estas modificaciones de expresión con la sensibilidad de la técnica de citometría utilizada y los rangos de expresión en los que nos movemos.

Sin embargo, las diferencias de expresión de estos marcadores sí son visibles al aplicar tratamientos crónicos, a largo plazo, de exposición a los péptidos derivados de PEDF. La línea que presenta una mayor expresión de BCRP1, HT-29, 0,3% de las células, experimenta un aumento de la expresión de dicho marcador tras el co-cultivo de las células con los derivados de PEDF en 6 tratamientos consecutivos. Dicha expresión asciende hasta valores 10 veces superiores a la línea control sin tratamientos, (3%) tanto con el péptido CT como con el péptido modificado con carga negativa CTE. Esta tendencia a la mayor expresión de la proteína BCRP1 la observamos también en la línea celular SW-480 aunque sin llegar a resultados estadísticamente significativos. La interpretación de este aumento de expresión, coincidente con el aumento de este marcador hasta casi tres veces en los pacientes con enfermedad activa respecto a los pacientes libres de enfermedad, puede indicarnos sus implicaciones en resistencia y tumorigenicidad, ya que es la línea en la que menos efecto se observa con los tratamientos combinados de quimioterapia (tanto oxaliplatino como irinotecan) y los péptidos derivados de PEDF. En el presente trabajo la mayor expresión de BCRP1 se correlaciona con una mayor agresividad tumoral y resistencia a fármacos, tanto en los ensayos *in vitro*, donde el aumento de 10 veces de dicha expresión en la línea tumoral HT-29 tras el tratamiento con CT y CTE coincide con una pérdida de efectividad de esos tratamientos en los ensayos de resistencia; como igualmente en los pacientes con enfermedad activa se observa una media de expresión del marcador tres veces superior a los pacientes libres de enfermedad.

La falta de efecto directo sobre la expresión de esta bomba de tóxicos a través de la superficie celular (BCRP1), podría estar relacionada con la complejidad de proceso que puede estar liderando esta proteína en cuanto a su presencia en pequeñas poblaciones del tumor. Precisamente podrían ser estas pequeñas poblaciones las encargadas de la autorrenovación y la generación de las células tumorales tras el efecto del tratamiento con quimioterapéuticos. A la vez, la exposición crónica a los péptidos CT y CTE puede estar produciendo dos efectos, un cambio en el tipo de división celular que implique ciclos celulares más rápidos y menor autorrenovación como ha sido descrito previamente (Paola Castro-García et al., 2013; Ramirez-Castillejo et al., 2006), pero también se pueda estar generando una sobre-expresión de la proteína que expulsa tóxicos por la presencia de estos péptidos exógenos. Estos efectos complejos y de signo contrario pueden estar enmascarando un resultado más contundente, y solamente la combinación de marcadores, el estudio del efecto de los péptidos sobre la supervivencia global y la

supervivencia libre de enfermedad en una muestra mayor de pacientes pueden ayudarnos en esta disyuntiva.

Otro efecto observado tras la aplicación de los tratamientos crónicos con los péptidos derivados de PEDF en las líneas celulares es el descenso, en la mayoría de las líneas celulares, de la expresión de los marcadores CD133 y AC133. Sin embargo, este descenso de expresión, que solamente es estadísticamente significativa en el caso de la línea tumoral HT-29, no se correlaciona in vivo con los datos de los pacientes, ni tiene una interpretación directa en los datos in vitro, pues hay líneas como la SW-620 donde hay poblaciones muy diferentes en cuanto al nivel de expresión basal de estos marcadores como se presenta en la figura 42 de resultados. Estos resultados pueden deberse a la conversión entre células CD133⁺ y CD133⁻ descrita anteriormente en un trabajo realizado por Jian-Ming Feng y colaboradores, en el que observaron una conversión de células CD133⁺ y CD133⁻ en la línea SW-620 (Feng et al., 2012).

7.2.2. EFECTO DEL EXTREMO CARBOXILO DE PEDF EN LA CINÉTICA DE DIVISIÓN CELULAR

Es especialmente relevante el efecto de los derivados carboxilo de PEDF sobre la cinética de división celular ya que está descrito el efecto de la proteína PEDF nativa sobre dicha cinética de división, aumentando el número de células que poseen ciclos más lentos y procesos de autorrenovación y han sido relacionadas con las células madre (Andreu-Agullo et al., 2009; Ramirez-Castillejo et al., 2006). De nuevo, el efecto de los tratamientos crónicos es más claro que los tratamientos agudos de aplicación puntual, también sobre los efectos de la cinética de división. Lo que se observa en los datos del presente estudio, es que el tratamiento con los derivados de PEDF produce un aumento de la población de células lentas especialmente significativo (de un 2,51% a más de un 90%) en la línea celular HT-29, precisamente la línea en la que dichos tratamientos no facilitaban el efecto de la quimioterapia in vitro. Sin embargo, en la línea SW480, incluso en la derivada de su metástasis, mucho más agresiva, la línea SW620, el efecto de los tratamientos crónicos con los derivados CT y CTE de PEDF produce un descenso estadísticamente significativo de la población de ciclo lento, lo que correlaciona con la mayor sensibilidad de estas líneas a los tratamientos con oxaliplatino e irinotecán, tanto la línea del tumor primario como la línea derivada de la metástasis posterior. Siendo estos claros efectos sobre el descenso de las dosis IC50, IC0 o la población final resistente a concentración fisiológica máxima, visibles tanto en tratamientos crónicos con los péptidos como en tratamientos puntuales (tratamiento agudo). De los datos presentados en este trabajo se deduce que CT y CTE disminuyen el porcentaje de células de ciclo lento en los cultivos,

relacionadas con la autoperpetuación de los tumores y su resistencia a fármacos, en las líneas tumorales SW480 y su metástasis SW-620, a la vez que facilita la respuesta al tratamiento disminuyendo las dosis IC50, IC0 y población resistente, tanto en tratamientos con oxaliplatino como con Irinotecan *in vitro*. Por el contrario, en líneas celulares donde el tratamiento con los péptidos derivados de PEDF producen un aumento la población de ciclo lento, especialmente la línea HT-29 donde prácticamente toda la línea celular relentiza su cinética de división, el efecto de los tratamientos combinados entre quimioterapéuticos y CT/CTE no tiene un efecto constante y estadísticamente significativo.

7.2.3. EFECTO DEL EXTREMO CARBOXILO DE PEDF EN LA RESISTENCIA A LOS TRATAMIENTOS CON OXALIPLATINO E IRINOTECAN

En los ensayos realizados *in vitro* en el presente trabajo con las distintas líneas celulares, se observa una mayor sinergia entre los tratamientos con Irinotecán y los péptidos derivados de PEDF en cuanto a la disminución de la resistencia, descenso del IC50, IC0 y descenso de la población resistente a concentración fisiológica máxima, que con los tratamientos combinados con oxaliplatino. Observando el mecanismo de acción de ambos fármacos, aunque ambos citotóxicos afectan a la división celular, es fácil entender la mayor sinergia con irinotecán, ya que es un fármaco muy específico de fase S y por consiguiente los agentes que activan la cinética celular y fuerzan a entrar a las células en fase S, pueden sinergizar con el efecto citotóxico de esta camptotecina. En cambio el oxaliplatino se clasifica como un agente alquilante. Los agentes alquilantes alcanzan su mayor nivel de actividad durante la fase de reposo celular. Estos tipos de fármacos no son específicos del ciclo celular y el efecto de los péptidos derivados de PEDF acelerando el ciclo celular puede tener menores sinergias con este tipo de fármacos.

7.2.4. EFECTO DEL EXTREMO CARBOXILO DE PEDF EN LA FORMACIÓN DE TUMORES

Acorde a los resultados discutidos hasta el momento, ha sido en los ensayos en los que se han utilizado las líneas tumorales SW480 y SW620, en las que los péptidos CT y CTE tienen un mayor efecto, tanto sobre la expresión de marcadores, como sobre la población de ciclo lento y sobre la resistencia a quimioterapéuticos, donde el efecto de estos péptidos sobre la formación de tumores *in vivo* ha sido visible. En la línea SW480 vemos un descenso de un 25% en la capacidad de la línea para formar tumores en un modelo de xenograft en flanco tras el tratamiento con el péptido CTE. Este efecto es mucho más

visible en la línea SW620, derivada de la metástasis del mismo paciente. En este caso, observamos un descenso de un 25% en la formación de tumores en el modelo de xenograft en flanco con los tratamientos con CT y hasta un descenso de un 50% en los tratamientos con CTE. El mayor efecto observado en la línea derivada de la metástasis puede ser debido a que al ser una línea más agresiva derivada de una metástasis avanzada e inhibir su comportamiento con los péptidos, el efecto pueda ser más claro que en condiciones basales.

7.2.5. CONCENTRACIONES DEL EXTREMO CARBOXILO DE PEDF UTILIZADAS Y TIEMPOS DE EXPOSICIÓN

Hay diversos puntos que podrían ser optimizados en un futuro para continuar el estudio y que se concluyen de los ensayos aquí presentados. Las concentraciones de droga y dosis utilizadas en el presente estudio fueron seleccionadas en base a los rangos fisiológicos en los que han sido testados las distintas drogas así como los péptidos derivados de PEDF en artículos previamente publicados por nuestro grupo de investigación y otros grupos (Paola Castro-García et al., 2013; Ramirez-Castillejo et al., 2006). Para optimizar los ensayos de las curvas dosis-respuesta, y basándonos en los resultados obtenidos, en futuros ensayos se podría aumentar el número de puntos de la curva en dosis correspondientes a la fase exponencial de cada uno de los fármacos utilizados puesto que debido a la cantidad de experimentos y la variedad de líneas derivadas de distintos tumores se han estandarizado las dosis de ensayo cayendo varios puntos en la zona tangencial, donde el efecto de la droga describe una función asintótica debido a la población más resistente dentro de la heterogeneidad de la línea celular.

El efecto de distintas dosis de CT y CTE y tiempos de tratamiento también deberá ser optimizado en posteriores ensayos, de forma que se pueda ver si antes de producir un efecto nocivo de los péptidos, podemos encontrar concentraciones con mayor sinergia en cuanto a la reducción de la población tumoral al combinarlos con los quimioterápicos.

Las diferencias del extremo carboxilo, CT, frente al mutante con una serina intercambiada por un Glutámico, CTE, en el sitio de fosforilación del péptido pueden indicarnos si los requerimientos de actividad de los péptidos estudiados son en cuanto a fosforilación propiamente dicha, o simplemente en cuanto a la presencia de una carga negativa. Cabe reseñar que cuando ponemos el péptido CTE, la serina fosforilable ha sido mutada a glutámico, por lo que la carga negativa es constante en todos los tratamientos, en cambio el péptido CT puede encontrarse en forma fosforilada o no fosforilada en función de las condiciones del medio con lo que el efecto puede ser más variable si

dependiese de dicha fosforilación. En cuanto a las diferencias observadas al aplicar el tratamiento con CT vs CTE, solamente hay diferencias estadísticamente significativas en ensayos puntuales. En concreto, en el estudio de la expresión de los marcadores BCRP1, EpCam, CD133 y AC133 en los tratamientos crónicos en la línea DLD1, hay una disminución de la expresión del marcador AC133 con la exposición crónica a CTE que no se observa con CT. En el resto de tratamientos y líneas, los efectos son paralelos entre CT y CTE.

Por último, al tratarse de medios condicionados en lugar de péptidos purificados, también puede haber otro tipo de proteínas o moléculas que interfieran a modo de contaminantes del medio condicionado, por lo que los ensayos directos con los péptidos purificados también serían convenientes para continuar estos estudios.

7.3 DETECCIÓN DE CÉLULAS INICIADORAS DE TUMORES EN SANGRE PERIFÉRICA

En la práctica oncológica actual cada vez se ha extendido más el uso de marcadores tumorales que son detectados en el suero, sangre y fluidos biológicos de los pacientes, y permiten ser cuantificados debido a su capacidad antigénica mediante técnicas de inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales. El método que hemos desarrollado en nuestro laboratorio se basa en la utilización de tres marcadores relacionados con las CIT o CMT para la detección de células tumorales circulantes en sangre periférica de pacientes con cáncer colorrectal. Con ello pretendemos conseguir un beneficio clínico para los pacientes mediante un diagnóstico precoz de posibles recidivas tumorales, predecir la respuesta de la enfermedad a los diversos tratamientos oncológicos o una información sobre el pronóstico de los pacientes. Sin embargo, la validez de nuestros marcadores está limitada en su aplicación clínica, tanto en la monitorización de la respuesta al tratamiento y sobre todo en el seguimiento de los pacientes, debido a la aparición de valores falsos positivos (elevación del marcador en ausencia de evento clínico que se pretende evidenciar) o falsos negativos (ausencia de elevación del marcador en presencia del evento clínico) en pacientes libres de enfermedad y pacientes aplásicos.

El diseño de nuestra metodología está enfocado principalmente para la localización de pacientes con enfermedad controlada susceptibles a sufrir una recaída de la enfermedad. Este grupo de pacientes, también es el más interesante desde el punto de vista clínico. Es justo en este grupo de pacientes donde hemos observado una alta correlación entre el nivel de los marcadores y la evolución de los pacientes. Sin embargo, en pacientes libres de enfermedad

hemos observado un grupo de pacientes con una elevada expresión de marcadores durante los primeros ciclos de quimioterapia adyuvante. Es posible que durante los primeros ciclos de adyuvancia, debido a la constante regeneración celular, estos marcadores se vean aumentados. Nuestra técnica también ha demostrado no ser válida para un subgrupo de pacientes incluido en el grupo de enfermedad avanzada. Se trata de los pacientes aplásicos, en los que no detectamos altos niveles de marcadores, por lo que para los casos particulares de pacientes con enfermedad activa que, han recibido diferentes líneas de tratamiento y, en los que a pesar de darse una situación de progresión clínica de la enfermedad, observamos todos los marcadores a niveles bajos, estos datos nos revelarían que se trata de un paciente con mal pronóstico. La metodología CellSearch también ha sido cuestionada en el análisis de pacientes metastásicos (Criscitiello et al., 2010).

Respecto a los datos brutos con los que se trabaja en este estudio, lo primero que llama la atención es la pequeña proporción del número de células detectadas. Los datos con los que se trabaja cuando se localizan marcadores relacionados con la población de células madre o células madre tumorales, están muchas veces, en el límite de detección de los instrumentos de análisis, como por ejemplo la citometría de flujo o la detección inmunocitoquímica. Sin embargo, este es un problema que se debe asumir cuando se trabaja con estas poblaciones, pues son extremadamente minoritarias, y no por ello poco importantes, pues a pesar del pequeño porcentaje que representan en el total celular de los sistemas, son capaces de iniciar tumores y son justamente nuestra diana de estudio.

Respecto a otras técnicas de detección de células madre tumorales o células iniciadoras de tumores, en pacientes, destacar, como ya se ha señalado, la técnica de Veridex, que ya está validada clínicamente y en uso para diagnóstico de recaídas en los pacientes, y los rangos de detección están en dos células positivas por cada 7,5 ml de sangre total del paciente, con una especificidad del 100% y una sensibilidad del 50%.

Para validar los resultados, y puesto que en muchas ocasiones cuando se trabaja con muestras de pacientes no se dispone de réplicas de las mismas, el método utilizado es conseguir muestras del mismo paciente durante el seguimiento de su enfermedad, que estén cercanas en el tiempo, de forma que el efecto del tratamiento todavía sea mínimo y el resultado previsible entre muestras muy similares. De este modo se han conseguido validar gran parte de los pacientes de este estudio. Sin embargo, es de resaltar la dificultad de la obtención de muestras sucesivas, ya que no depende del experimentador, sino del personal sanitario habitualmente muy saturado de tareas clínicas y asistenciales, esto supone un incremento de su carga de trabajo para colaborar en la investigación.

La prueba más fehaciente de que estas pequeñas poblaciones analizadas, en el límite de detección y error del equipamiento utilizado, son capaces de iniciar tumores, es realizar inyecciones en ratones inmunodeprimidos para el estudio directo de la formación de un nuevo tumor, inyectando la misma cantidad las células negativas para la proteína marcador en cuestión.

La aplicabilidad de la técnica de detección de células tumorales como indicio de enfermedad metastásica en sangre periférica, ha sido y es muy controvertida, debido a la dificultad de realización y a la sensibilidad y especificidad de la técnica que se consigue (Hoshino et al., 2011; Sato et al., 2012). Sin embargo, la importancia de disponer de una herramienta de este tipo, que pueda predecir la recaída de los pacientes antes de que la metástasis esté avanzada, de forma que aumentemos las posibilidades de un nuevo tratamiento efectivo, hace que los estudios al respecto continúen y centren gran parte de la atención de la investigación oncológica (Hoshino et al., 2011; Liu et al., 2015; Shivapurkar et al., 2014; Yu et al., 2014).

Estos estudios han sido basados en su mayoría en múltiples marcadores, que están demostrando una mayor eficacia y sensibilidad, aunque por el momento el único aprobado por la FDA es el ensayo Veridex, basado en un único marcador, EpCam. En esta tesis, hemos utilizado tres nuevos marcadores relacionados con las células iniciadoras de tumores, y como en muchas pruebas, la medida de la expresión de estas proteínas produce resultados continuos. El comportamiento de la prueba (mayor o menor sensibilidad y especificidad) dependerá de donde se fije el punto de corte en la lista de datos continua que ofrece la variable, de modo que un problema en estas pruebas es la selección del punto de corte óptimo. Para caracterizar su comportamiento se usan las llamadas curvas ROC (Receiver Operating Characteristic) desarrolladas por los operadores de radar e introducidas en la investigación clínica por los radiólogos Hanley y McNeil. Las curvas ROC son curvas en las que se presenta la sensibilidad en función de los falsos positivos (complementario de la especificidad: $1 - \text{especificidad}$) para distintos puntos de corte. Sensibilidad y especificidad son dos características complementarias, y el punto óptimo de corte será aquél que nos permita tener la máxima sensibilidad (pocos falsos negativos) de la técnica sin perder especificidad (pocos falsos positivos) y viceversa. En este trabajo, se ha seleccionado el punto de corte 0,245 para la suma de los tres marcadores de interés (BRCP1, Epcam, CD133 y AC133) ya que es el que permite una mayor sensibilidad, superior al 83%, sin comprometer la especificidad, superior al 71% (figura 55). Un parámetro para evaluar la bondad de la prueba es el área bajo la curva que toma valores entre 1 (prueba perfecta) y 0,5 (prueba inútil). Esta área puede interpretarse como la probabilidad de que ante un par de individuos, uno enfermo y el otro sano, la prueba los clasifique correctamente.

En la siguiente figura (figura 63), vemos un ejemplo de diversas posibles curvas ROC y su bondad (figura 63 A), así como nuestra curva, que aún no siento perfecta se ajusta a una curva útil (figura 63 B)(Hanley and McNeil, 1982; Hanley and McNeil, 1983).

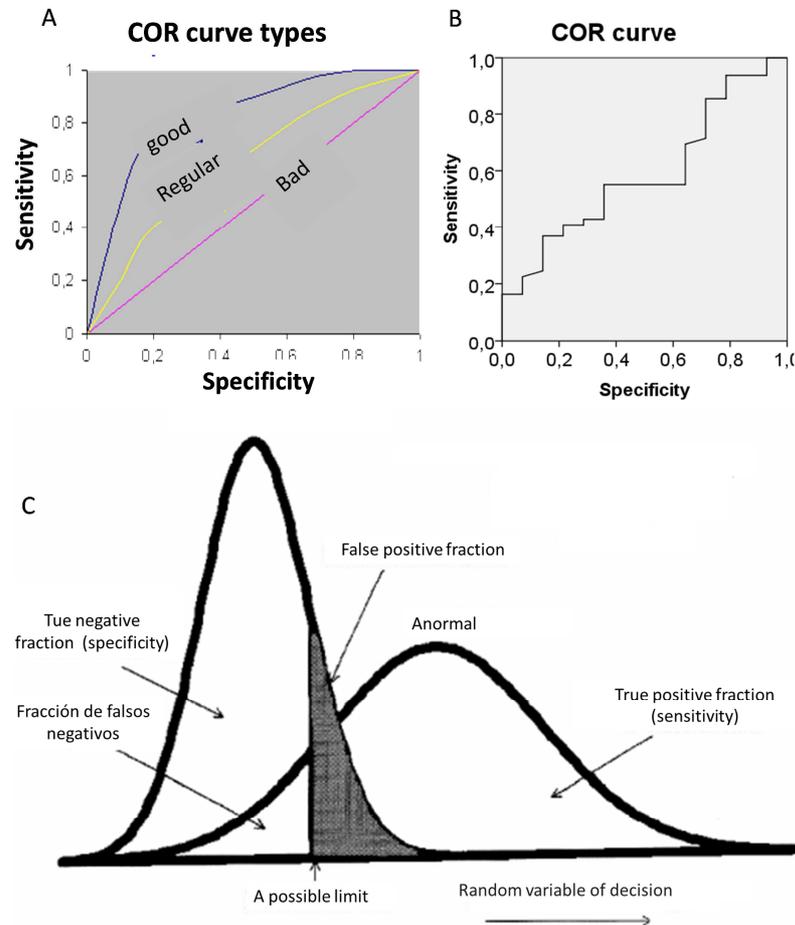


Figure 63: COR curve. COR curve types (A) can be good, regular and bad. A COR curve example (B). Bi-normal model of probability distribution for a ROC curve analysis (C).

En el presente trabajo, la curva ROC fue realizada con las muestras de los individuos pertenecientes al grupo de enfermedad activa y las muestras de individuos pertenecientes al grupo libres de enfermedad, clasificados de esta manera en función de su estado clínico y evolución de la enfermedad. Lo que buscamos es el punto de corte óptimo que nos ayude a discernir entre pacientes con mal o buen pronóstico. Se ha utilizado la suma del porcentaje de expresión de las proteínas seleccionadas como el parámetro a evaluar ya que consideramos que la expresión de una única proteína es menos informativa y que no todos los pacientes tienen elevado el mismo marcador cuando se aproxima una recidiva.

El hecho de que no realicemos la curva ROC con las muestras de los individuos controles es debido a que los controles, en la mayoría de los casos, presentan niveles iguales o superiores de los marcadores. Esto, nos indica que

los controles no son buenos referentes de nivel basal para los distintos marcadores, lo que no supone un problema para la aplicación y funcionalidad de nuestra técnica ya que nosotros no intentamos desarrollar una técnica que permita detectar pacientes sanos que van a sufrir una neoplasia, sino encontrar a aquellos pacientes que sufren o han sufrido una neoplasia colorrectal y que son candidatos a sufrir una recaída o progresión de la enfermedad. Por lo tanto, nuestros niveles basales no pueden ser calculados con los pacientes controles sanos, sino con aquellos pacientes libres de enfermedad neoplásica colorrectal. Se trata pacientes curados pero que han superado un cáncer colorrectal y se han visto sometidos a tratamientos antitumorales.

7.3.1. DETECCIÓN DE CÉLULAS INICIADORAS DE TUMORES EN SANGRE PERIFÉRICA, SU VALOR PRONÓSTICO Y SU RELACIÓN CON LA SUPERVIVENCIA

Una vez fijado el límite que discrimina, con la mejor sensibilidad y especificidad posibles, y optimizada la técnica de seguimiento de los pacientes y análisis de las muestras, se estableció la relación entre el porcentaje de expresión de estas proteínas y la supervivencia a cinco años y la supervivencia libre de enfermedad de los pacientes, encontrando diferencias significativas entre los pacientes con marcadores altos y bajos con el punto de corte seleccionado para la discriminación en el análisis ROC.

Uno de los datos significativos es la diferencia en meses de la mediana de supervivencia global entre los pacientes con marcadores altos respecto a los que presentan una suma de expresión de marcadores por debajo de 0,2450. Los datos presentados en el apartado de resultados son de 50 meses los pacientes con marcadores altos, con un intervalo de confianza al 95% de 47,6 a 52,2 meses, respecto a una mediana de 60 meses en los pacientes con marcadores por debajo de un 0,245% de expresión, con un intervalo de confianza al 95% de 56,9 a 63 meses. La diferencia de medias entre ambos grupos de pacientes es de cinco meses y la diferencia de medianas es de 10 meses. Estos datos están en el rango de los datos publicados hasta el momento (Berk et al., 2015; Hendlisz et al., 2015).

Al analizar las curvas de supervivencia vemos una diferencia significativa de supervivencia a cinco años con una significación de 0,036. Observamos diferencias en este análisis de Kaplan Meier (figura 57) tales como el 90% de la población con expresión alta de la suma de marcadores muere en los 15 primeros meses desde el diagnóstico, mientras que el 90% de la población con una expresión menor de 0,245% de marcadores, tienen supervivencias superiores a los 35 meses, casi dos años de diferencia entre ambos grupos.

En cuanto al tiempo libre de enfermedad, también hay diferencias significativas entre ambos grupos de pacientes. Los pacientes con expresión de marcadores altos tienen una media de recaída de 8,6 meses con un intervalo de confianza al 95% de 6,6 a 10,6 meses, mientras que los pacientes con expresión baja de marcadores tienen una media de 14 meses con un intervalo de confianza al 95% de 10,1 a 17,7 meses hasta la aparición de una nueva recaída. Igualmente los datos de la mediana y media entre ambos grupos son estadísticamente significativos.

En el análisis de la curva Kaplan-Meier de supervivencia libre de enfermedad, también se observan diferencias significativas, con una significación de 0,04. Así, como en el análisis del riesgo de recidiva, donde podemos observar que los pacientes con altos marcadores tienen un riesgo de 3,5 de recaída antes de los tres años, mientras que en los pacientes del grupo con suma de marcadores inferior a 0,245 el riesgo de 2 (figura 57 de resultados).

7.3.2. LIMITACIONES DE LA TÉCNICA

Dos de las limitaciones más importantes de este tipo de estudios suelen ser el bajo número de pacientes de los que se consigue hacer un seguimiento y obtención de muestras en paralelo a sus tratamientos y exploraciones habituales, con consentimiento informado del paciente y con la colaboración del personal sanitario para la obtención de muestras sanguíneas en el momento que el paciente tiene su próxima cita de seguimiento. El estudio está diseñado para la toma de muestras sucesivas a los pacientes durante el periodo de estudio. Es complicado conseguir estas muestras, ya que no están incluidas en el protocolo habitual y en muchas ocasiones la muestra no es recogida, con lo que se dificulta el seguimiento de la expresión de marcadores a lo largo del tiempo y con la evolución del paciente. La segunda limitación común a este tipo de estudios es la heterogeneidad de las muestras, dentro del cáncer colorrectal, como podemos ver en la tabla 24. En este caso, tenemos hasta diez localizaciones distintas pasando por colon, recto, ciego, sigma, etc. y un rango de edades entre 42 y 85 años. Respecto al estadio del tumor tenemos más de un 40% de tumores grado III, casi un 50% grado IV y menos de un 10% de tumores grado II, de los cuales, la mitad presentan metástasis y la otra mitad no han sido detectadas por el momento. El rango de supervivencias que resulta de dicha heterogeneidad en las muestras va de 2 a 141 meses, lo que complica el estudio y la extracción de conclusiones generalizables.

Otro tipo de limitaciones detectadas al inicio del trabajo, y que han sido evaluadas como casos separados son, por un lado, la presencia de un alto porcentaje de individuos en tratamiento adyuvante tras haber sido valorados

como libres de enfermedad y la mayoría de ellos presentan una expresión alta de marcadores en contra de lo esperado. Más del 70% (71,4%) de los pacientes libres de enfermedad que expresan un porcentaje de marcadores superior al valor seleccionado de referencia (0,245) son pacientes en tratamiento adyuvante, lo que puede estar modificando la expresión de estas proteínas, porque afecte a otros tipos celulares que también las expresen en este tipo de condiciones de tratamiento y exposición a agentes quimioterapéuticos.

Por otro lado, en el grupo de los pacientes con enfermedad activa, hay heterogeneidad intra-grupal debido a la presencia de pacientes que están respondiendo a los tratamientos a pesar de sus múltiples recaídas, y pacientes que se encuentran en una fase muy avanzada de la enfermedad donde la aplasia celular es la tónica general en la mayoría de las muestras analizadas. El límite de detección de la técnica, y los valores de expresión de estas proteínas (BCRP1, CD133 y AC133) limitan la sensibilidad de forma que en pacientes con aplasia hematopoyética no es posible la detección de las células positivas debido a la baja celularidad. Este grupo de pacientes, la mayoría en situación terminal, también han sido excluidos y clasificados a parte para la interpretación de los resultados y posibles aplicaciones terapéuticas futuras.

Por último, hay un grupo de pacientes, que mostrando unos niveles elevados de expresión de marcadores, han sido sometidos a una intervención quirúrgica justo después del momento de la toma de la muestra. La cirugía, que evidentemente se prescribe para frenar el avance de la enfermedad, interfiere en el tiempo de recaída y en el tiempo de supervivencia de los pacientes, dificultando el pronóstico basado en la presencia de una elevada expresión proteica. Estos pacientes también han sido analizados por separado en las curvas de supervivencia y evaluaciones predictivas realizadas.

Con todo ello, el número de pacientes efectivos incluidos en el estudio aún se hace más pequeño, así como el número de muestras y su continuidad en el seguimiento de la enfermedad en cada uno de los pacientes.

7.3.3. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA TÉCNICA

Puesto que el único ensayo validado por la oficina americana del medicamento, la FDA, es el ensayo Veridex®, comparamos nuestra técnica con los datos de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo de la técnica Veridex®. La técnica de Veridex, en nuestro estudio, tiene una sensibilidad y especificidad del 48% y 92% respectivamente, con un valor predictivo positivo de 94% y valor predictivo negativo 43%. La metodología puesta a punto en el presente estudio mejora los datos de sensibilidad de Veridex en hasta un 97%, manteniendo la especificidad en niveles admisibles

de 86%. El aumento de sensibilidad permite que desciendan los falsos negativos que tanto perjudicaban, junto con las dificultades técnicas y los costes, a la generalización de la aplicabilidad de la técnica Veridex en la mayoría de los hospitales españoles. Los valores predictivos positivo y negativo también incrementan la futura aplicabilidad de esta nueva metodología. Además, como se ha visto tanto en la aplicación *in vitro* del tratamiento de las células que expresan estos marcadores como en la aplicación in vivo en el modelo de xenograft, cabe la posibilidad de que tengamos una futura aplicación terapéutica a poner en marcha en ensayos pre-clínicos y ensayos clínicos fase I para poder dar una alternativa a los pacientes con marcadores altos antes de que la recidiva sea un tumor detectable.

La eficacia de la metodología aquí planteada, así como su eficiencia, se ponen por lo tanto de manifiesto tras comprobar que en casi el 50% (47,7%) de los casos analizados de forma conjunta con el Hospital San Carlos de Madrid, coincidimos en el pronóstico, siendo más del 95% de ellos casos de acierto. De estos aciertos conjuntos de las dos técnicas, el 70% eran enfermos de mal pronóstico con alta expresión de marcadores, y un 30% individuos libres de enfermedad con baja expresión de marcadores. Ambas técnicas fallan en un caso simultáneamente, que es un falso positivo, asumible como error de la técnica por su baja frecuencia al ser un caso aislado. Este apartado de muestras coincidentes valida nuestra metodología en un 50 % de los casos evaluados.

Sin embargo, las mayores aportaciones de la metodología puesta a punto en este trabajo se deducen de la otra mitad (52,3%) de los casos evaluados, en los que la técnica de veridex y los nuevos marcadores analizados no dan resultados coincidentes. De las 23 muestras analizadas en esta cohorte, Veridex da un resultado correcto en 7 de los casos, (la mayoría, 85,7%, casos negativos y algún caso positivo) y erróneo en 16, todos ellos falsos negativos. Esto es lo que hace que la técnica de Veridex tenga más de un 36% de falsos negativos con un VPN de 43%, lo que dificulta su aplicabilidad, ya que no podemos estar seguros del pronóstico de los pacientes con bajo marcador tras el costoso análisis.

Sin embargo, de estas 23 muestras analizadas conjuntamente, mediante la cuantificación de la expresión de los marcadores BCRP1, EpCam, CD133 y AC133 obtenemos casi un 70% de aciertos correspondientes a 16 muestras resultaron coherentes con el estado y evolución de los pacientes y 7 resultaron erróneas. Los aciertos en este caso corresponden en su totalidad a pacientes con enfermedad activa y mal pronóstico que tienen elevada la expresión de marcadores. En cuando a los siete fallos detectados, 6 de ellos son falsos positivos, debido al umbral seleccionado como punto de corte al inicio del estudio. Por ello solamente un 16% de las muestras analizadas son falsos positivos con esta metodología, y lo que supondría para el paciente solamente

es un seguimiento más exhaustivo ante la amenaza de recidiva. A la vez que disminuimos el número de falsos negativos a tan solo un caso aislado. Así, la nueva metodología planteada presenta un VPN de 86% y un VPP de 97% mejorando lo disponible hasta el momento con aplicación clínica.

7.4 UTILIDAD DEL MODELO DE XENOGRAFT Y CULTIVO IN VITRO DE CÉLULAS DE PACIENTE

Pocas cosas nos ayudarían más en el momento actual, tanto económicamente como en rentabilidad de calidad de vida para los pacientes, como conocer si los tratamientos que vamos a aplicarles van a ser beneficiosos, inocuos o incluso perjudiciales para cada uno de los pacientes oncológicos. Cada día es menos ciencia ficción que podamos disponer de modelos *in vitro*, derivados de pacientes, tanto células en cultivo (Cayrefourcq et al., 2015; Chik et al., 2014; Costabile et al., 2015; Ludwig et al., 2013) donde probar los distintos tratamientos posibles de forma más rápida y segura, que en el propio paciente, por líneas terapéuticas consecutivas, como hacemos actualmente, viendo cual es la de mayor eficacia y menor efecto secundario. Como también incluso, de avatares a partir de modelos de xenograft, con células derivadas del tumor del paciente inyectadas en el modelo de ratón, donde ver el comportamiento de este específico tumor *in vivo*, y su respuesta a los posibles tratamientos (Garraalda et al., 2014; Hasan et al., 2015; Klinghammer et al., 2015; Russo et al., 2015; Zayed et al., 2015).

No todos los pacientes responden del mismo modo ante los tratamientos, en parte por su tipo de tumor o su estado físico, y en parte por la carga génica que conlleva múltiples respuestas en función de la expresión, por ejemplo de variantes de proteínas detoxificantes como BCRP1 o GSTT1 (Rodríguez-Antona and Taron, 2015). La farmacogenética es la técnica que estudia estas variaciones inter-individuales y de la que posiblemente encontremos muchos apoyos en los próximos años (Relling and Evans, 2015).

Tanto conocer la respuesta esperable del paciente en base a su carga génica, como las técnicas de cultivo celular *in vitro*, como la de avatares *in vivo*, permitirían por un lado, evitar la exposición de los pacientes a tratamientos ineficaces y altas toxicidades y, por otro lado, ahorrar costes al sistema. Además, estas técnicas son base fundamental para la puesta en marcha de nuevos posibles tratamientos, con futuras aplicaciones terapéuticas antes de administrarlos a los pacientes, como puede ser el caso de los péptidos derivados del extremo carboxilo de PEDF, utilizados como se ha explicado en el presente trabajo.

En resumen, tanto 1) conocer nuevos marcadores eficaces en la detección precoz de la recaída del pacientes, como 2) tener nuevas herramientas que modifiquen el comportamiento y cinética celular de las células responsables del inicio de los tumores y las recidivas, para evitar que puedan seguir propagando el tumor, han sido los dos objetivos en los que se ha trabajado en el presente proyecto y cuyos resultados paso a resumir en las conclusiones del mismo.

CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

1. La mayor expresión de BCRP1 se correlaciona con una mayor agresividad tumoral y resistencia a fármacos, en los ensayos in vitro, donde el aumento de 10 veces dicha expresión, en la línea tumoral HT-29 tras el tratamiento con CT y CTE, coincide con una pérdida de efectividad de esos tratamientos en los ensayos de resistencia.

2. Al igual que los ensayos in vitro, en los estudios con sangre de pacientes, el marcador BRCP1 se correlaciona con tumorigenicidad. En los pacientes con enfermedad activa se observa una media de expresión del marcador tres veces superior a los pacientes libres de enfermedad.

3. Del mismo modo, en los ensayos in vivo en el modelo de xenograft en flanco de los ratones, se observa un descenso de la expresión de BCRP1 con los tratamientos con CT y CTE, a la vez que desciende el número de tumores formados y su tamaño con dichos tratamientos.

4. Los péptidos CT y CTE, derivados de la proteína PEDF, disminuyen la población de ciclo lento, relacionada con la autoperpetuación de los tumores y su resistencia a fármacos, en las líneas tumorales SW480 y su metástasis SW-620, a la vez que facilita la respuesta al tratamiento disminuyendo las dosis IC50, IC0 y población resistente, tanto en tratamientos con oxaliplatino como con Irinotecan in vitro.

5. En líneas celulares donde el tratamiento con los péptidos derivados de PEDF producen un aumento la población de ciclo lento, especialmente la línea HT-29, el efecto de los tratamientos combinados entre quimioterapéuticos y CT/CTE no tiene un efecto constante y estadísticamente significativo.

6. Los péptidos derivados del extremo carboxilo de la proteína PEDF, CT, y especialmente la forma CTE, que simula la fosforilación permanente, producen un efecto sinérgico con la quimioterapia, disminuyendo el IC50 de los fármacos oxaliplatino, y especialmente irinotecan, así como los valores de IC0 y la población resistente a concentraciones de droga máxima fisiológica.

7. Los marcadores BCRP1, EpCam, CD133 y AC133 correlacionan con la evolución del paciente y la supervivencia libre de enfermedad, aunque no se observan diferencias significativas en supervivencia global con los pacientes analizados. Sin embargo, no son los marcadores por separado los que son informativos, sino el estudio de la cinética de expresión de los cuatro marcadores simultáneamente lo que ayuda a predecir la recidiva.

► CONCLUSIONES

8. El 80% de los pacientes con enfermedad activa presentan una expresión de la combinación de marcadores BCRP1/EpCam/CD133/AC133 superior al 0,24% de las células en sangre periférica. Mientras que solo el 36% de los pacientes libre de enfermedad presentan este nivel de expresión.

9. La expresión de esta combinación de marcadores, por encima del 0,2450% en pacientes libres de enfermedad (36%) coincide con pacientes en tratamiento adyuvante de largo periodo, lo que dificulta la aplicación de la técnica en este tipo de pacientes.

10. La expresión de esta combinación de marcadores por debajo del 0,2450% en pacientes con enfermedad activa (20%), coincide con pacientes aplásicos, con muy poca celularidad hematopoyética, por lo que en estos casos la técnica no es aplicable.

11. La detección de esta combinación de marcadores con el valor de referencia seleccionado, en el grupo de pacientes con enfermedad controlada, donde el la sintomatología no ayuda a predecir la aparición de la recidiva, confiere una sensibilidad de la técnica de 84%, una especificidad de 71%, un valor predictivo positivo de 69% y un valor predictivo negativo de 78%.

12. Las curvas de supervivencia y supervivencia libre de enfermedad presentan diferencias estadísticamente significativas entre pacientes que presentan una suma de marcadores de estudio igual o superior a 0.2450 y aquellos que presentan una suma total de los marcadores por debajo de 0.2450, siendo la supervivencia de 15 meses más en el grupo de pacientes con nivel bajo de marcadores al 80% de los casos.

13. Respecto a la técnica de veridex, hasta el momento la única aprobada por la FDA, comparada con la técnica propuesta en este trabajo, presenta niveles de sensibilidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo inferior a los obtenidos en nuestro laboratorio. Por lo tanto, la complementación de ambas técnicas mejorará los resultados de la posible recaída de los pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

Al Hajj M, Becker MW, Wicha M, Weissman I, Clarke MF (2004) Therapeutic implications of cancer stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 14:43-47

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF (2003) Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:3983-3988

Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, Tibbe AG, Uhr JW, Terstappen LW (2004) Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res* 10:6897-6904

Andreu-Agullo C, Morante-Redolat JM, Delgado AC, Farinas I (2009) Vascular niche factor PEDF modulates Notch-dependent stemness in the adult subependymal zone. *Nat Neurosci* 12:1514-1523

Armstrong L, Saretzki G, Peters H, Wappler I, Evans J, Hole N, von ZT, Lako M (2005) Overexpression of telomerase confers growth advantage, stress resistance, and enhanced differentiation of ESCs toward the hematopoietic lineage. *Stem Cells* 23:516-529

Aust S, Obrist P, Jaeger W, Klimpfinger M, Tucek G, Wrba F, Penner E, Thalhammer T (2004) Subcellular localization of the ABCG2 transporter in normal and malignant human gallbladder epithelium. *Lab Invest* 84:1024-1036

Baeuerle PA, Gires O (2007) EpCAM (CD326) finding its role in cancer. *Br J Cancer* 96:417-423

Bailey-Dell KJ, Hassel B, Doyle LA, Ross DD (2001) Promoter characterization and genomic organization of the human breast cancer resistance protein (ATP-binding cassette transporter G2) gene. *Biochim Biophys Acta* 1520:234-241

Becerra SP (2006) Focus on Molecules: Pigment epithelium-derived factor (PEDF). *Exp Eye Res* 82:739-740

Becerra SP, Notario V (2013) The effects of PEDF on cancer biology: mechanisms of action and therapeutic potential. *Nat Rev Cancer* 13:258-271

Bellizzi A, Sebastian S, Ceglia P, Centonze M, Divella R, Manzillo EF, Azzariti A, Silvestris N, Montemurro S, Caliendo C, De LR, Cicero G, Rizzo S, Russo A, Quaranta M, Simone G, Paradiso A (2013) Co-expression of CD133(+)/CD44(+) in human colon cancer and liver metastasis. *J Cell Physiol* 228:408-415

Berk V, Deniz K, Bozkurt O, Ozaslan E, Karaca H, Inanc M, Duran AO, Ozkan M (2015) Predictive Significance of VEGF and HIF-1alpha Expression in Patients with Metastatic Colorectal Cancer Receiving Chemotherapy Combinations with Bevacizumab. *Asian Pac J Cancer Prev* 16:6149-6154

Bhatia M, Wang JC, Kapp U, Bonnet D, Dick JE (1997) Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:5320-5325

► BIBLIOGRAFIA

Bilak MM, Becerra SP, Vincent AM, Moss BH, Aymerich MS, Kuncl RW (2002) Identification of the neuroprotective molecular region of pigment epithelium-derived factor and its binding sites on motor neurons. *J Neurosci* 22:9378-9386

Bissell MJ, Labarge MA (2005) Context, tissue plasticity, and cancer: are tumor stem cells also regulated by the microenvironment? *Cancer Cell* 7:17-23

Bodmer W, Bishop T, Karran P (1994) Genetic steps in colorectal cancer. *Nat Genet* 6:217-219

Boman BM, Fields JZ, Cavanaugh KL, Guetter A, Runquist OA (2008) How dysregulated colonic crypt dynamics cause stem cell overpopulation and initiate colon cancer. *Cancer Res* 68:3304-3313

Boman BM, Wicha MS, Fields JZ, Runquist OA (2007) Symmetric division of cancer stem cells--a key mechanism in tumor growth that should be targeted in future therapeutic approaches. *Clin Pharmacol Ther* 81:893-898

Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T (2005) Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer* 5:744-749

Brittan M, Wright NA (2004) The gastrointestinal stem cell. *Cell Prolif* 37:35-53

Budman DR (2000) Capecitabine. *Invest New Drugs* 18:355-363

Burkert J, Otto WR, Wright NA (2008) Side populations of gastrointestinal cancers are not enriched in stem cells. *J Pathol* 214:564-573

Burkert J, Wright NA, Alison MR (2006) Stem cells and cancer: an intimate relationship. *J Pathol* 209:287-297

Butof R, Dubrovskaya A, Baumann M (2013) Clinical perspectives of cancer stem cell research in radiation oncology. *Radiother Oncol* 108:388-396

Campbell LL, Polyak K (2007) Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution? *Cell Cycle* 6:2332-2338

Carrato A, Gallego J, Diaz-Rubio E (2002) Oxaliplatin: results in colorectal carcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 44:29-44

Cayrefourcq L, Mazard T, Joosse S, Solassol J, Ramos J, Assenat E, Schumacher U, Costes V, Maudelonde T, Pantel K, Alix-Panabieres C (2015) Establishment and characterization of a cell line from human circulating colon cancer cells. *Cancer Res* 75:892-901

Chen KL, Pan F, Jiang H, Chen JF, Pei L, Xie FW, Liang HJ (2011) Highly enriched CD133(+)/CD44(+) stem-like cells with CD133(+)/CD44(high) metastatic subset in HCT116 colon cancer cells. *Clin Exp Metastasis* 28:751-763

Chen KY, Liu X, Bu P, Lin CS, Rakhilin N, Locasale JW, Shen X (2014) A metabolic signature of colon cancer initiating cells. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2014:4759-4762

Chen S, Song X, Chen Z, Li X, Li M, Liu H, Li J (2013) CD133 expression and the prognosis of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 8:e56380

Chen YC, Hsu HS, Chen YW, Tsai TH, How CK, Wang CY, Hung SC, Chang YL, Tsai ML, Lee YY, Ku HH, Chiou SH (2008) Oct-4 expression maintained cancer stem-like properties in lung cancer-derived CD133-positive cells. *PLoS One* 3:e2637

Cheng T, Rodrigues N, Shen H, Yang Y, Dombkowski D, Sykes M, Scadden DT (2000) Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1. *Science* 287:1804-1808

Chik JH, Zhou J, Moh ES, Christopherson R, Clarke SJ, Molloy MP, Packer NH (2014) Comprehensive glycomics comparison between colon cancer cell cultures and tumours: implications for biomarker studies. *J Proteomics* 108:146-162

Chu P, Clanton DJ, Snipas TS, Lee J, Mitchell E, Nguyen ML, Hare E, Peach RJ (2009) Characterization of a subpopulation of colon cancer cells with stem cell-like properties. *Int J Cancer* 124:1312-1321

Church JM, Gibbs P, Chao MW, Tjandra JJ (2003) Optimizing the outcome for patients with rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 46:389-402

Clarke MF (2005) Epigenetic regulation of normal and cancer stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 1044:90-93

Clarke MF, Becker MW (2006) Stem cells: the real culprits in cancer? *Sci Am* 295:52-59

Cohen SJ, Alpaugh RK, Gross S, O'Hara SM, Smirnov DA, Terstappen LW, Allard WJ, Bilbee M, Cheng JD, Hoffman JP, Lewis NL, Pellegrino A, Rogatko A, Sigurdson E, Wang H, Watson JC, Weiner LM, Meropol NJ (2006) Isolation and characterization of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 6:125-132

Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, Picus J, Morse M, Mitchell E, Miller MC, Doyle GV, Tissing H, Terstappen LW, Meropol NJ (2008) Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 26:3213-3221

Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ (2005) Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 65:10946-10951

Corbeil D, Roper K, Hellwig A, Tavian M, Miraglia S, Watt SM, Simmons PJ, Peault B, Buck DW, Huttner WB (2000) The human AC133 hematopoietic stem cell antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusions. *J Biol Chem* 275:5512-5520

Costabile V, Duraturo F, Delrio P, Rega D, Pace U, Liccardo R, Rossi GB, Genesio R, Nitsch L, Izzo P, De RM (2015) Lithium chloride induces mesenchymal-to-epithelial reverting transition in primary colon cancer cell cultures. *Int J Oncol* 46:1913-1923

Criscitello C, Sotiriou C, Ignatiadis M (2010) Circulating tumor cells and emerging blood biomarkers in breast cancer. *Curr Opin Oncol* 22:552-558

Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, Reuben JM, Doyle GV, Allard WJ, Terstappen LW, Hayes DF (2004) Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 351:781-791

► BIBLIOGRAFIA

Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, Liu R, Wang X, Cho RW, Hoey T, Gurney A, Huang EH, Simeone DM, Shelton AA, Parmiani G, Castelli C, Clarke MF (2007) Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:10158-10163

Dean M, Fojo T, Bates S (2005) Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer* 5:275-284

Dick JE (2003) Breast cancer stem cells revealed. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:3547-3549

Diehn M, Cho RW, Lobo NA, Kalisky T, Dorie MJ, Kulp AN, Qian D, Lam JS, Ailles LE, Wong M, Joshua B, Kaplan MJ, Wapnir I, Dirbas FM, Somlo G, Garberoglio C, Paz B, Shen J, Lau SK, Quake SR, Brown JM, Weissman IL, Clarke MF (2009) Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature* 458:780-783

Douard R, Moutereau S, Pernet P, Chimingqi M, Allory Y, Manivet P, Conti M, Vaubourdolle M, Cugnenc PH, Loric S (2006) Sonic Hedgehog-dependent proliferation in a series of patients with colorectal cancer. *Surgery* 139:665-670

Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, Ross DD (1998) A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15665-15670

Du L, Wang H, He L, Zhang J, Ni B, Wang X, Jin H, Cahuzac N, Mehrpour M, Lu Y, Chen Q (2008) CD44 is of functional importance for colorectal cancer stem cells. *Clin Cancer Res* 14:6751-6760

Ek ET, Dass CR, Choong PF (2006) Pigment epithelium-derived factor: a multimodal tumor inhibitor. *Mol Cancer Ther* 5:1641-1646

Eramo A, Lotti F, Sette G, Pilozi E, Biffoni M, Di VA, Conticello C, Ruco L, Peschle C, De MR (2008) Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ* 15:504-514

Fearon ER, Vogelstein B (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61:759-767

Fehm T, Sagalowsky A, Clifford E, Beitsch P, Saboorian H, Euhus D, Meng S, Morrison L, Tucker T, Lane N, Ghadimi BM, Heselmeyer-Haddad K, Ried T, Rao C, Uhr J (2002) Cytogenetic evidence that circulating epithelial cells in patients with carcinoma are malignant. *Clin Cancer Res* 8:2073-2084

Feng JM, Miao ZH, Jiang Y, Chen Y, Li JX, Tong LJ, Zhang J, Huang YR, Ding J (2012) Characterization of the conversion between CD133+ and C. *Cancer Biol Ther* 13:1396-1406

Fialkow PJ, Gartler SM, Yoshida A (1967) Clonal origin of chronic myelocytic leukemia in man. *Proc Natl Acad Sci U S A* 58:1468-1471

Galizia G, Gemei M, Del VL, Zamboli A, Di NR, Mirabelli P, Salvatore F, Castellano P, Orditura M, De VF, Pinto M, Pignatelli C, Lieto E (2012) Combined CD133/CD44 expression as a prognostic indicator of disease-free survival in patients with colorectal cancer. *Arch Surg* 147:18-24

Galmarini CM, Mackey JR, Dumontet C (2002) Nucleoside analogues and nucleobases in cancer treatment. *Lancet Oncol* 3:415-424

Garralda E, Paz K, Lopez-Casas PP, Jones S, Katz A, Kann LM, Lopez-Rios F, Sarno F, Al-Shahrour F, Vasquez D, Bruckheimer E, Angiuoli SV, Calles A, Diaz LA, Velculescu VE, Valencia A, Sidransky D, Hidalgo M (2014) Integrated next-generation sequencing and avatar mouse models for personalized cancer treatment. *Clin Cancer Res* 20:2476-2484

Gatalica Z, Torlakovic E (2008) Pathology of the hereditary colorectal carcinoma. *Fam Cancer* 7:15-26

Gil J, Stembalska A, Pesz KA, Sasiadek MM (2008) Cancer stem cells: the theory and perspectives in cancer therapy. *J Appl Genet* 49:193-199

Gonzalez C (2008) Centrosome function during stem cell division: the devil is in the details. *Curr Opin Cell Biol* 20:694-698

Gostjeva EV, Zukerberg L, Chung D, Thilly WG (2006) Bell-shaped nuclei dividing by symmetrical and asymmetrical nuclear fission have qualities of stem cells in human colonic embryogenesis and carcinogenesis. *Cancer Genet Cytogenet* 164:16-24

Greaves LC, Preston SL, Tadrus PJ, Taylor RW, Barron MJ, Oukrif D, Leedham SJ, Deheragoda M, Sasieni P, Novelli MR, Jankowski JA, Turnbull DM, Wright NA, McDonald SA (2006) Mitochondrial DNA mutations are established in human colonic stem cells, and mutated clones expand by crypt fission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:714-719

Guo W, Lasky JL, III, Wu H (2006) Cancer stem cells. *Pediatr Res* 59:59R-64R

Guo Y, Ma J, Wang J, Che X, Narula J, Bigby M, Wu M, Sy MS (1994) Inhibition of human melanoma growth and metastasis in vivo by anti-CD44 monoclonal antibody. *Cancer Res* 54:1561-1565

Guzman ML, Swiderski CF, Howard DS, Grimes BA, Rossi RM, Szilvassy SJ, Jordan CT (2002) Preferential induction of apoptosis for primary human leukemic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:16220-16225

Hanley JA, McNeil BJ (1982) The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology* 143:29-36

Hanley JA, McNeil BJ (1983) A method of comparing the areas under receiver operating characteristic curves derived from the same cases. *Radiology* 148:839-843

Haraguchi N, Ohkuma M, Sakashita H, Matsuzaki S, Tanaka F, Mimori K, Kamohara Y, Inoue H, Mori M (2008) CD133+CD44+ population efficiently enriches colon cancer initiating cells. *Ann Surg Oncol* 15:2927-2933

Hasan N, Ohman AW, Dinulescu DM (2015) The promise and challenge of ovarian cancer models. *Transl Cancer Res* 4:14-28

Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, Masterman-Smith M, Geschwind DH, Bronner-Fraser M, Kornblum HI (2003) Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15178-15183

Hendlisz A, Deleporte A, Delaunoit T, Marechal R, Peeters M, Holbrechts S, Van den Eynde M, Houbiers G, Filleul B, Van Laethem JL, Ceyssens S, Barbuto AM, Lhommel R, Demolin G, Garcia C, El MH, Ameye L, Moreau M, Guiot T, Paesmans M, Piccart M, Flamen P (2015) The

► BIBLIOGRAFIA

Prognostic Significance of Metabolic Response Heterogeneity in Metastatic Colorectal Cancer. *PLoS One* 10:e0138341

Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, Nuchtern JG, Jax TW, Gobel U, Goodell MA, Brenner MK (2004) A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:14228-14233

Horst D, Kriegl L, Engel J, Kirchner T, Jung A (2008) CD133 expression is an independent prognostic marker for low survival in colorectal cancer. *Br J Cancer* 99:1285-1289

Horst D, Scheel SK, Liebmann S, Neumann J, Maatz S, Kirchner T, Jung A (2009) The cancer stem cell marker CD133 has high prognostic impact but unknown functional relevance for the metastasis of human colon cancer. *J Pathol* 219:427-434

Hoshino K, Huang YY, Lane N, Huebschman M, Uhr JW, Frenkel EP, Zhang X (2011) Microchip-based immunomagnetic detection of circulating tumor cells. *Lab Chip* 11:3449-3457

Huang EH, Wicha MS (2008) Colon cancer stem cells: implications for prevention and therapy. *Trends Mol Med* 14:503-509

Huls M, Russel FG, Masereeuw R (2009) The role of ATP binding cassette transporters in tissue defense and organ regeneration. *J Pharmacol Exp Ther* 328:3-9

Huntly BJ, Gilliland DG (2005) Cancer biology: summing up cancer stem cells. *Nature* 435:1169-1170

Israeli D, Ziaei S, Gonin P, Garcia L (2005) A proposal for the physiological significance of *mdr1* and *Bcrp1/Abcg2* gene expression in normal tissue regeneration and after cancer therapy. *J Theor Biol* 232:41-45

Jones RJ, Matsui WH, Smith BD (2004) Cancer stem cells: are we missing the target? *J Natl Cancer Inst* 96:583-585

Jonker JW, Buitelaar M, Wagenaar E, van der Valk MA, Scheffer GL, Scheper RJ, Plosch T, Kuipers F, Elferink RP, Rosing H, Beijnen JH, Schinkel AH (2002) The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15649-15654

Jonker JW, Freeman J, Bolscher E, Musters S, Alvi AJ, Titley I, Schinkel AH, Dale TC (2005) Contribution of the ABC transporters *Bcrp1* and *Mdr1a/1b* to the side population phenotype in mammary gland and bone marrow of mice. *Stem Cells* 23:1059-1065

Karanu FN, Murdoch B, Gallacher L, Wu DM, Koremoto M, Sakano S, Bhatia M (2000) The notch ligand *jagged-1* represents a novel growth factor of human hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 192:1365-1372

Kikuchi A (2009) [Wnt signaling; its abnormalities and diseases]. *Seikagaku* 81:780-792

Kim YH, Ishii G, Goto K, Ota S, Kubota K, Murata Y, Mishima M, Saijo N, Nishiwaki Y, Ochiai A (2009) Expression of breast cancer resistance protein is associated with a poor clinical outcome in patients with small-cell lung cancer. *Lung Cancer* 65:105-111

Kinzler KW, Vogelstein B (1996) Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87:159-170

Klinghammer K, Raguse JD, Plath T, Albers AE, Joehrens K, Zakarneh A, Brzezicha B, Wulf-Goldenberg A, Keilholz U, Hoffmann J, Fichtner I (2015) A comprehensively characterized large panel of head and neck cancer patient-derived xenografts identifies the mTOR inhibitor everolimus as potential new treatment option. *Int J Cancer* 136:2940-2948

Kojima M, Ishii G, Atsumi N, Fujii S, Saito N, Ochiai A (2008) Immunohistochemical detection of CD133 expression in colorectal cancer: a clinicopathological study. *Cancer Sci* 99:1578-1583

Kondo T, Setoguchi T, Taga T (2004) Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:781-786

Koprowski H, Steplewski Z, Mitchell K, Herlyn M, Herlyn D, Fuhrer P (1979) Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies. *Somatic Cell Genet* 5:957-971

Kuboki Y, Matsusaka S, Minowa S, Shibata H, Suenaga M, Shinozaki E, Mizunuma N, Ueno M, Yamaguchi T, Hatake K (2013) Circulating tumor cell (CTC) count and epithelial growth factor receptor expression on CTCs as biomarkers for cetuximab efficacy in advanced colorectal cancer. *Anticancer Res* 33:3905-3910

Kucia M, Ratajczak MZ (2006) Stem cells as a two edged sword--from regeneration to tumor formation. *J Physiol Pharmacol* 57 Suppl 7:5-16

Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE (1994) A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367:645-648

Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF, Simeone DM (2007) Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 67:1030-1037

Li CY, Li BX, Liang Y, Peng RQ, Ding Y, Xu DZ, Zhang X, Pan ZZ, Wan DS, Zeng YX, Zhu XF, Zhang XS (2009) Higher percentage of CD133+ cells is associated with poor prognosis in colon carcinoma patients with stage IIIB. *J Transl Med* 7:56

Liu C, Gao H, Cao L, Gui S, Liu Q, Li C, Li D, Gong L, Zhang Y (2015) The role of FSCN1 in migration and invasion of pituitary adenomas. *Mol Cell Endocrinol*

Liu G, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir IR, Lu L, Irvin D, Black KL, Yu JS (2006) Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer* 5:67

Lobo NA, Shimono Y, Qian D, Clarke MF (2007) The biology of cancer stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23:675-699

Ludwig K, Tse ES, Wang JY (2013) Colon cancer cells adopt an invasive phenotype without mesenchymal transition in 3-D but not 2-D culture upon combined stimulation with EGF and crypt growth factors. *BMC Cancer* 13:221

Lugli A, Iezzi G, Hostettler I, Muraro MG, Mele V, Tornillo L, Carafa V, Spagnoli G, Terracciano L, Zlobec I (2010) Prognostic impact of the expression of putative cancer stem cell markers CD133, CD166, CD44s, EpCAM, and ALDH1 in colorectal cancer. *Br J Cancer* 103:382-390

► BIBLIOGRAFIA

Ma S, Lee TK, Zheng BJ, Chan KW, Guan XY (2008) CD133+ HCC cancer stem cells confer chemoresistance by preferential expression of the Akt/PKB survival pathway. *Oncogene* 27:1749-1758

Maik-Rachline G, Seger R (2006) Variable phosphorylation states of pigment-epithelium-derived factor differentially regulate its function. *Blood* 107:2745-2752

Maik-Rachline G, Shaltiel S, Seger R (2005) Extracellular phosphorylation converts pigment epithelium-derived factor from a neurotrophic to an antiangiogenic factor. *Blood* 105:670-678

Maliepaard M, Scheffer GL, Faneyte IF, van Gastelen MA, Pijnenborg AC, Schinkel AH, van De Vijver MJ, Scheper RJ, Schellens JH (2001) Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res* 61:3458-3464

Mao Q, Unadkat JD (2005) Role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in drug transport. *AAPS J* 7:E118-E133

Marhaba R, Zoller M (2004) CD44 in cancer progression: adhesion, migration and growth regulation. *J Mol Histol* 35:211-231

McDonald SA, Preston SL, Lovell MJ, Wright NA, Jankowski JA (2006) Mechanisms of disease: from stem cells to colorectal cancer. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 3:267-274

Meyerhardt JA, Niedzwiecki D, Hollis D, Saltz LB, Hu FB, Mayer RJ, Nelson H, Whittom R, Hantel A, Thomas J, Fuchs CS (2007) Association of dietary patterns with cancer recurrence and survival in patients with stage III colon cancer. *JAMA* 298:754-764

Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, Haller DG, Laurie JA, Goodman PJ, Ungerleider JS, Emerson WA, Tormey DC, Glick JH, . (1990) Levamisole and fluorouracil for adjuvant therapy of resected colon carcinoma. *N Engl J Med* 322:352-358

Morrison SJ, Kimble J (2006) Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* 441:1068-1074

Moser AR, Pitot HC, Dove WF (1990) A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science* 247:322-324

Munz M, Kieu C, Mack B, Schmitt B, Zeidler R, Gires O (2004) The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation. *Oncogene* 23:5748-5758

Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, Bell DW, Irimia D, Ulkus L, Smith MR, Kwak EL, Digumarthy S, Muzikansky A, Ryan P, Balis UJ, Tompkins RG, Haber DA, Toner M (2007) Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature* 450:1235-1239

Nakatomi K, Yoshikawa M, Oka M, Ikegami Y, Hayasaka S, Sano K, Shiozawa K, Kawabata S, Soda H, Ishikawa T, Tanabe S, Kohno S (2001) Transport of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) by breast cancer resistance protein ABCG2 in human lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 288:827-832

Naor D, Nedvetzki S, Golan I, Melnik L, Faitelson Y (2002) CD44 in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci* 39:527-579

Natarajan K, Xie Y, Baer MR, Ross DD (2012) Role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in cancer drug resistance. *Biochem Pharmacol* 83:1084-1103

Nelson H, Petrelli N, Carlin A, Couture J, Fleshman J, Guillem J, Miedema B, Ota D, Sargent D (2001) Guidelines 2000 for colon and rectal cancer surgery. *J Natl Cancer Inst* 93:583-596

Neureiter D, Herold C, Ocker M (2006) Gastrointestinal cancer - only a deregulation of stem cell differentiation? (Review). *Int J Mol Med* 17:483-489

Notari L, Baladron V, Aroca-Aguilar JD, Balko N, Heredia R, Meyer C, Notario PM, Saravanamuthu S, Nueda ML, Sanchez-Sanchez F, Escribano J, Laborda J, Becerra SP (2006) Identification of a lipase-linked cell membrane receptor for pigment epithelium-derived factor. *J Biol Chem* 281:38022-38037

O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE (2007) A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 445:106-110

Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S (2007) Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448:313-317

Osta WA, Chen Y, Mikhitarian K, Mitas M, Salem M, Hannun YA, Cole DJ, Gillanders WE (2004) EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy. *Cancer Res* 64:5818-5824

Ota I, Li XY, Hu Y, Weiss SJ (2009) Induction of a MT1-MMP and MT2-MMP-dependent basement membrane transmigration program in cancer cells by Snail1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:20318-20323

Paola Castro-García, Carmen Gil-Gas, Paloma Honrubia-Gómez, Carmen Belen Álvarez-Simón, Jesús-José Ferre-Fernández, José Luis Sánchez-Sánchez, Jose María García-Bueno, Sebastián Sabater, Guadalupe Apraricio, Luis Miguel Antón Aparicio, Carmen Ramirez-Castille (2013) C-Terminal-PEDF Reduces IC50 Doses and Chemoresistant Population of CD133 and BCRP1-Positive Cancer Stem Like Cells. *Lifescience Global* 2:

Polyak K, Hahn WC (2006) Roots and stems: stem cells in cancer. *Nat Med* 12:296-300

Ponta H, Sherman L, Herrlich PA (2003) CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:33-45

Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, Pilotti S, Pierotti MA, Daidone MG (2005) Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res* 65:5506-5511

Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB (1999) Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts. *Am J Physiol* 277:C183-C201

Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, Weissman IL, Clarke MF, Ailles LE (2007) Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:973-978

Quirke P, Williams GT, Ectors N, Ensari A, Piard F, Nagtegaal I (2007) The future of the TNM staging system in colorectal cancer: time for a debate? *Lancet Oncol* 8:651-657

► BIBLIOGRAFIA

Radtke F, Clevers H (2005) Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science* 307:1904-1909

Ramirez-Castillejo C, Sanchez-Sanchez F, Andreu-Agullo C, Ferron SR, Aroca-Aguilar JD, Sanchez P, Mira H, Escribano J, Farinas I (2006) Pigment epithelium-derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal. *Nat Neurosci* 9:331-339

Rebollo E, Sampaio P, Januschke J, Llamazares S, Varmark H, Gonzalez C (2007) Functionally unequal centrosomes drive spindle orientation in asymmetrically dividing *Drosophila* neural stem cells. *Dev Cell* 12:467-474

Relling MV, Evans WE (2015) Pharmacogenomics in the clinic. *Nature* 526:343-350

Reya T, Duncan AW, Ailles L, Domen J, Scherer DC, Willert K, Hintz L, Nusse R, Weissman IL (2003) A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 423:409-414

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414:105-111

Reynolds BA, Weiss S (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255:1707-1710

Ricci-Vitiani L, Fabrizi E, Palio E, De MR (2009) Colon cancer stem cells. *J Mol Med (Berl)* 87:1097-1104

Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De MR (2007) Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 445:111-115

Ricci-Vitiani L, Pallini R, Biffoni M, Todaro M, Invernici G, Cenci T, Maira G, Parati EA, Stassi G, Larocca LM, De MR (2010) Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature* 468:824-828

Riethdorf S, Fritsche H, Muller V, Rau T, Schindlbeck C, Rack B, Janni W, Coith C, Beck K, Janicke F, Jackson S, Gornet T, Cristofanilli M, Pantel K (2007) Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system. *Clin Cancer Res* 13:920-928

Rodriguez-Antona C, Taron M (2015) Pharmacogenomic biomarkers for personalized cancer treatment. *J Intern Med* 277:201-217

Russo MV, Favarsani A, Gatti S, Ricca D, Del GA, Ferrero S, Palleschi A, Vaira V, Bosari S (2015) A new mouse avatar model of non-small cell lung cancer. *Front Oncol* 5:52

Sahlberg SH, Spiegelberg D, Glimelius B, Stenerlow B, Nestor M (2014) Evaluation of cancer stem cell markers CD133, CD44, CD24: association with AKT isoforms and radiation resistance in colon cancer cells. *PLoS One* 9:e94621

Salama P, Platell C (2009) Colorectal cancer stem cells. *ANZ J Surg* 79:697-702

Saltz LB, Minsky B (2002) Adjuvant therapy of cancers of the colon and rectum. *Surg Clin North Am* 82:1035-1058

Sarkadi B, Ozvegy-Laczka C, Nemet K, Varadi A (2004) ABCG2 -- a transporter for all seasons. *FEBS Lett* 567:116-120

Sato N, Hayashi N, Imamura Y, Tanaka Y, Kinoshita K, Kurashige J, Saito S, Karashima R, Hirashima K, Nagai Y, Miyamoto Y, Iwatsuki M, Baba Y, Watanabe M, Baba H (2012) Usefulness of transcription-reverse transcription concerted reaction method for detecting circulating tumor cells in patients with colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 19:2060-2065

Schatton T, Murphy GF, Frank NY, Yamaura K, Waaga-Gasser AM, Gasser M, Zhan Q, Jordan S, Duncan LM, Weishaupt C, Fuhlbrigge RC, Kupper TS, Sayegh MH, Frank MH (2008) Identification of cells initiating human melanomas. *Nature* 451:345-349

Schmidt DS, Klingbeil P, Schnolzer M, Zoller M (2004) CD44 variant isoforms associate with tetraspanins and EpCAM. *Exp Cell Res* 297:329-347

Shackleton M, Quintana E, Fearon ER, Morrison SJ (2009) Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell* 138:822-829

Shaffer DR, Leversha MA, Danila DC, Lin O, Gonzalez-Espinoza R, Gu B, Anand A, Smith K, Maslak P, Doyle GV, Terstappen LW, Lilja H, Heller G, Fleisher M, Scher HI (2007) Circulating tumor cell analysis in patients with progressive castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 13:2023-2029

Sharpe CR, Siemiatycki J, Rachet B (2002) Effects of alcohol consumption on the risk of colorectal cancer among men by anatomical subsite (Canada). *Cancer Causes Control* 13:483-491

Shen Q, Goderie SK, Jin L, Karanth N, Sun Y, Abramova N, Vincent P, Pumiglia K, Temple S (2004) Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science* 304:1338-1340

Shivapurkar N, Weiner LM, Marshall JL, Madhavan S, Deslattes MA, Juhl H, Wellstein A (2014) Recurrence of early stage colon cancer predicted by expression pattern of circulating microRNAs. *PLoS One* 9:e84686

Shmelkov SV, Butler JM, Hooper AT, Hormigo A, Kushner J, Milde T, St CR, Baljevic M, White I, Jin DK, Chadburn A, Murphy AJ, Valenzuela DM, Gale NW, Thurston G, Yancopoulos GD, D'Angelica M, Kemeny N, Lyden D, Rafii S (2008) CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and C. *J Clin Invest* 118:2111-2120

Shmelkov SV, Jun L, St CR, McGarrigle D, Derderian CA, Usenko JK, Costa C, Zhang F, Guo X, Rafii S (2004) Alternative promoters regulate transcription of the gene that encodes stem cell surface protein AC133. *Blood* 103:2055-2061

Siewewerts AM, Kraan J, Bolt J, van der Spoel P, Elstrodt F, Schutte M, Martens JW, Gratama JW, Sleijfer S, Foekens JA (2009) Anti-epithelial cell adhesion molecule antibodies and the detection of circulating normal-like breast tumor cells. *J Natl Cancer Inst* 101:61-66

SIMINOVITCH L, MCCULLOCH EA, TILL JE (1963) THE DISTRIBUTION OF COLONY-FORMING CELLS AMONG SPLEEN COLONIES. *J Cell Physiol* 62:327-336

Simonovic M, Gettins PG, Volz K (2001) Crystal structure of human PEDF, a potent anti-angiogenic and neurite growth-promoting factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:11131-11135

► BIBLIOGRAFIA

Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB (2003) Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 63:5821-5828

Sonnenschein C, Soto AM (2008) Theories of carcinogenesis: an emerging perspective. *Semin Cancer Biol* 18:372-377

Spangrude GJ, Johnson GR (1990) Resting and activated subsets of mouse multipotent hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:7433-7437

Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T (2001) Stem cells find their niche. *Nature* 414:98-104

Steele FR, Chader GJ, Johnson LV, Tombran-Tink J (1993) Pigment epithelium-derived factor: neurotrophic activity and identification as a member of the serine protease inhibitor gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:1526-1530

Stingl J, Caldas C (2007) Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. *Nat Rev Cancer* 7:791-799

Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663-676

Takaishi S, Okumura T, Tu S, Wang SS, Shibata W, Vigneshwaran R, Gordon SA, Shimada Y, Wang TC (2009) Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. *Stem Cells* 27:1006-1020

Tanaka F, Yoneda K, Kondo N, Hashimoto M, Takuwa T, Matsumoto S, Okumura Y, Rahman S, Tsubota N, Tsujimura T, Kuribayashi K, Fukuoka K, Nakano T, Hasegawa S (2009) Circulating tumor cell as a diagnostic marker in primary lung cancer. *Clin Cancer Res* 15:6980-6986

Till JE, McCulloch EA (1961) A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 14:213-222

Tombran-Tink J, Pawar H, Swaroop A, Rodriguez I, Chader GJ (1994) Localization of the gene for pigment epithelium-derived factor (PEDF) to chromosome 17p13.1 and expression in cultured human retinoblastoma cells. *Genomics* 19:266-272

Trzpis M, McLaughlin PM, de Leij LM, Harmsen MC (2007) Epithelial cell adhesion molecule: more than a carcinoma marker and adhesion molecule. *Am J Pathol* 171:386-395

Tseng JY, Yang CY, Yang SH, Lin JK, Lin CH, Jiang JK (2015) Circulating CD133(+)/ESA(+) cells in colorectal cancer patients. *J Surg Res* 199:362-370

Ueno H, Murphy J, Jass JR, Mochizuki H, Talbot IC (2002) Tumour 'budding' as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. *Histopathology* 40:127-132

van Baren N, Bonnet MC, Dreno B, Khammari A, Dorval T, Piperno-Neumann S, Lienard D, Speiser D, Marchand M, Brichard VG, Escudier B, Negrier S, Dietrich PY, Maraninchi D, Osanto S, Meyer RG, Ritter G, Moingeon P, Tartaglia J, van der BP, Coulie PG, Boon T (2005) Tumoral and immunologic response after vaccination of melanoma patients with an ALVAC virus encoding MAGE antigens recognized by T cells. *J Clin Oncol* 23:9008-9021

Vaz MA, Martinez JC, Devesa JM, Trill JD, Abraira V, Riquelme A, Carrato A (2014) Prognostic value of stem cell quantification in stage II colon cancer. *PLoS One* 9:e88480

Vidaurreta M, Sastre J, Sanz-Casla MT, Maestro ML, Rafael S, Diaz-Rubio E (2007) [Detection and quantification of circulating tumor cells in peripheral blood in patients with colon cancer]. *Med Clin (Barc)* 129:333-334

Wang BB, Li ZJ, Zhang FF, Hou HT, Yu JK, Li F (2015) Clinical Significance of Stem Cell Marker CD133 Expression in Colorectal Cancer. *Histol Histopathol* 11676

Wang C, Xie J, Guo J, Manning HC, Gore JC, Guo N (2012) Evaluation of CD44 and CD133 as cancer stem cell markers for colorectal cancer. *Oncol Rep* 28:1301-1308

Wang YK, Zhu YL, Qiu FM, Zhang T, Chen ZG, Zheng S, Huang J (2010) Activation of Akt and MAPK pathways enhances the tumorigenicity of CD133+ primary colon cancer cells. *Carcinogenesis* 31:1376-1380

Weitz J, Koch M, Debus J, Hohler T, Galle PR, Buchler MW (2005) Colorectal cancer. *Lancet* 365:153-165

Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K, Bernstein BE, Jaenisch R (2007) In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 448:318-324

Wharton RQ, Jonas SK, Glover C, Khan ZA, Klokouzas A, Quinn H, Henry M, Allen-Mersh TG (1999) Increased detection of circulating tumor cells in the blood of colorectal carcinoma patients using two reverse transcription-PCR assays and multiple blood samples. *Clin Cancer Res* 5:4158-4163

Wheater P (1987) *Histología funcional. Texto y atlas en color.*

Wicha MS, Liu S, Dontu G (2006) Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. *Cancer Res* 66:1883-1890

Winawer SJ (1990) International collaboration for the prevention of colorectal cancer. *Bull World Health Organ* 68:373-375

Wolf NS, Kone A, Priestley GV, Bartelmez SH (1993) In vivo and in vitro characterization of long-term repopulating primitive hematopoietic cells isolated by sequential Hoechst 33342-rhodamine 123 FACS selection. *Exp Hematol* 21:614-622

Xie ZY, Lv K, Xiong Y, Guo WH (2014) ABCG2-mediated multidrug resistance and tumor-initiating capacity of side population cells from colon cancer. *Oncol Res Treat* 37:666-2

Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW (1997) AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 90:5002-5012

Yoh K, Ishii G, Yokose T, Minegishi Y, Tsuta K, Goto K, Nishiwaki Y, Kodama T, Suga M, Ochiai A (2004) Breast cancer resistance protein impacts clinical outcome in platinum-based chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 10:1691-1697

Yu YP, Ding Y, Chen Z, Liu S, Michalopoulos A, Chen R, Gulzar ZG, Yang B, Cieply KM, Luvison A, Ren BG, Brooks JD, Jarrard D, Nelson JB, Michalopoulos GK, Tseng GC, Luo JH (2014) Novel fusion transcripts associate with progressive prostate cancer. *Am J Pathol* 184:2840-2849

► BIBLIOGRAFIA

Yuan J, Lv H, Peng B, Wang C, Yu Y, He Z (2009) Role of BCRP as a biomarker for predicting resistance to 5-fluorouracil in breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 63:1103-1110

Zayed AA, Mandrekar SJ, Haluska P (2015) Molecular and clinical implementations of ovarian cancer mouse avatar models. *Chin Clin Oncol* 4:30

Zhang NH, Li J, Li Y, Zhang XT, Liao WT, Zhang JY, Li R, Luo RC (2012) Co-expression of CXCR4 and CD133 proteins is associated with poor prognosis in stage II-III colon cancer patients. *Exp Ther Med* 3:973-982

Zhang Y, Kalderon D (2001) Hedgehog acts as a somatic stem cell factor in the Drosophila ovary. *Nature* 410:599-604

Zhou S, Morris JJ, Barnes Y, Lan L, Schuetz JD, Sorrentino BP (2002) Bcrp1 gene expression is required for normal numbers of side population stem cells in mice, and confers relative protection to mitoxantrone in hematopoietic cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:12339-12344