

Programa de Doctorado de Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina.
Facultad Ciencias Químicas, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Universidad Complutense de Madrid

Diagnóstico y pronóstico del cáncer colorrectal mediante la cuantificación de autoanticuerpos en suero de pacientes.

Memoria para optar al grado de doctor

Presentada por

Roi Villar Vázquez

Licenciado en Biotecnología (UAB)

Máster en I+D+c de Medicamentos (UB)

Bajo la dirección de los doctores

José Ignacio Casal Álvarez

Rodrigo Barderas Manchado

Madrid 2017

El Dr. José Ignacio Casal Álvarez, Investigador Científico del grupo de Proteómica Funcional del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB – CSIC) de Madrid y el Dr. Rodrigo Barderas Manchado, Investigador Ramón y Cajal del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I de la Facultad de Ciencias Químicas de la UCM.

CERTIFICAN

Que el trabajo titulado: “Diagnóstico y pronóstico del cáncer colorrectal mediante la cuantificación de autoanticuerpos en suero de pacientes”, que presenta Roi Villar Vázquez para la obtención del Grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid, ha sido realizado bajo nuestra dirección en el grupo de Proteómica Funcional del CIB de Madrid y reúne la calidad y contenidos suficientes para que sea presentado ante el tribunal correspondiente.

Para que así conste a los efectos oportunos, se expide el presente certificado en Madrid, 6 de marzo de 2017.

Dr. José Ignacio Casal Álvarez

Dr. Rodrigo Barderas Manchado

NISSUNA UMANA INVESTIGAZIONE SI PÒ DIMANDARE VERA SCIENZA S'ESSA NON PASSA PER
LE MATEMATICHE DIMOSTRAZION

"Ninguna investigación humana puede ser llamada ciencia real si no puede demostrarse
matemáticamente".

LEONARDO DI SER PIERO DA VINCI

“QUESTO GRANDISSIMO LIBRO CHE CONTINUAMENTE CI STA APERTO INNANZI A GLI OCCHI
(IO DICO L'UNIVERSO). È SCRITTO IN LINGUA MATEMATICA, E I CARATTERI SON TRIANGOLI,
CERCHI, ED ALTRE FIGURE GEOMETRICHE, SENZA I QUALI MEZI È IMPOSSIBILE A
INTENDERNE UMANAMENTE PAROLA”

"El grandísimo libro [de la naturaleza] está escrito en lengua matemática; y los caracteres son triángulos,
círculos, y otras figuras geométricas, sin las cuales es imposible entender ni una palabra"

GALILEO GALILEI

(IL SAGGIATORE / EL ENSAYADO, CAP VI, 1623ANE)

Agradecimientos

SO WHAT IF WE LOOSE OUR MINDS, SO WHAT IF IT DOESN'T MAKE MUCH SENSE.

AT LEAST WE KNOW WE'RE LAZY, AT LEAST WE KNOW HOW TO PLAY, WE'RE SO GREAT.

DANCE WITH ME – THE SOUNDS

Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Aenean commodo ligula eget dolor. Aenean massa. Cum sociis natoque penatibus et magnis dis parturient montes, nascetur ridiculus mus. Donec quam felis, ultricies nec, pellentesque eu, pretium quis, sem. Nulla consequat massa quis enim. Donec pede justo, fringilla vel, aliquet nec, vulputate eget, arcu. In enim justo, rhoncus ut, imperdiet a, venenatis vitae, justo. Nullam dictum felis eu pede mollis pretium. Integer tincidunt. Cras dapibus. Vivamus elementum semper nisi. Aenean vulputate eleifend tellus. Aenean leo ligula, porttitor eu, consequat vitae, eleifend ac, enim. Aliquam lorem ante, dapibus in, viverra quis, feugiat a, tellus. Phasellus viverra nulla ut metus varius laoreet. Quisque rutrum. Aenean imperdiet. Etiam ultricies nisi vel augue. Curabitur ullamcorper ultricies nisi. Nam eget dui. Etiam rhoncus. Maecenas tempus, tellus eget condimentum rhoncus, sem quam semper libero, sit amet adipiscing sem neque sed ipsum. Nam quam nunc, blandit vel, luctus pulvinar, hendrerit id, lorem. Maecenas nec odio et ante tincidunt tempus. Donec vitae sapien ut libero venenatis faucibus. Nullam quis ante. Etiam sit amet orci eget eros faucibus tincidunt. Duis leo. Sed fringilla mauris sit amet nibh. Donec sodales sagittis magna. Sed consequat, leo eget bibendum sodales, augue velit cursus nunc, Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Aenean commodo ligula eget dolor. Aenean massa. Cum sociis natoque penatibus et magnis dis parturient montes, nascetur ridiculus mus. Donec quam felis, ultricies nec, pellentesque eu, pretium quis, sem. Nulla consequat massa quis enim. Donec pede justo, fringilla vel, aliquet nec, vulputate eget, arcu. In enim justo, rhoncus ut, imperdiet a, venenatis vitae, justo. Nullam dictum felis eu pede mollis pretium. Integer tincidunt. Cras dapibus. Vivamus elementum semper nisi. Aenean vulputate eleifend tellus. Aenean leo ligula, porttitor eu, consequat vitae, eleifend ac, enim. Aliquam lorem ante, dapibus in, viverra quis, feugiat a, tellus. Phasellus viverra nulla ut metus varius laoreet. Quisque rutrum. Aenean imperdiet. Etiam ultricies nisi vel augue. Curabitur ullamcorper ultricies nisi. Nam eget dui. Etiam rhoncus. Maecenas tempus, tellus eget condimentum rhoncus, sem quam semper libero, sit amet adipiscing sem neque sed ipsum. Nam quam nunc, blandit vel, luctus pulvinar, hendrerit id, lorem. Maecenas nec odio et ante tincidunt tempus. Donec vitae sapien ut libero venenatis faucibus. Nullam quis ante. Etiam sit amet orci eget eros faucibus tincidunt. Duis leo. Sed fringilla mauris sit amet nibh. Donec sodales sagittis magna. Sed consequat, leo eget bibendum sodales, augue velit cursus nunc, Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Aenean commodo ligula eget dolor. Aenean massa. Cum sociis natoque penatibus et magnis dis parturient montes, nascetur ridiculus mus. Donec quam felis, ultricies nec, pellentesque eu, pretium quis, sem. Nulla consequat massa quis enim. Donec pede justo, fringilla vel, aliquet nec, vulputate eget, arcu. In enim justo, rhoncus ut, imperdiet a, venenatis vitae, justo. Nullam dictum felis eu pede mollis pretium. Integer tincidunt. Cras dapibus. Vivamus elementum semper nisi. Aenean vulputate eleifend tellus. Aenean leo ligula, porttitor eu, consequat vitae, eleifend ac, enim. Aliquam lorem ante, dapibus in, viverra quis, feugiat a, tellus. Phasellus viverra nulla ut metus varius laoreet. Quisque rutrum. Aenean imperdiet. Etiam ultricies nisi vel augue. Curabitur ullamcorper ultricies nisi. Nam eget dui. Etiam rhoncus. Maecenas tempus, tellus eget condimentum rhoncus, sem quam semper libero, sit amet adipiscing sem neque sed ipsum. Nam quam nunc, blandit vel, luctus pulvinar, hendrerit id, lorem. Maecenas nec odio et ante tincidunt tempus. Donec vitae sapien ut libero venenatis faucibus. Nullam quis ante. Etiam sit amet orci eget eros faucibus tincidunt. Duis leo. Sed fringilla mauris sit amet nibh. Donec sodales sagittis magna. Sed consequat, leo eget bibendum sodales, augue velit cursus nunc, Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Aenean commodo ligula eget dolor. Aenean massa. Cum sociis natoque

penatibus et magnis dis parturient montes, nascetur ridiculus mus. Donec quam felis, ultricies nec, pellentesque eu, pretium quis, sem. Nulla consequat massa quis enim. Donec pede justo, fringilla vel, aliquet nec, vulputate eget, arcu. In enim justo, rhoncus ut, imperdiet a, venenatis vitae, justo. Nullam dictum felis eu pede mollis pretium. Integer tincidunt. Cras dapibus. Vivamus elementum semper nisi. Aenean vulputate eleifend tellus. Aenean leo ligula, porttitor eu, consequat vitae, eleifend ac, enim. Aliquam lorem ante, dapibus in, viverra quis, feugiat a, tellus. Phasellus viverra nulla ut metus varius laoreet. Quisque rutrum. Aenean imperdiet. Etiam ultricies nisi vel augue. Curabitur ullamcorper ultricies nisi. Nam eget dui. Etiam rhoncus. Maecenas tempus, tellus eget condimentum rhoncus, sem quam semper libero, sit amet adipiscing sem neque sed ipsum. Nam quam nunc, blandit vel, luctus pulvinar, hendrerit id, lorem. Maecenas nec odio et ante tincidunt tempus. Donec vitae sapien ut libero venenatis faucibus. Nullam quis ante. Etiam sit amet orci eget eros faucibus tincidunt. Duis leo. Sed fringilla mauris sit amet nibh. Donec sodales sagittis magna. Sed consequat, leo eget bibendum sodales, augue velit cursus nunc, Bla bla bla

Resumen

I WAS ANGRY WHEN I MET YOU, I THINK I'M ANGRY STILL

WE CAN TRY AND TALK IT OVER, IF YOU SAY YOU'LL HELP ME OUT

PUSH IT - GARBAGE

Los estudios de esta Tesis Doctoral se realizaron en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC) y pretenden continuar el análisis de la respuesta humoral inmune en cáncer colorrectal (CCR) iniciado en el Laboratorio de Proteómica Funcional desde una perspectiva traslacional.

El cáncer colorrectal (CCR) es el cáncer de mayor mortalidad en los países desarrollados. Por tanto, el CCR supone un serio problema de salud que requiere mejoras en el diagnóstico temprano de la enfermedad y un pronóstico más preciso de la evolución del paciente. La respuesta inmunológica humoral que desarrollan los pacientes con cáncer frente a proteínas alteradas durante la formación y progresión tumoral ofrece una serie de biomarcadores que podrían ayudar a mejorar la supervivencia de la enfermedad al permitir un diagnóstico temprano de la patología y mejorar el manejo del paciente ya diagnosticado. Los autoanticuerpos son marcadores circulantes que suponen una nueva herramienta para el cribado poblacional al satisfacer un alto grado de precisión, no invasividad, reproducibilidad y suponer una oportunidad de ahorro debido al bajo coste de su detección.

El objetivo final de la Tesis Doctoral fue obtener un panel de autoantígenos asociados a tumor (AAT) específicos de CCR útil para el diagnóstico y pronóstico de los pacientes de la enfermedad. Para ello, partimos de un panel de AAT descubiertos a través de micromatrices de proteínas utilizando un reducido número de muestras. Durante la Tesis Doctoral, se optimizó la expresión recombinante de los antígenos previamente descubiertos y se desarrolló y validó un método de detección múltiple de autoanticuerpos mediante Luminex, comparando los datos obtenidos mediante ELISA. Posteriormente, se demostró la utilidad de los autoanticuerpos frente al CCR para el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad utilizando modelos murinos y amplias cohortes humanas.

Para demostrar la utilidad de los autoanticuerpos para el diagnóstico temprano de la patología se estudió la respuesta humoral frente a CCR en modelos murinos de cáncer colorrectal. Encontramos que los ratones con CCR reproducían la respuesta humoral humana frente a los mismos AAT que los pacientes humanos. Los autoanticuerpos específicos de CCR se detectaron en etapas tempranas de la enfermedad y sus niveles aumentaron en paralelo a la progresión tumoral, demostrando su potencial diagnóstico. También pudimos describir las alteraciones que dan lugar a la respuesta inmune humoral, encontrando que la sobreexpresión de los AAT es un evento importante en la formación de los autoanticuerpos.

Con el objeto de mejorar el diagnóstico de CCR, pusimos a punto la detección simultánea de 9 autoanticuerpos frente a AAT de CCR y 2 controles mediante microesferas Luminex, lo que mejoró la detección de los mismos autoanticuerpos y controles respecto a ELISA. La cuantificación de autoanticuerpos mediante Luminex presentó un mayor rango dinámico y permitió reducir errores técnicos de medida. Para validar el ensayo y encontrar la mejor combinación de AAT para la detección de CCR se cribaron 307 muestras de sueros de pacientes de CCR y controles. Aunque la sensibilidad, especificidad y valor predictivo de los AAT individuales fueron insuficientes para su uso como biomarcadores, su combinación en un panel de AAT específico de CCR (GTF2B, EDIL3, HCK, PIM1, STK4, y p53) permitía discriminar entre pacientes de CCR y controles con un AUC de 89.7%, por lo que podría ser utilizado para cribado poblacional en rutina clínica. Además, el test presentó una gran capacidad para la detección temprana de los pacientes en estadios I y II de CCR.

Finalmente, evaluamos la asociación de la **respuesta humoral frente a CCR con el pronóstico** de los pacientes utilizando una cohorte de 95 sueros de pacientes de CCR que tenían seguimiento hasta 150 meses desde el diagnóstico. Encontramos que el panel de AAT basado en la detección de autoanticuerpos frente a STK4, SRC, MAPKAPK3, GTF2B y p53 permitió pronosticar las recaídas o fallecimiento de los pacientes. La detección de los niveles de autoanticuerpos frente a dicho panel en el momento del diagnóstico permitiría adaptar y personalizar la quimioterapia adyuvante de los pacientes al aumentar la información obtenida en el momento del diagnóstico de los pacientes sobre su riesgo de sufrir recidivas y potencial supervivencia. La personalización de la terapia oncológica supondría un importante ahorro para el sistema sanitario, tanto en cuanto a la administración de dosis innecesarias como en cuanto a la toxicología de aquellos tratamientos prescindibles. En cuanto a los pacientes de CCR, estos mejorarían su calidad de vida y aquellos pacientes de alto riesgo aumentarían su supervivencia, cuya vigilancia podría ser más intensiva.

En conjunto, en esta Tesis Doctoral hemos verificado la utilidad de los autoanticuerpos para el diagnóstico y pronóstico de pacientes de CCR. La detección de los autoanticuerpos mediante Luminex podría ser trasladada a clínica para cribado poblaciones de riesgo, y obtener un pronóstico del riesgo de recaída y fallecimiento para personalizar su tratamiento.

Colorectal cancer (CRC) is the leading cause of cancer associated death in developed countries. Therefore, CRC has become a major public health problem in which current techniques of secondary and tertiary prevention are not enough to manage the disease. The humoral immune developed by cancer patients provides autoantibodies as biomarkers, which could help to improve patients' survival allowing for an early diagnosis of the disease and a better management of diagnosed patients. Autoantibodies directed to altered proteins during the formation and progression of colorectal cancer are circulating markers, which could be used for CRC population screening, satisfying a high degree of accuracy, non-invasiveness, reproducibility and low cost. In addition, autoantibody detection is easily implementable to a clinical routine, as antibodies are well characterized molecules and immunoassays are techniques already used in research and clinical diagnosis of different diseases.

Here presented studies were conducted at the Center for Biological Research (CIB-CSIC) and intended to continue the analysis of the humoral immune response in CRC initiated in the Functional Proteomics Laboratory but from a translational perspective. To that end, we started from a panel of tumor-associated autoantigens (TAA) discovered through the screening of protein microarrays to demonstrate the utility of CRC autoantibodies for the diagnosis of the disease and with the ultimate goal of obtaining a panel of CRC-specific TAA useful for diagnosis and prognosis of patients using for a such a purpose both, murine models of CRC and human samples from CRC patients and controls, respectively.

Thus, to demonstrate the utility of the autoantibodies for the early CRC diagnosis, we have studied the humoral immune response to CRC in chemically induced murine models of colorectal cancer. Therefore, we demonstrated that CRC murine models reproduced the human humoral immune response to the same TAA than in human. Autoantibodies directed against CRC-specific TAA were detected in early stages of the disease and, in general, increased in parallel to the tumor progression, demonstrating the enormous diagnostic potential of autoantibodies. In this study, we could also describe the molecular alterations that result in immune responses in cancer, finding that TAA overexpression is an important event in the formation of autoantibodies.

Moreover, using different cohorts of sera from CRC patients and control individuals, we have here determined the utility of TAA not only for diagnosis but also for the prognosis of CRC patients. First, we have set up the multiplex detection of autoantibodies based on Luminex microspheres, which improved the detection by ELISA. Once optimized the assay to simultaneously measure autoantibodies to 9 CRC-specific TAA and controls, 307 serum samples from CRC patients and controls were screened to validate the test and find the best combination of CRC-specific TAA for diagnosis. We found that although the sensitivity, specificity and predictive value of individual TAA had insufficient values to use them as CRC biomarkers, their combination in a panel of CRC-specific TAA (GTF2B, EDIL3, HCK, PIM1, STK4, and p53) allowed discriminating between CRC patients and controls with an AUC of 89.7%, and could be used for population screening in a clinical setting. In addition, the test showed a great capacity for early CRC detection of patients in stages I and II.

In addition, we analysed a cohort of 95 CRC patients' sera with up to 150 months of follow-up from diagnosis in order to determine the association of CRC autoantibodies with patient's prognosis. We found a TAA panel composed of STK4, SRC, MAPKAPK3, GTF2B and p53 that revealed the relevance of the

measurement of autoantibody levels to predict relapse or death of patients. The detection of autoantibody levels to this panel at the time of diagnosis would permit to adapt and customize the adjuvant chemotherapy of patients by increasing the diagnostic information obtained about their potential risk of recurrence and survival. Personalizing cancer therapy would permit significant savings for the health system in terms of administration of unnecessary doses as regarding the toxicology of those dispensable treatments. Regarding to CRC patients, they would improve their quality of life and high-risk CRC patients should increase their survival rates, since they could be more intensive monitored.

Overall, although it would be desirable to have a multicentric validation, in this Doctoral Thesis we have verified the actual usefulness of CRC autoantibodies for the diagnosis and prognosis of patients with CRC, whose detection using a methodology based on the here optimized and validated Luminex test could be translated to clinical routine for population screening and at the same time that CRC patients are diagnosed, get prognosis data to personalize the treatment of CRC patients.

Índice

YOU CAME ON YOUR OWN, THAT'S HOW YOU'LL LEAVE

WITH HOPE IN YOUR HANDS AND AIR TO BREATHE

AN END HAS A START - EDITORS

Agradecimientos 7**Resumen 11****Índice 17****Abreviaturas 23****Introducción 27****1. El cáncer colorrectal 29**

- 1.1. Epidemiología y factores que predisponen al cáncer colorrectal esporádico 29
- 1.2. Vías moleculares que conducen a la carcinogénesis colorrectal 30
- 1.3. Estadía del cáncer colorrectal y evolución de la enfermedad 33

2. Modelos animales en cáncer colorrectal 35

- 2.1. Modelo de cáncer colorrectal asociado a colitis (AOM/DSS) 36
- 2.2. Modelo de carcinogénesis espontánea lenta inducida por AOM 37
- 2.3. Modelo de colitis ulcerosa con alta incidencia de cáncer 37

3. Diagnóstico y pronóstico en cáncer colorrectal 38

- 3.1. Situación clínica y manejo del paciente con cáncer colorrectal 38
- 3.2. Diagnóstico temprano en cáncer colorrectal 38
- 3.3. Alternativas actuales para el diagnóstico temprano 39
- 3.4. Biomarcadores y diagnóstico molecular 41
- 3.5. Pronóstico del cáncer colorrectal 43
- 3.6. Alternativas para el seguimiento y pronóstico de los pacientes con CCR 44
- 3.7. Aspectos diferenciales de los biomarcadores circulantes 44

4. Los autoanticuerpos como biomarcadores de CCR 44

- 4.1. Generación de autoanticuerpos durante el desarrollo del cáncer 44
- 4.2. Descubrimiento de Antígenos Asociados a Tumor 46
- 4.3. Características de los autoanticuerpos como biomarcadores 49
- 4.4. Identificación de los AAT para su validación en diagnóstico y pronóstico a partir de micromatrices de proteínas 50
- 4.5. Determinación cuantitativa de autoanticuerpos para su uso clínico. 51
- 4.6. Retos para el empleo clínico de los autoanticuerpos en cáncer colorrectal 52

Objetivos 55**Materiales y Métodos 59****1. Material Biológico 61**

- 1.1. Sueros humanos 61
- 1.2. Ratones 62
- 1.3. Cepas bacterianas 62
- 1.4. cDNA codificante de AAT humanos 62

- 1.5. Enzimas 62
- 1.6. Proteínas comerciales usadas en los ensayos de ELISA 62
- 1.7. Anticuerpos para WB 63

2. Material no biológico 63

- 2.1. Medios de cultivo 63
- 2.2. Disoluciones y tampones 63

3. Métodos experimentales 65

- 3.1. Obtención de sueros y material sanguíneo 65
- 3.2. Inducción química de cáncer colorrectal en ratones FBV/N 65
- 3.3. Producción y purificación de AAT recombinantes 66
- 3.4. Cuantificación de ácidos nucleicos y proteínas 69
- 3.5. Determinación de autoanticuerpos mediante ELISA y Luminex 71

4. Metodología estadística 73

- 4.1. Optimización de las condiciones experimentales de ELISA y Luminex 73
- 4.2. Comparación de los niveles de autoanticuerpos entre los grupos experimentales murinos y humanos 73
- 4.3. Identificación de grupos de alto o bajo riesgo a través de la cuantificación de autoanticuerpos de los pacientes de CCR 74
- 4.4. Comparación del valor pronóstico de los autoanticuerpos utilizando datos dicotomizados y continuos 74
- 4.5. Comparación del valor pronóstico de los autoanticuerpos utilizando datos censurados 75
- 4.6. Combinación de variables para construir algoritmos multivariantes 76

Resultados 79

1. Producción de antígenos recombinantes, efecto de la expresión y pureza 81

- 1.1. Expresión heteróloga en *E. coli* 81
- 1.2. Selección del sistema de expresión de los AAT (*E. coli* y Sf9) por su capacidad predictiva 82

2. Respuesta humoral en modelos murinos basados en AOM y DSS 84

- 2.1. El modelo murino de carcinogénesis asociada a colitis ulcerosa reproduce las características histopatológicas del CCR humano 84
- 2.2. El modelo AOM/DSS produce autoanticuerpos específicos de CCR 85
- 2.3. Alteraciones moleculares en el modelo AOM/DSS 87
- 2.4. Los niveles de autoanticuerpos aumentan con la progresión tumoral. 88
- 2.5. Los autoanticuerpos son detectables antes de observar lesiones neoplásicas. 90
- 2.6. Desarrollo de autoanticuerpos en modelos lentos de carcinogénesis a 9 semanas (AOM y DSS por separado) 91
- 2.7. Respuesta humoral en los modelos AOM y DSS 93
- 2.8. Carcinogénesis provocada por AOM a 250 días 93
- 2.9. Autoanticuerpos en ratones AOM y correlación con las lesiones histológicas 95
- 2.10. Ampliación y confirmación del estudio en una cohorte mayor 96

3. Detección múltiple de autoanticuerpos frente a CCR mediante microesferas (Luminex) 103

- 3.1. Capacidad máxima de antígeno por microesfera y dilución del suero problema 104
- 3.2. Optimización de la dilución de suero, tampón de bloqueo y anticuerpo secundario 104
- 3.3. Detección múltiple de 9 autoanticuerpos en pacientes de CCR mediante Luminex 105
- 3.4. Características clínicas de la cohorte de estudio 106
- 3.5. Niveles de autoanticuerpos en los diferentes grupos de pacientes 106
- 3.6. Análisis univariado y capacidad predictiva individual de los AAT 109
- 3.7. Ausencia de sesgo por el hospital de procedencia de la muestra 110
- 3.8. Selección de AAT no redundantes para el diagnóstico de CCR 111
- 3.9. Capacidad diagnóstica del modelo basado en AAT 112
- 3.10. Especificidad del modelo diagnóstico de Luminex frente a otros tipos de cáncer 113
- 3.11. Utilidad del modelo para la detección temprana de CCR 115
- 3.12. Evaluación de la implementación clínica de un test diagnóstico basado en Luminex 116

4. Estudio de la asociación de los autoanticuerpos con el pronóstico de los pacientes de CCR 117

- 4.1. Características clínicas de la cohorte de pacientes del estudio 118
- 4.2. Determinación de los valores de corte de reactividad para cada AAT 119
- 4.3. Valor de los autoanticuerpos en el pronóstico de recidivas tempranas 122
- 4.4. Predicción de la recidiva temprana a partir de la regresión multivariante 124
- 4.5. Valor de los autoanticuerpos en la predicción de recidiva tardía y curación 125
- 4.6. Valor de los autoanticuerpos a lo largo del intervalo libre de enfermedad 126
- 4.7. Valor de los autoanticuerpos en el pronóstico de supervivencia global 128
- 4.8. Identificación de AAT independientes para la predicción de ILE y SG 130
- 4.9. Propuesta y validación de paneles de AAT para la predicción de recaída y fallecimiento 132

Discusión 137

Conclusiones 153

Bibliografía 157

Anexos y publicaciones 181

Abreviaturas

WELL YOU ONLY NEED THE LIGHT WHEN IT'S BURNING LOW

ONLY MISS THE SUN WHEN IT STARTS TO SNOW

ONLY KNOW YOU LOVE HER WHEN YOU LET HER GO

LET HER GO - PASSENGER

AAT	Autoantígeno asociado a tumor
ANOVA	Análisis de la Varianza (del inglés)
AOM	Azoximetano
AUC	Área bajo la curva (del inglés)
CCA	Capacidad de carga de antígeno (del inglés ALC, Antigen Loading Capacity)
CCR	Cáncer Colorrectal
cDNA	DNA complementario
CI 95%	Intervalo de Confianza al 95% para el estimador.
DFS	Supervivencia Libre de Enfermedad (del inglés)
DNA	Ácido desoxirribunucleico (del inglés)
DSS	Sulfato sódico de dextrano (Sulphate Sodium Dextrane)
EII	Enfermedad Inflamatoria Intestinal
ELISA	Ensayo inmunoenzimático en fase sólida (del inglés ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay))
FIT	Test de sangre fecal inmuno químico (del inglés)
FOBT	prueba de sangre oculta en heces (del inglés)
FVB/N	Cepa de ratón: FVB, Friend Virus B NIH,
gFOBT	Prueba de sangre oculta en heces basada en guayacol
GLM	modelo lineal generalizado (GLM, de sus siglas en inglés)
H&E	Hematoxilina Eosina
HR	Riesgo relativo (del inglés)
i.p.	Intraperitoneal
ILE	Intervalo libre de enfermedad (DFS, disease free survival).
IMAC	Cromatografía de afinidad de metal quelado
LB	Medio de cultivo "Luria Beltrani"
Mb	Millón de microesferas (del inglés)
MFI	Intensidad de Fluorescencia Mediana (del inglés)
mRNA	RNA mensajero
OR	Razón de momios (del inglés, odds ratio)
OS	Supervivencia Generalizada (del inglés)
PBS	Sistema tamponado fosfato salino (del inglés)
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa (del inglés).
PM	Peso Molecular
ROC	Característica Operativa del Receptor, del inglés, aplicado a las típicas curvas en la teoría de detección de señales
SDS-PAGE	Gel de electroforesis de acrilamida polimerizada y SDS (del inglés)
Sf9	Células clonales de <i>Spodoptera frugiperda</i>
SG	Supervivencia general (OS, overall survival)
SRM	Monitorización sencilla de reacción (del inglés)
Tis	tumor <i>in situ</i>
TTE	tiempo hasta evento (Time to event)
VPP	Valor predictivo positivo
WB	WB, técnica de inmunodetección.

Introducción

THE STAR MAKER SAYS, "IT AIN'T SO BAD", THE DREAM MAKER'S GOING MAKE YOU MAD

THE SPACEMAN SAYS, "EVERYBODY LOOK DOWN, IT'S ALL IN YOUR MIND"

SPACEMAN- THE KILLERS

I. El cáncer colorrectal

I.1. Epidemiología y factores que predisponen al cáncer colorrectal esporádico

El cáncer colorrectal (CCR) es el tercer cáncer más frecuente en el mundo [1] y el de mayor mortalidad en países desarrollados [2], provocando el 10% de las muertes relacionadas con cáncer [3]. A nivel mundial, se estima que el CCR produce 600.000 muertes al año [1]. A pesar de ser un tipo de cáncer raro a mediados del siglo pasado, tanto su prevalencia como mortalidad han avanzado en los países occidentales [3], en paralelo al aumento de la esperanza de vida en estos países.

Cada año, son diagnosticados con CCR aproximadamente 1,2 millones de personas, principalmente en países de Europa occidental, Oceanía y Norteamérica [1]. África y Asia presentan una incidencia más baja, pero la occidentalización tanto de su estilo de vida como de su dieta está aumentando significativamente los nuevos casos. Más de la mitad de los casos de cáncer colorrectal son diagnosticados en estadios tardíos (III y IV), cuando los pacientes ya han desarrollado sintomatología clínica y el tumor se ha diseminado a ganglios linfáticos adyacentes o colonizado otros órganos. Las posibilidades de curación del paciente disminuyen conforme progresa la enfermedad. En estadios tardíos, la tasa de supervivencia a cinco años de los pacientes apenas alcanza el 12%. En España, el cáncer colorrectal es el tipo de cáncer más frecuente, diagnosticándose 32.240 nuevos casos en 2012. Ese mismo año, 14.700 personas fallecieron por CCR, situándolo como el segundo cáncer tras el de pulmón con mayor mortalidad [4]. Además, ocupa el tercer puesto en cuanto a prevalencia a 5 años [5] (Tabla 1).

Tabla 1: Tipos de cáncer más prevalentes en la población española (2012*).

	Incidencia		Mortalidad		Prevalencia	
	Número	%	Número	%	Número	%
Todos los cánceres excluyendo cáncer de piel no melanoma	215534	100	102762	100	581688	100
Mama	25215	11.7	6075	5.9	104210	17.9
Próstata	27853	12.9	5481	5.3	102559	17.6
Colorrectal	32240	15	14700	14.3	89705	15.4
Vejiga	13789	6.4	5007	4.9	47225	8.1
Pulmón	26715	12.4	21118	20.6	28148	4.8
Melanoma	5004	2.3	967	0.9	19792	3.4

Fuentes: [4, 5]. *Último año con estadísticas

La carcinogénesis en colon y recto se debe a complejas interacciones entre el individuo y factores ambientales, determinadas por el estilo de vida y por el fondo genético y epigenético de los individuos. Diferentes estudios sugieren que diferentes alteraciones genéticas y epigenéticas están involucradas en un gran número de oncogenes y genes supresores de tumores [6]. Las causas que pueden iniciarlo son variadas [7, 8], dando lugar a una forma histológica u otra [9]. El origen del CCR nos permite clasificarlo entre hereditario, adquirido o esporádico o debido a antecedentes familiares.

El cáncer hereditario constituye entre un 5% y 15% de los casos de CCR diagnosticados, donde existe una correlación directa con una serie de alteraciones genéticas específicas y hereditarias concretas, que se agrupan en diferentes síndromes de CCR hereditario [10], entre los que cabe destacar el Síndrome de Lynch y

la Poliposis Adenomatosa Familiar. A medio camino están los cánceres con antecedentes familiares (15-25%), donde el componente hereditario no está tan claro y probablemente exista una predisposición genética conjuntamente con la interacción con el entorno. Finalmente, el CCR adquirido o esporádico constituye la mayoría de los casos de CCR (aproximadamente entre el 70-85%), y es atribuido al estilo de vida del paciente al no asociarse a causas genéticas, hereditarias o familiares. Más allá del estilo de vida, la presencia de inflamación crónica en el colon se ha descrito como un factor de riesgo de padecer CCR que aumenta con el tiempo de padecimiento de la enfermedad [11]. La variedad de factores que influyen en la carcinogénesis colorrectal provoca una gran heterogeneidad de la enfermedad, condicionando las características moleculares del tumor y el pronóstico [12].

Entre las variables demográficas que promueven la aparición de CCR esporádico, se ha encontrado una asociación entre una mayor presencia de CCR y la edad del individuo y entre CCR y sexo masculino [13]. En el plano ambiental, estudios epidemiológicos muestran una asociación directa entre la presencia de CCR y una dieta rica en carnes rojas y pobre en fibra [14, 15], o el consumo de carne ahumada y procesada [16, 17]. El tabaquismo ha mostrado una relación directa con la aparición y la mortalidad de CCR en diferentes metanálisis que muestran el incremento de CCR en la población fumadora con respecto a la no fumadora [18-20]. Además, se ha asociado el tabaquismo con una mayor aparición de diferentes tipos de pólipos como el adenomatoso o el serrado [19, 21]. Otros factores que incrementan las posibilidades de contraer CCR incluyen el consumo de alcohol de forma proporcional a la ingesta diaria [22] y el sobrepeso, que según el “World Cancer Research Fund International” (WCRFI) por cada unidad de índice de masa corporal aumenta el riesgo de padecer CCR entre un 2 y un 3%, así como la diabetes mellitus [23]. Todos estos factores y su prevalencia explican la mayor incidencia del CCR en países desarrollados y en determinados estratos socioeconómicos [24]. Alternativamente, el consumo de lácteos, cereales integrales, fruta y vegetales frescos, así como alimentos que contengan calcio, fibra y multivitaminas (en concreto la D) han demostrado disminuir el riesgo de contraer CCR [17, 25]. En el mismo sentido, 30 minutos diarios de actividad física vigorosa reducen un 10% el riesgo de contraer CCR [26, 27]. En el plano farmacológico, la aspirina ha demostrado ejercer una acción protectora [28] dependiendo del genotipo del paciente [29, 30]. También tienen un pequeño efecto protector las estatinas [31, 32], así como la terapia hormonal en mujeres postmenopáusicas [33]. Por ahora, aunque se ha debatido ampliamente, el papel de la microbiota colónica en el desarrollo de CCR todavía no se ha podido confirmar [3].

1.2. Vías moleculares que conducen a la carcinogénesis colorrectal

El CCR es una enfermedad de origen epitelial y en el que las células de la mucosa intestinal que recubren el colon crecen de manera anómala en número y tamaño. Las células pretumorales comienzan a presentar displasia (pérdida de forma debido a un crecimiento anómalo), así como mitosis activas y aberrantes caracterizadas por aneuploidías o inestabilidad de microsatélites, dando lugar al proceso de carcinogénesis.

La carcinogénesis hereditaria constituye un 5%-15% de los casos de CCR diagnosticados, en los cuales se confirma una correlación directa con alteraciones genéticas hereditarias [10], permitiendo estudiar las diferentes vías de carcinogénesis que conducen al desarrollo del CCR.

El Síndrome de Lynch (o HNPCC) supone un 3% de los casos anuales de CCR [13]. Está provocado por una mutación dominante autosomal que predispone al desarrollo del tumor colorrectal, entre otros [34, 35]. Su estudio permitió describir una vía molecular adicional que también se da en el CCR esporádico, sumándose en 1993 a la vía de Vogelstein como modelos de carcinogénesis [36]. Los pacientes con HNPCC suelen detectarse en los estadios II y III de la enfermedad y evolucionar favorablemente respecto otros tipos de CCR [37]. Su frecuencia en la población es de 1:1000 [38]. Su pronóstico no suele ser complicado al estar asociado a una mayor infiltración de linfocitos T-CD8 citotóxicos en el tumor [39], ya que estos promoverían la apoptosis de células tumorales [40, 41].

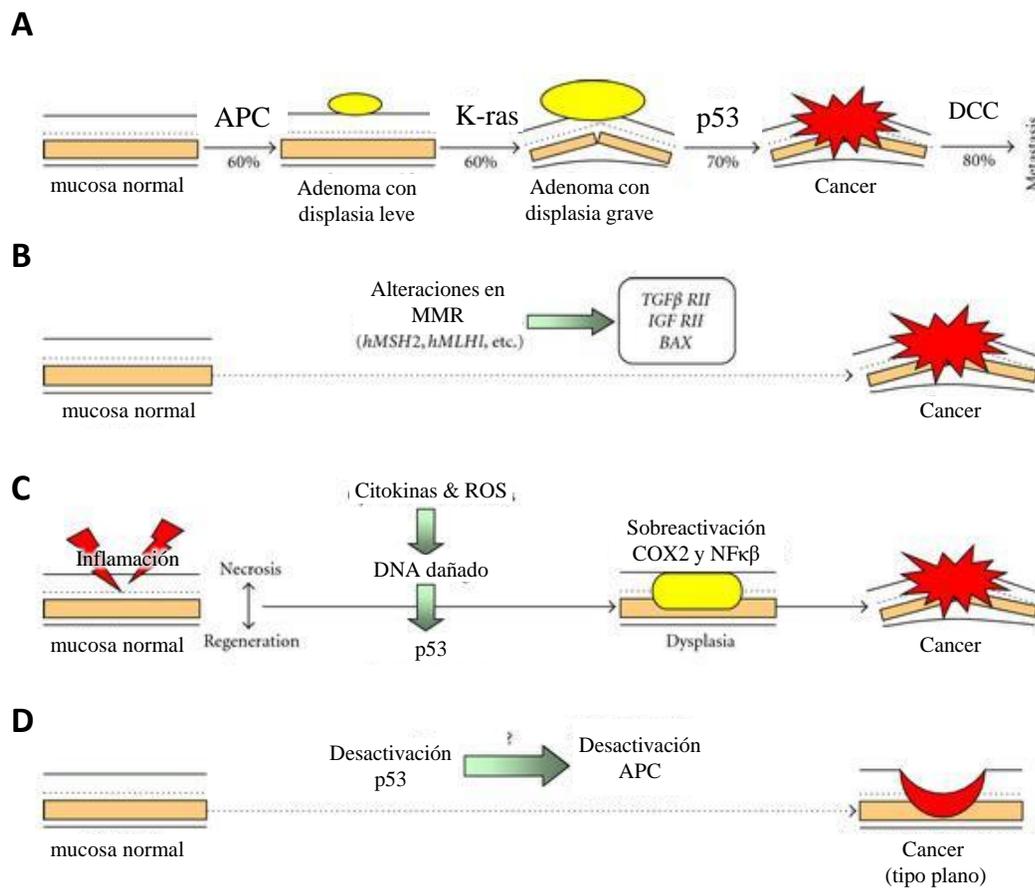


Figura 1: Evolución del CCR según su etiología (adaptado de [9]). A. Modelo de Vogelstein adenoma-carcinoma de inestabilidad cromosómica. B. Vía neoplásica de la inestabilidad de microsatélites (habitual en el Síndrome de Lynch). C. Cáncer asociado a colitis, o vía de la displasia progresiva. D. Carcinogénesis *de novo* de la lesión plana.

La Poliposis Adenomatosa Familiar (FAP) está provocada por una mutación dominante autosomal en el gen APC (*adenomatous polyposis coli*), uno de los primeros eventos en la secuencia adenoma-adenocarcinoma, provocando cientos de adenomas en el colon y recto en edades tempranas. La mutación en APC hace que inicien la secuencia adenoma carcinoma, asociada a la inestabilidad cromosómica y posterior desarrollo de CCR [42].

Los cánceres con antecedentes familiares probablemente se deban a la sinergia entre una predisposición genética y la interacción con el ambiente. Entre un 15 y un 20% de los casos de CCR diagnosticados corresponden a pacientes que presentan antecedentes familiares de CCR o pólipos adenomatosos [43]. Desde que se describió una de las primeras secuencias genómicas consenso del cáncer colorrectal [44],

los orígenes del cáncer con antecedentes familiares suponen un área de intensa investigación, ya que en muchos casos no se ha descrito el gen o genes alterados en estos cánceres como sí se ha descrito en los síndromes hereditarios.

En esta tesis doctoral nos hemos centrado en el estudio del CCR adquirido o esporádico, que constituye la mayoría de los casos (aproximadamente entre el 70-85%) [45], y es atribuido al estilo de vida del paciente. Ya que los pacientes con cáncer hereditario o con antecedentes familiares suelen estar estrechamente vigilados, profundizaremos en las vías de carcinogénesis esporádica que ocurren en la gran mayoría de diagnósticos tardíos de CCR.

1.2.1. Carcinogénesis canónica o supresora asociada a inestabilidad cromosómica.

La primera hipótesis que explicó el cáncer esporádico fue la secuencia adenoma – carcinoma [46]. Este proceso consiste en una serie de alteraciones genéticas y conduce a la transformación del epitelio hiperplásico (una lesión benigna de células de gran tamaño) en un pólipo adenomatoso con displasia benigna en adenoma y finalmente en un adenocarcinoma colorrectal invasivo que coloniza otros órganos mediante metástasis [47, 48] (Figura 1A). Uno de los primeros eventos es la delección del gen APC, que se produce en aproximadamente el 60% de las neoplasias colorrectales. Las mutaciones en los oncogenes K-ras conllevan un aumento en el crecimiento y la progresión de adenoma hacia adenocarcinoma que se completa finalmente con la inactivación o mutación de p53 [49-52].

La vía de Vogelstein se caracteriza por la inestabilidad cromosómica [53] y tiene lugar en un 70-85% de los tumores esporádicos [13, 45]. No obstante, en el restante 15-30% de los tumores esporádicos diagnosticados se ha observado la secuencia MSI o de pólipo serrado [13, 41, 54-56].

1.2.2. Carcinogénesis a través de la inestabilidad de microsatélites.

La inestabilidad de microsatélites ocurre en el 15-20% de los tumores esporádicos [57]. Tanto los pacientes esporádicos con secuencia MSI (inestabilidad de microsatélites), como aquellos afectados por el síndrome de Lynch presentan alteraciones en los genes involucrados en el sistema MMR de reparación del DNA: MSH2, MLH1, MSH6, PMS2 o PMS1 [58]; que provocan alteraciones del marco de lectura en las secuencias repetitivas de nucleótidos (o repeticiones cortas en tándem) [41] provocando alteraciones proteicas en el extremo C-terminal (Figura 1B). Estas secuencias repetitivas se encuentran en los microsatélites, lo que da nombre a este subtipo de CCR como asociado a MSI [59].

En el CCR MSI+ se han descrito alteraciones en las regiones codificantes [60] de los siguientes genes: TGF- β [61] e IGF-IIr [62] [60]. También se han visto afectados reguladores del ciclo celular [63], reguladores de la apoptosis [64], o factores de transcripción y diferenciación epitelial como CDX2 [41]. La afectación de cualquiera de estos genes explicaría la transformación tumoral de las células del colon, como se ha descrito anteriormente [7, 8] (Figura 1C).

Los pólipos serrados son un grupo heterogéneo de lesiones con distinta morfología e histología que comparten una apariencia dentada [65]. La secuencia adenoma serrado sésil – adenocarcinoma ha podido estudiarse en profundidad gracias al síndrome de Lynch y se relaciona con hasta un tercio de todos los

cánceres colorrectales esporádicos. Por la morfología serrada a la que suele dar lugar, estos adenocarcinomas apenas se diagnosticaban hasta hace dos décadas.

1.2.3. Carcinogénesis asociada a enfermedad inflamatoria intestinal.

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII, principalmente colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn) presenta una etiología todavía desconocida. En 1925, Crohn y Rosenberg describieron el primer caso de CCR asociado a la EII. Desde entonces, se reconoce una elevada tasa de CCR en pacientes con colitis ulcerosa con episodios superiores a 8 - 10 años de duración [66, 67], siendo el riesgo proporcional a la duración de la enfermedad [68]. En conjunto, los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal representan entre el 1% y el 2% del total de CCR diagnosticados anualmente [54].

Los modelos murinos de carcinogénesis química (ver página 65) han permitido profundizar sobre la patogénesis del desarrollo CCR asociado a EII [69-71]. Varios genes relacionados con la inflamación, como la ciclooxigenasa COX2 [72], la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) [69], el interferón- γ , el factor de necrosis tumoral α y la interleukina-1 β [73] se incrementan en la mucosa afectada y se mantienen elevados en los tumores de colon al encontrarse regulados por un factor de transcripción común, el NF- κ B, [74]. En un marco de enfermedad inflamatoria intestinal, la activación crónica de NF- κ B promueve la renovación de las células epiteliales y la generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Ambas situaciones promueven la acumulación de mutaciones y la consecuente carcinogénesis.

Las lesiones planas y/o serradas con displasia [11] en la mucosa de pacientes con EII constituyen otra vía más de carcinogénesis colorrectal [75] (Figura 1C). El patrón de progresión del cáncer asociado a colitis sigue una displasia progresiva: desde la ausencia de displasia, a la displasia indefinida, displasia de bajo grado, de alto grado y finalmente al carcinoma, pudiendo desarrollar lesiones planas o en forma de pólipo [54, 70].

A diferencia de las alteraciones adquiridas presentes en la carcinogénesis supresora, la mutación de p53 podría producirse debido a la constante renovación de células del epitelio y los daños genéticos provocados por el estrés oxidativo, contribuyendo a los procesos de carcinogénesis [71]. La carcinogénesis asociada a colitis también implica inestabilidad cromosómica o inestabilidad de microsatélites en la misma proporción (70-85% vs. 15-30%) que las otras dos vías de cáncer esporádico [54]. A diferencia de la secuencia adenoma-carcinoma, en la secuencia de displasia progresiva se desconoce la implicación de K-ras [9] perdiéndose la funcionalidad de APC en fases más avanzadas del cáncer [11] y siendo habitual encontrar zonas de mucosa con displasia multifocal [54]. Hoy en día, hay indicios para sugerir que las mejoras en el seguimiento de los pacientes así como las terapias anti-inflamatorias están reduciendo la incidencia del CCR en este tipo de pacientes [76, 77].

1.3. Estadaje del cáncer colorrectal y evolución de la enfermedad

El CCR se clasifica mediante estadios que cuantifican el avance y extensión de la enfermedad. El crecimiento del carcinoma colorrectal se produce en la pared del revestimiento epitelial, que llega a perforar el tubo digestivo al malignizarse. El tumor sigue creciendo hasta invadir los nódulos linfáticos adyacentes, lo que le permite alcanzar el torrente sanguíneo para provocar metástasis distales, habitualmente en hígado, pulmón o médula ósea.

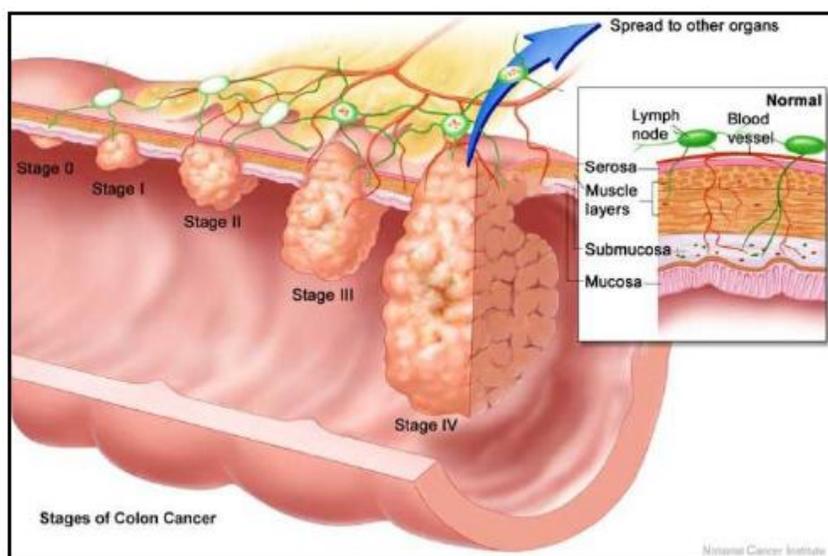


Figura 2: Desarrollo del tumor colorrectal en el lumen intestinal. Progresión tumoral del CCR y su correspondencia con el sistema de estadiaje TNM (imagen obtenida del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos).

El estadiaje del cáncer se realiza según la etapa en la que se encuentra, resumiendo la información necesaria para iniciar el tratamiento apropiado y constituyendo el principal factor pronóstico de la enfermedad. Aunque existen diferentes sistemas de clasificación, el TNM (Tumor Nódulo Metástasis), es el más aceptado a nivel internacional ya que es común a todos los tipos de cáncer. Fue introducido por el comité de legislación americano en cáncer (AJCC) y la unión internacional contra el cáncer (UICC). Cada letra indica una magnitud de crecimiento y evolución del cáncer: tamaño del tumor primario (T), nódulos linfáticos proximales afectados (N) y la presencia de metástasis en otros órganos (M), que se combinan para formar diferentes grupos de estadiaje (Figura 2).

El primer sistema de estadiaje de CCR fue el sistema de clasificación de Dukes. Este sistema lo propuso el Dr. Cuthbert Dukes en 1932 para la clasificación del cáncer rectal [78, 79]. El propio Dukes lo modificó posteriormente para incluir los tumores colorrectales y la inclusión de un estadio “D” para indicar la presencia de metástasis distal. Este sistema clasifica a los tumores en función de la profundidad de la invasión en la pared intestinal y la presencia o ausencia de nódulos linfáticos afectados o metástasis distal. El estadio A indica que la lesión está localizada en la mucosa o submucosa del intestino. En el estadio B, el tumor alcanza la capa muscular que recubre el epitelio intestinal. Un tumor en estadio C ha colonizado los nódulos linfáticos, lo que se conoce como metástasis proximal. El subíndice indica si las células tumorales han atravesado la pared intestinal (C2) o no (C1). El estadio D indica la presencia de metástasis distales. En la Tabla 2 se muestra una comparativa entre ambos sistemas de clasificación.

Posteriormente, y con el objetivo de adaptarlo al tratamiento y pronóstico del paciente diagnosticado, los doctores Astler y Collier modificaron el sistema de Dukes a mediados de los años 50 [80]. Tanto los sistemas de Dukes como de Astler y Collier apenas se utilizan actualmente y se ha adoptado el estadiaje agrupado de la AJCC para el cáncer de colon y recto, indicando en números romanos desde el estadio I (tumor que ha crecido hasta submucosa o muscularis propria) hasta el IV (cáncer extendido a un órgano distante como pulmón, hígado o a peritoneo). El estadiaje agrupado es consecuencia de la evaluación de los parámetros T, N

y M y otorga información pronóstica sobre las probabilidades de curación, mayores cuanto más bajo es el estadio [81].

Tabla 2: Equivalencias entre la clasificación agrupada de AJCC, TNM (común a todos los cánceres), Duke's y Duke's modificada (Astler y Coller).

Estadio agrupado según AJCC	T	N	M	Duke's	Ashler y Coller
0	To	No	Mo	Tis	Tis
I	T1	No	Mo	A	A
I	T2	No	Mo	A	B1
IIA	T3	No	Mo	A	B1
IIB	T4	No	Mo	B	B2
IIIA	Cualquier T	N1	Mo	C1	C1
IIIB	Cualquier T	N2	Mo	C2	C2
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1	D	D

Fuentes: [13, 82, 83]

Aunque ambos sistemas aportan información útil para el pronóstico de la enfermedad, presentan diversos inconvenientes dado que hay información que se debe obtener mediante cirugía, como el número de nódulos afectados en el paciente.

2. Modelos animales en cáncer colorrectal

La mayoría de modelos animales para el estudio del CCR están basados en knock-outs genómicos (por ejemplo APC^{-/-}) y no representan la variedad de vías moleculares que conducen a la carcinogénesis esporádica [84]. Uno de los modelos más utilizados dada su rapidez y rendimiento es el modelo AOM/DSS, basado en una inyección intraperitoneal del agente promutagénico azoximetano (AOM) seguido de 3 ciclos del agente inflamatorio sulfato sódico de dextrano (DSS) administrado oralmente [9, 84]. El AOM es un agente químico cuyo metabolito, el metil-azoxi-metanol, provoca tumores por alquilación del ADN, favoreciendo la introducción de mutaciones [84]. El DSS es un agente irritante de la mucosa intestinal que se administra *ad libitum* disuelto en agua de bebida. Al llegar al colon, induce la infiltración de células inflamatorias en la *mucosa propria* y la consecuente ulceración de la mucosa intestinal y diarrea sanguinolenta [85]. El DSS altera el revestimiento epitelial del colon permitiendo la infiltración de microorganismos, provocando colitis severa, colitis ulcerosa y neoplasias en el colon distal [85, 86].

La acción mutagénica de los metabolitos del AOM y la acción inflamatoria del DSS permiten un uso combinado o por separado que permite obtener tres modelos diferentes de carcinogénesis. Los tres modelos nos permitirían estudiar los niveles de autoanticuerpos durante la progresión del tumor evitando los factores ambientales que aumentan la heterogeneidad en los ensayos clínicos. También permitirían comparar el efecto inflamatorio y mutagénico de los dos agentes y sus efectos en la producción de autoanticuerpos y el desarrollo de lesiones cancerosas afines. Finalmente, los modelos de carcinogénesis basados en AOM y DSS por separado presentan una evolución más lenta del tumor, lo que nos permitiría aumentar el número de puntos temporales y estudiar con más detalle la cinética de la producción de autoanticuerpos en función del tiempo.

Pese a las ventajas de los modelos basados en AOM y DSS, no hay evidencias de metástasis o invasión nodular en ninguno de los modelos [70, 87], no permitiendo estudiar marcadores de fases avanzadas. Los

modelos animales de cáncer colorrectal permiten la obtención de muestras seriadas previas a y durante el desarrollo tumoral, que son difíciles de obtener en humanos. Estas muestras permitirían estudiar el momento en el que aparecen los autoanticuerpos, su cinética y su evolución de acuerdo a la progresión de la enfermedad, así como las vías moleculares que conducen a estos.

2.1. Modelo de cáncer colorrectal asociado a colitis (AOM/DSS)

El protocolo basado en la administración intraperitoneal de AOM y distintos ciclos de 5 días de DSS *ad libitum* en el agua de la bebida se conoce como protocolo de carcinogénesis acelerada por colitis ulcerosa. Este modelo mimetiza el curso de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) de una manera acelerada (63 días) y aumenta la incidencia de cáncer respecto a otros modelos [84]. La aceleración se debe a la concatenación de un proceso en dos fases. En la primera, el AOM provoca daños en el material hereditario, cuya severidad determinará el número de tumores por ratón y la prevalencia de estos. Una semana después, la presencia del DSS junto con la existencia de microbiota en el tubo digestivo producen una estimulación de las citocinas pro-inflamatorias, en concreto, la activación de la ruta STAT3 que marca el inicio de esta segunda fase [88] (Figura 3).

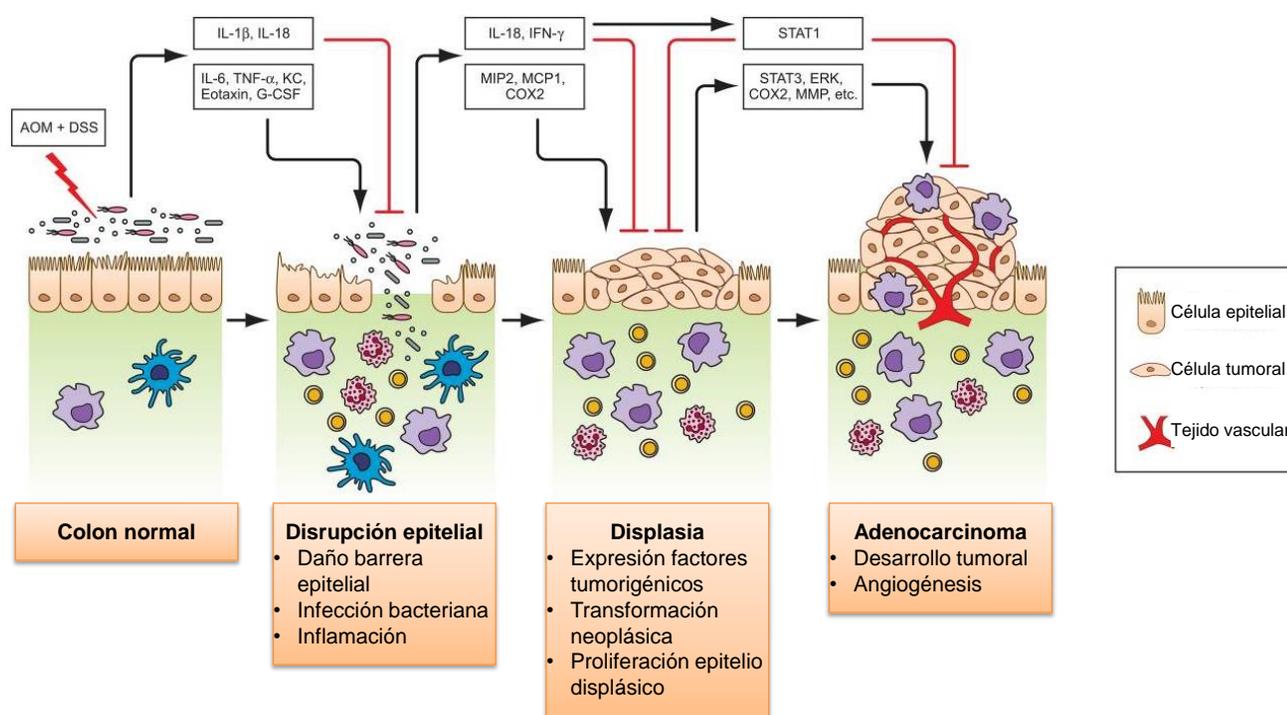


Figura 3: Acción del AOM y DSS en el colon [89]. La acción combinada del mutágeno y el daño de la mucosa intestinal provoca una inflamación y crecimiento tumoral análogo al encontrado en humanos. Las líneas negras indican activación, mientras que las rojas inhibición de los mediadores y vías moleculares indicadas.

Los tumores inducidos por AOM/DSS se producen preferentemente en la parte distal del colon, que es la localización predominante de cáncer colorrectal esporádico en humanos. Además, la progresión tumoral comparte rasgos histológicos con los humanos que incluyen la formación de focos de criptas aberrantes, pólipos, adenomas y carcinomas. Molecularmente se caracteriza por la sobreexpresión de APC, la mutación y alteración de la localización de β -catenina, la mutación de K-ras, inestabilidad cromosómica [90] y elevación de los niveles locales de las enzimas iNOS y COX2 [84]. Por ello, este modelo ha sido muy útil para la

elucidación de la función de TNF- α , IL6, NF κ B y otras moléculas asociadas a inflamación e importantes en la iniciación e inducción del tumor [91].

La rapidez del proceso de carcinogénesis ha extendido su uso como modelo de estudio de la inflamación del colon y su asociación con el desarrollo del cáncer [73, 92], así como para el desarrollo de fármacos preventivos [86]. El tiempo de desarrollo de tumores en menos de 10 semanas, así como el número y la gravedad de las lesiones depende de la susceptibilidad de la cepa de ratón utilizada [84].

No obstante y a pesar de su extendido uso en investigación, al comienzo de la tesis doctoral, el modelo AOM/DSS todavía no se había utilizado para estudios enfocados a la identificación o validación de biomarcadores, ni para el análisis de la autoinmunidad en CCR.

2.2. Modelo de carcinogénesis espontánea lenta inducida por AOM

El protocolo basado en administraciones intraperitoneales repetidas de AOM simula un modelo de cáncer esporádico, sin componente inflamatorio y con desarrollo a largo plazo (entre 24 y 35 semanas). La administración intraperitoneal de 3 a 6 inyecciones de AOM induce el desarrollo de tumores espontáneos en el colon distal en un plazo de 7-10 meses dependiendo de la cepa de ratón [93]. Este mayor marco temporal de carcinogénesis esporádica respecto al modelo AOM/DSS [84], permite aumentar el número de puntos temporales para estudiar con detalle la evolución temporal de marcadores serológicos, ya que realizar extracciones sanguíneas cada menos de 21 días compromete la viabilidad y la ética del experimento [94].

Este modelo provoca tumores en la región distal del colon, intramucosos, polipoides y de color claro a rojizo, indicando la presencia de irrigación sanguínea [70]. La administración i.p. del AOM es habitualmente inexacta en cuanto a la cantidad administrada provocando variabilidad y que no se observen tumores en el 100% de los ratones, lo que mimetiza al cáncer esporádico.

2.3. Modelo de colitis ulcerosa con alta incidencia de cáncer

El protocolo basado en ciclos de DSS simula el proceso de los pacientes que desarrollan CCR fruto de una inflamación intestinal crónica. Se ha descrito también como modelo de pacientes con colitis ulcerosa [95] o colitis crónica [96]. Este modelo produce cáncer de colon con incidencia variable dependiendo del número de ciclos [97] y la concentración de DSS administrado en el agua de bebida [96]. El número, gravedad de las lesiones y el porcentaje de ratones afectados depende de la cepa de ratón utilizada [86, 95, 98].

Este protocolo consiste en 4 ciclos de 5 días de 2,5% DSS *ad libitum* en el agua de la bebida sin la inyección de AOM [96]. Durante cada ciclo, el DSS provoca por si solo episodios de colitis aguda severa con diarrea sanguinolenta que termina por cronificarse [85, 96]. El DSS provoca la disrupción del revestimiento epitelial y su ulceración, resultando en colitis crónica similar a la colitis ulcerosa humana al final de los 4 ciclos y lesiones neoplásicas en el colon distal partir de 30 semanas [86, 99]. La administración de entre 3 y 4 y hasta 9 ciclos de DSS resulta en el desarrollo de displasia colorrectal y posterior adenocarcinoma en una fracción de los ratones tratados [86, 95]. Consecuencia de la inflamación del colon se produce un engrosamiento de sus paredes y acortamiento de su longitud.

3. Diagnóstico y pronóstico en cáncer colorrectal

3.1. Situación clínica y manejo del paciente con cáncer colorrectal

El comportamiento y evolución del CCR requiere una gran vigilancia clínica durante todas sus etapas. En estadios tempranos, el CCR permanece silente con apenas sintomatología clínica detectable. Desgraciadamente, el diagnóstico tardío eleva notablemente la mortalidad [100], por lo que es urgente obtener herramientas que permitan detectar el CCR de forma temprana.

La sintomatología del CCR varía según la localización, tamaño y crecimiento del tumor. El sangrado de la lesión es habitual y puede evolucionar hasta provocar una anemia ferropénica [101]. Su detección depende de la localización del tumor primario y del uso de técnicas específicas ya que en el colon ascendente, la sangre se mezcla con las heces y solo se detecta enzimática o inmunológicamente. Aquellos tumores en la zona rectal son más fácilmente detectables ya que presentan importante sangrado y dolor pélvico [102]. El crecimiento del tumor primario hacia el lumen o hacia las estructuras adyacentes al colon provoca habitualmente dolor abdominal, alteraciones en la motilidad intestinal y pérdida involuntaria de peso [103]. En el CCR avanzado, el tumor invade los tejidos adyacentes por lo que es raro que los pacientes sean asintomáticos, presentando obstrucción intestinal, fistulación o perforación de la pared intestinal [102].

Una vez detectado, el CCR es tratado mediante cirugía radical exploratoria y/o paliativa, complementada con tratamiento adyuvante en forma de quimioterapia o radioterapia. Aunque el estadiaje agrupado para CCR de la AJCC ha facilitado el pronóstico del paciente, este sigue siendo heterogéneo, al igual que la respuesta terapéutica y toxicológica al tratamiento [104]. Esto provoca que la naturaleza y potencia de la terapia adyuvante a prescribir sea un asunto en plena discusión (quimioterapia tradicional, biológica o radioterapia), [13] y determinante en estadios concretos (IIB, IIIA) para prevenir la recidiva de intervalo [105], que implica el seguimiento de los pacientes.

El tratamiento tras el diagnóstico de CCR metastásico tiene un gran componente paliativo, ya que la supervivencia estimada de los pacientes no supera el 6-10% a 10 años. La metástasis del tumor primario a otros órganos, principalmente hígado y pulmón, dificulta la cirugía y el tratamiento se basa en la quimioterapia [13]. Para reducir la alta mortalidad del CCR provocada por un diagnóstico tardío [100] es necesario identificar aquellos pacientes en estadios iniciales [106-108]. También es importante determinar el riesgo del paciente diagnosticado para personalizar su tratamiento, reduciendo efectos secundarios innecesarios y ajustando la posología para una mejor efectividad. Finalmente, es importante identificar nuevas dianas terapéuticas que permitan curar la enfermedad. El diagnóstico molecular podría ayudar a estos 3 objetivos mediante la identificación de biomarcadores.

3.2. Diagnóstico temprano en cáncer colorrectal

Un 95% de los casos de CCR se beneficiarían de una cirugía ambulatoria, poco complicada y de alta eficacia si fuesen detectados en estadios tempranos [100], ya que aquellos pacientes diagnosticados en una etapa inicial y localizada (estadios I y II), se caracterizan por tasas de supervivencia a 5 años del 91,1% y 69,8%,

respectivamente. Es por ello que la detección temprana ha demostrado su efectividad para reducir la mortalidad específica de CCR en diversos metanálisis [109].

La detección temprana del CCR es un reto desde la consulta médica, dada su sintomatología silente, lo que implica el uso de estrategias de prevención secundaria como el cribado poblacional. La prevención secundaria engloba aquellas estrategias para detectar y tratar las enfermedades en estadios muy tempranos impidiendo y/o retrasando el desarrollo de la misma [110]. El cribado poblacional busca detectar la enfermedad en su comienzo mediante la identificación de pólipos premalignos con el objetivo de reducir su mortalidad. El diagnóstico clínico del paciente suele realizarse en estadios tardíos, cuando presentan síntomas graves y diseminación peritoneal. Finalmente, el diagnóstico patológico y confirmatorio, se produce durante la intervención quirúrgica.

Los avances científicos sobre carcinogénesis en CCR han permitido profundizar en el papel del pólipo en la identificación de estadios tempranos. Si bien en un inicio todos los pólipos eran resecaados, se confirmó que mientras el 50% de los pacientes cribados mediante colonoscopia presentaban pólipos, su riesgo de contraer CCR a lo largo de su vida era tan solo del 5% [111]. Esto implica que no todos los pólipos adenomatosos acaban malignizando. Por otra parte, el descubrimiento de nuevas vías de carcinogénesis colorrectal hace que la detección de pólipos adenomatosos sea insuficiente en términos de sensibilidad, ya que no detectarían otras lesiones tempranas como la displasia grave o los adenomas planos. Una prueba de detección temprana para el cribado poblacional debería ser suficientemente poco invasiva para mejorar sustancialmente la adherencia, las expectativas de supervivencia de los pacientes y reducir el gasto sanitario dedicado a la quimioterapia y hospitalización debido a un diagnóstico de la patología en estadios tardíos [112]. Esta tecnología de prevención secundaria permitiría reducir sustancialmente la incidencia y la mortalidad en los próximos 15 años, algo bastante improbable a través de la prevención primaria y cambios de estilo de vida [3].

3.3. Alternativas actuales para el diagnóstico temprano

Actualmente existen diferentes alternativas para el diagnóstico y pronóstico del CCR. Para el diagnóstico, priman las herramientas no serológicas de diferente grado de invasividad: la prueba de sangre oculta en heces (FOBT) [113] y el diagnóstico por imagen, habitualmente mediante colonoscopia, considerada de segunda línea bajo previo positivo de la FOBT, sospecha clínica o pacientes de riesgo moderado [114]. Esto requiere una alta sensibilidad de las pruebas no invasivas. En investigación, existen diferentes biomarcadores que todavía no han sido aprobados para su uso en cribado poblacional.

3.3.1. Pruebas diagnósticas no invasivas: sangre oculta en heces

Los costes de producción, así como la facilidad de uso de la FOBT han permitido su universalización y utilización como prueba de cribado poblacional. Los dos tipos de pruebas comercializadas detectan la presencia de hemoglobina en las heces y no suponen grandes molestias al paciente [115]. La FOBT basada en guayacol utiliza este compuesto para detectar la hemoglobina de la sangre a partir de su actividad peroxidasa y se caracteriza por una baja sensibilidad ante aquellos casos avanzados de CCR [116] y su bajo coste [115, 117]. No obstante, la implementación de la FOBT como prueba de cribado en población de riesgo ha demostrado reducir la mortalidad del cáncer en estudios controlados y prospectivos en un 13%,

incrementándose a un 18% al prescindir de aquellos pacientes que voluntariamente no aceptaron someterse a la prueba [118], lo que confirmó la utilidad de la prueba en prevención secundaria.

Por otra parte, el FOBT inmunoquímico o FIT (*Fecal Immunologic Testing*) utiliza anticuerpos contra la hemoglobina humana [119], lo que mejora la sensibilidad y la interpretación de los datos (ya que su resultado es cuantitativo y automatizado) [115, 116, 120]. Su mayor precisión y sensibilidad respecto al basado en guayacol han sido previamente demostradas [119], ya que no reacciona con hemoglobinas de otros animales, presentes por ejemplo en la carne roja. Este aspecto resulta en un aumento de participación (aprox un 10%) porque tiene menos contraindicaciones en el estilo de vida y alimentación del paciente [115, 120]. Por ello, el FIT es el test recomendado en la actualidad para la detección de CCR en los programas de cribado [121, 122], habiendo demostrado similares resultados a la colonoscopia [123].

La implementación de la FIT en población general mayor de 60 años ha provocado una reducción en la incidencia de CCR [123, 124], definiendo así su criterio de inclusión en el programa de cribado. Por otra parte, se ha descrito que los individuos cuyos ascendientes familiares han tenido pólipos adenomatosos presentan un mayor riesgo de presencia de adenoma o CCR [125]. Por ello la prueba de sangre oculta en heces o colonoscopia de manera periódica está indicada para estos individuos a partir de los 40 años, con el objetivo de poder detectar y eliminar las lesiones antes del desarrollo de la enfermedad [108, 126].

3.3.2. Diagnóstico por imagen: Endoscopias colorrectales

La colonoscopia es la prueba de referencia y confirmación del diagnóstico de CCR, al visualizar y biopsiar directamente la mucosa del colon y del recto por lo que permite detectar lesiones benignas, adenomas y/o tumores malignos, así como comenzar su estadiaje [127-130]. La colonoscopia no solo detecta pólipos adenomatosos, sino que además previene su evolución hacia un desarrollo tumoral, por lo que resulta particularmente útil en aquellos pacientes cuya carcinogénesis ha seguido la secuencia adenoma-adenocarcinoma [127] y que presentan adenomas avanzados de alto riesgo [131, 132]. Entre las principales desventajas de esta técnica se encuentra su alta invasividad que puede suponer un aumento del riesgo de complicaciones, el elevado coste económico para el sistema sanitario y la poca adherencia a esta técnica entre los pacientes [3, 133]. Su generalización al cribado poblacional podría provocar 1 hemorragia por cada 150 pruebas, 1 perforación por cada 1500 y una defunción por cada 10.000 [112]. Además, la totalidad de pólipos detectados no evoluciona necesariamente hacia cáncer, lo que compromete su especificidad y eficiencia [111, 127], provocando gastos sanitarios innecesarios en aquellos pacientes que no llegasen a desarrollar cáncer.

La recto-sigmoidoscopia es más sencilla que la colonoscopia, ya que solo alcanza el colon distal y el recto, siendo efectiva para el diagnóstico de la mayoría de los tumores [134-136] e implicando menos molestias para el paciente. Por edad u otras características del paciente las técnicas endoscópicas pueden estar contraindicadas, en cuyo caso se recomienda la colonoscopia virtual (también llamada colonografía tomográfica computarizada). A partir de imágenes de rayos X se genera una reconstrucción tridimensional del colon. Finalmente, el enema de bario de doble contraste permite valorar fundamentalmente el colon izquierdo. Estas últimas apenas se utilizan actualmente debido a su carácter radiológico y al avance del resto de técnicas [137-139].

Tanto la prueba de sangre oculta en heces como la colonoscopia son susceptibles de mejora. Por una parte, la FOBT presenta una baja sensibilidad en estadios tempranos, además de una alta tasa de falsos positivos (baja especificidad). Esto requiere, el uso de una técnica cara e invasiva como la colonoscopia de segunda línea como confirmación del diagnóstico si la primera prueba es positiva. Por la otra, la colonoscopia no es apta generalmente para adenomas planos, es cara, no es aceptada en grado suficiente por la población y su eficacia depende del facultativo que la realice, complicándose a la hora de detectar adenomas planos. Todo ello hace necesario el desarrollo de nuevos marcadores que superen estas barreras.

3.4. Biomarcadores y diagnóstico molecular

Un biomarcador es aquella molécula cuya determinación cualitativa o cuantitativa “es capaz de identificar individuos de diferentes niveles de riesgo para una condición que afectaría a su salud” [140]. Por ello, más allá del diagnóstico de una enfermedad, los biomarcadores pueden utilizarse para la subdivisión y clasificación de pacientes (p.ej. cáncer de mama Her2+) o para predecir o monitorizar la respuesta a un tratamiento (p.ej. alelo K-ras). De particular interés, son los biomarcadores circulantes, ya que permiten analizar su estado de manera poco invasiva a partir de una extracción sanguínea [141]. Un biomarcador para la detección temprana necesita demostrar un alto grado de precisión y reproducibilidad, diferenciando cáncer y adenomas avanzados de otro tipo de lesiones, para lo que es necesario que la muestra (heces o sangre) no sufra cambios de concentración repentinos, y desaparezca al tratar o eliminar la lesión [3]. Finalmente, deberá caracterizarse por un bajo coste, y más importante, ser aceptado por la población de riesgo.

Actualmente, las tecnologías de alto rendimiento permiten identificar, y cuantificar miles de genes, proteínas o anticuerpos específicos en medios de cultivo, fluidos biológicos, extractos celulares o tejido tumoral. Estas tecnologías permiten estudiar redes moleculares que provocan el desarrollo tumoral, lo que ha revolucionado la identificación de nuevos biomarcadores y dianas terapéuticas. Hoy en día se han perfeccionado kits de diagnóstico molecular en sangre, heces y orina. Las pruebas sanguíneas pueden ser implementadas junto con las bioquímicas que están recomendadas a partir de los 50 años [3].

3.4.1. Biomarcadores genéticos y de expresión para el diagnóstico de CCR

La secuenciación masiva y las micromatrices de ácidos nucleicos han cambiado el paradigma del estudio genético de las enfermedades durante las últimas dos décadas, permitiendo la identificación y cuantificación de múltiples marcadores genéticos simultáneamente [142-144]. La comparación de la expresión génica de muestras de pacientes sanos con pacientes con cáncer, permiten definir perfiles asociados a un tipo de cáncer siempre que el número de muestras sea suficiente y representativo [143]. El uso de micromatrices ha permitido describir biomarcadores de varios tipos de cáncer como el de mama [145], próstata [146], vejiga [147] o melanoma [148]. No obstante, solo Oncotype DX, un test para pronosticar la recidiva de cáncer de mama a partir de 21 biomarcadores genéticos, se encuentra comercializado actualmente [149, 150].

En el campo del CCR, dos estudios recientes describen patrones génicos de expresión que son capaces de detectar el cáncer y predecir la respuesta a terapia [151-153]. La heterogeneidad del cáncer aporta una complejidad que requiere el análisis simultáneo de varios marcadores [143]. Hoy en día la mutación del gen K-ras es un ejemplo de biomarcador aprobado por la FDA y EMA para la personalización de la terapia, ya que

su mutación bloquea el efecto del fármaco cetuximab, anticuerpo monoclonal antagonista del EGFR [154, 155]. Tradicionalmente, la toma de muestra de biomarcadores genéticos o de expresión en biopsia del tejido afectado ha complicado su implementación como pruebas de cribado debido a su invasividad. Hoy en día es posible cuantificar marcadores genéticos en tejidos más accesibles y de manera menos invasiva, por lo que los tests de DNA fecales de multidetección génica han ido ganando terreno. Uno de los biomarcadores genéticos fecales más avanzados es la hipermetilación del promotor de SEPT9 [156], ya que se altera específicamente en la mucosa tumoral frente a la normal. No obstante, la FIT actual supera su rendimiento [157]. Le siguen las mutaciones de K-ras y APC. Como con SEPT9, la capacidad de la primera generación de sus pruebas para la detección de adenomas avanzados resultó insuficiente [157, 158]. Con todo, las mejoras técnicas posteriores, como la optimización de soluciones tamponadoras, la adición de otros biomarcadores al panel (NDRG4, BMP3 o metilación de β -actina) y la optimización del algoritmo clasificador mejoraron la capacidad diagnóstica y precisión del test, aunque no existen datos prospectivos ni protocolos validados de toma de muestra que permitan su implementación [159]. No obstante, se ha constatado la mejora de detección del CCR cuando este test se utiliza combinado con la FIT respecto al uso de la FIT por sí sola [160], conduciéndolo a la aprobación de este para su comercialización por la FDA para su uso conjunto [3].

3.4.2. Biomarcadores proteicos en el diagnóstico de cáncer colorrectal

Las proteínas modificadas a lo largo del desarrollo y progresión del cáncer son de alto interés diagnóstico y terapéutico. La irrupción de diferentes técnicas de alto rendimiento en proteómica ha permitido describir patrones proteicos en CCR que evolucionan a lo largo del desarrollo del tumor. La evolución de la enfermedad provoca cambios tanto en la identidad, como en la abundancia o en las modificaciones postraduccionales presentes en las proteínas de las células y los tejidos tumorales; siendo determinantes a la hora de otorgar un fenotipo tumoral a la célula. Estas proteínas asociadas a la evolución de la enfermedad se conocen como biomarcadores proteicos. Al igual que otros biomarcadores, suele ser necesario un perfil de varios biomarcadores cuantitativos relacionados a través de un algoritmo que devuelve un parámetro asociado a la enfermedad [161], por ejemplo, la probabilidad de contraer cáncer.

Muchas de las proteínas alteradas o sobreexpresadas son filtradas al torrente sanguíneo como biomarcadores serológicos. Aunque su cuantificación en sangre facilite su uso clínico, esta es complicada por las bajas concentraciones en las que se encuentran. Además, la sangre constituye un entorno que provoca que los biomarcadores se encuentren constantemente expuestos a la degradación. Estas características dificultan su descubrimiento e imposibilitan su estandarización como biomarcadores de diagnóstico [162-164]. El diseño de los estudios de validación, así como la recolección estandarizada de muestras son imprescindibles para la validación de este tipo de biomarcadores [161], que son más lábiles que otro tipo de biomarcadores como los genéticos o histológicos.

Como consecuencia, un bajo número de kits de diagnóstico basados en biomarcadores proteicos han sido autorizados para distintos tipos de cáncer [149]. Entre ellos, destaca un kit de 6 proteínas para diagnosticar el cáncer de ovario. Por otra parte, actualmente la cuantificación de la concentración del antígeno específico prostático (PSA) por encima de 4ng/ml para el cribado de cáncer de próstata es muy polémica debido a su falta de especificidad [165]. Debido a esto, su cuantificación ha sido desaconsejada recientemente como cribado de la población general, reduciéndose su uso al seguimiento o a pacientes que presenten motivos que

justifiquen la prueba tanto en Estados Unidos [166, 167] como en Europa [168]; como por ejemplo un tacto rectal sospechoso. Las causas de la baja especificidad incluyen la hiperplasia benigna de próstata, prostatitis, o la simple senectud del hombre. Además, la concentración sérica del PSA presenta una aleatoriedad en su cuantificación del 15%. Sus falsos positivos provocan un excesivo biopsiado que implica un porcentaje creciente de infecciones y sangrados complicados quirúrgicamente [169]. Finalmente, la alfa-fetoproteína (AFP), ha sido investigada como biomarcador circulante para diferentes cánceres, incluyendo tumor del sinus endodermal, neuroblastoma, hepatoblastoma, y carcinoma hepatocelular, aunque solo se recomienda para el cribado del tumor de células germinales no seminomatoso [170, 171]. Por su caída después de la resección de tumores localizados, también se usa como biomarcador para la vigilancia del paciente en caso de recidiva o no respuesta al tratamiento en cáncer hepatocelular (entre otros).

En CCR, los niveles de CEA superiores a 5 ng/ml y de CA19.9 superiores a 37 U/ml se utilizan habitualmente para pronosticar la evolución del paciente con CCR, aunque actualmente no están recomendados ni para el cribado poblacional ni para prevención secundaria debido a que sus niveles pueden elevarse en otras enfermedades inflamatorias o estados no patológicos y disminuir su especificidad [2, 172-174]. En investigación se encuentran una serie de marcadores proteicos, todavía carentes de una validación clínica que permita su uso. Entre ellos se encuentran proteínas de la matriz nuclear, los antígenos séricos CCSA2, CCSA3 y CCSA4 [175, 176], metaloproteinasas de matriz (MMP) [177] y las proteínas S100 A8/A9 [178, 179]. Un caso particular de biomarcadores proteicos, es el uso de autoanticuerpos específicamente dirigidos frente a proteínas tumorales. La estabilidad, vida media y concentración de los autoanticuerpos en la sangre superan los inconvenientes que presentan los biomarcadores proteicos (ver página 44). Los autoanticuerpos aparecen debido a que algunas proteínas son capaces de inducir una respuesta humoral específica frente al tumor, proteínas denominadas antígenos asociados a tumor (AAT). Los autoanticuerpos resultantes constituyen una herramienta eficaz, fiable y no invasiva para la detección del cáncer y el diagnóstico preclínico en pacientes con cáncer (Figura 4) [180-182].

3.5. Pronóstico del cáncer colorrectal

Hay una notable variabilidad en cuanto al pronóstico y a la respuesta al tratamiento prescrito en CCR avanzado [13]. Los regímenes terapéuticos recomendados todavía presentan reducidas tasas de supervivencia a pesar de su elevado coste y toxicidad. Por ello, es de capital importancia identificar aquellos grupos de pacientes con las formas más agresivas de cáncer con el objetivo de reforzar la terapia sobre ellos y aumentar sus probabilidades de supervivencia. Por otra parte, identificar a aquellos pacientes de menor riesgo, permitiría relajar los regímenes terapéuticos, reduciendo la incidencia y los efectos secundarios del tratamiento, ajustando las dosis para una mejor efectividad. Más allá del diagnóstico, es necesario avanzar hacia la estratificación de pacientes ya diagnosticados según su riesgo y la personalización de su tratamiento.

Después del tratamiento quirúrgico radical, estudios recientes subrayan la importancia de controlar las recidivas de intervalo (recaídas tempranas entre 6 y 60 meses después de la colonoscopia quirúrgica) [105] y la aparición de nuevas lesiones neoplásicas [183], mediante técnicas de prevención terciaria. La prevención terciaria se realiza cuando ya se ha diagnosticado la enfermedad, y su objetivo es evitar que ésta empeore y se desarrollen las lesiones tumorales [184]. Esto hace necesario desarrollar técnicas para la determinación de la agresividad y el riesgo de recaída o fallecimiento de los pacientes utilizando tecnologías no invasivas,

económicas, rápidas y precisas. Esto permitiría administrar una terapia adyuvante más intensa a pacientes con alto riesgo de recidiva.

3.6. Alternativas para el seguimiento y pronóstico de los pacientes con CCR

Hoy en día, para el seguimiento del paciente considerado curado y la detección de recidivas o nuevas lesiones se utiliza únicamente la colonoscopia periódica como técnica de elección [183, 185-187]. El análisis histopatológico de las biopsias extraídas se ha validado además como marcador para monitorizar el riesgo de recidiva de intervalo [127]. Del mismo modo, los biomarcadores para el manejo y pronóstico del paciente con CCR son escasos, destacando los anteriormente mencionados CEA (antígeno carcinoembrionario), CA19.9 y CA125 [2, 173, 174].

Inicialmente, CEA y CA19.9 han sido los marcadores serológicos de primera línea para pronóstico y vigilancia del paciente, aunque actualmente el CEA circulante solo se encuentra recomendado para monitorizar la terapia en CCR avanzado y para obtener información pronóstica [2, 172, 173]. Aquellos pacientes con niveles de CEA superiores a 5 ng/ml en suero presentan un peor pronóstico, independientemente del estadio del CCR. Por ello, la ASCO y SEOM recomiendan el seguimiento de los niveles de CEA en el pre- y post-operatorio como técnica de prevención terciaria, ya que es un marcador de recidiva después de la cirugía [173].

3.7. Aspectos diferenciales de los biomarcadores circulantes

Frente a pruebas como la colonoscopia, los biomarcadores presentes en fluidos biológicos de fácil acceso (como sangre, saliva u orina) han ido ganando relevancia científica y clínica. Este tipo de biomarcadores presentan menos dificultades para la obtención de muestras y suponen menos molestias para el paciente y una mejor aceptación por la población [3]. Además, tecnologías como el ELISA están bien establecidas para su cuantificación en fluidos biológicos, lo que facilita su desarrollo tecnológico e industrial.

En concreto, los marcadores presentes en el torrente sanguíneo presentan la ventaja de poder ser integrados en una analítica bioquímica rutinaria [3]. Para la búsqueda de nuevos biomarcadores circulantes en CCR existen, al menos tres aproximaciones diferentes: el estudio de la expresión diferencial de proteínas en el secretoma o derivados sanguíneos mediante espectrometría de masas, las micromatrices de anticuerpos y el estudio de la respuesta humoral del organismo frente a proteínas tumorales. Entre los estudios de identificación sérica abundan las técnicas de MALDI y SELDI [100]. Mediante SELDI-TOF se describieron AAT90K/Mac2BP [188] y la transtiretina y C3a-desArg [189] como potenciales biomarcadores de CCR. Recientemente estudios más rigurosos a partir del análisis comparado del secretoma de líneas celulares han permitido describir los biomarcadores SERPINI y S100A8/A9 [179].

4. Los autoanticuerpos como biomarcadores de CCR

4.1. Generación de autoanticuerpos durante el desarrollo del cáncer

El inicio y progresión de un tumor provoca cambios en el tejido afectado que alteran directamente el patrón de proteínas expresadas tanto en las células tumorales como en el estroma tumoral. Para mantener la homeostasis, el sistema inmune reconoce y elimina habitualmente estas alteraciones a través de una

respuesta celular y humoral dirigida a los antígenos asociados a tumor (AAT) [180, 190] (Figura 4). La relevancia de la respuesta inmune frente al tumor es tal, que la evasión a ésta se ha incluido en los “Nuevos desafíos del cáncer” [8].

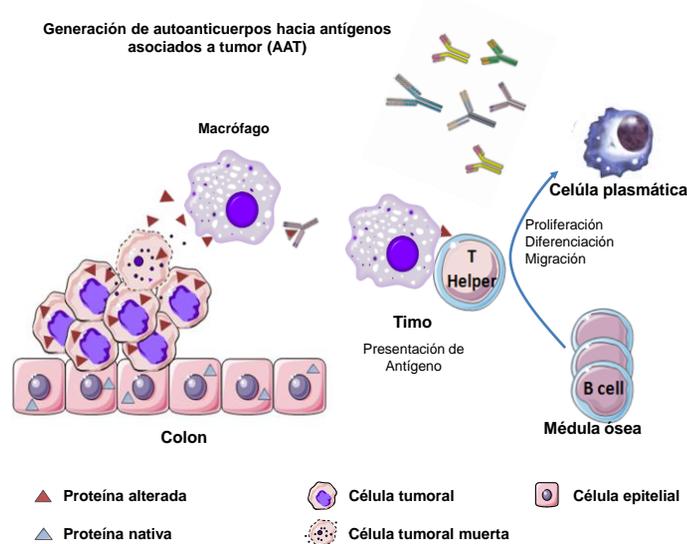


Figura 4: Mecanismo de producción de anticuerpos frente a AAT durante el desarrollo del cáncer colorrectal. El desarrollo tumoral produce alteraciones en las proteínas, que permiten la producción de una respuesta autoinmune. La producción de autoanticuerpos específicos puede ser detectada por técnicas de inmunodetección como ELISA, siendo útil para el diagnóstico y pronóstico en cáncer.

Las causas de la respuesta humoral frente al cáncer han sido ampliamente debatidas y parece que los mecanismos moleculares asociados son bastante heterogéneos [141]. En los últimos años, se han descrito diferentes alteraciones moleculares que dan lugar a una respuesta inmune humoral frente a cada AAT [191]. Por ejemplo, la respuesta humoral frente a MUC1, está provocada por glicosilaciones post-traduccionales aberrantes [192]. En el caso de proteínas asociadas al desarrollo como CEA o NY-ESO-1, los autoanticuerpos se deben a una expresión anómala, expresándose en el tumor cuando su expresión canónica tiene lugar durante el desarrollo embrionario. Otra causa es la localización celular, por ejemplo, la ciclina B1 se transloca al citosol desde el núcleo en varios tipos de cáncer [193-195]. Cuando la célula tumoral muere, la liberación de proteínas intracelulares induce una respuesta humoral. Se han propuesto otras causas de la respuesta inmune como las alteraciones de la secuencia en el extremo C-terminal por alteraciones del marco de lectura, mutaciones puntuales, truncamientos, plegamiento aberrante, proteólisis aberrante, sobreexpresión o expresión en otro tejido o localización celular [180, 181, 193, 194, 196]. Estas alteraciones que sufren los AAT hacen que sean reconocidos como extraños por el sistema inmune produciendo autoanticuerpos frente a ellos (Figura 5) [180, 190].

Además de las alteraciones en la expresión de los AAT, la pérdida de la tolerancia inmunológica debido a la inflamación crónica en el CCR también puede desencadenar la producción de autoanticuerpos (algo muy habitual en enfermedades autoinmunes como la psoriasis). La respuesta inmune actúa como presión evolutiva en el desarrollo del tumor a través de un proceso conocido como inmunoedición ante la evasión inmunológica del cáncer. El equilibrio entre evasión e inmunoedición define el fenotipo tumoral en pacientes inmunocompetentes [197]. Los responsables de ese equilibrio son los linfocitos T reguladores, que inhiben una respuesta citotóxica (Th1, CD8⁺), en favor de una respuesta Th2 que implica la producción de

anticuerpos, que además favorecen la progresión tumoral [198, 199], aumentando el número de metástasis [199, 200]. Los linfocitos T reguladores parecen reconocer específicamente una serie de AAT, como LAGE-1 [201] o Dna J-like2, que no parecen sufrir ninguna alteración en su expresión [202]. En conjunto, el complejo proceso de selección de AAT se conoce como inmunoedición y se articula en 3 fases (Figura 5): la contención del tumor mediante la eliminación de AAT, la evolución del fenotipo del tumor dirigida por la presión evolutiva del sistema inmune y, finalmente, el crecimiento del tumor mediante escape o evasión de la respuesta inmune [181, 199]. Esta interacción hace que la inmuno-oncología sea un área con gran importancia en investigación básica, clínica y producción farmacéutica [203]

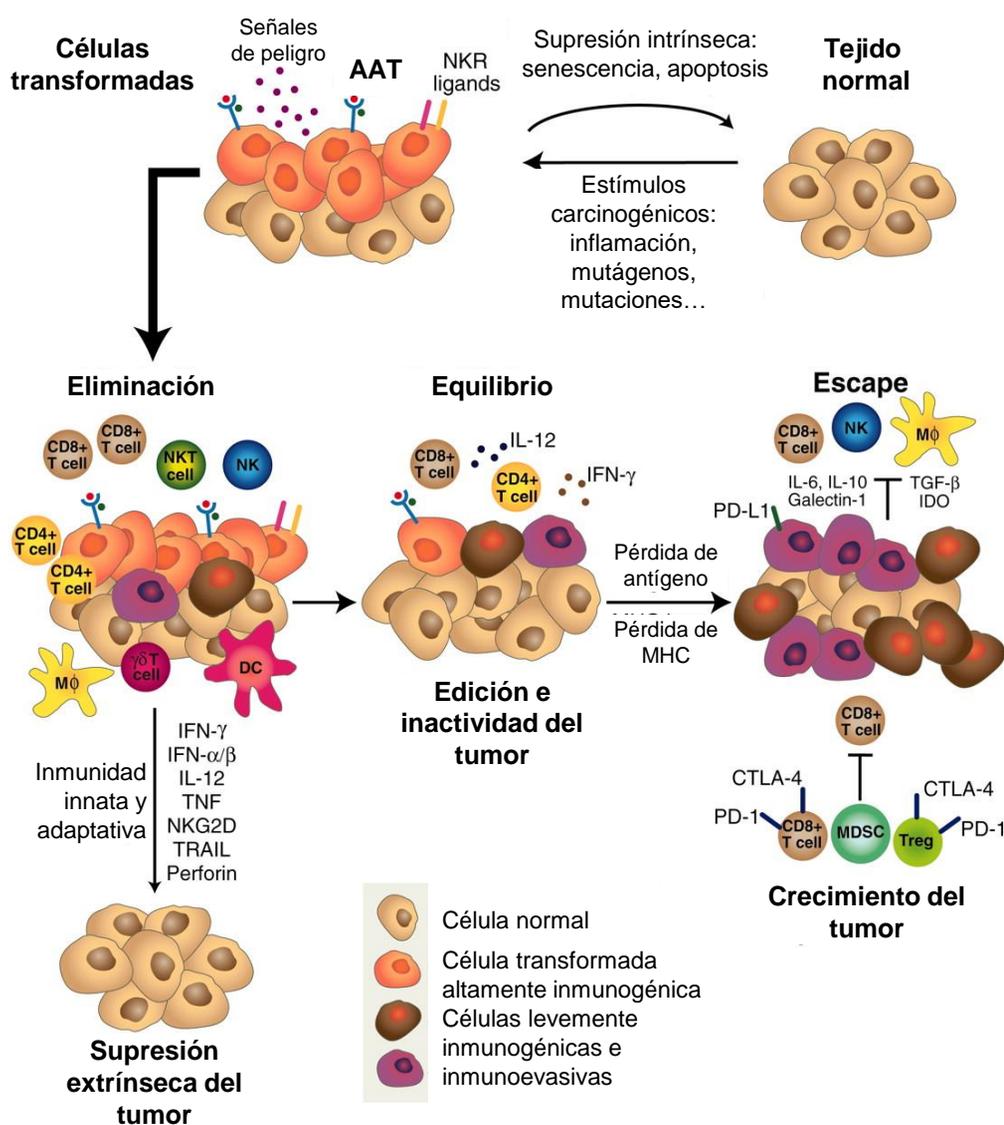


Figura 5: Interacciones entre el cáncer y el sistema inmunológico (inmuoedición) durante el desarrollo tumoral. [203].

4.2. Descubrimiento de Antígenos Asociados a Tumor

Los primeros estudios que identificaron AAT y autoanticuerpos frente al cáncer se publicaron a finales de los 70 y principios de los 80, utilizando una aproximación llamada cribado autólogo. En un primer paso, el cribado autólogo incubaba las células normales y el suero de pacientes para descartar autoanticuerpos. Posteriormente, el mismo suero se incubaba con células tumorales autólogas para identificar AAT expresados

exclusivamente en el tumor. Finalmente los AAT identificados se validan por ELISA y se valora su prevalencia. En estos estudios, se utilizaron células de melanoma en cultivo primario y sueros de los mismos pacientes para identificar autoanticuerpos circulantes. No obstante, la heterogeneidad de la respuesta complicó la identificación de antígenos comunes a todos los pacientes [204, 205].

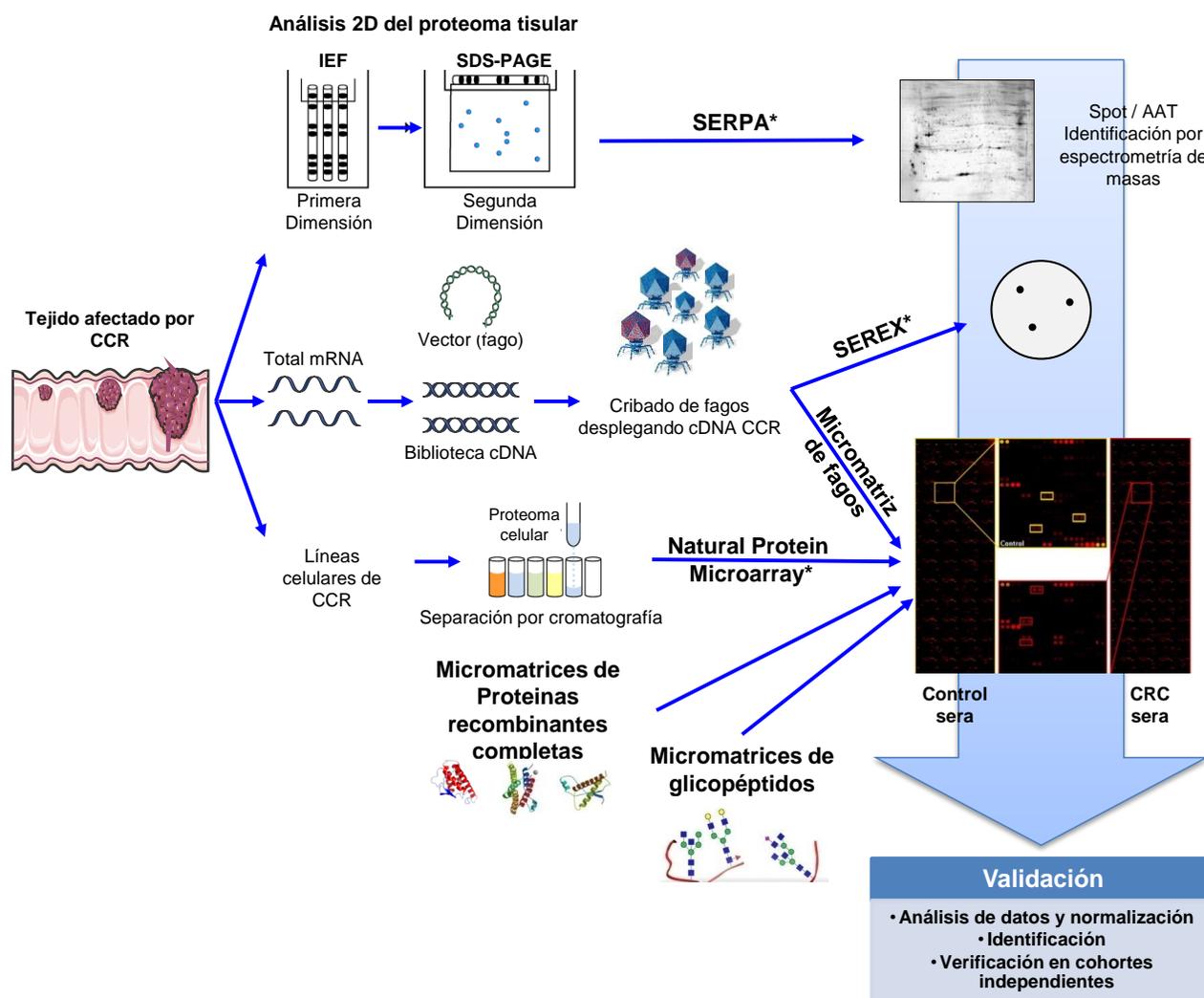


Figura 6: Estrategias de descubrimiento e identificación de AAT. IEF: Isoelectroenfoque. SERPA: Serological Proteome Analysis. SEREX: Serological Analysis of Recombinant cDNA Expression Libraries.

Las nuevas tecnologías de alto rendimiento en proteómica han acelerado la identificación de autoanticuerpos en suero y sus respectivos AAT como potenciales biomarcadores de cáncer (Figura 6). Las estrategias más habituales son SEREX (análisis serológico de bibliotecas de expresión de cDNA recombinante), SERPA (análisis serológico del proteoma), y sobre todo, micromatrices de proteínas con fracciones de células tumorales, proteínas recombinantes impresas en alta densidad o librerías de fagos.

El SEREX fue la primera técnica a gran escala utilizada para identificar autoanticuerpos en CCR [202, 206]. Consiste en incubar librerías de fagos obtenidas a partir de tumores de pacientes con sueros de los mismos pacientes para enriquecer en fagos específicos de autoanticuerpos. Una vez inmovilizados los fagos en membrana se detectan aquellas proteínas reactivas desplegadas por los fagos en forma de spots reactivos mediante la incubación con sueros de pacientes [180, 207-209]. El grupo de Old publicó un trabajo

utilizando esta técnica, donde se validaron trece de los 77 antígenos identificados como proteínas diana de autoanticuerpos: p53, MAGEA3, SSX2, NY-ESO-1, HDAC5, MBD2, TRIP4, NYCO-45, KNSL6, HIP1R, Seb4D, KIAA1416 y LMNA. A pesar de estos resultados, solo 34 de los 74 pacientes con CCR (46%) presentaron autoanticuerpos frente a uno o más de los 13 antígenos [210]. En conjunto más de 2300 AAT han sido identificados a través de este método, aunque debido a la inmovilización en membrana, estos antígenos se limitan a epítomos lineales y/o que sean expresables en bacteria [180, 209]. Sin embargo, este método presenta severas limitaciones, ya que dificulta la comparación de sueros problema con sueros control [211], además de que no permite identificar proteínas poco abundantes o que se expresen en células normales [209, 212].

Las micromatrices de fagos suponen una mejora respecto al protocolo SEREX. Esta técnica parte de una librería de cDNA extraída de células tumorales, desplegada en fagos T7 y posteriormente sometida a un proceso de *biopanning* con sueros de pacientes afectados. A continuación, se imprime la selección de fagos en micromatrices de nitrocelulosa que serán incubadas con un nuevo set de sueros de pacientes cancerosos y control. Finalmente la incubación con anticuerpos secundarios marcados con fluorescencia permitirá identificar aquellas proteínas cuyos spots posean diferente reactividad. El SEREX combinado con micromatrices de fagos fue descrito por primera vez para identificar AAT de próstata [213] y de ovario [214]. También se utilizó en nuestro grupo, resultando en la identificación de 43 fagos que mostraron mayor inmunoreactividad frente a sueros de pacientes con CCR que los controles [215]. En concreto, el protocolo partió de tejidos de cáncer de colon de los cuales se extrajo mRNA. Este fue amplificado mediante RT-PCR y clonado en fagos T7. Después del enriquecimiento por *biopanning*, 1800 fagos seleccionados por su afinidad por los sueros cancerosos se imprimieron en micromatrices que fueron incubadas con 15 sueros de pacientes de diferentes estadios de CCR y 15 pacientes asintomáticos. Seis de estos fagos contenían péptidos homólogos a STK4, SULF1, NHSL1, SREBF2, GRN y GTF2I. Para validar el uso clínico de los fagos identificados para el diagnóstico de CCR, se determinó la reactividad de sueros de 153 pacientes mediante ELISA, obteniéndose una AUC de 0,78 [215]. En estudios posteriores, la sustitución de los fagos que desplegaban en su superficie péptidos de STK4 y SULF1 por sus proteínas recombinantes correspondientes mejoró significativamente la capacidad de diagnóstico del panel predictor: de una AUC de 0,78 se llegó a 0,86, y la sensibilidad aumentó del 72% al 82,6%, manteniéndose la especificidad en el 70% [215].

El SERPA consiste en la utilización de proteínas naturales purificadas a partir de líneas celulares tumorales. Puede partirse de una electroforesis bidimensional o pueden imprimirse directamente las proteínas fraccionadas en una micromatriz de baja densidad. Así, se utilizaron células LoVo para identificar la ubiquitina C-terminal hidrolasa L3 (UCH-L3) cuyos autoanticuerpos se detectaron en 19 de los 43 pacientes con CCR, sin observar reactividad en los pacientes con cáncer de pulmón o de individuos sanos [216]. La principal dificultad del SERPA consiste en la identificación *a posteriori* del spot reactivo, ya que *a priori* se desconoce su identidad y podrían encontrarse dos o más proteínas diferentes bajo un mismo spot. Este paso suele llevarse a cabo a través de una cromatografía líquida y espectrometría de masas (LC-MS/MS), aunque no siempre se obtienen resultados concluyentes.

4.3. Características de los autoanticuerpos como biomarcadores

Los autoanticuerpos fruto de la respuesta humoral frente al cáncer son biomarcadores circulantes que permiten su análisis mediante una extracción sanguínea rutinaria, cuya simplicidad es particularmente importante para un cribado diagnóstico poblacional. A diferencia de otros biomarcadores circulantes, los autoanticuerpos son moléculas muy estables que no están sujetas a fluctuaciones diarias. Persisten en el suero durante un período de tiempo relativamente largo ya que no se degradan en la sangre, por lo que permiten la realización de estudios clínicos retrospectivos a largo plazo empleando muestras almacenadas en biobancos [164]. Su tradicional utilización en inmunoensayos de diagnóstico y pronóstico para enfermedades infecciosas y autoinmunes [217], facilita su estandarización, normalización y ulterior implementación en la práctica clínica.

Gracias a la expansión de técnicas inmunológicas de alto rendimiento (Figura 6), se han podido describir firmas de autoanticuerpos para el diagnóstico de diferentes tipos de cáncer [218, 219] incluyendo el cáncer colorrectal [182, 206, 215, 216, 220-222], de próstata [213, 223], ovario [214, 224], pulmón [225, 226], vejiga [227], o mama [221, 228], entre otros. La respuesta inmune humoral frente al tumor es típica de tumores sólidos e inflamatorios [218, 219]. Diversos estudios han confirmado la utilidad de los autoanticuerpos para el diagnóstico temprano de CCR [141, 164, 182, 215, 222], aportando diversas ventajas sobre otros biomarcadores proteicos. Hoy en día los autoanticuerpos frente al cáncer de pulmón [225, 226] están indicados para el cribado poblacional en primera línea en Reino Unido y Estados Unidos, recomendándose la tomografía axial computarizada (TAC) en caso de reactividad hacia alguno de los 6 AAT que componen el test [229], aunque todavía no se han recomendado para sustituir a la tomografía computarizada [230-232].

Más allá del diagnóstico, los AAT tienen utilidad en el manejo del paciente ya diagnosticado o a la hora de discernir un cáncer de lesiones benignas. Por ejemplo, en cáncer de mama, una firma de 5 AAT (RBP-J kappa, HMG1, PSRC, CIRBP y ECHDC1) fue capaz de discriminar a las pacientes de carcinoma ductal benigno *in situ* (que no requieren cirugía) frente a cáncer de mama invasivo [233]. De manera similar en cáncer de próstata, los niveles de autoanticuerpos frente a TARDBP, Tln1, PARK7, CALD1 y PISP1 fueron capaces de discriminar la hiperplasia benigna de próstata de pacientes con cáncer de próstata [234]. Por último, ya que la mayoría de los autoanticuerpos en el suero de pacientes con cáncer reconocen proteínas alteradas asociadas a procesos de carcinogénesis como el ciclo celular, la transducción de señales, proliferación o apoptosis; la identificación y caracterización de estas moléculas podría ayudar a describir las vías moleculares de la carcinogénesis. Actualmente, moléculas involucradas en la respuesta inmunológica como CEA están siendo investigadas para su uso vacunal [235]. Recientemente, hemos demostrado en el laboratorio que el bloqueo de un AAT como FGFR4 a través de inhibidores químicos y anticuerpos específicos resultó en una reducción significativa del crecimiento tumoral [236].

No obstante, se sabe poco sobre el momento exacto en el que aparecen los autoanticuerpos, su cinética y su evolución a lo largo de la progresión de la enfermedad, ya que la investigación se ve dificultada por la obtención de muestras sanguíneas previas al diagnóstico del cáncer. Por otra parte, la resección de las lesiones y el tratamiento del cáncer después de su diagnóstico en pacientes no permiten estudiar la evolución de dichos autoanticuerpos en función de la progresión tumoral en humanos.

4.4. Identificación de los AAT para su validación en diagnóstico y pronóstico a partir de micromatrices de proteínas

Una de las tecnologías de identificación de AAT más extendidas consiste en el uso de micromatrices de proteínas en alta densidad, donde se inmovilizan miles de proteínas recombinantes que se incuban con sueros de pacientes con cáncer y controles sanos. Hoy en día, se comercializan micromatrices de alta densidad con más de 9500 proteínas recombinantes expresadas en Sf9 y fusionadas a GST, cuya identidad se conoce de antemano. Dada la mínima cantidad de suero que requiere el cribado a través de micromatrices de proteínas recombinantes, esta fue la técnica de elección para identificar potenciales AAT en nuestro laboratorio.

La incubación con anticuerpos secundarios marcados con fluorescencia revela la identidad de los AAT reactivos, ya que las proteínas impresas se conocen *a priori*. Cada muestra sérica requerirá el uso de una micromatriz. La validación de las firmas resultantes de autoanticuerpos se realiza mediante otras pruebas más económicas, como el ELISA, lo que permite aumentar significativamente la *n* del estudio.

Recientemente, nuestro grupo utilizó 20 micromatrices comerciales Protoarray v4.0 para caracterizar la respuesta humoral a CCR. Para ello se incubaron con 12 sueros de pacientes con CCR metastásico y 8 sueros control de pacientes asintomáticos [182]. Se identificaron 43 proteínas cuya reactividad era mayor en pacientes de CCR. Entre ellas se encontraron ACVR2B, MAPKAPK3, PIM1, STK4, FGFR4, TRIM21, SRC, AKT1, IRAK4, PRKCH, PAK1 y PRKD2. En ese mismo estudio, ACVR2B, MAPKAPK3, PIM1, STK4 y FGFR4 fueron validados en una cohorte independiente de 94 pacientes (42 sanos contra 52 casos de CCR) para obtener una AUC de 0,85 con una especificidad y sensibilidad del 73,9% y 83,3% en el diagnóstico de pacientes de CCR [182]. Los resultados de nuestro laboratorio se combinaron para generar un algoritmo diagnóstico sobre una población de 92 pacientes repartidos entre individuos sanos y CCR [222]. Como resultado se encontró que la combinación de cuatro AAT recombinantes (FGFR4, PIM1, MAPKAPK3 y ACVR2B) junto con los fagos correspondientes a GTF2i, NHSL1 y SREBF2 [215], permitía discriminar sueros de pacientes con CCR frente a sueros control con gran especificidad y sensibilidad [222].

Más tarde, utilizamos una nueva versión de las micromatrices comerciales Protoarray v4.1 con las mismas 8000 proteínas recombinantes y la misma cohorte de 20 sueros para su cribado, pero con una superficie de inmovilización de nitrocelulosa ultrafina [237]. Como resultado, MAPKAPK3 fue re-confirmado como un AAT comprobando la reproducibilidad de la tecnología basada en micromatrices. Además, se identificaron 24 nuevos AAT, entre los que se validaron EDIL3, GTF2B y HCK en una cohorte de 50 muestras de CCR, 54 pacientes con otras afecciones (otros tipos de cáncer, enfermedad inflamatoria intestinal y adenomas benignos) y 49 individuos sanos. Los 3 AAT se combinaron con p53 para obtener una AUC de 0,75, una sensibilidad del 82% y una especificidad del 56% para el diagnóstico de CCR [237]. Globalmente, se encontró que los AAT identificados fueron en su mayor parte quinasas por lo que podrían ser potenciales dianas terapéuticas en CCR dada su participación en procesos de regulación de la transcripción, el crecimiento celular o la diferenciación, como se ha descrito anteriormente para FGFR4 [236].

También es posible fabricar las micromatrices a partir de librerías de expresión como la hEx1, donde se imprimieron más de 36000 proteínas (o fragmentos) humanas recombinantes expresadas en *E. coli*. Como resultado se identificaron AAT como p53, HMGB1 y Trim28 [238]. Otra alternativa son las micromatrices de glicopéptidos para la identificación de AAT glicopeptídicos inmovilizados en micromatrices. Este enfoque permitió la identificación de un conjunto de glicopéptidos aberrantes derivados de MUC1 y MUC4, que fueron validados con anticuerpos monoclonales en líneas celulares de CCR [239].

4.5. Determinación cuantitativa de autoanticuerpos para su uso clínico.

Recientemente se han desarrollado una serie de técnicas que permiten la detección cuantitativa de varios AAT en una cohorte relativamente grande de pacientes, abriendo puertas a la validación del uso clínico de los AAT.

4.5.1. Luminex xMAP

La tecnología Luminex xMAP se basa en la detección múltiple de biomoléculas mediante microesferas en un único pocillo. Para ello emplea diferentes grupos o regiones de microesferas según los porcentajes de colorantes fluorométricos que se le añadan, delimitados por intervalos de fluorescencia [240]. Las regiones se identifican de manera unívoca por la longitud de onda que emiten las microesferas de poliestireno al ser excitadas. Cada región permite acoplar una molécula de captura determinada, por lo que la mezcla de varias regiones permite la determinación simultánea de hasta 500 analitos (Figura 7A) utilizando la misma cantidad de muestra que para un ensayo de ELISA frente un antígeno [241]. La determinación múltiple utiliza un citómetro de doble haz, cuyo haz rojo identifica la región de la microesfera, mientras el haz verde determina la intensidad de fluorescencia del anticuerpo secundario, que es proporcional a la cantidad de analito unido [242] (Figura 7B). También existen sistemas de menor capacidad que utilizan diferentes LED y cámaras digitales para identificar el color e intensidad de cada una de las microesferas como es el caso de MAGPIX, capaz de medir 50 analitos diferentes, pero mucho más rápido que sus predecesores [240]. El sistema de microfluídica permite determinar la fluorescencia de 50 - 200 microesferas de cada región en cada muestra, midiendo así la fluorescencia de todos los analitos simultáneamente de manera robusta en forma de la mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI).

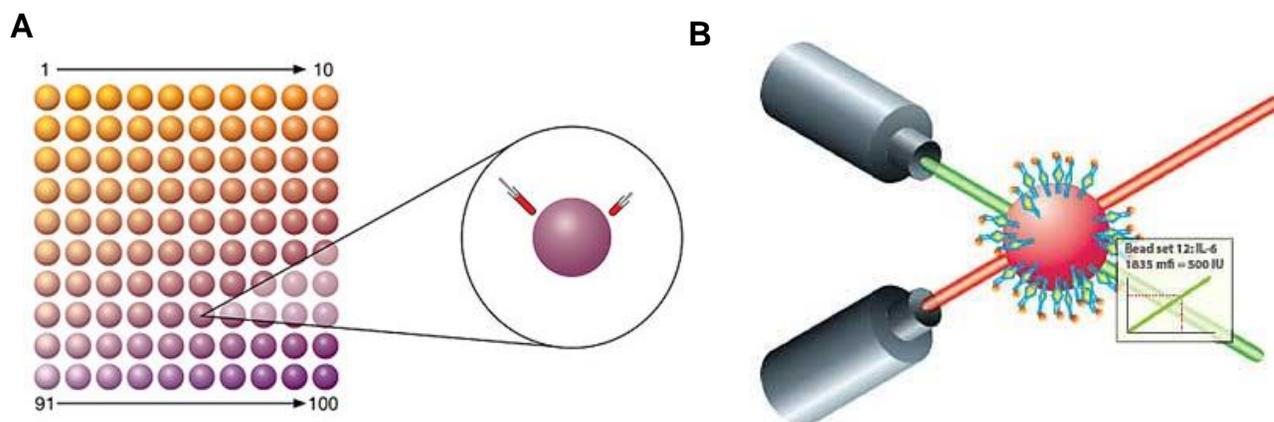


Figura 7: Detección múltiple de analitos mediante microesferas Luminex. A. Debido a la mezcla de dos fluoróforos existen hasta 500 regiones de fluorescencia única diferenciadas por un citómetro de doble haz. B. Detección simultánea de la región de la microesfera e intensidad del analito.

La capacidad de cuantificar una gran cantidad de analitos en una única determinación se conoce como multiplex. Aparte de ser la característica fundamental de Luminex, las determinaciones multiplex también son típicas en micromatrices, o microesferas Veracode [241]. La tecnología se utiliza actualmente en varios ámbitos de las ciencias de la vida, incluyendo el descubrimiento y desarrollo de fármacos; así como el diagnóstico clínico, análisis genético, bio-defensa, seguridad alimentaria e investigación biomédica. Además de la tecnología xMAP para la detección de analitos, Luminex también ofrece la tecnología MultiCode, que se utiliza para el multiplexado de PCR y PCR en tiempo real. También se ha comprobado la utilidad de esta plataforma para la personalización terapéutica en el caso del cetuximab en CCR [243].

Al tener lugar la reacción antígeno-anticuerpo en la superficie de la microesfera y no en el fondo de un pocillo se reduce la cantidad de proteína necesaria por ensayo. Por otra parte, el ensayo es teóricamente más robusto que el ELISA ya que los autoanticuerpos son medidos entre 50 y 200 veces por muestra, utilizándose la mediana de intensidad de fluorescencia (MFI) como resultado final. Además, como técnica fluorimétrica, presenta un rango dinámico mucho mayor que técnicas colorimétricas como el ELISA; reduce la cantidad de muestra necesaria y minimiza errores de pipeteo al reducir la manipulación.

4.5.2. Biosensores nanoplasmonicos

En la búsqueda de nuevos métodos de detección de autoanticuerpos que mejoren el diagnóstico y pronóstico de pacientes con CCR, existen abordajes nanotecnológicos que minimizan la toma de muestra, el tiempo de manejo y aumentan la robustez del resultado. Los biosensores nanoplasmonicos son dispositivos nanotecnológicos capaces de detectar biomoléculas mediante las propiedades de la luz. La plasmónica se centra en el estudio y aplicación de la interacción de las ondas electromagnéticas con los metales. Entre los biosensores plasmónicos más conocidos se encuentra el biosensor de resonancia de plasmón superficial. En este dispositivo, una superficie nanométrica de oro se excita creando una resonancia de plasmón superficial que, a su vez, genera un campo evanescente. Este campo evanescente es extremadamente sensible a los cambios de índice de refracción que se producen en la superficie metálica, tales como los originados por una interacción biomolecular [244, 245].

El avance de la nanotecnología en los últimos años ha permitido el desarrollo de nuevos biosensores nanoplasmonicos integrados y miniaturizados, ofreciendo dispositivos analíticos rápidos, de fácil manejo y del tamaño de un *smartphone* [246]. Este tipo de biosensores permiten una cuantificación absoluta (utilizando un anticuerpo policlonal) y la reutilización de la superficie sensora a través de un proceso de regeneración. Además, el uso de capas basadas en PEG evita las uniones inespecíficas [247, 248] facilitando el análisis de suero o plasma sin necesidad de pretratamiento o purificación de las muestras. Durante el abordaje de la tesis, y a través de colaboraciones desde nuestro laboratorio, validamos esta tecnología para la detección de autoanticuerpos específicos de CCR en sangre de pacientes [249].

4.6. Retos para el empleo clínico de los autoanticuerpos en cáncer colorrectal

Dados los diferentes retos que debe superar un panel de AAT para el diagnóstico de cáncer, hasta la fecha solo dos dispositivos diagnósticos basados en autoanticuerpos han llegado al mercado [229, 250].

Los tests para el diagnóstico deben identificar el número mínimo de AATs útiles para el diagnóstico de CCR, ser validados en un contexto clínico utilizando poblaciones independientes de pacientes suficientemente amplias y verificar su utilidad en términos de reproducibilidad, límite de detección y valor predictivo. El desarrollo de biomarcadores se estructura incluyendo estudios preclínicos de identificación y descubrimiento, optimización tecnológica, estudios retrospectivos de muestras almacenadas y, finalmente, ensayos clínicos prospectivos aleatorizados y multicéntricos de cribado [251]. En muchos casos este desarrollo no se ha completado, y sigue siendo un campo de intenso estudio.

Entre los parámetros de optimización utilizados para mejorar la capacidad diagnóstica de un panel de autoanticuerpos, como los analizados en esta Tesis Doctoral para optimizar la capacidad diagnóstica de un panel de AAT de CCR identificado en el laboratorio [182, 215, 222, 237], se encuentran: i) la identificación del número mínimo de AAT que forman el panel; ii) la optimización de la expresión recombinante de los AAT, permitiendo la conservación y accesibilidad de epítomos; y iii) la plataforma de cuantificación de los autoanticuerpos incluyendo parámetros como diluciones de los sueros y anticuerpos, diferentes tampones y agentes de bloqueo, etc.

4.6.1. Número y composición del panel mínimo de AAT para diagnóstico.

Debido a la complejidad del cáncer, la respuesta inmune humoral de los pacientes es muy heterogénea. Solo un 10-40% de los pacientes producen autoanticuerpos específicos contra un AAT concreto [219, 252, 253]. Por ejemplo, los seis AAT identificados por SEREX (NY-CO-8, -9, -13, -16, -20 y -38) que reaccionaban exclusivamente con sueros de pacientes con cáncer de colon solo eran identificados por un 10-27% de los pacientes [206]. Por otra parte, algunos antígenos aparecen en diferentes tipos de cáncer, como p53 en páncreas, ovario y mama [254]. Esto dificulta la identificación de autoanticuerpos específicos de cáncer colorrectal e implica la utilización de varios AAT combinados para superar estos problemas de sensibilidad y especificidad.

La diversidad de enfoques para la identificación de AAT ha provocado la identificación de más de 100 biomarcadores candidatos para su implementación clínica en CCR [255]. Es preocupante la poca coincidencia de AAT identificados entre diferentes enfoques. Únicamente STK4 y MAPKAPK3 han sido identificados en diferentes estudios como biomarcadores de CCR y galectina-4, p53, c-myc, p62, Koc, Imp1 y NY-ESO-1 como AAT en múltiples tipos de cáncer, como mama o próstata, entre otros [141]. La escasa coincidencia de los AAT a través de los estudios de identificación ha sido explicada de acuerdo a diversas razones: diferente sensibilidad de las técnicas y plataformas, diferente repertorio de proteínas impresas o diferente soporte de inmovilización en el caso de las micromatrices, y también diferentes sistemas de expresión para la producción de proteínas, diversas proteínas de fusión para su purificación como GST o MBP, las diferentes modificaciones post-traduccionales en las proteínas impresas [141] o la mezcla de sueros que originan falsos descubrimientos en la identificación de AAT [256].

Para seleccionar el número mínimo de AAT por panel, es necesario calcular la dependencia de los marcadores entre sí y discernir si la información proporcionada por cada AAT es redundante, o no, con el resto de los AAT para clasificar correctamente a los pacientes y controles, de manera que podamos descartar aquellos AAT que no aportan información relevante para el diagnóstico. Para esta selección de variables,

existen diversos métodos. Koziol y col. utilizaron el particionamiento recursivo para definir un panel de 7 AAT que diferenciaba entre individuos sanos y pacientes con diferentes tipos de cáncer (mama, colon, hígado, pulmón o próstata) con sensibilidades y especificidades mayores al 75% [252]. También son habituales los métodos parsimoniosos (*stepwise*) [257], la validación cruzada LOO (*leave one out*) en pequeñas cohortes [213] y la regresión logística multivariante [222]. Estos métodos indican qué antígenos poseen un mayor grado de independencia frente a los demás. Los métodos jerárquicos parsimoniosos (el paquete estadístico “*rms*” de R, entre otros) permiten incluir a aquellos AAT que aporten la mayor información posible para la implementación e universalización del panel (y modelo resultante) y se ha utilizado de forma habitual en múltiples publicaciones [222, 258, 259].

4.6.2. Características de los AAT recombinantes utilizados.

La calidad de los AAT expresados es determinante para su utilidad diagnóstica o pronóstica. La obtención de péptidos y proteínas representa una importante fuente de variabilidad en la validación de los biomarcadores identificados. Los AAT deben presentar todos sus epítomos: continuos o conformacionales debido a la heterogeneidad de la respuesta policlonal observada en los pacientes con cáncer [229, 260]. Las impurezas provenientes de células Sf9 son reactivas a las inmunoglobulinas de pacientes con cáncer, lo que podría afectar de manera similar a la detección de autoanticuerpos específicos frente a CCR [261]. Aparte de las impurezas, las proteínas sintetizadas en *E. coli* carecen de puentes disulfuro y/o glicosilaciones. Por ello, la optimización final de la expresión debería incluir la producción de cada antígeno en *E. coli*, células de insecto Sf9 y/o de mamífero para determinar la plataforma más adecuada en términos de sensibilidad y especificidad. Finalmente, la presencia de diferentes etiquetas (GST, MBP o 6xHis) fusionadas a los AAT seleccionados en el extremo N- o C-terminal podría impedir la unión de los autoanticuerpos. Sin embargo, hasta la fecha existen pocos estudios comparativos [260].

4.6.3. Efecto de la plataforma de detección de autoanticuerpos.

La plataforma y el soporte sólido utilizado para determinar los niveles de autoanticuerpos pueden afectar el resultado final y rendimiento diagnóstico de un kit de diagnóstico. Se ha publicado recientemente que los autoanticuerpos son reconocidos de manera distinta en ELISA, que inmovilizando los AAT en membranas (WB o micromatrices) ya que se modifica el plegamiento de los AAT y la accesibilidad de los anticuerpos [260]. También es necesario optimizar los tampones y soportes utilizados, ya que el cambio de soporte de nitrocelulosa en los micromatrices de proteínas permitió el descubrimiento de nuevos AAT, habiendo utilizado los mismos sueros [237].

En este contexto, la investigación llevada a cabo en esta Tesis Doctoral se ha centrado en primer lugar en la optimización de la cuantificación de autoanticuerpos, utilizando para ello proteínas expresadas en bacteria y células de insecto, tampones y soluciones de bloqueo y diferentes métodos de detección (Luminex y ELISA), para en segundo lugar validar el uso clínico de los autoanticuerpos para el diagnóstico y pronóstico del cáncer colorrectal. Además, utilizando modelos murinos de CCR demostramos: i) que los ratones con la enfermedad desarrollaban una respuesta inmune humoral frente a los mismos autoantígenos observados en humanos, y ii) la gran utilidad para el diagnóstico de CCR de los autoanticuerpos frente a AAT de CCR.

Objetivos

THOUGH NOTHING, WILL DRIVE THEM AWAY, WE CAN BEAT THEM, JUST FOR ONE DAY

WE CAN BE HEROES JUST FOR ONE DAY

HEROES – SIR DAVID BOWIE

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral ha consistido en verificar y determinar la utilidad de los autoanticuerpos de CCR en el diagnóstico y pronóstico, utilizando para ello muestras de pacientes con CCR y controles bien caracterizados, además de modelos murinos de CCR. Nuestros objetivos específicos para desarrollar estos estudios fueron los siguientes:

1. Optimización de la expresión de los antígenos asociados a tumor de CCR

- Optimizar la expresión y comparar la capacidad de los AAT de cáncer colorrectal, producidos en bacterias y células de insecto, para su uso en la cuantificación de autoanticuerpos para el diagnóstico y pronóstico de pacientes con CCR.

2. Evaluación de la autoinmunidad en modelos murinos de CCR y su impacto en diagnóstico temprano

- Implementar modelos animales de CCR para el estudio de la autoinmunidad en cáncer colorrectal.
- Analizar la producción de autoanticuerpos y su desarrollo a lo largo de la progresión tumoral, así como verificar y validar la utilidad de los autoanticuerpos en el diagnóstico temprano de la patología.
- Analizar la correlación en la producción y desarrollo de los autoanticuerpos con la progresión tumoral mediante el análisis histológico.
- Analizar cambios de expresión a nivel de mRNA y proteína de los AAT y determinar su correlación con la respuesta humoral.
- Comparar diferentes modelos murinos de carcinogénesis de CCR para describir su firma humoral en relación con el progreso de la patología.

3. Puesta a punto de ensayos multiplex de autoanticuerpos para el diagnóstico de CCR

- Establecer las condiciones de ensayo óptimas para la detección múltiple de autoanticuerpos en microesferas (Luminex).
- Comparar la capacidad de detección de autoanticuerpos de CCR en microesferas (Luminex) con ELISA.
- Comparar la capacidad de discriminación de los autoanticuerpos de pacientes de CCR y pacientes con enfermedades relacionadas mediante ensayos multiplex.
- Validar clínicamente nuestro panel de autoanticuerpos para su uso en diagnóstico temprano de pacientes con CCR.

4. Evaluación de la utilidad pronóstica de los autoanticuerpos en CCR

- Evaluar la asociación de los autoanticuerpos de CCR con el pronóstico de la enfermedad.
- Determinar el poder predictivo de los autoanticuerpos para predecir la supervivencia de pacientes con CCR.
- Desarrollar algoritmos de estratificación del riesgo del paciente de CCR de sufrir una recidiva temprana, tardía, y/o fallecer.

Materiales y Métodos

I NEVER BELIEVED, BUT I SEE IT NOW, I'M LEARNING YOUR LESSON, I'M LEARNING YOUR LESSON

DID IT MAKE YOU FEEL SO CLEVER, DID YOU WEAR IT ON YOUR SLEEVE?

GUN - CHVRCHES

I. Material Biológico

I.1. Sueros humanos

I.1.1. Sueros utilizados

En los estudios que conforman esta Tesis Doctoral se utilizaron un total de 430 sueros de pacientes con cáncer colorrectal, enfermedades relacionadas (otros tipos de cáncer o enfermedad inflamatoria intestinal), y donantes sanos sin enfermedad declarada. Los 430 sueros usados en los ensayos de diagnóstico y pronóstico se obtuvieron de pacientes de los hospitales universitarios de Salamanca, Bellvitge/Institut Català d'Oncologia (Barcelona), Puerta de Hierro (Madrid), Fundación Jiménez Díaz (Madrid), Hospital de Cabueñes (Gijón) y de Guadalajara tras obtener el consentimiento informado por escrito de todos ellos. Las muestras de sangre fueron extraídas previamente a cualquier cirugía y ulterior tratamiento farmacológico o radioterápico. Los datos clínicos de los pacientes se detallan en cada uno de los estudios. Todas las muestras fueron manejadas de forma anónima de acuerdo con las normas éticas y legales del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y de los hospitales correspondientes.

I.1.2. Cohorte para optimización de ensayos

Para determinar las condiciones óptimas de los ensayos se contó con 42 muestras séricas (19 CCR y 23 sanos). Los 19 sueros tumorales utilizados en el estudio fueron seleccionados por tener altas concentraciones de autoanticuerpos.

I.1.3. Cohorte para el estudio diagnóstico

Esta cohorte se compone de 307 pacientes de 4 hospitales distintos (ver Tabla 10 en página 106 en 3.4.Características clínicas de la cohorte de estudio de Resultados): 112 muestras de la Fundación Jiménez Díaz (anotados como FJD); 101 muestras del Hospital de Cabueñes (anotados como Gijón), y 70 del Hospital de Puerta de Hierro (anotados como Phierro). Finalmente, a través del consorcio Colodetect obtuvimos 24 sueros del Hospital Universitario de Salamanca (anotados como HUSal). El periodo de recolección de muestras tuvo lugar entre marzo de 2005 y marzo de 2014.

Aquellas muestras utilizadas como controles sin enfermedad declarada (H) provenían de donaciones de sangre o cirugías de crecimientos benignos como angiodisplasias, adenomas de paratiroides o pólipos no malignizados o enfermedades no relacionadas (no tumorales y no inflamatorias) como isquemias intestinales o diverticulitis.

I.1.4. Cohorte para el estudio de pronóstico

Para el análisis de la asociación entre presencia de autoanticuerpos y supervivencia se empleó otro panel independiente de 95 sueros de pacientes con CCR con más de 10 años de seguimiento (ver Tabla 18 en página 118 en 4.1.Características clínicas de la cohorte de pacientes del estudio, de Resultados). Estos 95 pacientes provienen de una colección de 200 sueros de pacientes reclutados de marzo de 1996 a septiembre de 2002 en el Hospital Universitari de Bellvitge/Institut Català d'Oncologia (Barcelona). Fueron seleccionados en base a la existencia de datos de seguimiento después del diagnóstico de CCR.

1.2. Ratones

Para los estudios de carcinogénesis colorrectal química en modelos murinos se utilizaron ratones FVB/N por su alta sensibilidad frente al AOM. Los ratones fueron criados y estabulados en el animalario del CIB – CSIC.

1.3. Cepas bacterianas

Para el clonaje y expresión de proteínas se utilizaron las siguientes cepas bacterianas competentes de *E. coli*:

One Shot TOP10 (C4040-10, Invitrogen). Bacteria competente similar a la cepa comercial DH10B™ diseñada para el clonaje. Presenta ausencia de endonucleasas dependientes de metilación, lo que facilita la introducción de DNA en el citosol. Genotipo: F- *mcrA* Δ(*mrr-hsd*''rms''-*mcrBC*) Φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74* *recA1* *araD139* Δ(*araleu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (StrR) *endA1* *nupG*.

One Shot BL21 (DE3) pLysS (Invitrogen). Bacteria competente diseñada para la expresión de proteínas recombinantes bajo sistemas de doble promotor gracias a la integración del fago DE3 en su genoma (*lac* y T7pol). El plásmido pLysS expresa lisozima basal que impide la expresión residual del inserto recombinante y facilita la disrupción celular. Genotipo: F-*ompT* *hsdSB* (_{r_B}, m_B) *galcdmrne131* (DE3) pLysS (Cam^R)

1.4. cDNA codificante de AAT humanos

Los cDNA de PRKD2 e IRAK4 fueron extraídos mediante PCR preparativa y sub-clonados en un plásmido de expresión pET para su expresión heteróloga en *E. coli*.

Tabla 3: Origen de las secuencias de cDNA de los AAT clonados

AAT	Repositorio	ID	Número de acceso	Plásmido de origen	Plásmido de destino
IRAK4	DNASU*	HsCD00044937	BC013316	pDONR221	pET-28 ^a
PRKD2	DNASU*	HsCD00021447	NM016457	pDNR-Dual	pET-41b

* <https://dnasu.org/DNASU/Home.do>

1.5. Enzimas

Las enzimas de restricción *NdeI* y *HindIII* se obtuvieron de New England Biolabs. Las enzimas MMLV-RT y DNA polimerasa se obtuvieron del kit de síntesis de cDNA (OrientExpress Oligo-dT cDNA Synthesis Kit) de Novagen. La enzima T4 DNA ligasa se obtuvo de Roche. La enzima HotMaster™ Taq DNA polimerasa provino de 5' Prime.

1.6. Proteínas comerciales usadas en los ensayos de ELISA

BSA se compró a Sigma y EBNA1 a Tebu-Bio. Anexina IV fue expresada en células de mamífero (HEK293T), Trim21 y p53 expresadas en bacteria fueron cedidas amablemente por Protein Alternatives SL; empresa que también cedió las proteínas recombinantes expresadas en células de insecto Sf9 mediante infección con baculovirus utilizadas en esta Tesis Doctoral.

1.7. Anticuerpos para WB

1.7.1. Anticuerpos primarios

Los anticuerpos primarios utilizados durante la tesis fueron seleccionados prefiriendo aquellos obtenidos inmunizando con proteínas completas.

Tabla 4: Anticuerpos primarios.

Anticuerpo	Fabricante	Uso	Dilución	Clonalidad	Animal	Referencia
AKT1	Cell Signaling	WB	1/1000	policlonal	conejo	1132254
EDIL3	Abcam	WB	1/1000	policlonal	ratón	ab67573
GTF2B	Santa Cruz Biotech	WB	1/1000	policlonal	conejo	sc225
HCK	Santa Cruz biotech	WB	1/1000	policlonal	conejo	sc72
MAPKAPK3	Abcam	WB	1/500	policlonal	pollo	clone2B5
MST1/STK4	Atlas Antibodies	WB	1/1000	policlonal	conejo	HPA015270
PAK1	Abcam	WB	1/1000	policlonal	conejo	ab79218
PIM1	Abcam	WB	1/100	policlonal	oveja	ab15002
SRC	R&D	WB	1/1000	policlonal	cabra	AF3389
Tubulina	Sigma	WB	1/5000	monoclonal	ratón	T9026

1.7.2. Anticuerpos secundarios

Tabla 5: Anticuerpos o reactivos secundarios.

Anticuerpo	Reactividad	Conjugado	Fabricante	Uso	Dilución	Referencia
anti-IgG	Cabra	Peroxidasa	Dako Cytomation	WB	1/10000	P0449
anti-IgG	Conejo	Peroxidasa	Sigma	WB	1/5000	A6154
anti-IgG	Humana	Peroxidasa	Jackson IR	ELISA	1/10000	109 035 098
anti-IgG	Oveja	Peroxidasa	Sigma	WB	1/5000	A9452
anti-IgG,M,A	Humana	Peroxidasa	Dako Cytomation	ELISA	1/4000	A0190
anti-IgG	Pollo	Biotina	Jackson IR	WB	1/20000	303-065-003
Streptavidina peroxidasa	-	Peroxidasa	Ray Biotech	ELISA	1/500	EL-HRP

2. Material no biológico

2.1. Medios de cultivo

Para el crecimiento de las bacterias, se utilizó medio LB suplementado con el antibiótico adecuado.

2.2. Disoluciones y tampones

Medio LB. Para 1 l: 0,17 M NaCl, 10 g triptona, 5 g extracto de levadura, pH=7,5.

LB-agar. Para 1 l: 0,17 M NaCl, 10 g triptona, 5 g extracto de levadura, 20 g de agar, pH=7,5.

Medio SOC. Para 1 l: 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 g triptona, 5 g extracto de levadura, 20mM de glucosa a añadir después de haber autoclavado la solución.

PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄. pH=7,4 utilizando HCl.

MPBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄. pH=7,4 utilizando HCl. Se añade un 3% de leche desnatada (Central Lechera Asturiana).

MPBST: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄. pH=7,4 utilizando HCl. Se añade 0,10% Tween-20 y 3% leche desnatada en agitación.

PBST: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄. pH=7,4 utilizando HCl. Se añade 0,10% Tween-20.

PBS+BSA: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄. pH=7,4 utilizando HCl. Se añade 1% BSA.

Tampón de electroforesis para SDS-PAGE 1x (Tris-glicina-SDS): 25 mM Tris-HCl (pH 8,3), 192 mM glicina, 0,1% SDS.

Solución de resuspensión bacteriana: 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1 mM EDTA a pH 7,5 con inhibidores de proteasas.

Tampón de equilibrado para la columna de afinidad IMAC: 20 mM fosfato sódico, 0,5 M NaCl, 20 mM imidazol a pH 7,4. Equilibrio de fosfato sódico a pH 7,4 a partir de 19% de fosfato sódico monobásico 0,2 M (27,8 g de NaH₂PO₄ en 1000 ml de agua destilada) y 81% de fosfato sódico dibásico 0,2 M (53,65 g de Na₂HPO₄·7H₂O).

Tampón de elución para la columna de afinidad IMAC: 20 mM fosfato sódico, 0,5 M NaCl, 0,5 M imidazol. pH= 7,4.

Tampón de carga de Laemli: 60 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2% SDS, 5% β-mercaptoetanol, 10% glicerol, 0,024% azul de bromofenol.

Tampón de carga para DNA (6x): 0,25% azul de bromofenol, 0,25% xilencianol, 30% glicerol.

Tampón de transferencia para WB: 25 mM Tris-HCl (pH 8,3), 192 mM glicina, 20% metanol.

Tampón TAE (Tris-acetato-EDTA): 4 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA.

Tampón TE (Tris-EDTA): 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA. pH=8,0 utilizando HCl.

3. Métodos experimentales

3.1. Obtención de sueros y material sanguíneo

Todos los sueros fueron procesados de la misma manera. Las muestras de sangre se dejaron a temperatura ambiente entre 30 y 60 min para permitir la formación del coágulo. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 min a 4°C dos veces para evitar restos de hemólisis. Los sueros se congelaron y almacenaron a -80°C hasta su utilización siguiendo el protocolo descrito previamente [262]. Todas las muestras de tejido asociado se evaluaron histológicamente por patólogos para especificar el estadio y grado de diferenciación del cáncer.

3.2. Inducción química de cáncer colorrectal en ratones FBV/N

Para poder estudiar la progresión del cáncer no hereditario, se desarrollaron modelos animales mediante la inducción química de carcinogénesis en el colon y recto. El comité ético del CSIC aprobó los protocolos usados para la experimentación animal de acuerdo a las normas de experimentación y bienestar animal, cumpliendo las normativas de la FELASA para la extracción sanguínea en ratones [263]. Se indujo la carcinogénesis siguiendo 3 protocolos diferentes [84, 96] basados en la combinación de azoximetano (AOM) y sulfato sódico de dextrano (DSS) o ambos compuestos por separado (Figura 8).

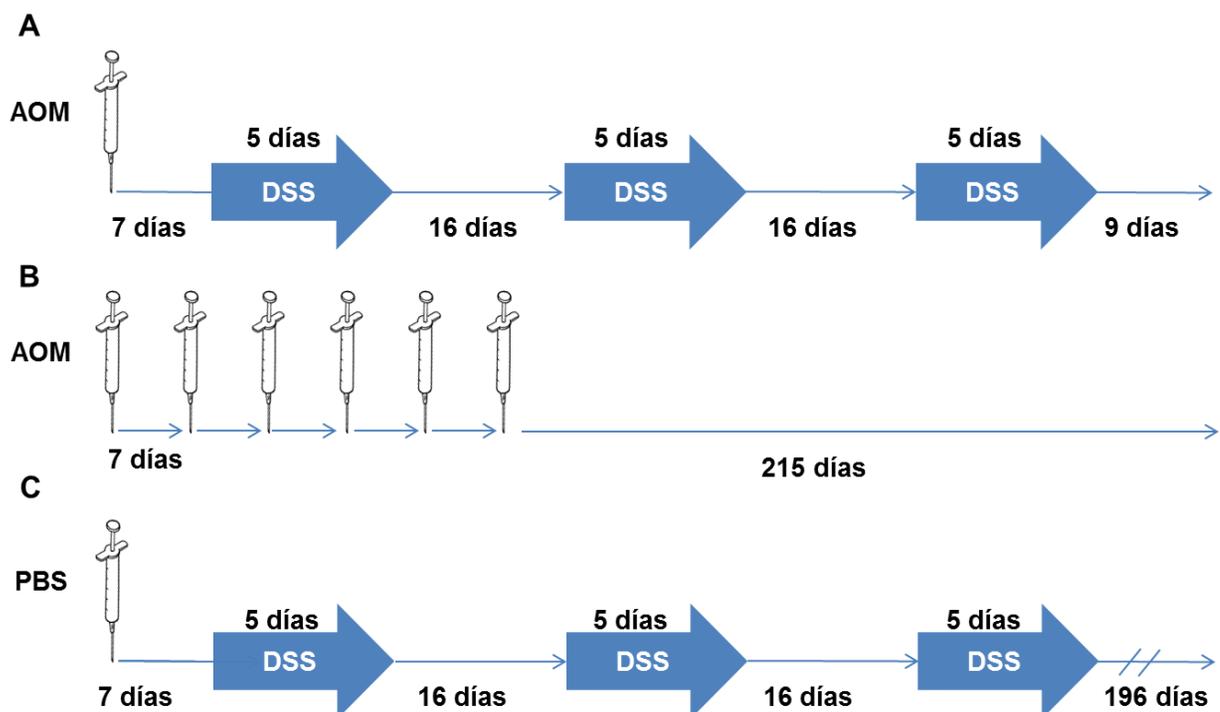


Figura 8: Protocolo de inducción química de carcinogénesis en ratón. Se muestran los tres protocolos aplicados para el desarrollo de lesiones neoplásicas en el colon distal de los ratones. A. AOM/DSS. B. AOM: Inyección semanal i.p. de AOM (10 mg/kg). C. DSS: Tres ciclos de administración de agua *ad libitum* suplementada con DSS fresco a 25 g/l durante 5 días seguido de 16 días de descanso. Tras el último ciclo de DSS los ratones se mantuvieron con agua *ad libitum* libre de DSS hasta un tiempo final de 250 días de estabulación desde el inicio de tratamiento.

El protocolo basado en la administración i.p. de AOM y 3 ciclos de 2,5% DSS *ad libitum* de 5 días se conoce como protocolo de carcinogénesis asociada a colitis [84]. Brevemente, los ratones FVB/N de 4-6 semanas de edad fueron pesados y se les administró una única inyección intraperitoneal de AOM (10 mg/kg) o vehículo (PBS). Cinco días más tarde, los animales recibieron agua *ad libitum* suplementada con 2,5% DSS o agua normal, respectivamente. Los ciclos de tratamiento con DSS consistían en 5 días de agua suplementada con 2,5% DSS fresco seguido de 16 días de agua normal. Se recogieron muestras sanguíneas en el día de inicio del experimento y 1 semana después de cada ciclo de DSS. El protocolo incluye la observación de los ratones durante 70 días.

Los modelos lentos de carcinogénesis basados en AOM o DSS permitieron estudiar por separado la contribución individual de los agentes inflamatorios y mutagénicos al desarrollo de autoanticuerpos, así como observar con más detenimiento su cinética [94]. El protocolo basado exclusivamente en AOM consistió en una inyección i.p. de AOM (10 mg/kg) una vez por semana durante 6 semanas [84]. Los ratones se mantuvieron en observación durante 250 días. El protocolo basado exclusivamente en DSS consistió en 3 ciclos de administración oral de 2,5% DSS en agua *ad libitum*. Cada ciclo duró 5 días seguidos de 16 días de descanso. Al igual que en el protocolo AOM, los ratones se mantuvieron durante 250 días con control de peso y heces semanal.

La sangre se recogió el día de inicio del tratamiento y en intervalos de 21 días [263]. Al final del protocolo, se recogieron muestras de todos los ratones mediante exsanguinación por punción intracardíaca o ventricular bajo sedación y anestesia. Los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical tras anestesiarse a los ratones para observar la progresión tumoral mediante tinción histológica. Posteriormente, los tejidos a analizar fueron recogidos durante la necropsia. Concretamente se extrajo el colon distal de cada ratón, se lavó dos veces con PBS enfriado en hielo, se cortó longitudinalmente y, se congeló una mitad a -80°C para la extracción de ARN y proteína, mientras que la otra se fijó en formalina al 10% tamponada para llevar a cabo la tinción histológica después de su inclusión en parafina.

3.3. Producción y purificación de AAT recombinantes

3.3.1. Amplificación del cDNA mediante PCR

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un volumen de 50 μL con: 0,5 μM de los oligonucleótidos directo y reverso, 200 μM dNTPs, tampón de amplificación 1x (*HotMaster™* Taq) y 1,25 U de Taq DNA polimerasa *HotMaster™*. Se utilizó el siguiente programa de amplificación: 1 ciclo (3 min a 94°C), 30 ciclos (1 min a 94°C , 1 min a 55°C y 2 min a 72°C) y un ciclo final de 7 min a 72°C . Los fragmentos de DNA procedentes de reacciones de PCR o de digestiones con enzimas de restricción se separaron mediante electroforesis en geles de 1% agarosa en TAE 1x teñidos con 0,5 mg/ml de *Gel Red* (Biotium, Inc) siguiendo protocolos descritos anteriormente [264]. La banda de DNA se purificó mediante el kit comercial “*QIAprep Spin Miniprep*” (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.3.2. Construcción de los vectores de expresión y transformación en bacteria

Los cDNAs codificantes de las proteínas se clonaron en los plásmidos pET28a o pET41b según la disposición deseada de la cola de histidinas en el N- o C-terminal de las proteínas a expresar. Se realizó la digestión de 5

µg de producto de PCR y del vector con las enzimas de restricción *NdeI* y *HindIII*. La digestión se llevó a cabo en un volumen de 50 µL conteniendo 5 µg de producto de PCR o vector, 5 µL de Buffer 2 (New England Biolabs), 0,5 µL de BSA 100x y 10 U de cada enzima de restricción *NdeI* y *HindIII* (New England Biolabs). La reacción se incubó 3 h a 37°C y las enzimas se inactivaron a 60°C durante 20 min. El DNA digerido se purificó con el kit “*QIAQuick PCR purification*” (Qiagen) o, alternativamente, si fue necesario cortar la banda de un gel de agarosa con el “*QIAQuick Gel Extraction Kit*” (Qiagen). Posteriormente, se realizó la ligación en un volumen de 15 µl utilizando 200 fmol de producto de PCR digerido y 100 fmol de vector digerido, 1 µl de T4 DNA ligasa (Roche) y 1,5 µl de tampón de ligación. La mezcla se incubó a 16°C toda la noche. Finalmente, el producto de ligación se transformó en la cepa *E. coli* One Shot TOP10 (Invitrogen).

Para su transformación, las bacterias competentes *E. coli* One Shot TOP10 se descongelaron en hielo mezclando 50 µL de bacterias con el DNA transformante (110 ng). Después de incubar en hielo durante 30 min, se aplicó un choque térmico a las células a 42°C durante 45 s. Tras mantenerlas de nuevo en hielo durante 2 min, se añadió 1 ml de medio SOC y se incubaron a 37°C durante 1 h a 225 rpm. Por último, se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 min, se resuspendieron en 100 µl de medio SOC y se sembraron en una placa de LB-agar suplementada con kanamicina. Finalmente, al menos una colonia obtenida en cada clonaje se creció durante toda la noche a 37°C en 10 ml de LB y el DNA plasmídico se purificó empleando los kits de aislamiento de DNA “*QIAprep Spin Miniprep*” (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se comprobó su identidad mediante PCR de colonia y secuenciación.

3.3.3. Verificación de las construcciones por PCR de colonia

La eficiencia de la clonación se analizó mediante PCR de colonia. Las colonias se lisaron con 100 µl de agua milliQ para liberar el DNA plasmídico usado como molde en la reacción. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 20 µL con los oligonucleótidos T7 directo 5´-AATTACGACTCACTATAGG-3´ y reverso (específico de cada cDNA). A partir de la placa réplica se inoculó una colonia positiva en 10 ml de LB suplementado con 50 µg/ml de kanamicina o 100 µg/ml de ampicilina según el vector y se purificaron los plásmidos mediante miniprep utilizando el kit Wizard DNA Miniprep (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, se comprobaron las secuencias en el servicio de genómica del CNIO (Madrid).

3.3.4. Selección de transformantes

Tras verificar las secuencias, las cepas de *E. coli* One Shot TOP10 se utilizaron para almacenar y amplificar los plásmidos recombinantes. Después de su amplificación y purificación, los plásmidos se transformaron en las células BL21 (DE3) pLysS competentes de *E. coli* (Invitrogen) según el protocolo descrito por el fabricante. Las células se sembraron en una placa de LB-agar suplementada con kanamicina y cloranfenicol.

Para la selección de cepas transformantes se siguió un protocolo analítico de cuantificación de la expresión [265, 266] y de acuerdo con el manual del fabricante (Invitrogen), con el objetivo de seleccionar aquellos clones de mayor expresión y solubilidad de los antígenos recombinantes. Los clones más productivos seleccionados fueron almacenadas a -80°C usando: 264 µl de solución de glicerol al 85% y 1,235 ml del propio cultivo bacteriano.

Los clones de expresión para PIM1, MST1/STK4, ACVR2B, FGFR4, SRC, HCK, GTF2B, EDIL3, PAK1 y AKT1 se obtuvieron como se describió previamente [182, 237].

3.3.5. Expresión de las proteínas en *E. coli*

Para la expresión heteróloga se cultivaron colonias individuales de células BL21 (DE3) pLysS de *E. coli* transformadas en 10 ml toda la noche a 37°C con agitación en medio LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina o 100 µg/ml de kanamicina y/o 34 µg/ml de cloranfenicol dependiendo del vector empleado. Al día siguiente, los cultivos se relanzaron tras hacer una dilución 1:100 en 1 l de medio LB con el antibiótico correspondiente. Se mantuvieron a 37°C con agitación hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial ($A_{600} = 0,6-0,8$), momento en el que se añadió isopropil 1-β-D-galactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0,4 mM [267, 268]. Dependiendo de la estabilidad y solubilidad de la proteína se ensayaron diferentes condiciones de temperatura (16°C, 30°C y 37°C) y tiempos de inducción (4 h, 24 h, o 48 h). Al final del periodo de inducción, las células se centrifugaron a 7000 rpm durante 15 minutos a 4°C y el sedimento bacteriano resultante se congeló a -20°C.

Para la ruptura de las paredes celulares, el sedimento bacteriano se resuspendió en 40 ml de solución de resuspensión. Todo el proceso se llevó a cabo en hielo para minimizar la proteólisis y desnaturalización de los antígenos recombinantes. Posteriormente, se añadieron 4,4 ml de 10% laurilsarcosinato sódico y 2 µl de Benzonasa (Sigma Aldrich). Después de 30 min de incubación en hielo, se añadieron 4,88 ml de 10% Triton X-100 y se dieron 3 pulsos de sonicación de 1 min a una amplitud del 10% (Sonifier 150, Branson) hasta obtener un fluido homogéneo. Tras la lisis celular, las muestras se centrifugaron a 10000 rpm durante 30 min a 4°C para separar la fracción soluble de la insoluble utilizando un rotor SS34. Después de la centrifugación, se separó el sobrenadante por decantación. El lisado bacteriano clarificado fue almacenado a -20°C hasta su utilización.

3.3.6. Purificación de las proteínas recombinantes fusionadas a 6xHis mediante IMAC

La purificación de las proteínas fusionadas al tag de histidinas se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad a metal inmovilizado (IMAC) utilizando columnas HisTrap™ “FF Crude columns” (GE Healthcare) de 5 ml acopladas a un sistema ÄKTA Prime (GE Healthcare). Brevemente, el programa de purificación de proteínas fusionadas a 6xHis consta de los siguientes pasos: lavado de la columna con 25 ml de agua y tampón de equilibrado de la columna a un flujo de 5 ml/min, equilibrado de la columna con 10 ml de tampón de elución a un flujo de 5 ml/min y reequilibrado en tampón de equilibrado a un flujo de 5 ml/min. Inyección de la muestra a un flujo de 5 ml/min, lavado de la columna con 50 ml de tampón de equilibrado y elución de las proteínas unidas a la columna con un gradiente de imidazol desde 20 mM (tampón de equilibrado) hasta 0,5 M (tampón de elución).

Aquellas fracciones que presentaron niveles de pureza e integridad superiores al 95% en un gel de SDS-PAGE teñido con Azul de Coomassie G250 (Bio-Rad) se agruparon en lotes. Para cambiar el tampón y eliminar el imidazol de los lotes que contenían las proteínas recombinantes se utilizaron columnas PD-10 (GE Healthcare). Las proteínas purificadas se cuantificaron mediante $A_{280\text{ nm}}$ utilizando su coeficiente de extinción molar teórico.

3.3.7. Análisis electroforético de proteínas en geles SDS-PAGE

Las electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes por SDS (SDS-PAGE) se realizaron en un sistema Mini-PROTEAN II (Bio-rad) a amperaje constante (25 mA por gel). La concentración de poliacrilamida empleada para el gel separador fue del 9% [269]. Las proteínas se fijaron y tiñeron con colorante Bio-Safe basado en Azul de Coomassie G250 (Bio-Rad) y se destiñeron con agua destilada siguiendo el protocolo del fabricante.

3.3.8. Verificación de la identidad de las proteínas recombinantes

Se analizaron 2 µg de cada proteína recombinante purificada mediante SDS-PAGE y la identidad de las bandas de interés se verificó mediante huella peptídica con un espectrómetro de masas MALDI TOF-TOF Autoflex III (Bruker-Daltonics, Servicio Proteómica CIB).

3.4. Cuantificación de ácidos nucleicos y proteínas

3.4.1. Obtención de extractos proteicos a partir de tejido

Para la obtención de los extractos, 50 mg de tejido se lavaron 2 veces con PBS antes de su lisado con 1 ml de 0,5% SDS con inhibidores de proteasas (una pastilla de “*Complete Mini EDTA-free*” (Roche Applied Science) por cada 7 ml de solución). La concentración de los extractos se determinó mediante el “2D-Quant kit” (GE Healthcare) después de centrifugar las muestras a 10000 rpm durante 15 min a 4°C según protocolos previamente publicados [182, 236].

3.4.2. WB - Detección inmunológica de proteínas fijadas en membrana

Las proteínas purificadas (1 µg) o los extractos proteicos (10 µg) se separaron mediante SDS-PAGE al 9%. Las proteínas separadas mediante electroforesis se transfirieron en húmedo a membranas de nitrocelulosa Hybond-C extra (Amersham Biosciences) durante 1 h a 100 V utilizando un Mini Trans-Blot Cell (Bio-rad). Las membranas se bloquearon con MPBST durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, las membranas se incubaron con la dilución optimizada de los anticuerpos mono- o poli-clonales específicos frente a cada proteína (

Tabla 4). Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla 5) durante 1 h a temperatura ambiente. La visualización se realizó incubando con 1,5 ml de ECL (GE Healthcare) o “*SuperSignalWest Femto Chemiluminescent Substrate*” (Pierce) con agitación. La detección de la señal se realizó utilizando la cámara de luminiscencia LAS-3000 (FujiFilm).

Para comparar la expresión de antígenos en muestras tumorales y normales, los geles se realizaron y corrieron en las mismas condiciones experimentales y se procesaron en paralelo, asimismo, las muestras se cargaron en un gel por duplicado para cada antígeno. Para el WB se utilizaron 10 µg de extracto de proteína del colon distal de 5 ratones control y 5 ratones tratados. Las diferencias detectadas fueron densitometradas utilizando tubulina como control de carga.

3.4.3. Cuantificación de proteínas

Para cuantificar la abundancia de las proteínas detectadas, se densitometraron las bandas del WB con el software ImageJ [270] y Quantity-One (Bio-Rad) normalizando los niveles de expresión respecto a la proteína constitutiva Rho GDI y a la media de los individuos control. Posteriormente se compararon los niveles de expresión usando el Test T de Student unilateral.

3.4.4. Extracción y purificación del mRNA

El RNA total de tejido normal y tumoral se extrajo añadiendo 1 ml de Trizol (Invitrogen) por cada 100 mg de tejido y homogeneizando mecánicamente utilizando una aguja 27G (BBraun). A continuación, se incubó la muestra durante 5 min a temperatura ambiente. Tras incubar la mezcla durante 5 min a temperatura ambiente, se añadieron 200 µl de cloroformo y se incubó durante 3 min a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó a 13200 rpm durante 15 min a 4°C, se recogió la fracción acuosa donde se encuentra el RNA y se añadió 1 volumen de etanol al 70%. Posteriormente, el RNA se purificó con el kit RneasyMini (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. Se determinó la concentración del mRNA obtenido a través de la absorbancia a 260 nm en un Nanodrop ND-2000 (Thermo Technologies). La pureza se valoró usando el ratio de absorbancias 260/280 nm. Los ratios oscilaban entre 1,8 y 2 en todas las muestras. Finalmente, se evaluó la calidad del RNA mediante su análisis en chip Experion (Bio-rad).

Tabla 6: Oligonucleótidos diseñados para la cuantificación de mRNA de los genes de interés en los modelos murinos.

AAT	Cebador	Secuencia (5'→3')	Longitud amplificada (pb)
P53	Directo	CGCTGCCCCCACCATGAGCG	227
	Reverso	GGTCGGCGGTTTCATGCCCC	
STK4	Directo	GAGGAACCCACCGCGCAGGC	236
	Reverso	CGTGAGGGGCTGTCACACTGCTGC	
EDIL3	Directo	ACTCAGCCTCGGGGTGCCCC	330
	Reverso	CCGCCATTTCTGCAAGGCTCAGCT	
GTF2B	Directo	CCC GCAAGGCAGTGGAGCTGG	181
	Reverso	CTGAAGGGAAGAGATCCGGAGCCCG	
MAPKAPK3	Directo	CTCCGGCCCCAGGTGTGCGA	266
	Reverso	ACAGCGCTTGCCGTGGTGCA	
β-actina	Directo	CATGTACGTAGCCATCCAGGC	251
	Reverso	CTCTTTGATGTCACGCACGAT	

3.4.5. Cuantificación del mRNA (PCR semicuantitativa)

La expresión del mRNA de los genes de interés fue cuantificada mediante RT-PCR adaptando el protocolo descrito previamente [271, 272]. Brevemente, 1 µg de RNA total fue utilizado para obtener el cDNA mediante el kit de síntesis Superscript III (Invitrogen) utilizando el oligo-dT suministrado. Para la PCR, en un volumen total de 20 µl se amplificaron 0,8 µl del producto de la RT-PCR mediante PCR utilizando la enzima KOD DNA polimerasa (Novagen). Se amplificaron los cDNA murinos de p53, GTF2B, EDIL3, STK4 y MAPKAPK3 con cebadores específicos (Tabla 6). Los oligonucleótidos para los AAT murinos fueron diseñados utilizando el programa Primer 3 [273]. La PCR consistió en 25 ciclos de amplificación descritos anteriormente (página 66) con una temperatura de hibridación de 62°C. Finalmente, 5 µl de la reacción se cargaron en un gel de

agarosa al 1,5%. El cDNA de β -actina se utilizó como control de carga y amplificación. Las muestras se cargaron en un gel por triplicado para cada antígeno.

3.4.1. Inmunohistoquímica

El colon distal extraído de los ratones fue fijado durante toda la noche en formaldehído tamponado y 24 h después fue incluido en parafina. Las tinciones de inmunohistoquímica se realizaron en secciones de 6 μ m siguiendo un método automatizado (Dako Autostainer) en el servicio de Anatomía Patológica de la Fundación Jiménez Díaz. Los cortes fueron contrastados con hematoxilina y eosina. En todos los casos se incluyó un control positivo y un control negativo externos y la gravedad de la lesión fue evaluada por un patólogo especialista en Patología digestiva.

3.5. Determinación de autoanticuerpos mediante ELISA y Luminex

3.5.1. ELISA

El protocolo de ELISA se llevó a cabo como se ha descrito previamente [182, 215], con pequeñas modificaciones. Brevemente, placas microtiter de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc) se tapizaron durante toda la noche a 4°C con ligera agitación (100 rpm) y 50 μ l de antígeno de elevada pureza (> 95%) a una concentración de 6 μ g/ml en PBS pH 7.4. GST y Anexina IV humana se usaron como controles negativos, mientras que EBNA-1 se utilizó como control positivo. Después de lavar dos veces con PBS, las placas fueron bloqueadas con 3% de leche desnatada en PBS (MPBST) durante 2 h a temperatura ambiente. Entonces, las muestras de suero se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente y en agitación. Después del lavado, se incubó con un anticuerpo policlonal anti-IgG humana conjugado con peroxidasa (Jackson Labs) diluido 1/10000 en 3% MPBST durante 1 h a 37°C. Después de 3 lavados, la señal se detectó con 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) (Sigma) durante 10 min, parando la reacción con 1 M HCl y midiendo la señal a 450 nm mediante el lector de microplacas Varioskan Flash (Thermo Scientific).

3.5.2. Acoplamiento de AAT a las microesferas Luminex MagPlex

Se utilizaron las microesferas Luminex MagPlex de las regiones que comprobamos anteriormente que. En concreto utilizamos las regiones #13-15, #18-22 y #29, las cuales eran no solapantes en los espectros de detección, para acoplar cada una a un AAT diferente. El protocolo de acoplamiento de los AAT siguió las instrucciones del kit de acoplamiento para microesferas Luminex "Bio-Rad BioPlex Coupling kit" ligeramente modificadas según los protocolos anteriormente publicados [274-276]. Brevemente, las aminas primarias de los AAT son enlazadas a las microesferas a través de enlaces epóxido promovidos mediante el 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y la sulfo-N-hidroxisuccinimida (SNHS), para posteriormente bloquear las microesferas con BSA y proceder a su almacenaje con azida sódica. Las microesferas deben protegerse de la luz y debe determinarse la relación óptima de μ g de AAT por millón de microesferas (Mb).

Partiendo de $1,25 \times 10^6$ microesferas, el protocolo constaba de los siguientes pasos. Tanto el EDC y como la SNHS se secaron 1 h antes de preparar las soluciones. Inmediatamente, se prepararon disoluciones frescas de SNHS y EDC a una concentración de 50 μ g/ μ l. Después de agitar en un vórtex, se retiraron 100 μ l de la suspensión de microesferas, se separaron con un imán y se eliminó la solución de almacenaje. A las

microesferas lavadas se le añadieron 80 μ l de solución de activación, el EDC y la SNHS. Después de incubar 20 min agitando, se neutralizó la reacción mediante la adición de 150 μ l PBS pH=7.4. Se retiró el sobrenadante y se añadieron 100 μ l de PBS y los AAT en PBS hasta un volumen final de 500 μ l. Después de incubar las microesferas durante 2 h agitando a temperatura ambiente, se separaron y lavaron con 500 μ l de PBS. Inmediatamente se bloquearon con 250 μ l de tampón de bloqueo durante 30 min en agitación. Finalmente se lavaron en 500 μ l de tampón de almacenamiento y se cuantificó al microscopio utilizando un hemocitómetro. Después de cada nueva inmovilización de los AAT en las microesferas se realizó un control utilizando anticuerpos primarios específicos de los AAT para verificar su inmovilización y la calidad del lote.

3.5.3. Cuantificación de autoanticuerpos mediante Luminex

Después de juntar las microesferas de todas las regiones a analizar (5000 microesferas por región y pocillo), se lavaron para eliminar la azida sódica y equilibrar con tampón de bloqueo. A continuación la mezcla de microesferas se repartió entre los diferentes pocillos que contenían la muestra de suero diluída, hasta alcanzar 50 μ l de volumen final por pocillo. Siguió una incubación toda la noche a 4°C en agitación horizontal a 350 rpm. Por la mañana los lavados se realizaron con PBS+BSA utilizando un imán adaptado. Posteriormente se añadió el anticuerpo biotinilado de detección anti-IgG durante 1 h, se lavó y se incubó con streptavidina conjugada con ficoeritrina, para proceder a cuantificar la cantidad de complejos inmunológicos en el Luminex 200 (Figura 9). Las diluciones de suero y anticuerpo de detección variaron según la naturaleza de las muestras.

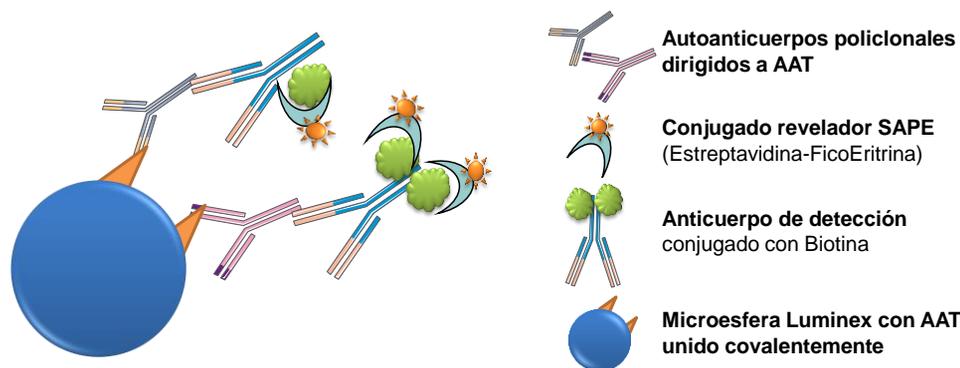


Figura 9: Complejo inmunológico obtenido tras la incubación de los sueros con los AAT para la detección serológica indirecta basada en Luminex. Para la detección de las IgGs humanas se utilizó un anticuerpo biotinilado anti-IgG humana seguido de estreptavidina-ficoeritrina (SAPE).

3.5.4. Tratamiento de datos de absorbancia o fluorescencia

En los ensayos de determinación de ELISA (absorbancia) o Luminex (Mediana de la Intensidad de Fluorescencia: MFI) se incluyeron GST y Anexina IV como controles negativos, para demostrar la especificidad de la respuesta. Dado que GST fue producida en las mismas condiciones que el resto de AAT purificados, fue usada para cuantificar las interacciones inespecíficas de cada suero. La reactividad cruda de cada uno de los AAT fue normalizada para obtener la reactividad específica utilizando la reactividad de GST como valor de fondo, ya que no inducía ninguna respuesta inmunológica como se ha descrito anteriormente [229].

Se utilizó una mezcla de sueros para obtener un suero maestro reactivo a todos los AAT, de manera que confiriese reproducibilidad a la técnica. Utilizando diluciones seriadas de este suero maestro construimos una curva de calibración para cada AAT [276]. Se linearizaron los datos utilizando una curva logística de 3 parámetros (inflexión, asíntota y pendiente). El espectro de valores de absorbancia incluía el cero técnico, que actuaba como asíntota inferior. Los niveles de reactividad se utilizaron para construir una curva patrón, que permitió asignar a cada densidad óptica un título en base a la dilución de suero maestro, lo que permitió determinar la reactividad específica del suero mediante la titulación de los autoanticuerpos, una metodología habitual en los kits de diagnóstico [250, 276-279]. Para la detección de autoanticuerpos humanos se utilizó una curva de calibración del suero maestro entre una dilución 1/20 y 1/800.

4. Metodología estadística

El tratamiento estadístico de los resultados se realizó en colaboración con el Dr. Guillermo Padilla (Servicio de Bioinformática y Bioestadística del CIB – CSIC). En todos los contrastes de hipótesis realizados, aquellos resultados cuyo valor de p fue inferior a 0,05 ($p < 0,05$) fueron considerados estadísticamente significativos.

4.1. Optimización de las condiciones experimentales de ELISA y Luminex

Se realizaron experimentos con la cohorte de optimización y se seleccionaron aquellas condiciones que daban lugar a una mayor relación señal/ruido del promedio de los grupos; siempre y cuando la diferencia absoluta fuese lo suficientemente amplia dentro del error de la técnica. Los cálculos fueron realizados con el software Excel 2010 de Microsoft (Redmont) y el complemento Analyse-it.

4.2. Comparación de los niveles de autoanticuerpos entre los grupos experimentales murinos y humanos

Dada la homogeneidad de la carcinogénesis en los modelos murinos, se asumió un modelo paramétrico normal. Se verificó la significación estadística de las diferencias entre los grupos de tratamiento mediante el test T de Student (o ANOVA, si eran varios grupos). Las pruebas realizadas fueron unilaterales asumiendo que un ratón sano no podía tener niveles de autoanticuerpos más altos que uno con cáncer. Las varianzas de los diferentes grupos murinos fueron consideradas desiguales. Los gráficos obtenidos indican el intervalo de confianza de la media estimada al 95%. Los cálculos fueron realizados con el software Excel 2010 de Microsoft para la T de Student bilateral y JMP 12 de IBM para ANOVA y su representación gráfica.

Dada la heterogeneidad clínica de la enfermedad de cáncer colorrectal en humanos, se asumió un modelo no paramétrico, y se utilizaron técnicas no paramétricas para su detección. Para verificar diferencias entre grupos se aplicó la prueba Kruskal Wallis o U-Mann Whitney simplificada. Se representan en los gráficos aparte de la nube de puntos, los valores máximos y mínimos, cuartiles y *outliers* o valores atípicos mediante diagramas de cajas. Los cálculos fueron realizados utilizando el programa JMP 12 de IBM.

4.3. Identificación de grupos de alto o bajo riesgo a través de la cuantificación de autoanticuerpos de los pacientes de CCR

Con el fin de identificar grupos de alto y bajo riesgo según el nivel de autoanticuerpos, los pacientes fueron clasificados como reactivos o no reactivos para cada AAT. Esta clasificación o dicotomización se realizó a través de un valor de corte obtenido mediante la titulación de anticuerpos a partir del suero maestro. Dicho valor de corte se determinó siguiendo el método descrito anteriormente [280], que relaciona la serie de datos con la variable respuesta censurada. Este método encuentra el punto de corte óptimo en aquel valor de la serie de datos que obtiene la separación más significativa entre las dos categorías de la variable dependiente o respuesta, basándose para ello en el log-rank.

Aplicamos el mismo método para todos los autoantígenos utilizando como variable dependiente la supervivencia global (SG) o el intervalo libre de enfermedad (ILE). Cuando el método optimizaba un valor de corte que ofrecía una separación significativa entre dos categorías o grupos de supervivencia, el valor de corte fue equivalente para diferenciar tanto ILE como SG. Para programar este método se utilizó el entorno estadístico R [281]. Se prefirió este método a otros más tradicionales para determinar el valor de corte, como el uso de la mediana o el percentil 66 que proporcionaron resultados con menor significación estadística.

4.4. Comparación del valor pronóstico de los autoanticuerpos utilizando datos dicotomizados y continuos

Se evaluó la capacidad predictiva individual de los autoanticuerpos para predecir un estado del paciente (si/no recaída temprana, cáncer colorrectal vs sano, o estadio de la enfermedad) mediante regresión logística univariada, asumiendo el modelo lineal generalizado (GLM, de sus siglas en inglés) [282].

En la regresión logística univariada se relaciona cada variable independiente, sea continua o binaria (ej. edad, sexo o valores de los autoanticuerpos) con una variable dependiente categórica (ej. recaída temprana o estado de salud del paciente) a través del logaritmo de la “razón de probabilidades” que definen (conocido como logit) mediante una función lineal, aportando cada paciente un dato a esta regresión. La regresión logística estima, para cada variable independiente, su razón de oportunidades o momios (odds ratio, OR). Es necesario asignar a cada variable independiente un valor de referencia, que en los AAT hemos asumido como la presencia de autoanticuerpos por debajo del valor umbral establecido previamente. En consecuencia, la OR compara la probabilidad de que ocurra el evento de los pacientes reactivos frente a los pacientes no reactivos para cada AAT. En el caso de la predicción de recidiva, la OR (o estimador de efecto) indica las veces que es más probable recaer de un paciente positivo respecto a uno negativo. Dada su naturaleza exponencial, la OR puede tomar valores del intervalo $(0, \infty)$; los valores $(0, 1)$ indican un efecto paralelo de la variable dependiente hacia el valor de referencia, mientras que los valores $(1, \infty)$ indican un efecto antiparalelo. Mediante transformación logarítmica, la OR puede transformarse en el coeficiente de regresión de la variable, que toma valores $(-\infty, \infty)$: negativos para $0 < OR < 1$; 0, para $OR = 1$ y positivos para $1 < OR < \infty$; y permite comparar directamente variables en un sentido o en otro gracias a su carácter lineal.

El test de Wald permite analizar la significación estadística de los resultados. De los coeficientes de la función lineal se obtienen los valores de p de testar la hipótesis nula donde el valor del coeficiente sea cero (esto es, que la variable no tenga ningún valor predictivo). De la OR se obtiene un intervalo de confianza (CI) que nos

permite asegurar, con el 95% de confianza, que el valor “verdadero” del OR se encuentra entre los límites superior e inferior del intervalo. Este CI resulta muy ilustrativo ya que cuando incluye el valor 1 se puede descartar que esta variable tenga un papel predictor en el modelo establecido. Esta metodología ha sido descrita y revisada anteriormente [283]. Los cálculos fueron realizados con el programa JMP 12 y en el entorno de programación SAS.

Los diferentes OR de una regresión univariada nos permiten comparar el comportamiento individual de cada AAT con el de los otros AAT y con el resto de variables como edad, género o localización del tumor primario, para ordenar el efecto que ejerce cada uno de ellas como variables pronosticadoras. Para ello, la representación más visual de una regresión logística es el diagrama de bosque. En ella se representan los intervalos de confianza de la OR de cada una de las diferentes variables en horizontal, mientras que en la vertical está marcada la $OR=1$, o línea de no efecto. Aquellas variables cuyos intervalos de confianza que incluyan o toquen esta línea no disponen de la evidencia estadística suficiente para garantizar una asociación entre ambas variables. Los datos fueron representados gráficamente con el programa JMP 12.

Además, se valoró la capacidad diagnóstica de cada variable independiente continua mediante su curva ROC. La curva ROC ofrece más información en términos de especificidad y sensibilidad de la relación que mantiene la variable dependiente con la independiente. La curva ROC se dibuja utilizando cada valor de la variable independiente como punto de corte y calculando el porcentaje de verdaderos pacientes tumorales (tasa de verdaderos positivos) y verdaderos pacientes control (tasa de verdaderos negativos). A partir de estos porcentajes se tabulan los pares de especificidad y sensibilidad para cada valor de la variable independiente. Estos pares se representan mediante una curva en la que la sensibilidad se representa en las ordenadas y 1-especificidad se representa en el eje de abscisas. Las diferentes curvas ROC se evaluaron con el Área Bajo la Curva (AUC de sus siglas en inglés). Se determinó el par óptimo de sensibilidad y especificidad para cada marcador dependiendo de la utilidad del test según lo publicado anteriormente [284-286]. Este puede ser en términos de restricción de costes (90% especificidad, habitual en prevención terciaria y/o personalización de terapia), restricción de falsos negativos (90% sensibilidad, habitual en prevención primaria y/o cribados poblacionales) o distancia de Youden mínima (par de sensibilidad y especificidad más cercanos a las coordenadas (0,1)) [287].

Las curvas ROC se construyeron con el programa JMP 12 y Analyse-it (obteniendo idénticos resultados). Para la comparación de las diferentes AUC's se utilizó la prueba no paramétrica DeLong DeLong Clarke-Pearson ejecutada con el complemento Analyse-it para Microsoft Excel. Esta se basa en una aproximación en la prueba de Wald, habitualmente utilizada en regresión logística por alto número [288].

4.5. Comparación del valor pronóstico de los autoanticuerpos utilizando datos censurados

Para valorar el papel de los AAT en el tiempo hasta evento (TTE, *Time to event*) desde que la enfermedad es diagnosticada, se realizaron estudios que tuviesen en cuenta la información que aportan los pacientes cuyo seguimiento ha sido censurado o truncado. Se utilizaron herramientas estadísticas que asumen riesgos proporcionales y por tanto permiten analizar el efecto de los AAT en la aparición de eventos a lo largo del tiempo.

Como estudio exploratorio y descriptivo de cada AAT, se representaron las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para cada grupo de supervivencia. Asumiendo riesgos proporcionales, se compararon las curvas de supervivencia mediante el test no paramétrico de log-rank. Los gráficos de Kaplan-Meier y log-rank univariantes se realizaron con la librería *survival* de R versión 2.38-3. Los gráficos de Kaplan-Meier multivariantes se realizaron con el procedimiento *lifetest* de IBM SAS 9.4 (New Cary).

A diferencia de la regresión logística, la regresión de Cox permite el uso de datos censurados, permitiendo ampliar la n y tener datos a lo largo del periodo de seguimiento. De manera análoga a la regresión logística se ajustó un modelo de regresión univariante de riesgos proporcionales de Cox para cada AAT. Esto permitió determinar el valor pronóstico de los autoanticuerpos y otras variables independientes mediante Hazard Ratio (Razón de Riesgo), y su intervalo de confianza. La HR permite comparar el efecto entre las diferentes variables. Esta comparación se representó mediante un diagrama de bosque. En ella se representan los intervalos de confianza de la HR de cada una de las diferentes variables en horizontal, mientras que en la vertical está marcada la $HR=1$, o línea de no efecto. Aquellas variables cuyos intervalos de confianza que incluyan o toquen esta línea no disponen de suficiente evidencia estadística para garantizar una asociación entre ambas variables. Los datos fueron representados con el programa JMP 12.

4.6. Combinación de variables para construir algoritmos multivariantes

Con el fin de construir herramientas diagnósticas y pronósticas utilizando la información de diferentes antígenos y de otras variables clínicas, se procedió a construir modelos que aglutinasen todos estos datos en una misma función. Para el modelo de diagnóstico se efectuaron regresiones logísticas multivariantes y, para el modelo de pronóstico, modelos de riesgos proporcionales de Cox, también multivariantes.

En ambos casos se llevó a cabo una selección de variables, con el propósito de identificar las variables independientes y ajustadas a las covariables clínicas relevantes. Todos estos análisis se realizaron con el paquete “*rms*” [289, 290] versión 4.3-1 <http://CRAN.R-project.org/package='rms'>) del entorno de programación estadístico R. El paquete estadístico “*rms*” de R, ofrece un método jerárquico parsimonioso basado en la regresión logística o de Cox que es capaz de incluir a aquellos AAT que aporten la mayor información posible para la utilización de nuestro panel y es habitualmente utilizado en la literatura científica [222, 258, 259]. La selección de variables siguió la metodología llamada “*backwards step-down*”. Como cualquier otro método jerárquico-parsimonioso, dicha selección siguió la metodología por pasos que comienza con todas las variables candidatas incluidas en el modelo y que son sucesivamente eliminadas hasta que el modelo alcanza un criterio de convergencia establecido. Como criterio de convergencia se estableció el llamado Criterio de Información de Akaike (AIC).

Se prefirió la selección de variables por *stepwise* de variables al uso directo de la regresión multivariante, ya que el análisis de un gran número de variables (10-15 en nuestro caso) hace que cada una pierda valor. También se prefirió el *stepwise* a la selección de variables por su significación en el análisis univariante, ya que conduce a la pérdida de información al no tener en cuenta la posible interacción entre variables. La selección por *stepwise* ha sido ampliamente utilizada en múltiples estudios para la selección de variables no redundantes e independientes [222, 291].

Con las variables seleccionadas, ajustamos una regresión multivariante logística o de Cox (según la naturaleza de los datos) para conocer qué parámetros eran linealmente independientes utilizando la función GLM y LRM del paquete “*rms*” para R [281]. Los análisis multivariantes proporcionan información sobre como los AATs se comportan entre ellos y respecto a otras variables clinicopatológicas recogidas (edad, sexo, estadio y localización del tumor primario). Ya anteriormente, este tipo de análisis se han utilizado en estudios para determinar el pronóstico de otros cánceres [258].

En el caso de la regresión logística, se construyeron curvas ROC para representar el poder predictivo de la combinación lineal descrita por la regresión logística. En el caso de los modelos de Cox, asignamos como estado favorable para cada AAT aquél que se asociaba a un mayor período libre de enfermedad o supervivencia global. El estado favorable se correspondía cuando el suero era reactivo en aquellos AAT con $HR < 1$ y no reactivo en aquellos AAT con $HR > 1$. Mediante varias iteraciones agrupamos los pacientes en diferentes grupos de riesgo según el número de AAT que estuviesen en su estado favorable, observando las curvas de Kaplan-Meier resultantes de la combinación de AAT. Para comparar las diferencias de supervivencia entre diferentes grupos de riesgo se utilizó la prueba log-rank computada utilizando el procedimiento *lifetest* del paquete estadístico SAS.

Posteriormente, se aplicó un método de remuestreo (*bootstrap*) con el fin de llevar a cabo una validación interna y no sesgada del modelo seleccionado [292]. Brevemente, se generaron 500 pseudo-muestras a partir de la cohorte original de pacientes y, en cada una de ellas, se realizó una selección y una validación consistente en determinar el llamado grado de optimismo: diferencia entre el grado de ajuste del modelo obtenido con la pseudo-muestra en la propia pseudo-muestra y este mismo modelo aplicado al *training dataset* (o muestras originales). De esta forma, con el grado de optimismo medio (o error de generalización) obtenido con todas las 500 pseudo-muestras, se pudieron obtener estimadores corregidos (AUC corregido en las regresiones logísticas y C-index en los modelos de Cox). El C-index mide la capacidad de ajuste de una regresión de Cox al estimar la probabilidad de que para un par de pacientes aleatorios, aquél que tenga mayor probabilidad de una mayor supervivencia, efectivamente sobrevivirá durante más tiempo [292]. Estos estimadores corregidos penalizan el “sobreajuste” que se produce en el *training dataset*, por lo que se consideran estimadores más honestos que los estimadores sin corregir [293] y confirman que los resultados son generalizables.

Esta metodología de validación ha sido extensivamente utilizada en la literatura científica para la selección de variables no redundantes e independientes [222, 258]. La validación interna se realizó mediante un remuestreo por *bootstrapping*. La validación por *bootstrapping* consiste en tomar un gran número de muestras con el reemplazo de la muestra original. Proporciona estimaciones casi imparciales de exactitud de predicción cuya varianza es baja respecto al resto de validaciones, y utiliza todo el conjunto de datos para el desarrollo del modelo [289]. Esto justifica su superioridad y consecuente utilización en este trabajo.

Otros dos métodos también comunes de validación interna son: la división de datos y la validación cruzada. La división de datos es un método simple, sin embargo no se considera una validación del modelo final [289]. En concreto, supone una pérdida de pacientes en la modelización implicando una pérdida de potencia estadística y la estabilidad del modelo. La validación cruzada es una división de datos repetidos. Tiene la ventaja de que el training set es mayor y no se basa en una fracción de muestra. Sin embargo, la validación

cruzada suele producir estimaciones de la exactitud de predicción con una alta varianza, reduciendo su eficacia.

Resultados

IF WE SCREAM AND SHOUT TILL WE WORK IT OUT?, CAN WE JUST WORK IT OUT?

SCREAM AND SHOUT TILL WE WORK IT OUT? TILL WE WORK IT OUT, TILL WE WORK IT OUT

AFTERLIFE – ARCADE FIRE

I. Producción de antígenos recombinantes, efecto de la expresión y pureza

Con objeto de disponer de suficiente cantidad y calidad de los autoantígenos asociados a tumor para el desarrollo de los experimentos de la Tesis Doctoral, se optimizó la producción recombinante de los AAT previamente descritos en nuestro laboratorio [182, 215, 237] en *E. coli* y/o células de insecto Sf9, además de incorporar nuevos AAT como IRAK4 o PRKD2.

I.1. Expresión heteróloga en *E. coli*

Usando la cepa BL21 DE3 pLysS de *E. coli* se optimizó la expresión heteróloga de los antígenos humanos: p53, STK4, MAPKAPK3, GTF2B, HCK, GTF2B, PAK1, EDIL3, PRKCH, AKT1, PRKD2 (fragmento), IRAK4, ACVR2B, SRC y PIM1; y su purificación mediante cromatografía de afinidad (IMAC) de las AAT en forma soluble.

Los niveles de expresión variaron de un AAT a otro, así como sus condiciones de expresión y rendimiento por litro de cultivo (Tabla 7). Con el objetivo de obtener las proteínas en estructura nativa, soluble y libre de degradación, fue necesario inducir la expresión en frío (16°C durante 48h) de muchas de ellas, como SRC y PRKCH. La mayoría de los antígenos fueron producidos con un rendimiento entre los 1,5 y 3 mg de proteína por litro de cultivo con una pureza superior al 95%. La integridad y pureza de los AAT se confirmó mediante SDS-PAGE teñido con Azul de Coomassie coloidal. Todas las proteínas migraron según su masa molecular. Todas las bandas se correspondieron con los AAT clonados tras su análisis mediante huella peptídica.

Tabla 7: Rendimiento de la expresión y características de las proteínas producidas en la cepa BL21 DE3 pLysS de *E. coli*.

AAT	MM* (Da)	Temperatura de inducción (°C)	Tiempo de inducción (h)	Tag y localización*	Rendimiento por litro de cultivo (µg)
ACVR2B	57724	16	48	Ct-GST	60
AKT1	55686	16	48	Ct-His	48
EDIL3	53765	16	48	Nt-His	400
GTF2B	34833	37	4	Nt-His	525
GST	25499	37	4	Ct-His	7254
HCK	59600	37	4	Nt-His	2200
IRAK4	51530	37	4	Nt-His	2625
MAPKAPK3	42987	16	48	Ct-His	840
STK4	55630	30	24	Ct-His	1200
PAK1	60647	30	24	Ct-His	1520
PIM1	35686	37	4	Nt-His	21600
PRKCH	77828	16	24	Ct-His	280
PRKD2	96750 ⁺	37	4	Ct-His	1400
SRC	59835	16	48	Nt-His	60

*MM: Masa molecular; Nt, Posición del tag en el N-terminal; Ct, Posición del tag en el C-terminal. ⁺PRKD2 se expresó como un fragmento de 32 kDa y no en *full length*.

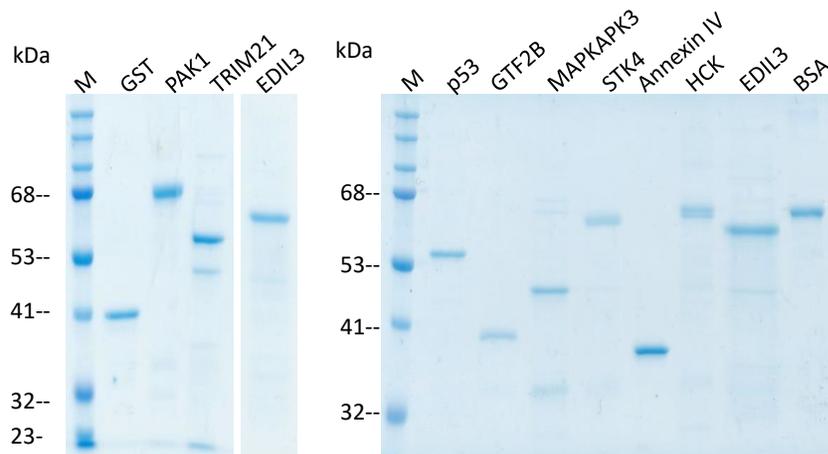


Figura 10: Pureza e integridad de los AAT utilizados. Proteínas recombinantes usadas en ELISA. Una vez expresadas y purificadas, se cargó 1µg en geles SDS-PAGE teñido con Coomassie coloidal para comprobar su integridad y pureza. M, marcadores de masa molecular conocida.

1.2. Selección del sistema de expresión de los AAT (*E. coli* y Sf9) por su capacidad predictiva

La expresión en *E. coli* presenta una serie de inconvenientes, como la ausencia de modificaciones post-traduccionales, la expresión en un citosol reductor (que impide la formación de puentes disulfuro) junto con otros componentes que dificultan la purificación. Dado que el plegamiento de los AAT podría afectar al reconocimiento por parte de los autoanticuerpos en la sangre de los pacientes, nos planteamos si la expresión en células Sf9 infectadas con baculovirus podría mejorar los resultados obtenidos con los AAT expresados en *E. coli*. Las células Sf9 permiten la formación de puentes disulfuro y glicosilar los AAT recombinantes, recuperando las proteínas en forma más nativa.

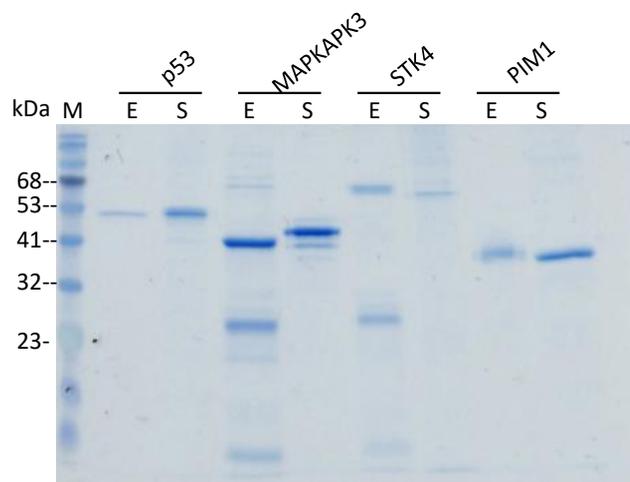


Figura 11: Comparación de las proteínas recombinantes expresadas en *E. coli* (E) o Sf9 (S).

Para verificar esta hipótesis, se expresaron los AAT p53, MAPKAPK3, STK4 y PIM1 en células Sf9. Comparamos su pureza e integridad con los antígenos expresados en *E. coli* mediante SDS-PAGE. Observamos que había pequeñas diferencias en la distancia migrada, que podrían achacarse a modificaciones post-traduccionales (Figura 11).

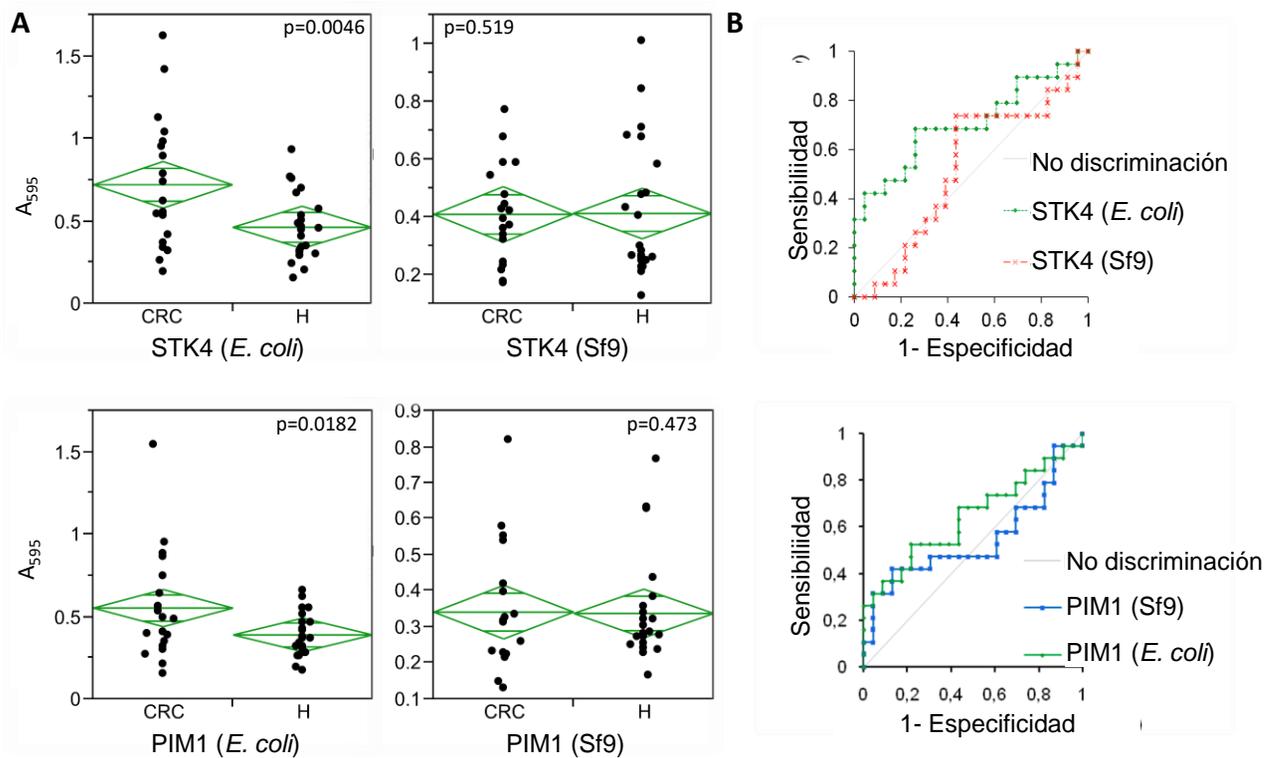


Figura 12: Comparación del valor diagnóstico de las proteínas expresadas en Sf9 y *E. coli*. A. Comparación de los valores de absorbancia en pacientes sanos (H) y con cáncer colorrectal (CRC). B. Curvas ROC derivadas de los datos de absorbancia. A_{595} : Absorbancia a 595 nm en unidades arbitrarias.

Una vez comprobada la integridad, pureza y concentración de los diferentes AAT, se comparó la capacidad de discriminación de sueros positivos (enfermos de CCR) y negativos (pacientes sanos) mediante ELISA. Los ensayos se realizaron sobre la cohorte de optimización con 42 pacientes (19 CCR y 23 sanos). En STK4 y PIM1 se apreció una disminución de la reactividad cuando los AAT se expresaban en Sf9 en comparación con *E. coli*, dando lugar a una pérdida de sensibilidad y una identificación deficiente de los pacientes tumorales (Figura 12A). La pérdida en p53 fue algo más moderada. En términos estadísticos, observamos una importante disminución de la significación para STK4, pasando de un valor de p de 0,0046 a 0,519 (Tabla 8). Se obtuvieron resultados similares para MAPKAPK3 y PIM1 (Tabla 8). También, la capacidad diagnóstica de los AAT producidos en Sf9 se veía seriamente afectada, ya que sus curvas ROC siempre eran menores que para los AAT expresados en *E. coli* (Figura 12B). Solo la versión de p53 expresada en Sf9 fue capaz de retener la significación de la expresión en *E. coli* cuyo valor de p pasó de 0,01 a 0,02 (Tabla 8).

En la mayoría de AAT testados observamos mejores resultados en términos de sensibilidad cuando eran expresados en *E. coli* (Figura 12). Además, observamos que la pureza de las proteínas es muy relevante en la detección de autoanticuerpos ya que la presencia de impurezas detectables mediante SDS-PAGE empeoró las diferencias entre pacientes sanos y cancerosos (datos no mostrados).

Tabla 8: Diferencias entre la detección de autoanticuerpos según la plataforma de expresión de los AAT.

AAT	Expresión	Sano (media \pm DT*)	CCR (media \pm DT*)	T-Student (p)	ROC (AUC)
p53	<i>E. coli</i>	0,21 \pm 0,05	0,55 \pm 0,60	0,01	0,82
	Sf9	0,34 \pm 0,11	0,68 \pm 0,69	0,02	0,67
MAPKAPK3	<i>E. coli</i>	0,58 \pm 0,21	0,82 \pm 0,49	0,04	0,79
	Sf9	0,37 \pm 0,21	0,76 \pm 0,88	0,05	0,53
STK4	<i>E. coli</i>	0,46 \pm 0,20	0,72 \pm 0,40	0,00	0,70
	Sf9	0,41 \pm 0,23	0,41 \pm 0,17	0,52	0,54
PIM1	<i>E. coli</i>	0,39 \pm 0,13	0,55 \pm 0,33	0,02	0,69
	Sf9	0,34 \pm 0,15	0,34 \pm 0,18	0,47	0,52

*DT, Desviación Típica

En conjunto los resultados obtenidos justificaron que los estudios realizados durante esta Tesis Doctoral se realizasen empleando antígenos recombinantes expresados en bacteria.

2. Respuesta humoral en modelos murinos basados en AOM y DSS

2.1. El modelo murino de carcinogénesis asociada a colitis ulcerosa reproduce las características histopatológicas del CCR humano

Ante la inexistencia de modelos animales para el estudio de la respuesta humoral frente al cáncer colorrectal, y con el fin de estudiar los niveles de autoanticuerpos durante la progresión del tumor sin la heterogeneidad habitual en humanos, se indujo carcinogénesis química en 16 ratones y lo comparamos con 16 ratones control siguiendo el protocolo basado en la combinación de AOM y DSS.

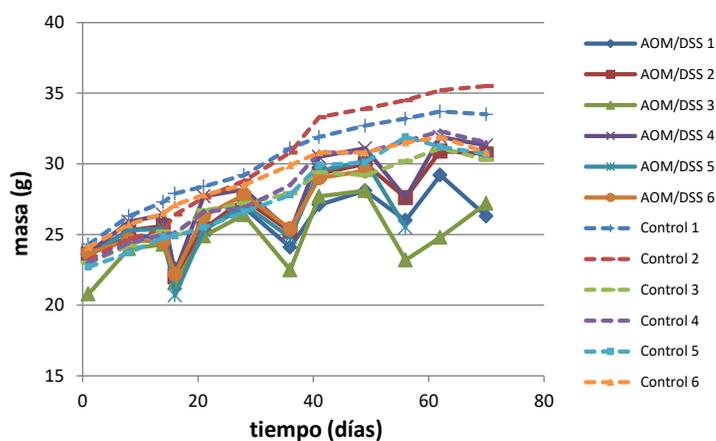


Figura 13: Evolución del peso de los ratones a lo largo del tratamiento con AOM/DSS. Se detalla el peso a los tiempos indicados de los ratones AOM/DSS y ratones control. Los ratones tratados con AOM/DSS perdían peso significativamente y presentaban sintomatología de colitis ulcerosa tras cada ciclo de DSS.

El protocolo completo tiene una duración de 63 días después de la inyección i.p. de AOM. Durante el protocolo, los ratones perdieron peso significativamente después de cada ciclo de DSS. Además, comprobamos la existencia de una sintomatología típica de colitis ulcerosa después de cada ciclo, concretamente, heces sanguinolentas y de consistencia viscosa. En la última semana de experimento, muchos

ratones presentaron un prolapso rectal debido al tamaño del tumor, lo que supuso el punto final del experimento (Figura 13).

Todos los ratones tratados con AOM y DSS desarrollaron tumores polipoides profundamente irrigados que ocluían el colon distal (Figura 14). Dichos tumores fueron resecados y se analizaron histológicamente tras su inclusión en parafina y tinción con hematoxilina y eosina. Se comprobó que los tumores eran adenocarcinomas enteroides bien diferenciados, que presentaban un frente de avance que invadía la capa muscular. También se observaba alta infiltración de células inflamatorias, así como ulceración de la superficie luminal (Figura 14). Este tipo de adenocarcinoma era similar al observado en pacientes con colitis ulcerosa y cáncer de colon. Adicionalmente, examinamos macroscópicamente y microscópicamente hígado, pulmón y peritoneo de cada ratón tratado en busca de metástasis sin ser encontradas.

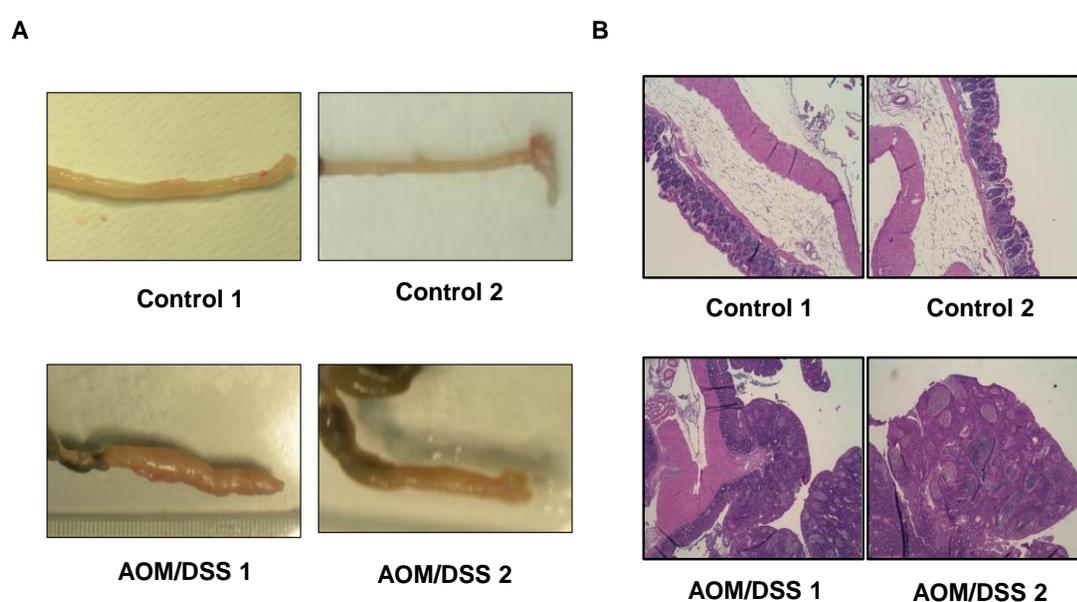


Figura 14: Inducción química de tumores en el colon de ratones FVB/N tratados con AOM/DSS y control. A. Imágenes macroscópicas del colon y recto de ratones significativos. B. Hematoxilina y eosina de la mucosa distal de colon en los mismos ratones con detalle de las lesiones tumorales en los ratones tratados respecto de los controles (detalle a 200x).

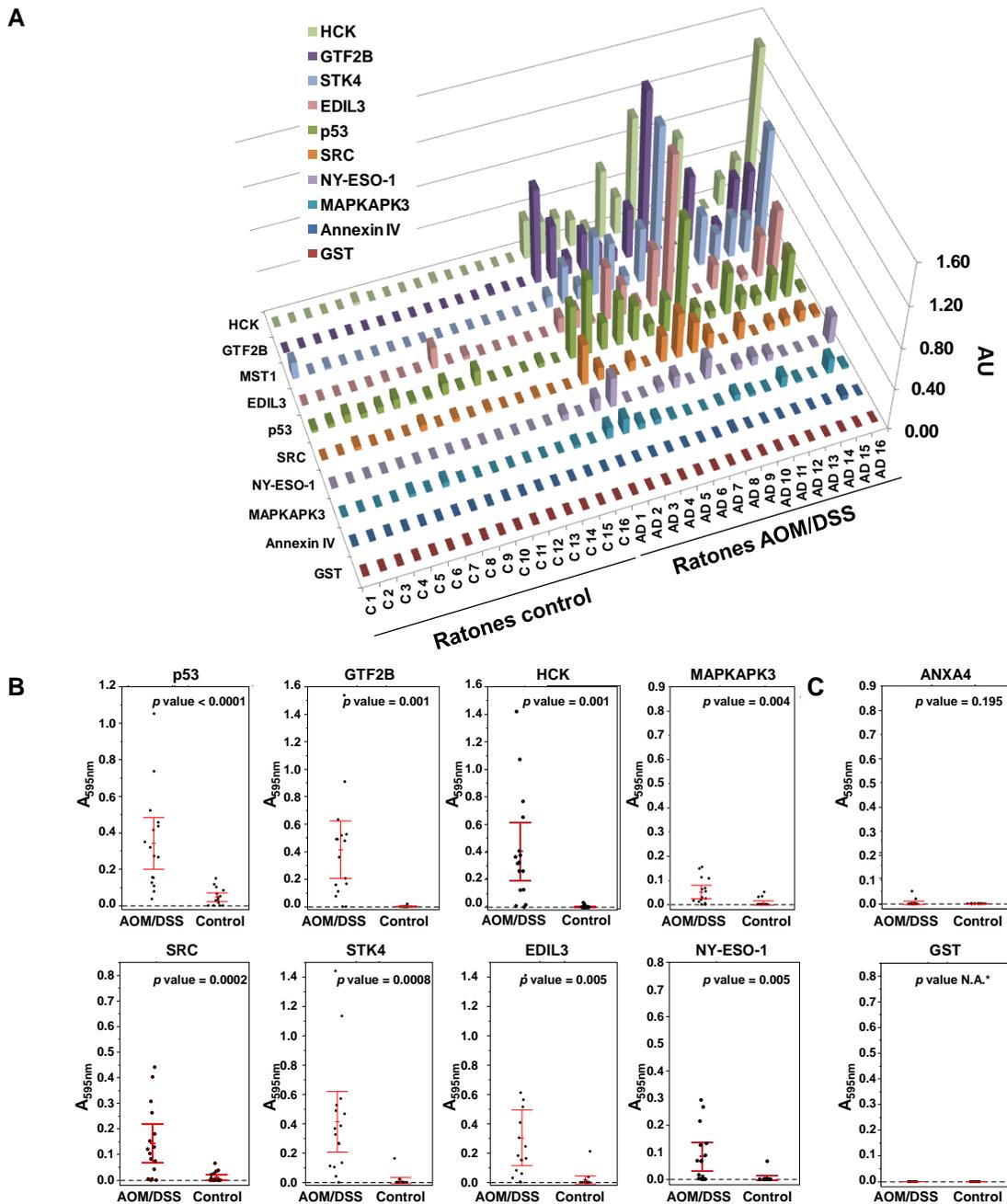
2.2. El modelo AOM/DSS produce autoanticuerpos específicos de CCR

Dado que las características histopatológicas de los tumores provocados por el tratamiento con AOM/DSS fueron similares al cáncer colorrectal en humanos, quisimos estudiar si este modelo animal desarrollaba una respuesta humoral hacia los AATs identificados en pacientes afectados de CCR en trabajos anteriores [237].

Tabla 9: Identidad de secuencia entre los AAT humanos y sus ortólogos murinos.

AAT	Identidad (%)	Similitud (%)
p53	76	83
STK4	97	98
EDIL3	95	97
GTF2B	99	100
MAPKAPK3	94	96
SRC	98	98
Anexina IV	91	96

Primero, se comprobó la identidad y similitud de secuencia entre los AAT humanos y murinos. Observamos que la estructura primaria de los AATs estaba altamente conservada entre ortólogos (Tabla 9), lo que nos permitió cuantificar la reactividad humoral en los ratones mediante ELISA utilizando los AAT recombinantes de origen humano. Así, estudiamos la existencia de autoanticuerpos frente a p53, STK4, MAPKAPK3, SRC, GTF2B, HCK y EDIL3 en 16 ratones tratados y 16 ratones control utilizando 0,3 μ g de proteína humana recombinante por pocillo (Figura 15). También se estudió NY-ESO-1 como control, pues a pesar de ser un antígeno descrito como alterado en CCR y diana de autoanticuerpos en pacientes [210], no presenta ortólogo en ratones.



Todos los ratones presentaron autoanticuerpos específicos hacia los antígenos: p53, STK4, MAPKAPK3, SRC, GTF2B, HCK y EDIL3 con valores estadísticamente significativos ($p < 0,0001$; $= 0,0008$; $= 0,005$; $= 0,001$; $= 0,006$; $= 0,003$; respectivamente) al finalizar el protocolo. Los niveles de autoanticuerpos detectados diferían entre antígenos, siendo GTF2B y STK4 los más reactivos, aunque todos los ratones tratados presentaron niveles de autoanticuerpos superiores a los ratones control (Figura 15).

GST y Anexina IV se incluyeron como control de reactividad inespecífica, ya que GST es una proteína ajena producida bajo los mismos procesos que el resto de AAT; Anexina IV es una proteína sobreexpresada en tejidos tumorales que no induce respuesta humoral alguna. No se observó reactividad específica frente a estas dos proteínas, comprobando la especificidad de la respuesta frente al resto de antígenos. El valor de p para GST no pudo ser determinado ya que la densidad óptica para ambos grupos era indistinguible del fondo, mientras que el de Anexina IV no fue significativo ($p = 0,195$). Por lo tanto, los ratones también reproducen la falta de respuesta a Anexina IV observada en pacientes humanos con CCR [182]. El perfil de reactividad, tanto en la identidad de los antígenos como en la cantidad de niveles de autoanticuerpos era muy similar al perfil previamente observado en pacientes con CCR. Además, NY-ESO-1, un antígeno descrito en humanos, que no presenta ortólogo en ratones, apenas indujo una respuesta inmune en los ratones tratados en comparación con el resto de los AAT, como era lo esperado. Por tanto, el protocolo AOM/DSS reproduce el modelo de autoinmunidad asociada a CCR.

2.3. Alteraciones moleculares en el modelo AOM/DSS

Al reproducirse la respuesta humoral en nuestro modelo murino, decidimos estudiar las alteraciones moleculares que conducen a la generación de autoanticuerpos frente a los AAT. A partir de muestras de tejido tomadas del colon distal de ratones tratados con AOM/DSS y ratones control analizamos los niveles de expresión de mRNA y proteína mediante RT-PCR semicuantitativa y *western blot*, respectivamente. Mediante densitometría cuantificamos los cambios de expresión proteica (Figura 16).

Observamos que p53, MAPKAPK3 y EDIL3 presentan una sobreexpresión de mRNA en el tumor. Paralelamente, también estos antígenos están sobreexpresados más de 5 veces en el tumor. En sentido contrario, la expresión de SRC se reprimió tanto a nivel de mensajero como a nivel de proteína en el tejido afectado. Estos datos demuestran una correlación entre niveles de mRNA y proteína en los AAT. Sin embargo, los antígenos GTF2B y STK4 no mostraron alteraciones significativas en los niveles de expresión de proteína ni de mRNA, por lo que no podemos excluir otros mecanismos que induzcan la generación de autoanticuerpos (mutaciones, alteración conformacional o modificaciones post-traduccionales alteradas...).

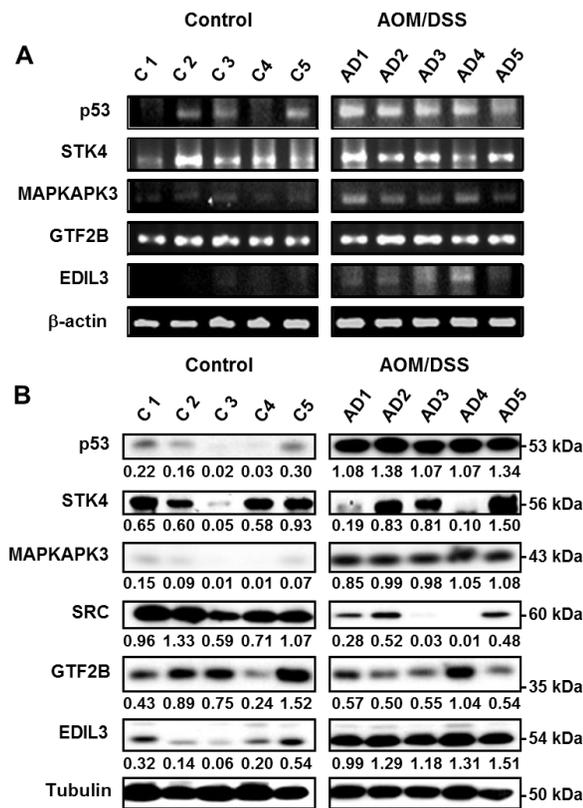


Figura 16: Diferencias de expresión de los AAT a nivel de mRNA y proteína en tumores asociados a colitis ulcerosa en comparación con ratones control sin lesión. A. PCR semi-cuantitativa. β -actina se utiliza como control de carga. B. *Western blot*. Tubulina se utiliza como control de carga. Ratones AD: ratones tratados con AOM/DSS, Ratones C: ratones control.

2.4. Los niveles de autoanticuerpos aumentan con la progresión tumoral.

Para seguir la progresión tumoral del modelo murino, realizamos tinciones histológicas del colon distal de ratones tratados a diferentes tiempos de la carcinogénesis (Figura 17).

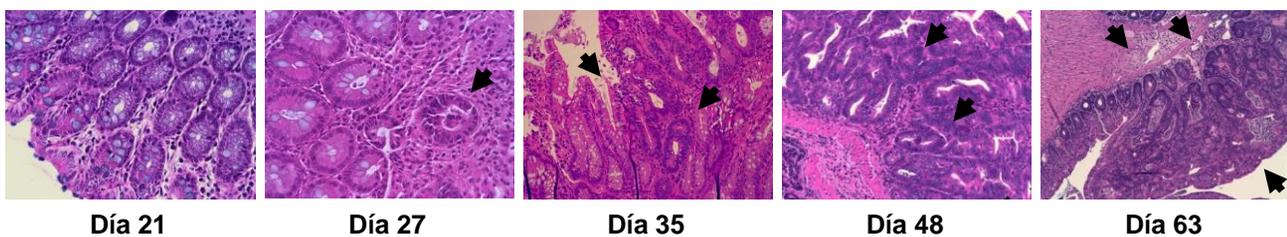


Figura 17: Progresión tumoral de las lesiones localizadas en el colon distal de ratones FVB/N. Tinciones histológicas de la mucosa de colon de ratones tratados con AOM y DSS y sacrificados a los tiempos indicados. Las lesiones adenomatosas están marcadas con flechas negras (detalle a 200x).

Después del primer ciclo de DSS y recuperación de peso (día 21) no observamos el desarrollo de adenomas o lesiones neoplásicas, aunque sí observamos mitosis activas. En el día 27, previo a la administración del segundo ciclo de DSS, observamos el desarrollo de pequeños adenomas (Figura 17), con focos de microinfiltración linfocitaria y diferentes niveles de inflamación, así como displasia focal leve. Durante el segundo ciclo, entre los días 35 y 48, observamos infiltración linfocitaria en los tumores, que encontramos en forma de adenomas diferenciados con alto grado de displasia y que progresaron a adenocarcinomas bien diferenciados al final del periodo de descanso. Finalmente, después del tercer ciclo de DSS, a día 63, los

adenocarcinomas habían progresado hasta invadir la pared muscular. Macroscópicamente, su tamaño alcanzaba los 8 mm (Figura 14A).

A continuación, estudiamos la cinética de producción de autoanticuerpos y su correlación con la progresión tumoral mediante ELISA indirecto (Figura 18). La rápida progresión del protocolo basado en AOM/DSS nos permite estudiar la cinética de autoanticuerpos con 4 puntos temporales y una alta homogeneidad del modelo.

Observamos que en el modelo AOM/DSS, los autoanticuerpos frente a STK4, p53, GTF2B y EDIL3 presentaron una evolución creciente paralela a la evolución del tumor desde el día 21 al 63 (Figura 18). Los autoanticuerpos frente a p53 aparecieron de manera más temprana, detectables ya a día 21 cuando solo se observan mitosis alteradas. Los autoanticuerpos frente a EDIL3 se produjeron de manera más tardía, ya que en un 75% de los casos no pudimos detectar autoanticuerpos hasta el día 42, cuando encontramos adenomas claramente diferenciados con alto grado de displasia y adenocarcinomas (Figura 18). Los autoanticuerpos frente a GTF2B y STK4 mostraron una aparición más heterogénea (Figura 18).

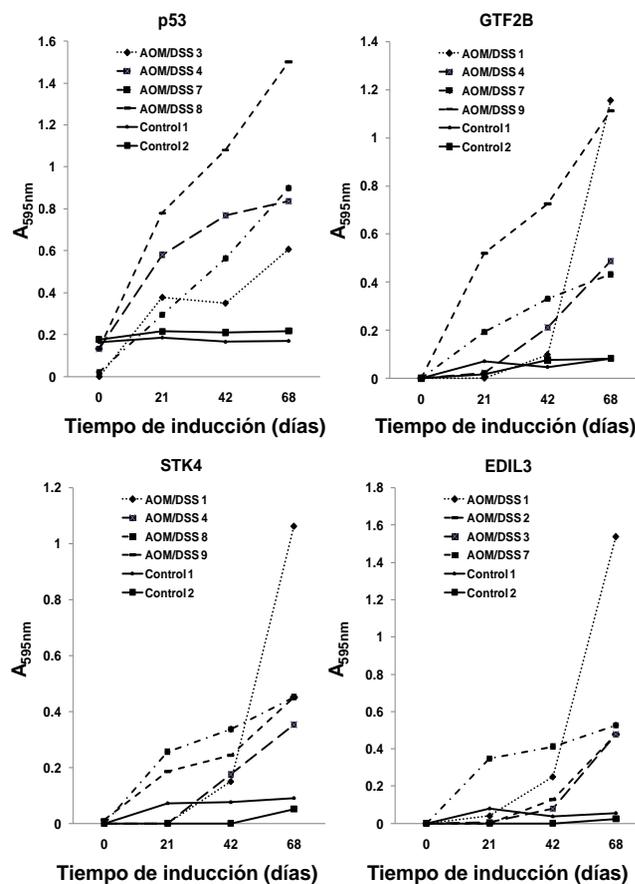


Figura 18: Cinética de los niveles de autoanticuerpos a lo largo del tratamiento con AOM/DSS. El nivel de autoanticuerpos frente a p53, GTF2B, STK4 y EDIL3 se estudió a lo largo del protocolo de inducción del cáncer colorrectal en ratones FVB/N. Los anticuerpos frente a estos AAT revelaron un aumento paralelo a la progresión tumoral.

En conjunto, observamos que los ratones presentaban niveles detectables y significativos de autoanticuerpos antes de la infiltración del adenoma hacia la pared muscular (lo que en humanos equivaldría a un estadio I; T₂,N₀,M₀). También, observamos que los ratones que desarrollaron adenocarcinomas presentaron mayores niveles de autoanticuerpos que aquellos ratones que solo desarrollaron adenomas. Estos resultados indican

que la producción de autoanticuerpos tiene lugar antes de las manifestaciones histopatológicas malignas y aumentan en paralelo a la progresión de la enfermedad. La respuesta humoral frente a GTF2B y p53 precede a los síntomas clínicos, confirmando su utilidad para el diagnóstico temprano del CCR.

2.5. Los autoanticuerpos son detectables antes de observar lesiones neoplásicas.

Decidimos comprobar la utilidad temprana de la respuesta inmune; para ello utilizamos suero recogido a 21 días del tratamiento con AOM, cuando todavía no se habían manifestado lesiones neoplásicas malignas relevantes. Obtener muestras previas al diagnóstico en ratones, permite realizar este tipo de estudios sobre la utilidad temprana de los biomarcadores, algo complejo en humanos.

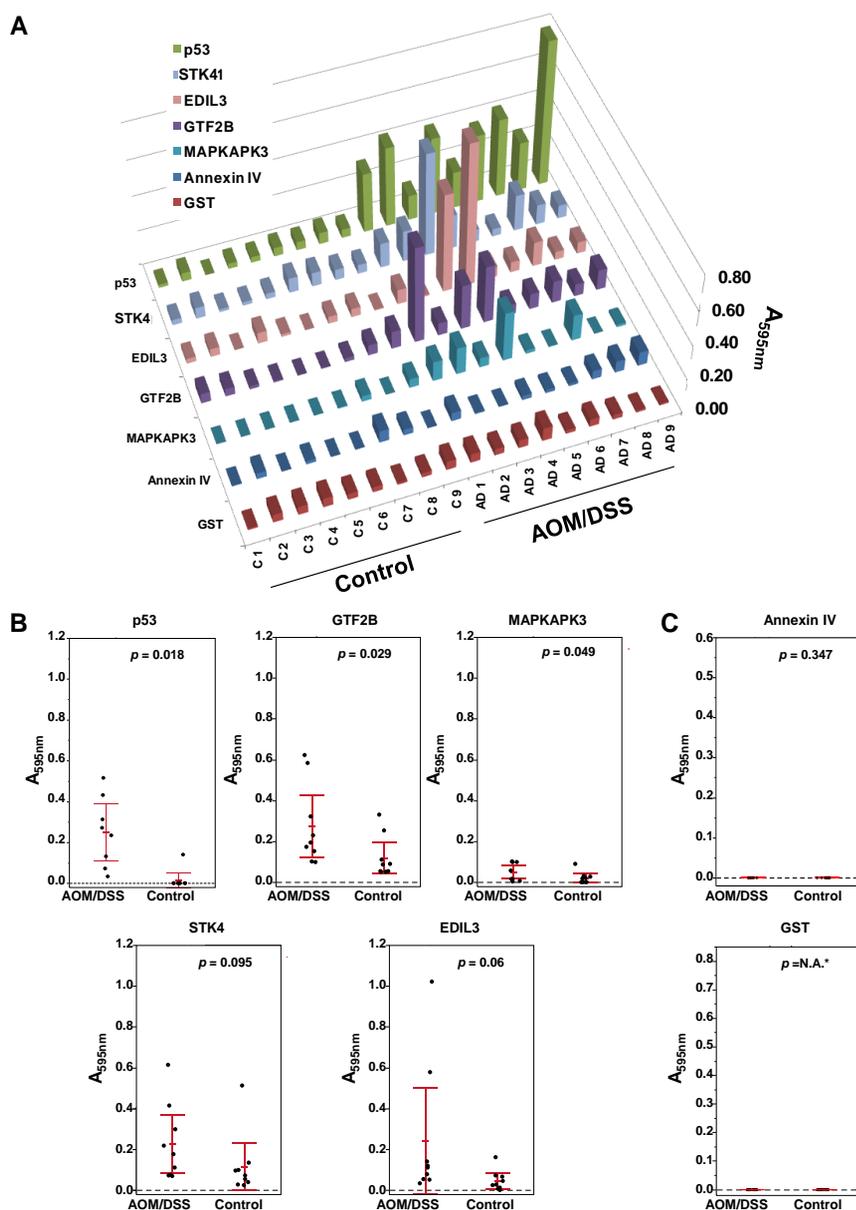


Figura 19: Niveles de autoanticuerpos antes de que la manifestación histológica sea evidente (21 días). A. Representación de los niveles de autoanticuerpos para cada ratón y cada AAT. B. Los gráficos de dispersión indican con puntos la reactividad de cada suero. La media de la DO de cada grupo está representada por una línea roja horizontal cuyas barras de error representan su estimación al 95% de confianza. C. Reactividad frente a las proteínas control.

Comprobamos la significación estadística de cada AAT comparando 9 ratones tratados con AOM y un ciclo de DSS respecto a 9 ratones control (Figura 19). A día 21 de tratamiento, p53 y GTF2B presentaron los mayores niveles de autoanticuerpos y fueron capaces de diferenciar entre ratones tratados y control. Existía una clara diferencia entre ratones tratados (valor medio de ELISA: 0,24 y 0,22, respectivamente) y ratones no tratados (media: 0,02 y 0,09, respectivamente) ($p=0,018$ y $0,029$, respectivamente) (Figura 19). Los niveles de autoanticuerpos frente a STK4, MAPKAPK3 y EDIL3 también resultaron significativamente distintos de los controles, aunque su respuesta fue más heterogénea. Ni Anexina IV ni GST mostraron valores de densidad óptica apreciables (Figura 19).

Comparando el análisis histopatológico con la presencia de autoanticuerpos para cada ratón, pudimos correlacionar la intensidad de la displasia y gravedad de las lesiones con los niveles de autoanticuerpos. Los niveles frente a GTF2B y p53 se anticipaban a la existencia de lesiones malignas, y eran capaces de detectar por si solos la manifestación clínica del tumor antes de que fuese visible o hubiese indicios de malignización.

2.6. Desarrollo de autoanticuerpos en modelos lentos de carcinogénesis a 9 semanas (AOM y DSS por separado)

El tratamiento con AOM/DSS producía tumores, inflamación colónica y autoanticuerpos en todos los ratones tratados. Así, para asociar de manera unívoca la presencia de lesiones tumorales con la presencia de autoanticuerpos, utilizamos modelos de ratón que no tienen una prevalencia de tumores del 100%, como son los modelos de ratón tratados solo con AOM y solo con DSS.

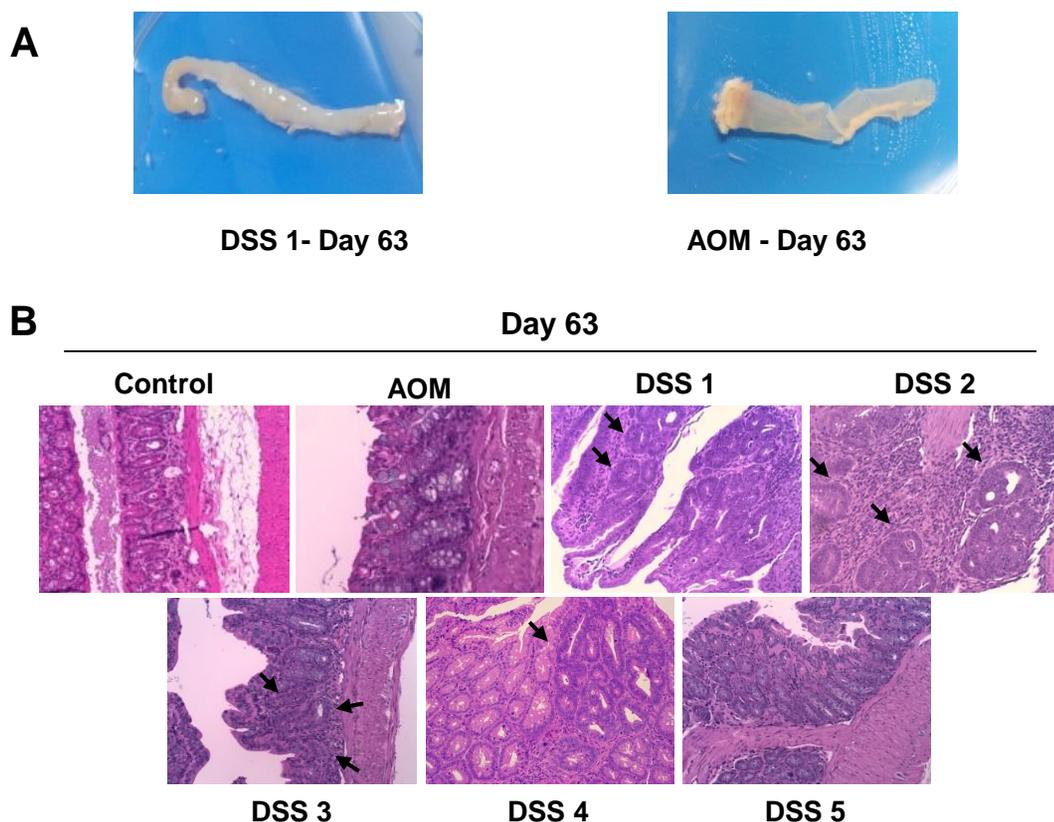


Figura 20: Secciones del colon representativas del colon distal a día 63 de tratamiento con AOM y DSS por separado. A. Imágenes macroscópicas. B. Imágenes microscópicas teñidas con hematoxilina y eosina donde se indican las lesiones malignas con flechas negras (Detalle a 200x).

Para ello, estudiamos dos series de ratones de tamaño medio ($n=8$ AOM y $n=5$ DSS) y evaluamos los cambios en tejido y autoanticuerpos a las 9 semanas de tratamiento. La serie piloto de DSS ($n=5$) permitió además estudiar la influencia de la inflamación en la generación de tumores y estimar su incidencia. La serie piloto de AOM ($n=8$) permitió también el estudio de la carcinogénesis sin el estímulo inflamatorio del DSS. Finalmente, ambos estudios tenían como objetivo adicional comparar el efecto y la velocidad de carcinogénesis de los dos modelos con el modelo de AOM/DSS a 63 días en la respuesta humoral frente a CCR y en los niveles de autoanticuerpos frente a los AAT.

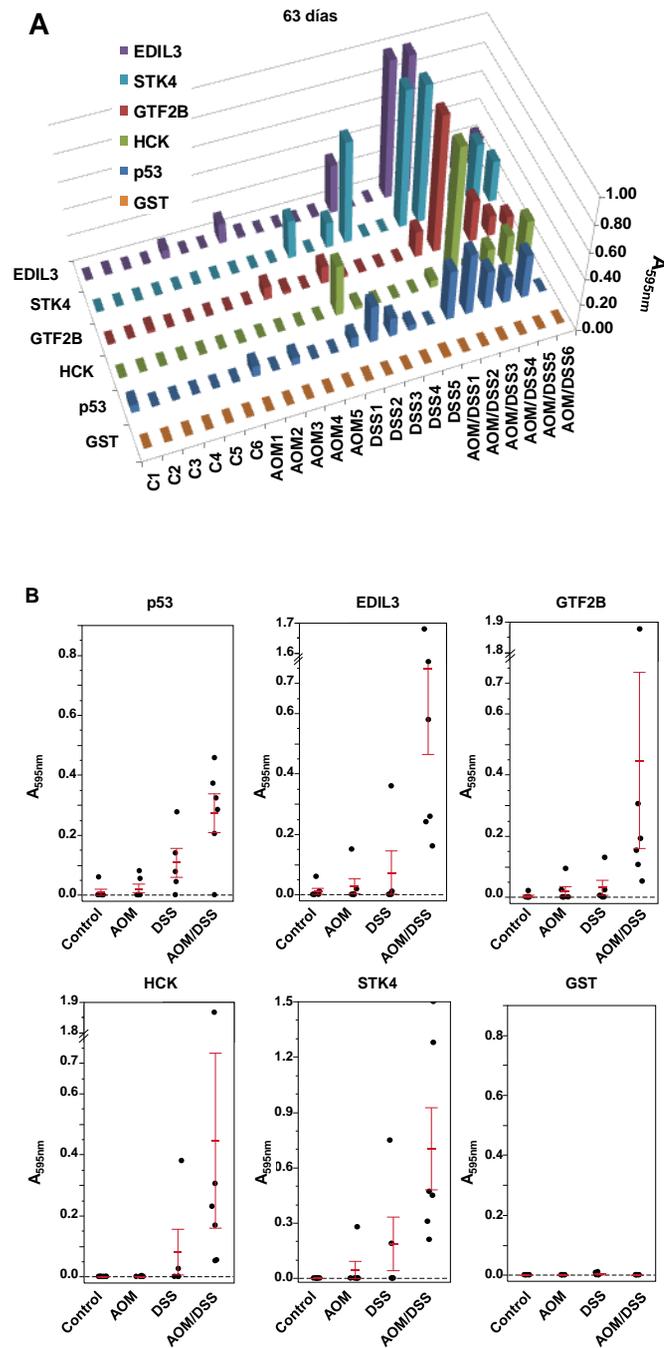


Figura 21: Niveles de autoanticuerpos a 63 días de tratamiento en los diferentes modelos murinos. Los gráficos de dispersión indican con puntos la reactividad de cada suero. La media de cada grupo está representada por una línea roja horizontal cuyas barras de error representan su estimación al 95% de confianza.

A los 63 días observamos que el colon de los 5 ratones DSS estaba visiblemente más inflamado, engrosado, blanquecino y acortado. Los ratones presentaron síntomas de colitis ulcerosa, aunque ninguno presentaba lesiones tumorales macroscópicamente observables. Al microscopio y mediante tinción histológica, tres de los cinco ratones (DSS1, DSS2 y DSS3) mostraron adenocarcinomas intramucosos. Un cuarto ratón (DSS4) presentó displasia de bajo grado, mientras que no se encontraron lesiones malignas en el quinto (Figura 20).

A día 63, el colon de 2 ratones tratados con AOM fue examinado macroscópicamente y microscópicamente sin encontrar lesiones, lo que indicaba que todavía no se habían producido alteraciones tumorales en el colon distal (Figura 20). Estos datos demuestran que la velocidad de la carcinogénesis de los modelos por separado es más lenta que la de los modelos basados en AOM/DSS. Posteriormente, procedimos a estudiar la respuesta humoral en cada modelo.

2.7. Respuesta humoral en los modelos AOM y DSS

Comprobamos los niveles de autoanticuerpos en el suero de los ratones a día 63 para comprobar las diferencias de la respuesta humoral en los modelos de carcinogénesis usando 5 ratones tratados con DSS y 8 con AOM. Determinamos los niveles de autoanticuerpos frente a p53, MST1/STK4, EDIL3, GTF2B y HCK, incluyendo GST como control y los comparamos con ratones AOM/DSS y control (Figura 21).

En la serie inicial de 8 ratones tratados con AOM ninguno desarrolló autoanticuerpos durante la semana 9, lo que correlaciona con la ausencia de lesiones neoplásicas en los animales. A día 63, los ratones tratados con DSS sufrían una colitis ulcerosa que ya se había cronificado y algunos de ellos presentaban autoanticuerpos frente a p53 o STK4. Comparativamente, los niveles de autoanticuerpos de los ratones DSS afectados eran más bajos que los niveles de AOM/DSS, lo que concuerda con una menor gravedad de las lesiones producidas en ese momento del tratamiento (Figura 21). La reactividad a día 63 solo fue relevante para aquellos animales que sufrían el avance de un tumor, inducido por DSS (adenoma con displasia en los ratones DSS1, DSS2 y DSS3) o AOM/DSS (adenocarcinoma). La reactividad frente a p53 fue proporcional al avance de las lesiones de los cinco ratones. El nivel de autoanticuerpos frente a p53 fue aumentando según la lesión era premaligna, displásica o adenomatosa.

Los ratones que no presentaron neoplasias (control, AOM, DSS 4 y DSS 5) a día 63 (Figura 20) mostraron ausencia de autoanticuerpos (Figura 21). Estos resultados demostraron la alta correlación entre las lesiones de cáncer de colon y la inducción de autoanticuerpos, independientemente de las causas de la tumorigénesis, y confirmaron el valor predictivo de la respuesta de autoanticuerpos para la detección del cáncer. Por tanto, el uso de protocolos basados en AOM y DSS por separado confirmó el valor predictivo temprano de los autoanticuerpos.

2.8. Carcinogénesis provocada por AOM a 250 días

Al no encontrar lesiones en la novena semana en los ratones tratados con AOM, se prolongó el experimento durante unas 26 semanas adicionales para observar el efecto del modelo de carcinogénesis lenta. En la semana 20 se examinó un ratón sin encontrar evidencias macroscópicas o microscópicas de cáncer o displasia en el colon distal. Finalmente, los 5 ratones restantes fueron necropsiados en el día 250 para

recoger muestras sanguíneas y de tejido y evaluar las lesiones y niveles de autoanticuerpos. Otros 5 ratones control de igual edad se utilizaron como control.

En el día 250, 4 ratones de un total de 5 mostraron adenomas macroscópicos tipo coliflor, encapsulados y profundamente irrigados en el colon distal (AOM1, AOM2, AOM3 y AOM5) (Figura 22). Al microscopio, las glándulas de estos ratones presentaban una alta degeneración en forma de patrón cribiforme, alta actividad mitótica e infiltración linfocitaria (Figura 22). En su colon se apreciaron zonas de alta densidad celular indicando una displasia de alto grado o grave. En estas zonas, las glándulas se degeneran y agregan formando un patrón cribiforme, perdiendo su luz y generando un espacio vacío alrededor (Figura 22).

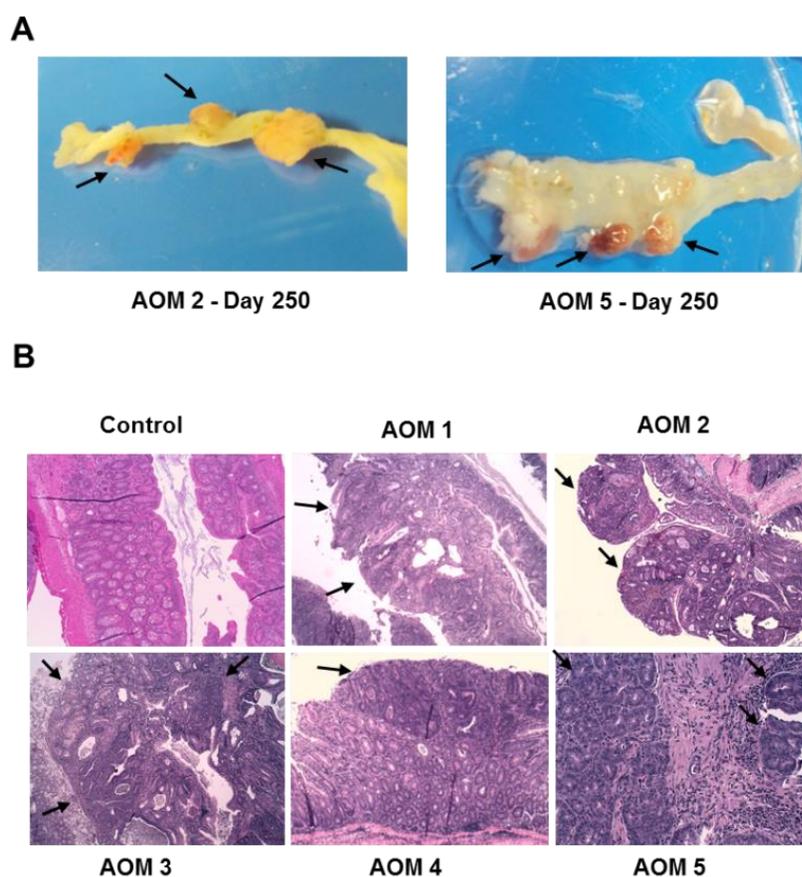


Figura 22: Imágenes representativas del colon distal a día 250 (semana 35) de tratamiento con AOM. A. Imagen macroscópica del colon distal de dos ratones tratados. B. Tinción histológica mediante hematoxilina y eosina donde se indican las lesiones neoplásicas malignas con flechas negras (200x). En el ratón AOM1, se observa una lesión cancerosa polipoide cuya unión con la mucosa se ve en el tercio superior de la fotografía. La lámina propia observada en el cuadrante superior derecho indica que se trata de una lesión no infiltrante. Los tumores en forma de coliflor de AOM2 y AOM3 alcanzan la muscularis propia, que corresponde a la zona eosinófila de la imagen.

Uno de los tumores observados en el ratón AOM5 había llegado a perforar la pared muscular, que el resto de ratones había mantenido intacta. Además de las lesiones malignizadas, la mucosa intestinal presentaba varios focos de tumor *in situ* (Tis) o carcinoma intra-mucoso, que son lesiones confinadas a la mucosa y no han penetrado la capa *muscularis mucosae*. En los ratones AOM2 y AOM3 se observan tumores en forma de coliflor que alcanzan la *muscularis propria*. Por ello, estos son tumores infiltrantes, más invasivos que los del ratón AOM1. Esta es la lesión más leve, que no llega a traspasar la *lamina propria*, que permaneció intacta. Desde arriba hacia abajo se observan la serosa, *muscularis propria*, submucosa, lamina muscular y lamina

propia (Figura 22). El ratón restante (AOM4) presentó adenomas con displasia que solo pudimos observar mediante tinción con hematoxilina y eosina (Figura 22). Sus células presentaban mitosis activas y proliferación en contraste con los ratones control, cuyos núcleos densamente teñidos indicaban que las células se encontraban en interfase, sin alteraciones tisulares observables.

2.9. Autoanticuerpos en ratones AOM y correlación con las lesiones histológicas

El análisis de autoanticuerpos en la semana 35 reveló altos niveles en los ratones AOM1, AOM2, AOM3 y AOM5 que presentaban adenocarcinomas. Los ratones presentaron absorbancias entre 0,20 y 0,60 frente a p53, EDIL3, GTF2B, HCK y STK4. La reactividad fue proporcional a la gravedad de las lesiones: Los adenocarcinomas infiltrantes presentes en los AOM2, AOM3 y AOM5 tuvieron los mayores niveles de autoanticuerpos, mientras que los tumores intramucosos del ratón AOM1 provocaron niveles inferiores de autoanticuerpos. Finalmente el ratón AOM4, con una lesión adenomatosa plana no cancerosa ni perceptible macroscópicamente, presentó niveles de autoanticuerpos similares a los de los ratones control ($Ab_{S_{595}} < 0,10$) (Figura 23).

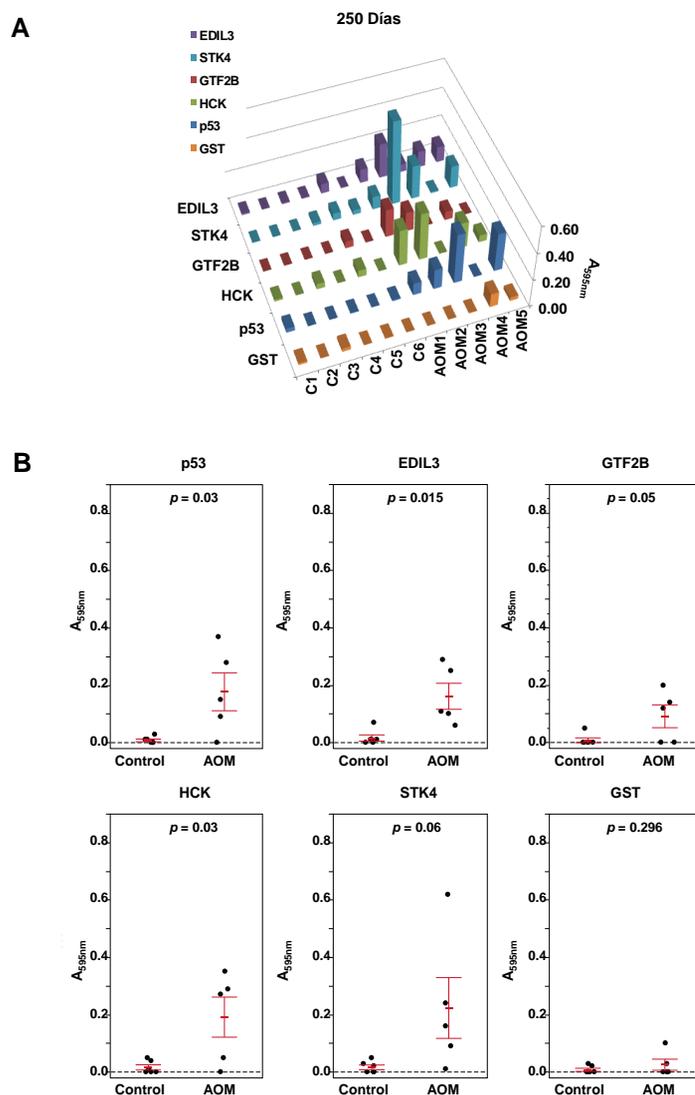


Figura 23: Niveles de autoanticuerpos a final del tratamiento con AOM. A. Representación de los niveles de autoanticuerpos de los ratones tratados con AOM frente a cada AAT. B. Los gráficos de dispersión indican con puntos la reactividad de cada suero. La media de cada grupo está representada por una línea roja horizontal cuyas barras de error representan su estimación al 95% de confianza.

Estos resultados demuestran que existe una respuesta humoral específica a la carcinogénesis que no solo depende de la inflamación. Los niveles de autoanticuerpos están relacionados de manera directa con la gravedad de las lesiones y la presencia celular inmune (infiltración linfocitaria), siendo de menor intensidad que en los ratones tratados con DSS.

2.10. Ampliación y confirmación del estudio en una cohorte mayor

A continuación, quisimos confirmar los datos anteriores con mayor número de ratones. Esto nos permite comparar la prevalencia de los tumores a largo plazo y analizar la dinámica de los autoanticuerpos con más muestras y puntos temporales. Para ello, estudiamos dos nuevas series de ratones (n=25 para AOM) (n=20 para DSS) a largo plazo (250 días). Dado que no todos los animales desarrollan CCR, se facilita el establecimiento de correlaciones entre la producción de autoanticuerpos y el desarrollo del cáncer de manera ciega y no sesgada, discriminándola de la inflamación en el colon.

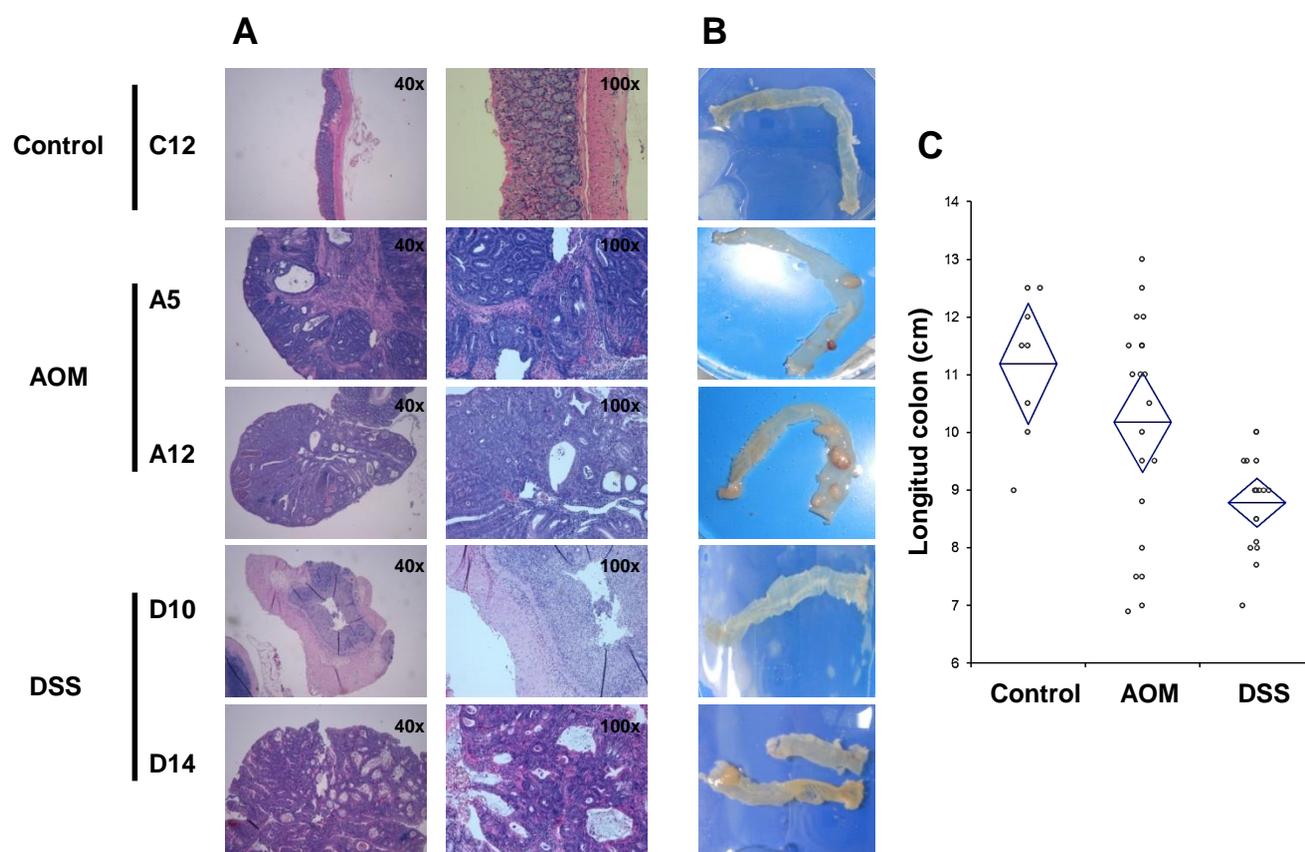


Figura 24: Efecto de los tratamientos AOM y DSS en el colon de ratones FVB/N. A. Imágenes histológicas de la mucosa de colon en los ratones indicados. B. Imágenes macroscópicas del colon y recto. C. Longitud media del colon como marcador de inflamación, el rombo representa su media y su desviación típica.

A los 250 días de tratamiento en ambos modelos pudimos observar diferentes efectos en el colon tanto a nivel microscópico como macroscópico (Figura 24A y B). Gracias a ampliar a 35 semanas el estudio de los ratones tratados con DSS, pudimos observar en ellos un colon intensamente inflamado y síntomas de colitis ulcerosa (heces sanguinolentas, pérdida de peso) hasta 20 semanas después del último ciclo, confirmando la cronificación de la inflamación observada en la cohorte inicial. La longitud del colon había disminuido más de 3 cm de media respecto al control y la mayoría de casos manifestaban una inflamación significativamente

mayor con un tamaño de colon por debajo de los 9 cm (Figura 24C). Pese a la inflamación, solo un 50% de los ratones presentaron neoplasias con distinto grado de evolución confirmados por inmunohistoquímica.

Confirmando los resultados anteriores, un 92% de los ratones tratados con AOM presentó entre 3 y 15 lesiones neoplásicas de histología diversa. Encontramos en este modelo una progresión heterogénea en el tiempo, ya que en la semana 15 e incluso en la semana 28 observamos tanto animales con múltiples adenocarcinomas con infiltración (hasta 9), como animales con lesiones leves (adenoma o displasia) (Figura 24A). Al igual que en la primera cohorte, los ratones tratados con AOM presentaron un patrón inflamatorio intenso similar a la EII a nivel microscópico alrededor de la mucosa lesionada. Del mismo modo, macroscópicamente no presentaron síntomas de inflamación colónica generalizada (Figura 24B), y la longitud media del colon era equiparable a la de ratones control y muy superior al modelo de colitis ulcerosa basado en DSS (Figura 24C).

Globalmente encontramos que el análisis histopatológico de las diferentes series de ratones no demostró diferencias entre los tratamientos AOM/DSS, AOM y DSS, confirmando los resultados anteriores. Este estudio nos permitió confirmar que la cinética de la carcinogénesis fue distinta para los diferentes modelos, así como los efectos producidos en el resto del colon por efecto de la inflamación.

2.10.1. Niveles de autoanticuerpos (semana 35) en los modelos de ratón AOM y DSS

A los 250 días de comenzar el tratamiento se determinaron los niveles de autoanticuerpos frente a p53, GTF2B, HCK, EDIL3, STK4, MAPKAPK3 y AKT1 de aquellos ratones que presentaron tumores en el análisis microscópico (Figura 25).

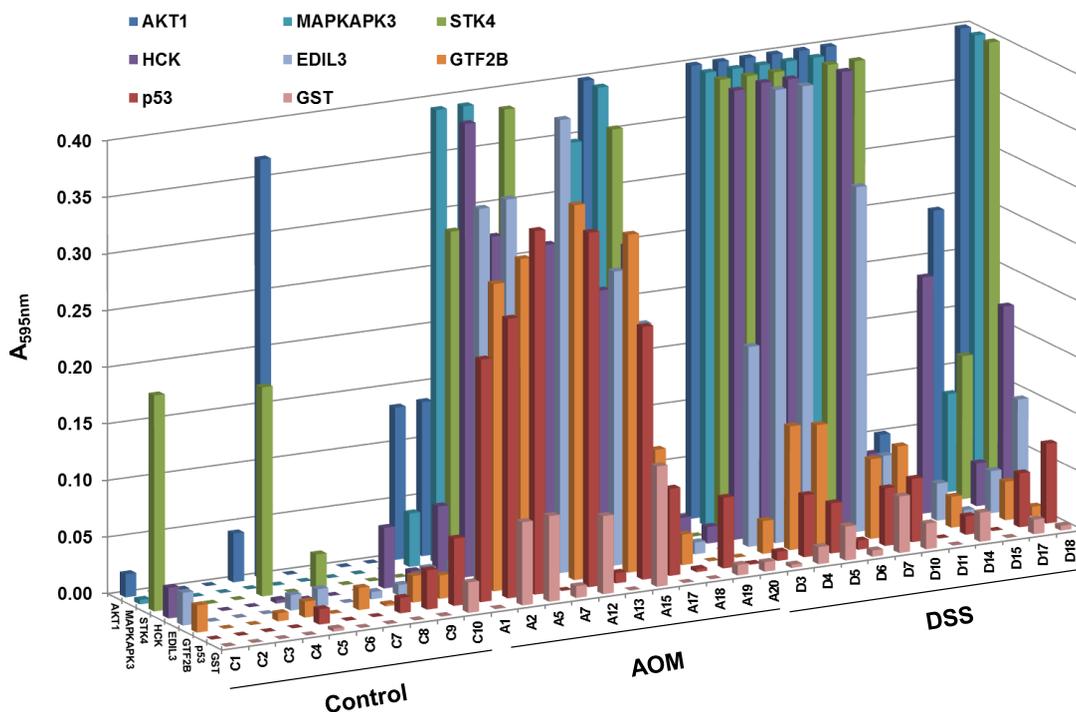


Figura 25: Niveles de autoanticuerpos en la semana 35 de tratamiento en los modelos AOM y DSS.

Para correlacionar los niveles de autoanticuerpos y las lesiones tumorales, analizamos cuatro ratones representativos tratados con AOM que presentaron adenocarcinoma (Figura 26). Los ratones A2 y A5 presentaban infiltración y mayores niveles de autoanticuerpos frente a MAPKAPK3 en comparación con los ratones A12 y A15 (0,58 y 0,43 vs 0,23 y 0,35) y HCK (0,41 y 0,30 vs 0,28 y 0,24). Los ratones A12 y A15 presentan menores niveles de autoanticuerpos al presentar una lesión menos avanzada, pese a que su nivel de inflamación fue también elevado (Figura 26). Por tanto la inflamación no parece ser el único desencadenante de la respuesta inmune humoral de autoanticuerpos en CCR.

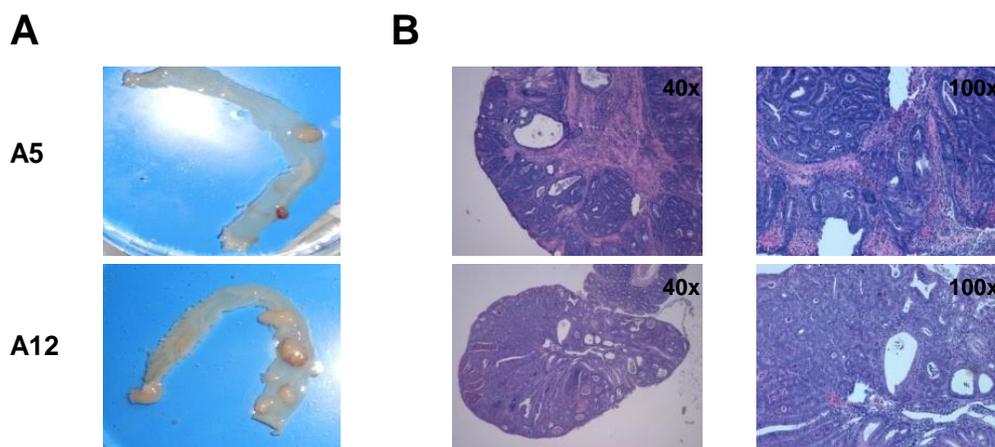


Figura 26: Lesiones observadas por la administración de AOM en la semana 35. A. Imágenes macroscópicas de las lesiones de los ratones A5 y A12. B. Imágenes histológicas de las tinciones con hematoxilina y eosina de las lesiones.

2.10.2. Expresión de mRNA y proteína en los modelos individuales de AOM y DSS

Posteriormente, se evaluaron los cambios en la expresión de AAT a nivel de RNA mensajero y proteína en 4 ratones representativos de cada grupo, con adenocarcinoma confirmado por histología y altos niveles de autoanticuerpos, así como 4 ratones control con el fin de confirmar las alteraciones moleculares que conducen a la generación de autoanticuerpos (Figura 27).

Para detectar diferencias en la expresión del mRNA, amplificamos mediante RT-PCR los mRNA de p53, MAPKAPK3, STK4 y GTF2B (Figura 27A). En el modelo DSS la expresión de mRNA de p53 aumenta ligeramente, excepto el ratón A15, y MAPKAPK3 disminuye. En AOM, se produce un mayor aumento del mRNA de p53, coincidiendo con unos niveles de autoanticuerpos, más elevados para AOM que para DSS. Al igual que en AOM, la expresión de MAPKAPK3 también disminuye en DSS. En ambos modelos, los niveles de mRNA de GTF2B aumentan, mientras que no observamos cambios para STK4.

Mediante *western blot* pudimos comparar la expresión de los AAT en los diferentes grupos en el punto final de estudio (Figura 27B). La expresión de p53 no aumenta en la carcinogénesis por AOM ($p=0,441$), aunque sí en el modelo de DSS. Como se vio anteriormente la sobreexpresión era mucho mayor en el tratamiento combinado. Tanto en el modelo AOM como en el DSS, los niveles de GTF2B disminuyen un 30% respecto a los controles. No encontramos apenas expresión de MAPKAPK3 en los controles, pero sí en AOM y DSS (como se observó en AOM/DSS). EDIL3 presentó dos isoformas, una de 53kDa y otra de 23kDa. Los ratones control y tratados con AOM no expresan la isoforma canónica (53kDa), que solo es detectada en el modelo

DSS (al igual que se observaba en el modelos AOM/DSS). Respecto a la isoforma de 23kDa, la carcinogénesis por AOM casi dobló sus niveles medios respecto de los controles (1,9 vs 1). En el modelo de DSS, la sobreexpresión es homogénea y más discreta aunque significativa.

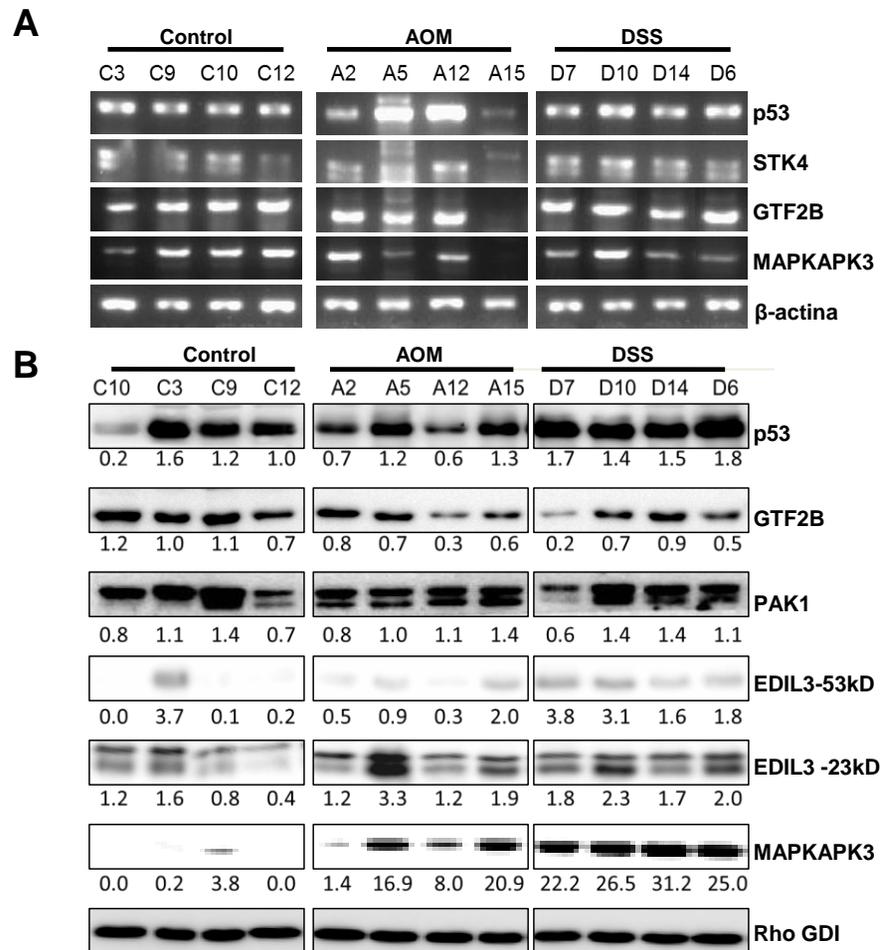


Figura 27: Relación entre la presencia de autoanticuerpos y los niveles de expresión de mRNA y proteína de cada uno de los autoantígenos en los modelos de ratón AOM y DSS. A. Expresión de mRNA mediante PCR semicuantitativa de los marcadores indicados. β-actina se usa como control de carga. B. Expresión de proteína en el colon distal de los ratones. El peso molecular de cada banda coincide con el indicado en la Tabla 7 excepto EDIL3. Rho GDI se usó como control de carga. El experimento se realizó por triplicado utilizando diferentes réplicas biológicas.

Globalmente observamos que aunque la reactividad frente a los AAT se asociaría preferentemente a cambios en la expresión de proteínas, no existe un único mecanismo para la generación de autoanticuerpos.

2.10.3. Progresión histológica del cáncer inducido en modelos lentos basados en AOM y DSS por separado

Con el objetivo de relacionar la progresión tumoral en ambos modelos con los niveles de autoanticuerpos, se realizaron necropsias a diferentes tiempos para determinar mediante histología el avance del tumor.

En los ratones tratados con DSS se realizaron las necropsias durante la semana 10 y 20 (Figura 28A). En la semana 10, los ratones D10 y D11 presentaron un adenocarcinoma intramucoso, mientras el del ratón D4 fue infiltrante con intensa inflamación. En la semana 20 el ratón D18 presentó un foco claro de adenocarcinoma infiltrante, pese a parecer asintomático (actividad normal y peso normal).

En los ratones tratados con AOM las necropsias se realizaron en las semanas 15, 20 y 28 (Figura 28B). En la semana 15 observamos que los ratones habían desarrollado adenocarcinomas infiltrantes con ulceraciones. En la semana 20 los ratones mostraron tanto adenocarcinomas infiltrantes, como adenomas con baja inflamación y de gravedad moderada. Finalmente, en la semana 28 observamos que había ratones que mostraban adenocarcinomas infiltrantes, al igual que un ratón mostraba tumor *in situ*. Las diferentes lesiones observadas en las semanas 20 y 28 evidencian una importante heterogeneidad en el avance de la carcinogénesis provocada por AOM. A tiempo final, en la semana 35, el 92% de los ratones sacrificados mostraron adenocarcinomas infiltrantes, de diversa morfología con un intenso patrón de inflamación en el área circundante a la lesión, corroborando estos datos.

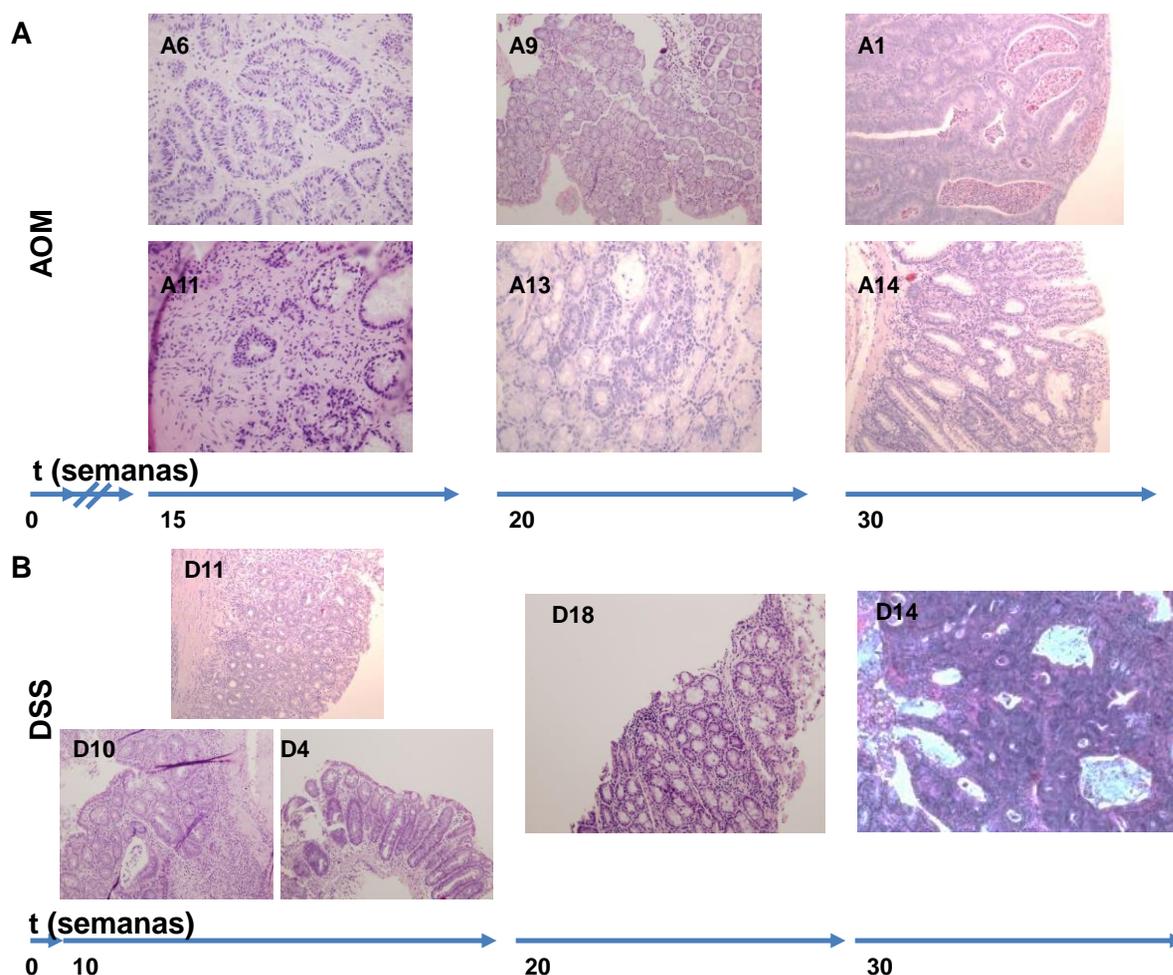


Figura 28: Evolución de las lesiones en los ratones tratados con AOM o DSS. Se muestran cortes significativos teñidos con hematoxilina y eosina. A. Evolución de las lesiones en los ratones tratados con AOM, observadas desde la semana 15. B. Evolución de las lesiones en los ratones tratados con DSS desde la semana 10. El tiempo se indica en semanas. Se muestra un ratón significativo de cada lesión observada.

En conjunto estos datos indican que el desarrollo del tumor sigue la secuencia adenoma -> tumor *in situ* -> adenocarcinoma al igual que en el tratamiento AOM/DSS, si bien el inicio de la carcinogénesis tiene lugar en diferentes momentos según el ratón. Las necropsias indicarían que la proporción de adenocarcinomas en los ratones sacrificados sería aproximadamente del 50% en la semana 20, un 75% en la semana 28, y del 100% en la semana 35 (Figura 28).

2.10.4. Cinética de producción de autoanticuerpos en los modelos AOM y DSS de larga duración.

Se monitorizaron los niveles de autoanticuerpos en 8 puntos temporales de la progresión tumoral frente a p53, EDIL3 y MAPKAPK3 en ambos modelos AOM y DSS, usando GST como control (Figura 29 y Figura 30, respectivamente). Como anteriormente, las muestras sanguíneas se recogieron cada 3 semanas para definir la cinética de generación de autoanticuerpos con respecto a la progresión del tumor.

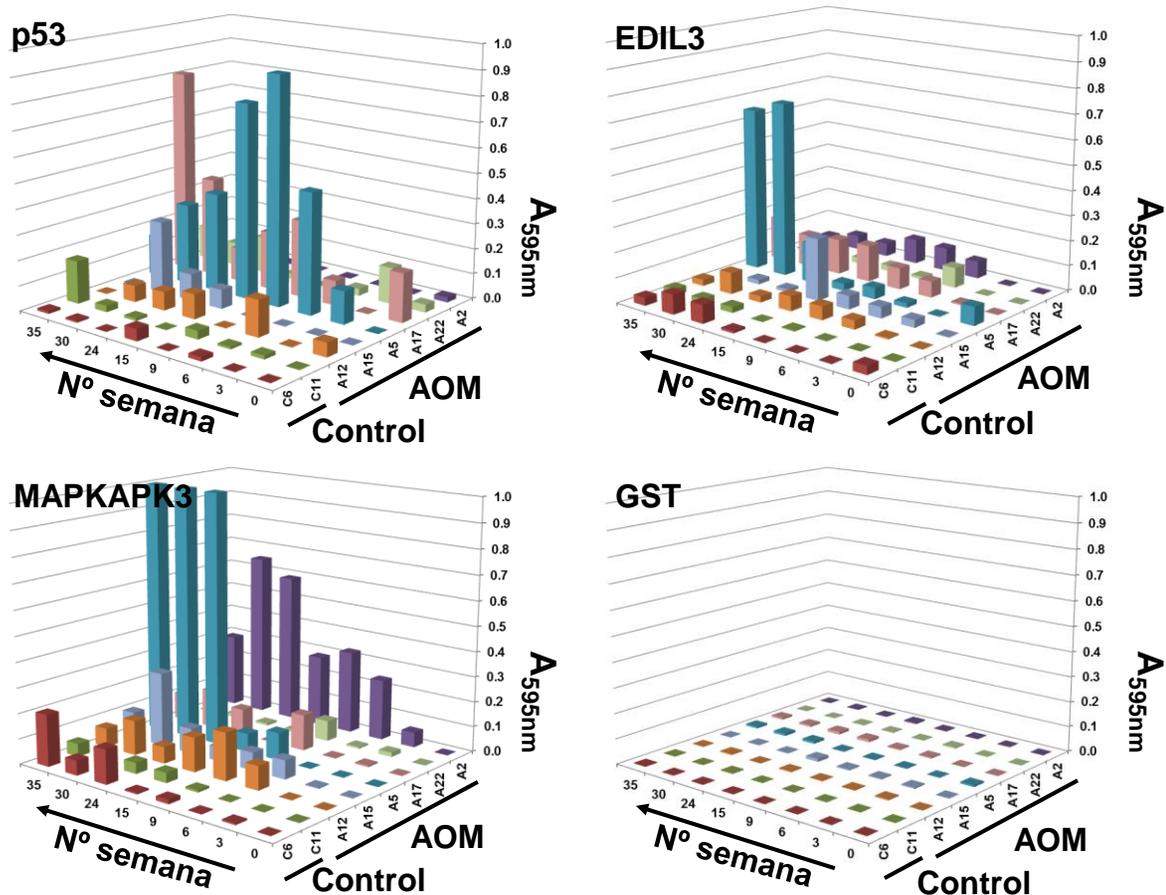


Figura 29: Cinética de la producción de autoanticuerpos en el modelo de AOM. Se analizaron los niveles de autoanticuerpos mediante ELISA indirecto frente a p53, MAPKAPK3 y EDIL3 a lo largo del protocolo de inducción del cáncer colorrectal en ratones FVB/N. Los anticuerpos frente a estos AAT revelaron un aumento paralelo a la progresión tumoral, seguido de cierto descenso en los niveles de autoanticuerpos en algunos ratones. STK4 y GTF2B no ofrecieron resultados concluyentes y no se representaron. Los resultados son representativos de 4 experimentos independientes. La proteína GST se utilizó como control.

Los autoanticuerpos frente a p53, MAPKAPK3 y EDIL3 presentaron diferencias en el inicio de la producción de autoanticuerpos y en su cinética. Se observa claramente que la aparición de autoanticuerpos frente a los AAT tiene lugar a diferentes tiempos (Figura 29). Los autoanticuerpos frente a p53 fueron los más tempranos, alcanzando su nivel máximo entre las semanas 9 y 15 después del tratamiento con AOM. MAPKAPK3, alcanzó su máximo de reactividad en fases mucho más tardías, entre las semanas 24 y 27. Observamos también que llegado a un punto máximo, los niveles de autoanticuerpos comienzan a disminuir, particularmente en aquellos AAT cuya reactividad aparece en las fases tempranas de la carcinogénesis: en p53 se observa después de la semana 15 y en MAPKAPK3 después de la semana 27 (Figura 29).

La respuesta de autoanticuerpos en DSS fue mucho más elevada que en AOM a tiempo final. Para saber si el aumento se debía a la inflamación crónica o, por el contrario, los autoanticuerpos frente a cada AAT aumentaban de manera independiente. Analizamos los autoanticuerpos de 6 ratones cada 3 semanas. Como en AOM y AOM/DSS, en DSS también observamos el inicio de la respuesta humoral para cada AAT a diferentes tiempos del tratamiento, aunque los niveles de autoanticuerpos fueron más homogéneos entre los ratones (Figura 30A).

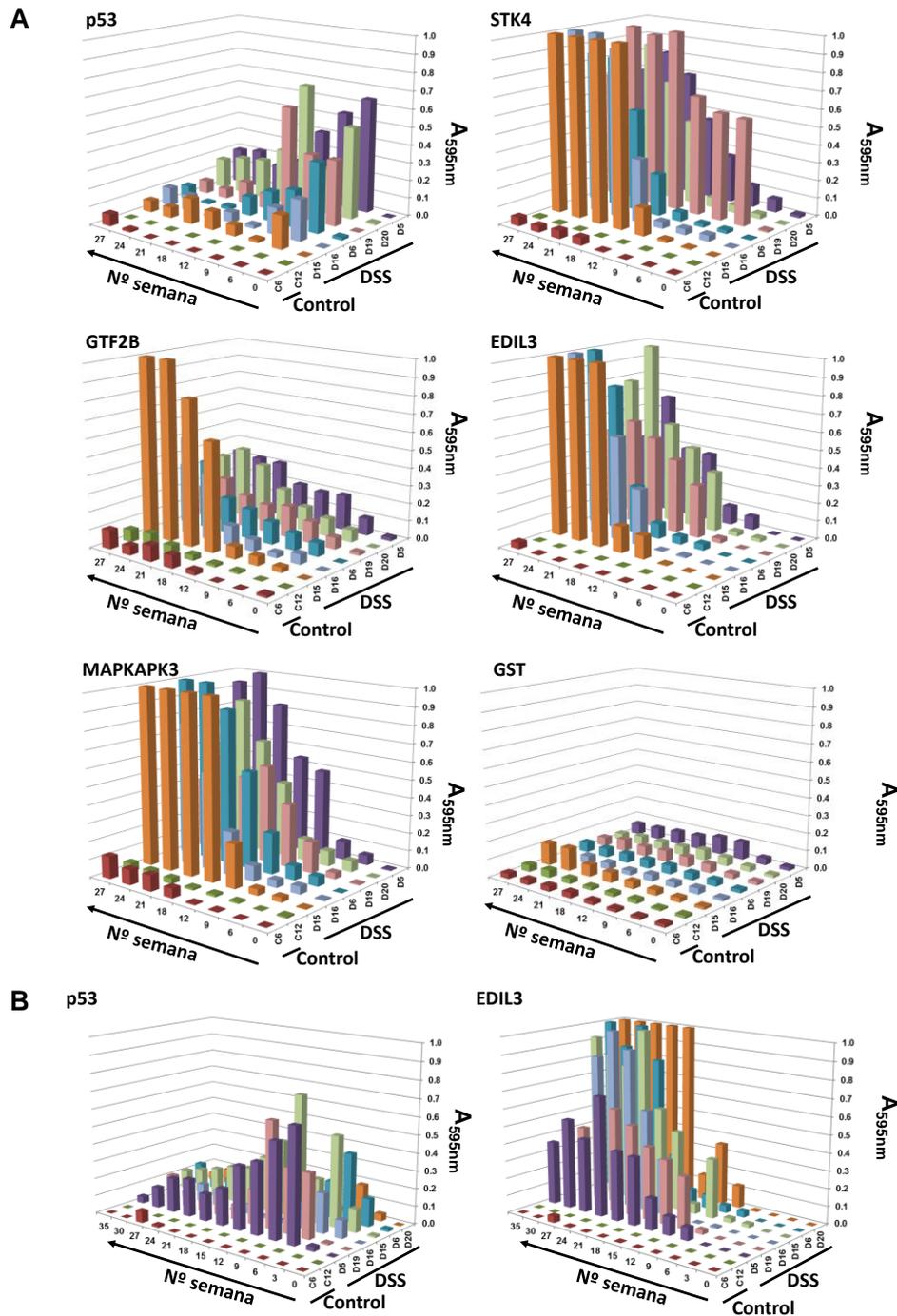


Figura 30: Cinética de la producción de autoanticuerpos en el modelo DSS. Los anticuerpos frente a p53, MAPKAPK3, GTF2B, STK4 y EDIL3 revelaron un aumento de sus niveles con la progresión tumoral, seguido del descenso de los autoanticuerpos en algunos ratones. A. Cinética de producción de autoanticuerpos en el modelo de inducción de carcinogénesis basado en DSS. B. Evolución a largo plazo de los autoanticuerpos frente a p53 y EDIL3.

A partir de la semana 6 observamos autoanticuerpos frente a p53, mientras que los autoanticuerpos frente a MAPKAPK3 aparecen entre las semanas 12 y 18 de tratamiento. Finalmente los autoanticuerpos frente a STK4 y GTF2B se detectaron en la semana 21 y los anticuerpos frente a EDIL3 entre la semana 9 y 18 (Figura 30). Al comparar AOM y DSS, se observó que los autoanticuerpos frente a p53 alcanzan sus máximos entre la semana 9 y 15 en AOM, más tarde que en DSS (semana 6-9). EDIL3 comienza a producir autoanticuerpos en AOM en la semana 6, que siguen un aumento paulatino mientras que en DSS la reactividad tiene lugar entre las semanas 12 y 18 (cuando el adenoma ya se ha formado y el entorno inflamatorio favorece la respuesta inmune) (Figura 30A). Con MAPKAPK3 ocurre algo más complejo: si bien en DSS los niveles ya son detectables en la semana 6, no es hasta las semanas 12-18 cuando se produce un segundo aumento de autoanticuerpos. Sin embargo, el modelo de AOM presenta su máximo de autoanticuerpos a partir de la semana 9 (Figura 30A). En todos los casos la aparición fue más tardía que en AOM/DSS, en consonancia con el crecimiento más lento del tumor.

En p53 observamos cómo después del pico en 6 semanas, la respuesta inmune cae a partir de la semana 12. Para confirmar estos resultados y estudiarlos con más detalle, utilizamos 12 puntos temporales a lo largo de las 35 semanas para observar p53 y EDIL3 (Figura 30B). Los títulos de autoanticuerpos frente a p53 ascienden paulatinamente hasta la semana 6, y comienzan a descender desde la semana 12. Algo similar ocurre con EDIL3, cuya producción se inicia entre la semana 9 y 15, y después de un incremento paulatino, comienza a decaer a partir de la semana 27 (Figura 30B).

El análisis detallado de la evolución serológica de los ratones que sufren carcinogénesis colorrectal revela que los niveles de autoanticuerpos aumentan y disminuyen a lo largo de la progresión tumoral estando asociados a las etapas de ésta, un aspecto que no pudimos observar en los cuatro puntos temporales estudiados en el modelo AOM/DSS.

En conjunto, los modelos murinos de inducción química nos han permitido el estudio temporal de los niveles de autoanticuerpos y comprobar su aparición temprana, previa a la sintomatología típica de la progresión del CCR. Además, este estudio nos ha permitido comprobar las alteraciones moleculares que dan lugar a su aparición, principalmente relacionada con cambios en el patrón de expresión de los autoantígenos.

3. Detección múltiple de autoanticuerpos frente a CCR mediante microesferas (Luminex)

De cara a su aplicación clínica, la determinación de un alto número de analitos en un gran número de pacientes utilizando el ELISA indirecto complicaría el estudio y reduciría la robustez del ensayo. Por ello, decidimos implementar la determinación múltiple de autoanticuerpos a través de la tecnología Luminex y determinar si mejoraría la detección de autoanticuerpos en comparación con ELISA. Poner a punto la detección múltiple requiere comenzar por optimizar las condiciones óptimas del ensayo: la cantidad de antígeno por millón de bolas, la dilución de suero de los pacientes, la composición del tampón de bloqueo y la concentración del anticuerpo secundario.

3.1. Capacidad máxima de antígeno por microesfera y dilución del suero problema

El primer paso fue establecer qué cantidad de antígeno obtenía una mayor señal y una menor interacción inespecífica en la inmunodetección indirecta en suero con microesferas Luminex [241]. Este valor se conoce como capacidad de carga de antígeno.

Utilizamos 2 AAT de diferente masa molecular, GTF2B y STK4 (33 kDa y 55 kDa) como representativos del resto de AAT y acoplamos diferentes cantidades de proteína recombinante expresada en *E. coli*. Para optimizar el acoplamiento de los AAT, se ajustó la cantidad de proteína en μg de AAT por millón de microesferas (Mb). Las condiciones probadas fueron 5 $\mu\text{g}/\text{Mb}$, 10 $\mu\text{g}/\text{Mb}$ y 15 $\mu\text{g}/\text{Mb}$. Respecto a la dilución óptima del suero, empleamos diluciones seriadas de nuestro suero maestro desde 1/20 a 1/800, las habituales en este tipo de ensayos. El suero maestro se preparó mezclando 19 sueros de pacientes con CCR para generar una mezcla reactiva a todos los AAT (página 61 en Cohorte para optimización de ensayos; Materiales y Métodos).

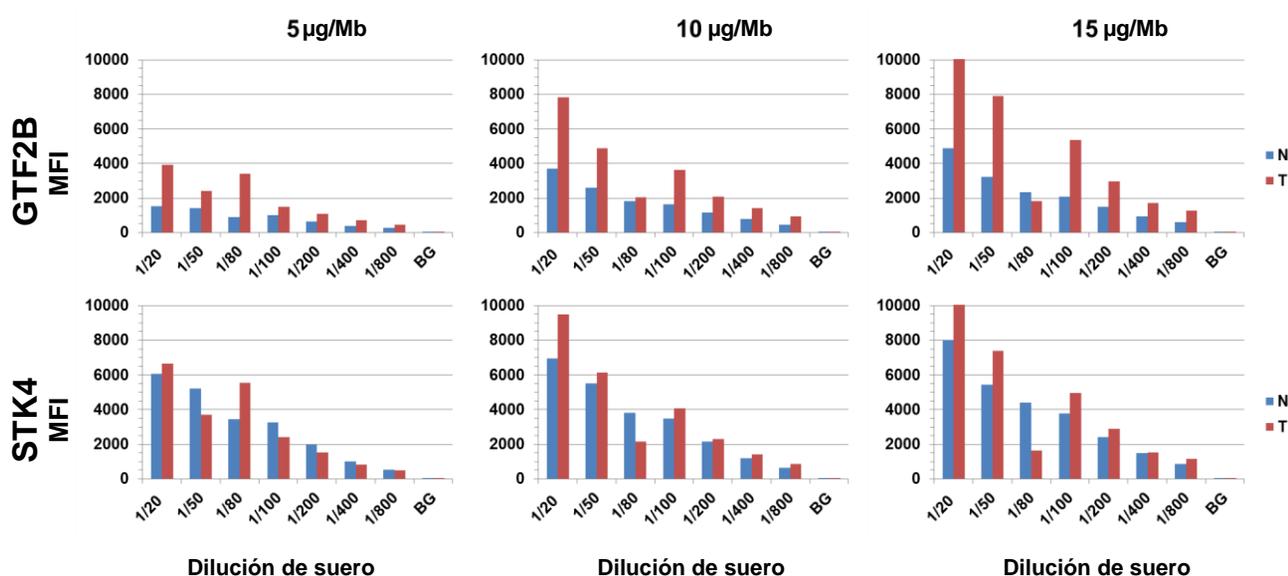


Figura 31: Optimización de la cantidad de AAT por millón de microesferas. Se comparó la señal de una mezcla de sueros tumorales (T) con una mezcla de sueros normales (N) a diferentes diluciones. MFI: Mediana de la Intensidad de Fluorescencia; BG: Blanco, MFI que resultaba al incubar las microesferas con tampón de trabajo; Mb: Megabeat, millón de microesferas.

Observamos que para todos los AAT, la mayor cantidad de antígeno (15 $\mu\text{g}/\text{Mb}$) aumentó los niveles de señal entre un 25% y un 50% respecto a 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{Mb}$ con niveles de interacciones inespecíficas inferiores (Figura 31). También observamos, que las diluciones de suero problema que daban una mejor relación señal-ruido se encontraban en el rango de dilución 1/50 y 1/200. Por ello, en los siguientes experimentos de validación utilizamos 15 $\mu\text{g}/\text{Mb}$ y las diluciones de suero de pacientes 1/50, 1/100 y 1/200.

3.2. Optimización de la dilución de suero, tampón de bloqueo y anticuerpo secundario

A continuación, determinamos la concentración óptima del suero problema, la composición del tampón de bloqueo y la concentración del anticuerpo secundario. Dados los resultados anteriores, utilizamos 1/50,

1/100 y 1/200 como diluciones de suero y 4 diluciones de anticuerpo secundario con el objetivo de encontrar la mejor relación entre concentración de suero problema y dilución del anticuerpo secundario (Figura 32).

Los datos indican que la dilución 1/50 permite lograr una buena relación señal/ruido conservando altos niveles de fluorescencia y un límite razonable de detección (MFI > 2000). Si bien la dilución de suero 1/200 proporcionó la mejor relación señal/ruido, los niveles de señal fueron demasiado bajos y podrían comprometer la integridad de los resultados. Se compararon también dos tampones de bloqueo: PBS+BSA y MPBST. Observamos que el bloqueo con PBS+BSA reducía la presencia de interacciones inespecíficas en sueros sanos en todas las condiciones observadas (Figura 32). Respecto al anticuerpo secundario, aunque las diluciones 1/400 y 1/5000 ofrecieron resultados similares en cuanto a la razón señal/ruido, la dilución 1/400 ofrece mejores resultados en términos absolutos. La dilución 1/10000 fue insuficiente para la detección de autoanticuerpos. Con estos resultados, seleccionamos las siguientes condiciones para el resto de experimentos con microesferas Luminex: 15 µg de AAT/Mb; suero diluido 1/50, y una dilución del anticuerpo secundario de 1/400.

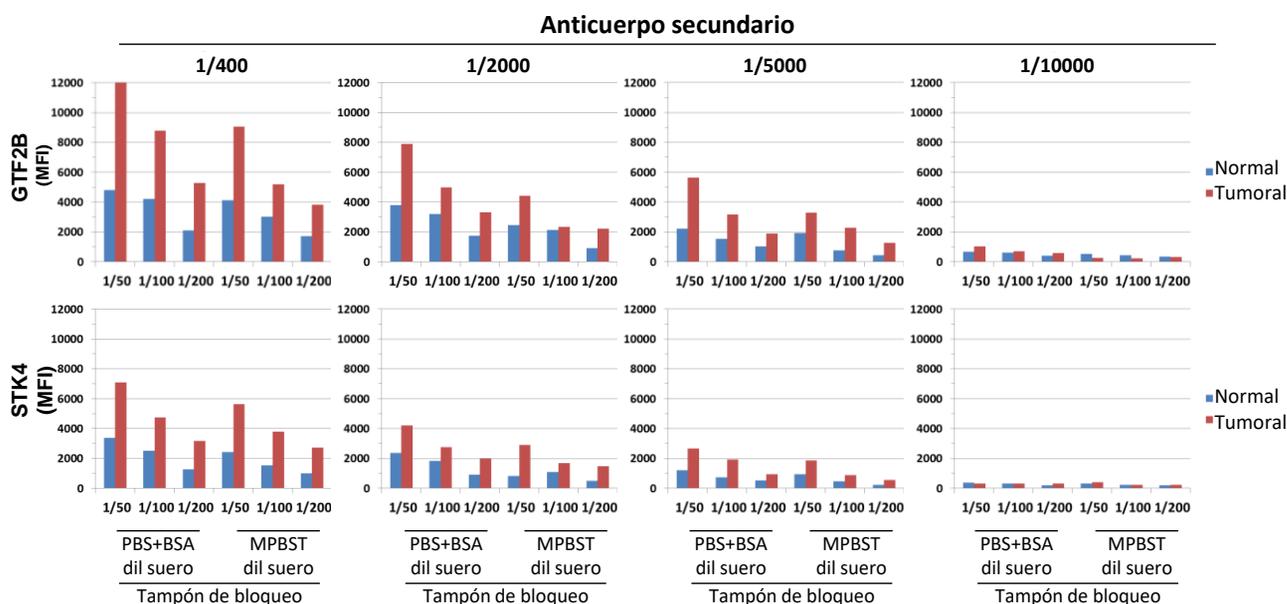


Figura 32: Optimización de las condiciones de ensayo para GTF2B y STK4. La optimización incluye la dilución de suero maestro, el tampón de bloqueo (MPBST o PBS+BSA) y la dilución del anticuerpo secundario.

3.3. Detección múltiple de 9 autoanticuerpos en pacientes de CCR mediante Luminex

Una vez puesta a punto, la metodología Luminex permite evaluar de manera conjunta la capacidad diagnóstica de los AAT, así como construir una herramienta que permita el diagnóstico diferencial de pacientes de CCR frente a pacientes sanos, con otros cánceres, o con enfermedad inflamatoria intestinal.

Utilizamos Luminex como tecnología experimental, comparando los resultados con los obtenidos mediante ELISA, tecnología habitual de detección de anticuerpos. En base a criterios de poder diagnóstico, estudios previos y estabilidad y escalabilidad de la producción proteica seleccionamos 14 AAT para el estudio. Sin embargo, los bajos rendimientos de expresión heteróloga de SRC, FGFR4, PAK1, PRKD2 y TRIM21

impidieron disponer de los AAT completos en cantidad suficiente para estos ensayos, por lo que no pudieron ser utilizados en este apartado de la tesis. Por ello, los AAT analizados mediante Luminex y ELISA en experimentos independientes fueron AKT1, EDIL3, GTF2B, HCK, IRAK4, MAPKAPK3, p53, PIM1 y STK4. Además, incluimos GST y Anexina IV como controles del estudio.

3.4. Características clínicas de la cohorte de estudio

A partir de la colaboración con cuatro hospitales, fue posible construir una cohorte multicéntrica de 307 pacientes que se agruparon de la siguiente manera: 135 (44%) pacientes con cáncer colorrectal (anotados como CRC), 93 (30%) pacientes sanos sin afección inflamatoria o cancerosa declarada (anotados como H), 65 (21%) pacientes con otros tumores (anotados como OC, Otros cánceres), incluyendo glioblastoma multiforme (GBM), GIT (tumor estromal gastrointestinal) y cáncer de mama entre otros; y 14 (4%) pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (anotados como IBD, incluyendo enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa) (Tabla 10). Los pacientes del grupo CRC incluyeron desde el estadio I hasta el IV en estadiaje agrupado de cáncer colorrectal (Tabla 10). Los 39 pacientes del grupo OC provenientes del hospital Puerta del Hierro no disponían de la edad en sus registros, por lo que la edad indicada es la mediana del resto de pacientes.

Tabla 10: Características demográficas de la cohorte de validación clínica.

	N; (%)	Edad (años); (RIC*)	Sexo		Hospital			
			Mujeres; (%)	Varones; (%)	FJD	Gijón	HUSal	Phierro
H	93 (30%)	51 (20)	46 (50%)	46 (50%)	16 (17%)	44 (47%)	9 (9%)	23 (25%)
OC[^]	65 (21%)	68 (14)	48 (77%)	14 (22%)	12 (18%)	8 (12%)	6 (9%)	39 (60%)
IBD	14 (4%)	51 (35)	10 (71%)	4 (28%)	7 (50%)	7 (50%)	0 (0%)	0 (0%)
CRC	135 (44%)	66 (22)	52 (38%)	82 (61%)	77 (56%)	42 (30%)	9 (6%)	8 (5%)
I	35 (25%)	66 (22)	12 (36%)	21 (63%)	22 (62%)	10 (28%)	3 (8%)	0 (0%)
II	25 (18%)	69 (21)	13 (52%)	12 (48%)	15 (60%)	7 (28%)	2 (8%)	1 (4%)
III	46 (34%)	64 (21)	17 (36%)	29 (63%)	25 (54%)	14 (30%)	4 (8%)	3 (6%)
IV	29 (21%)	67 (21)	10 (34%)	19 (65%)	15 (51%)	10 (34%)	0 (0%)	4 (13%)

*RIC, Rango intercuartílico. ^OC, Otros cánceres (mama n=38, ampuloma n=2, vejiga n=3, duodeno n=1, esófago n=3, glioblastoma n=6, tumor gastrointestinal n=2, páncreas n=3, estómago n=6 y tiroides n=1).

3.5. Niveles de autoanticuerpos en los diferentes grupos de pacientes

Se determinaron los niveles de autoanticuerpos en las 307 muestras de la cohorte mediante Luminex (Figura 33) y mediante ELISA (Figura 34), para comparar los resultados de Luminex con la técnica analítica de referencia. Se ha descrito que los autoanticuerpos frente a un único AAT solo aparecen en entre el 10% y 40% de los pacientes, por lo que cabría esperar una distribución bimodal de los marcadores en los pacientes con CRC. Al no tratarse de una distribución normal o paramétrica, estudiamos las diferencias de distribución de los autoanticuerpos en CRC y pacientes sanos usando gráficos de dispersión, cajas y pruebas no paramétricas. Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis (KW) para detectar diferencias entre los cuatro grupos y la U de Mann Whitney para confirmar las diferencias entre la distribución de CRC frente a los controles sanos.

Los niveles de autoanticuerpos frente a p53, GTF2B, HCK, MAPKAPK3, STK4, HCK y EDIL3 medidos mediante Luminex permitían discriminar entre los cuatro grupos de estudio con diferencias estadísticamente

significativas (valores de $p < 0,0001$) (Figura 33). Comparando la significación de las pruebas, observamos que la elevada reactividad de los pacientes con enfermedades relacionadas provocaba que los valores de p de la prueba Kruskal-Wallis (de varios grupos) fuesen más elevados, lo que ponía a los AAT en una situación más restrictiva de validación. Posteriormente cuantificamos la significación estadística de la diferencia del grupo CCR frente a los pacientes sanos con la prueba U de Mann Whitney (de dos grupos), encontrando que todos los autoantígenos analizados permitían discriminar entre ambos grupos ($p < 0,001$). Las mayores diferencias se obtenían con p53, MAPKAPK3, GTF2B, EDIL3, HCK y STK4.

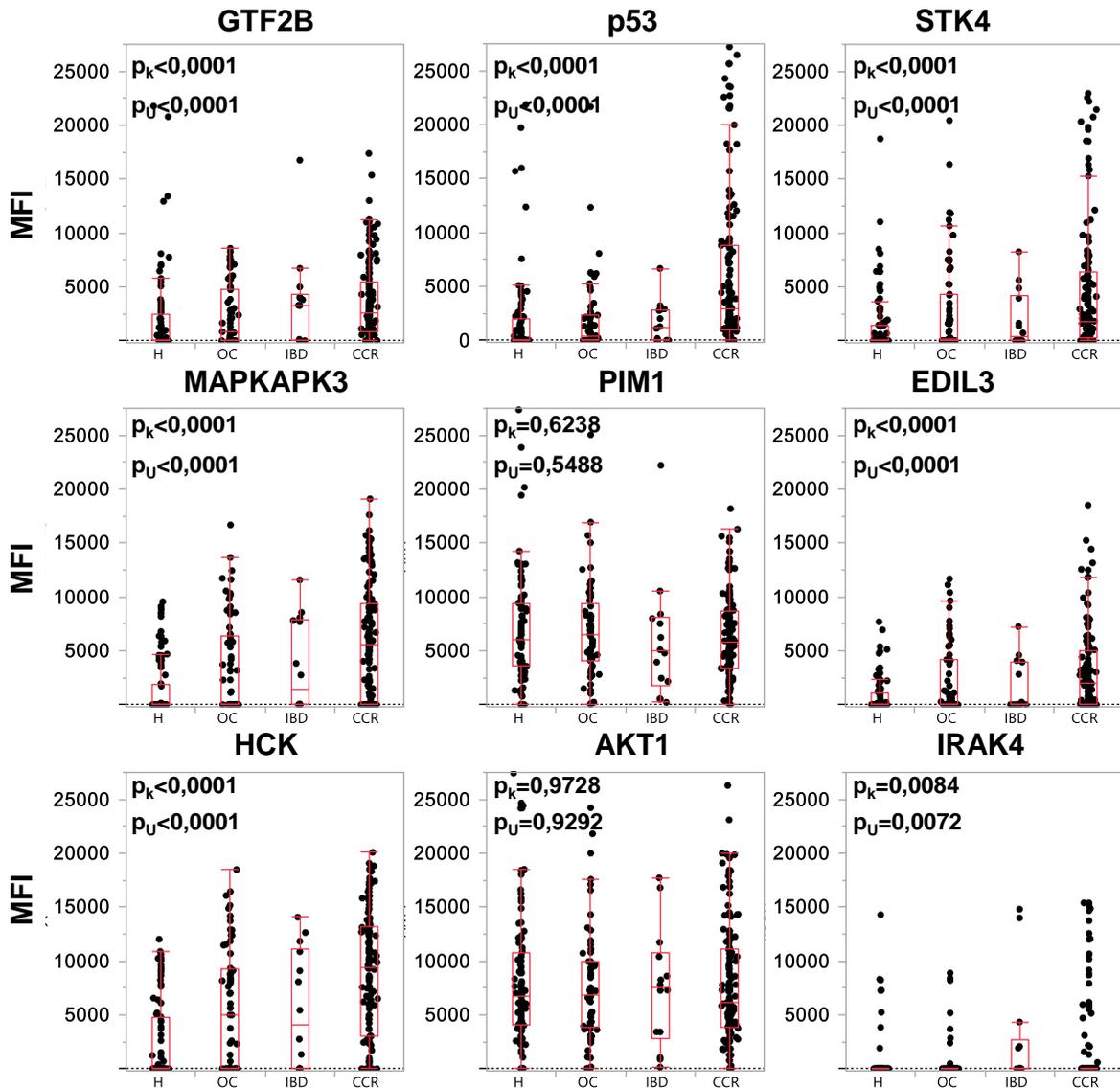


Figura 33: Cuantificación de autoanticuerpos en las 307 muestras de la cohorte de validación clínica determinados mediante Luminex. Se representan los niveles individuales de cada paciente mediante diagrama de puntos. El diagrama de cajas, representa la mediana y el primer y el tercer cuartil, así como el rango que los separa. p_k : valor de p correspondiente a la prueba de Kruskal Wallis; p_U : valor de p correspondiente a la prueba U de Mann Whitney. H: controles sanos; IBD: enfermedad inflamatoria intestinal; OC: otros cánceres; CCR: pacientes de cáncer colorrectal.

Como esperábamos, las medianas de reactividad de los AAT difirieron de su media aritmética, confirmando la falta de normalidad en la naturaleza de los datos. Esto justificó el uso de técnicas no paramétricas para detectar diferencias estadísticamente significativas, más exigentes que las pruebas paramétricas. En concreto, podemos observar una nube de puntos por encima del Q3 en el grupo de CCR, confirmando la

bimodalidad de la distribución de la respuesta inmune de los pacientes de CCR. En todos los casos, el Q1 de los pacientes control coincidió con el cero técnico de reactividad.

Tras repetir el mismo experimento con ELISA (Figura 34), observamos que existen diferencias significativas de reactividad en todos los AAT excepto IRAK4 ($p_k=0,0892$). Aunque las diferencias significativas entre los grupos eran de menor magnitud que las diferencias obtenidas mediante Luminex, se confirmaron los resultados de Luminex. Las mayores diferencias entre los grupos las encontramos para p53, STK4 y HCK ($p<0,001$) (Figura 34).

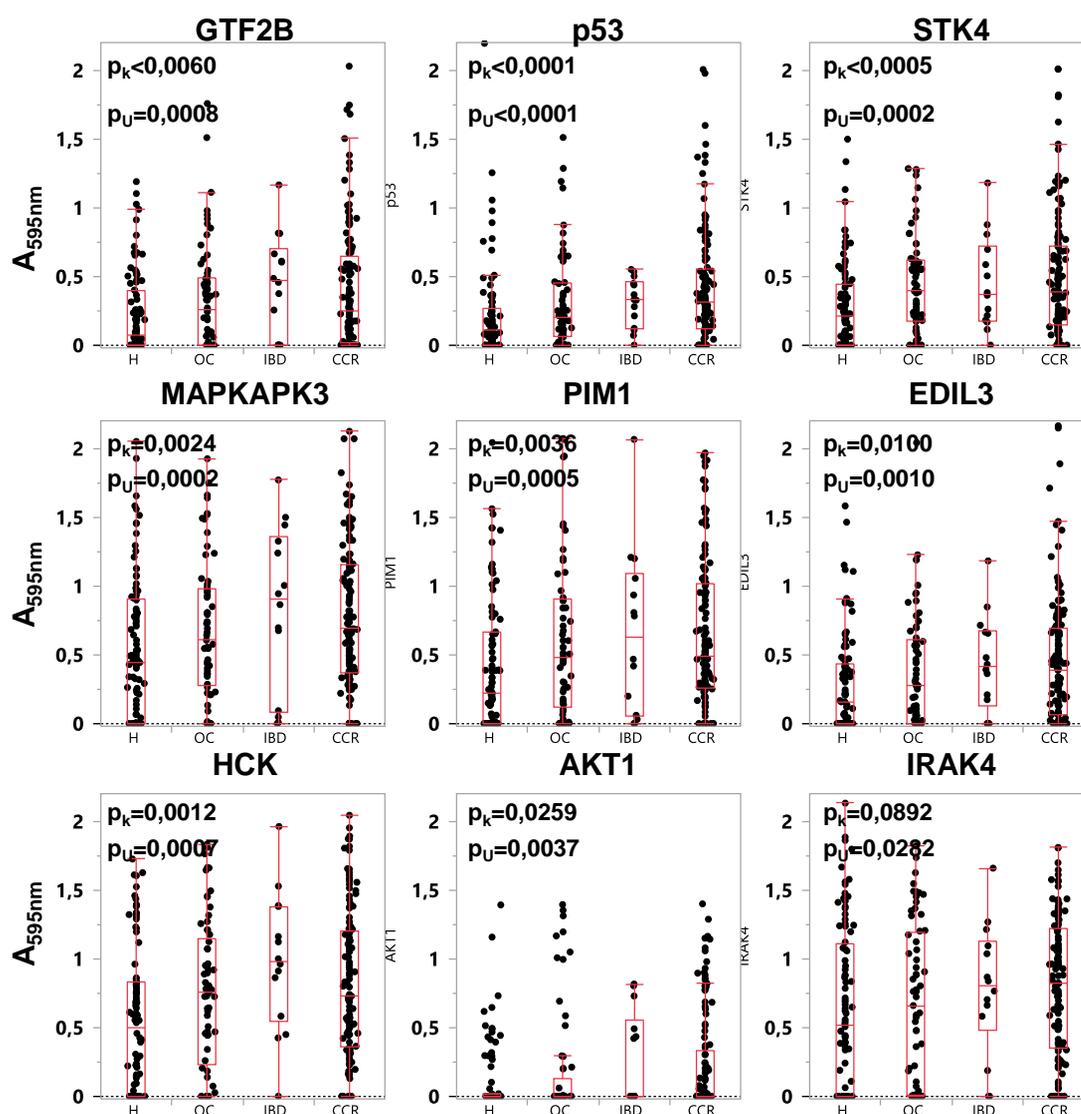


Figura 34: Cuantificación de autoanticuerpos en las 307 muestras de la cohorte de validación clínica determinados mediante ELISA. Se representan los niveles individuales de cada paciente mediante diagrama de puntos. El diagrama de cajas, representa la mediana y el primer y el tercer cuartil, así como el rango que los separa. p_k : valor de p correspondiente a la prueba de Kruskal Wallis; p_u : valor de p correspondiente a la prueba U de Mann Whitney. H: controles sanos; IBD: enfermedad inflamatoria intestinal; OC: otros cánceres; CCR: pacientes de cáncer colorrectal.

Comparando los resultados de los controles medidos mediante Luminex y ELISA, encontramos que los niveles de IBD medidos mediante Luminex fueron más bajos respecto a CCR que en ELISA (Figura 34), confirmando la mayor especificidad de Luminex. En Luminex, solo en IRAK4 el Q3 de IBD fue más alto que el máximo de CCR; mientras que en ELISA muchos AAT fueron reactivos en pacientes con IBD, en concreto

con un Q3 superior al de CCR: HCK, PIM1, MAPKAPK3 y AKT1. Estos datos cuestionan la utilidad clínica de IRAK4 como biomarcador de CCR.

En general observamos que los p valores de la discriminación entre los diferentes grupos analizados mediante Luminex superaban en significación estadística al ELISA, lo que podría deberse a la menor cantidad de interacciones inespecíficas y al mayor rango dinámico de las medidas de Luminex respecto del ELISA. En cualquier caso los p valores obtenidos mediante ambas técnicas son extremadamente significativos, debido al gran número de pacientes del ensayo. Sin embargo, no se encontraron evidencias de una reactividad específica para PIM1 ($p=0,5488$) y AKT1 ($p=0,9292$) mediante Luminex.

En términos generales Luminex presenta mejores valores de significación estadística que el ELISA a la hora de discriminar a los pacientes con CCR de los controles. En concreto, presenta una mayor especificidad respecto a pacientes con IBD u OC. No obstante, ningún AAT por separado es suficiente para el correcto diagnóstico de todos los pacientes de CCR, por lo que procedimos a combinar los AAT para su uso conjunto en un panel diagnóstico.

3.6. Análisis univariado y capacidad predictiva individual de los AAT

Para determinar el valor de los AAT en el diagnóstico de CCR y poder compararlos, desarrollamos una regresión logística univariante a partir de los datos de intensidad de las poblaciones control y CCR. Así, determinamos la *odds ratio* (OR) para cada AAT. Este valor consiste en las veces que se multiplica el riesgo del paciente de padecer CCR por cada aumento de una unidad de referencia de autoanticuerpos. Para poder comparar la capacidad de Luminex frente a ELISA, la unidad de referencia se define como una décima parte del valor máximo de cada una de las técnicas, siendo este de 1000 MFI en Luminex y 0,2 AU en ELISA. Por cada unidad que suba el nivel de autoanticuerpos, el paciente tiene un aumento de probabilidades de padecer CCR, que depende de la OR. Mediante la regresión logística univariante observamos que el aumento de los niveles de autoanticuerpos frente a cualquiera de los AAT investigados estaba asociado a una mayor probabilidad de padecer CCR (Figura 35).

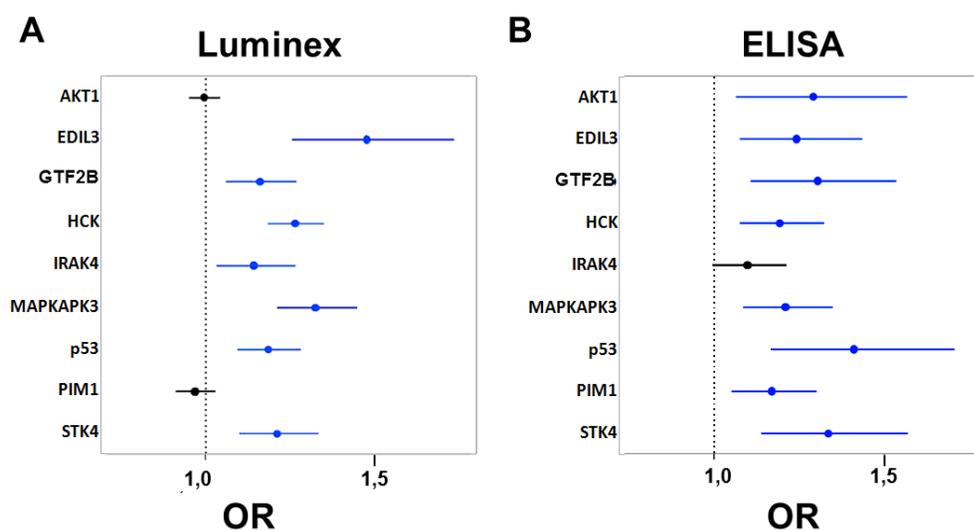


Figura 35: Influencia (OR) del aumento de autoanticuerpos en el diagnóstico de CCR. Los OR y sus intervalos de confianza al 95% están representados para un aumento de 1000 unidades de fluorescencia en Luminex y 0,2 unidades de absorbancia en ELISA. Los OR se representan como puntos. Las líneas representan su IC al 95%.

De manera similar a lo observado en los gráficos de dispersión, observamos que en Luminex los AAT que más influencia ejercen en la detección del CCR (mayores OR) son EDIL3, MAPKAPK3 y HCK, mientras que en ELISA son GTF2B, STK4 y p53. En todos los casos la OR se encuentra entre $1,0 < OR < 1,5$. En líneas generales, observamos que la estimación de las OR en Luminex es más precisa que en ELISA. En Luminex los intervalos de las OR están más distanciados en el diagrama mientras que los intervalos de confianza de ELISA se solapan. Observamos que AKT1, que era poco significativo en los resultados anteriores en Luminex también presenta un amplio intervalo de confianza de su OR en ELISA, lo que pone de manifiesto la incertidumbre acerca de su valor diagnóstico.

Posteriormente, evaluamos la capacidad diagnóstica de cada AAT calculando su área bajo la curva ROC (AUC) (Tabla 11). Observamos que la mayoría de AAT se caracterizaban por tener una $AUC > 0,60$ en ambas técnicas. En Luminex observamos dos comportamientos, una mayoría de antígenos con un $AUC > 0,72$ mientras que AKT1, IRAK4 y PIM1 cuentan con $0,50 < AUC < 0,60$ y serían prácticamente descartables. Esta situación discrimina mejor el valor de cada AAT respecto a los resultados del ELISA, cuyas AUC se encuentran entre 0,58 y 0,68. En Luminex, las AUC de AKT1, IRAK4 y PIM1 concordaron con las OR observadas cercanas a la barra de “no efecto” (Figura 35). La inmovilización covalente de PIM1 o AKT1 a las esferas de Luminex podría implicar un menor reconocimiento de los autoanticuerpos y consecuente pérdida en la sensibilidad en estos AAT.

Tabla 11: Capacidad diagnóstica de los diferentes AAT.

AAT	Luminex		ELISA	
	AUC	Especificidad (%)	AUC	Especificidad (%)
AKT1	0.503	8.6	0.598	13.2
EDIL3	0.731	23.7	0.628	18.3
GTF2B	0.725	40	0.629	17.9
HCK	0.804	40.3	0.632	27.9
IRAK4	0.574	11.7	0.586	26.4
MAPKAPK3	0.766	26	0.644	32.2
p53	0.768	43.2	0.688	17.4
PIM1	0.523	10.7	0.636	22.9
STK4	0.726	30.1	0.644	20.5

Valores de AUC y especificidad fijando la sensibilidad al 90% obtenidos mediante Luminex y ELISA para la discriminación entre pacientes de CCR e individuos sanos (n=228).

En conjunto, los valores de p obtenidos en la discriminación de pacientes de CCR del resto de controles, los mayores valores de AUC de los AAT obtenidos a través de Luminex y todas las pruebas estadísticas realizadas, demostraron que Luminex era superior al ELISA. La menor cantidad de reactividades inespecíficas de los pacientes control y el mayor rango dinámico de Luminex contribuyen a que las respuestas específicas sean más altas. Además, su robustez en la determinación de la fluorescencia permite reducir los falsos positivos y aumentar la especificidad del test.

3.7. Ausencia de sesgo por el hospital de procedencia de la muestra

Para comprobar si los resultados anteriores estaban sesgados debido a la obtención de las muestras en diferentes hospitales, aplicamos las mismas pruebas estadísticas sobre pacientes sanos. Observamos que ningún AAT fue capaz de discriminar a los pacientes sanos en función del hospital, excepto HCK que mostró

valores cercanos a la significación (Tabla 12). Esto descartó la presencia de sesgos importantes de selección de pacientes, y demostró que los niveles de autoanticuerpos no estaban asociados a ningún hospital en concreto.

Tabla 12: Estudio de posibilidades de sesgo en la selección de muestras por la procedencia de la muestra. Significación estadística en pacientes sanos medidos mediante Luminex.

	Valor de p*
AKT1	0.7153
EDIL3	0.4993
GTF2B	0.1627
HCK	0.0792
IRAK4	0.7554
MAPKAPK3	0.1561
p53	0.3640
PIM1	0.8165
STK4	0.2877

*Significación correspondiente a la prueba de Kruskal Wallis

3.8. Selección de AAT no redundantes para el diagnóstico de CCR

Para reducir el número de AAT y facilitar la transferencia del panel de diagnóstico a la clínica es necesario descartar aquellos AAT redundantes que no aporten información al panel. Para identificarlos ejecutamos una selección de variables “*backwards stepwise*” utilizando el paquete “rms” en la cohorte de pacientes de CCR e individuos sanos (n=228).

La selección se ejecutó sin forzar ningún parámetro, con el objetivo de comprobar la potencia de los AAT comparándola con las variables demográficas. La predicción informática permitió ejecutar la siguiente regresión logística multivariante sobre los datos de Luminex. Los AAT seleccionados fueron p53, HCK, EDIL3, GTF2B, STK4 y PIM1, junto con la edad, y donde PIM1 se caracterizó por su coeficiente negativo que ya mostraba en la regresión univariante (Figura 35). Aunque mejoraron el modelo diagnóstico, EDIL3, GTF2B y STK4 no resultaron estadísticamente significativos en el análisis multivariante. Esto implicaba que dichos AAT aportaron información útil para el diagnóstico, pero dependientes de otros factores. Observamos que solo HCK y p53 fueron AAT independientes con un coeficiente positivo, asociando la aparición de autoanticuerpos a una mayor probabilidad de contraer cáncer. Como era de esperar, también fue significativamente independiente la edad, ya que apenas hay pacientes jóvenes con cáncer (Tabla 13). En la regresión logística multivariante tuvimos en cuenta tanto el género del paciente como la edad, ya que queríamos estudiar si se producían efectos cruzados entre los autoanticuerpos específicos y alguna de las variables demográficas.

Los AAT seleccionados fueron p53, HCK, EDIL3, GTF2B, STK4 y PIM1, junto con la edad, y donde PIM1 se caracterizó por su coeficiente negativo que ya mostraba en la regresión univariante (Figura 35). Aunque mejoraron el modelo diagnóstico, EDIL3, GTF2B y STK4 no resultaron estadísticamente significativos en el análisis multivariante. Esto implicaba que dichos AAT aportaron información útil para el diagnóstico, pero dependientes de otros factores. Observamos que solo HCK y p53 fueron AAT independientes con un coeficiente positivo, asociando la aparición de autoanticuerpos a una mayor probabilidad de contraer cáncer.

Como era de esperar, también fue significativamente independiente la edad, ya que apenas hay pacientes jóvenes con cáncer.

Tabla 13: Modelo diagnóstico obtenido mediante regresión logística multivariante utilizando los datos de Luminex.

Parámetro	Referencia	Coefficiente estimado	Error estándar	Wald Chi-Square	Valor de p
Intercepto		-3.9824	0.8882	20.1018	<.0001
EDIL3		0.000196	0.000121	2.6122	0.1060
GTF2B		-0.00010	0.000068	2.0000	0.1573
HCK		0.000181	0.000047	14.8112	0.0001
p53		0.000161	0.000040	16.5605	<.0001
PIM1		-0.00012	0.000056	4.9831	0.0256
STK4		0.000077	0.000056	1.9121	0.1667
Edad		0.0582	0.0138	17.8419	<.0001
Género	femenino	-0.0315	0.3892	0.0066	0.9354

La unidad de referencia para estimar el coeficiente del parámetro edad es 1 año. Se incluyen los AAT seleccionados por el programa “rms”, así como las variables demográficas.

En la regresión logística, el sexo femenino tenía un coeficiente negativo, ya que solo un 38% de pacientes de CCR eran mujeres frente al 50% de los pacientes control. El mayor peso de cada uno de los AAT en la regresión en Luminex hace que el valor de p del género sea menos significativo, y por tanto que la variable género tenga menos relevancia en Luminex en ELISA. La asociación observada entre altos niveles de autoanticuerpos y la variable género ya se había descrito previamente [294].

3.9. Capacidad diagnóstica del modelo basado en AAT

Para comprobar la utilidad clínica del algoritmo obtenido de Luminex, aplicamos el modelo predicho a diferentes poblaciones, obtuvimos su curva ROC (Figura 36), y lo comparamos con el predicho para ELISA. Observamos que el modelo determinado para Luminex desarrolló mayor potencial diagnóstico, con una AUC cercana al 0,90 frente al 0,81 de ELISA (Figura 36A), demostrando nuevamente la mejora significativa que supone detectar los niveles de autoanticuerpos mediante Luminex. Asimismo, este modelo presentó una especificidad en el diagnóstico 1,5 veces mayor que el ELISA (42% vs 66%), manteniendo una sensibilidad al 90%. El modelo Luminex presentó mayor robustez frente a la inclusión de 40 pacientes con enfermedades relacionadas (14 con enfermedades inflamatorias intestinales y 26 pacientes con cáncer de mama, vejiga, y tumor estromal gastrointestinal (GIT)) y se caracterizó por una especificidad del 56% manteniendo una sensibilidad al 90% (Figura 36B).

Para demostrar que la capacidad diagnóstica de los AAT era independiente de la edad, la eliminamos del modelo y pudimos ampliar la muestra a 307 pacientes utilizando 39 muestras de pacientes afectados de cáncer de mama y vejiga cuya edad no estaba documentada (Figura 36C). El modelo mantuvo una AUC=0,812, resultando en una especificidad del 54% para un 90% de sensibilidad fijada. Comprobamos que cuantos más pacientes añadíamos, la diferencia de Luminex respecto a ELISA en sus AUC's era mayor y el valor de p de su diferencia se iba reduciendo (Figura 36).

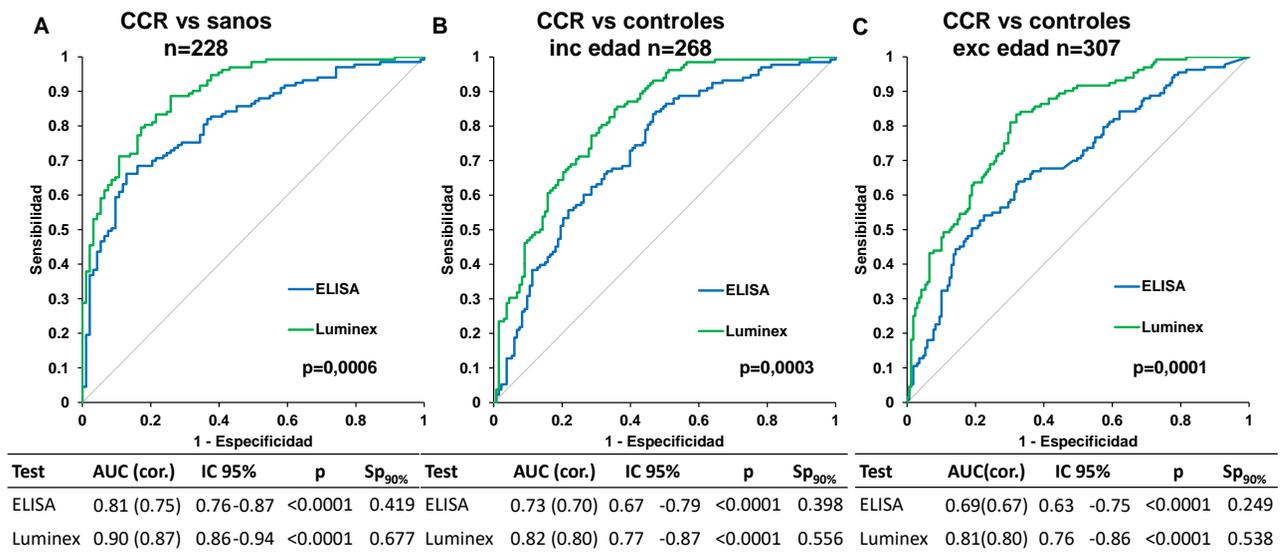


Figura 36: Comportamiento del algoritmo diagnóstico de Luminex mediante curvas ROC en CCR. Se detalla el valor de AUC y su valor corregido por *bootstrapping* entre paréntesis y el valor de especificidad fijando la sensibilidad al 90% para los modelos obtenidos por Luminex y ELISA. A. Estudio sobre una cohorte de pacientes con CCR e individuos sanos. B. Estudio sobre una cohorte de pacientes que incluye pacientes sanos, CCR, enfermedades inflamatorias intestinales y otros tipos de cáncer. C. Estudio sobre una cohorte mayor de pacientes que incluye pacientes sanos, de CCR, de enfermedades inflamatorias intestinales y otros tipos de cáncer. Este algoritmo prescinde de la edad, ya que no todas las muestras la tuvieron registrada. Cor.: corregido

En conjunto, estos resultados revelan que el diagnóstico con Luminex es más independiente de la edad que el ELISA, lo que lo convierte en una técnica más robusta para el diagnóstico de CCR. Del mismo modo, la corrección de la AUC en la validación por *bootstrapping*, siempre era menor en Luminex (0,80 utilizando $n=307$), lo que significa que los resultados de esta tecnología son más universalizables y generalizables a la población general que el ELISA, donde la mayor corrección de la AUC muestra que se produce una sobreestimación del optimismo en su construcción (*overfit*).

Globalmente, estos resultados sugieren que el diagnóstico de CCR a través de Luminex superaría en rendimiento diagnóstico los resultados de ELISA y presentaría menos inconvenientes en su implementación clínica.

3.10. Especificidad del modelo diagnóstico de Luminex frente a otros tipos de cáncer

Para asegurarnos de que el algoritmo de diagnóstico de Luminex era específico de CCR frente otros tipos de cáncer, usamos una regresión logística multivariante utilizando los mismos AAT seleccionados anteriormente en una cohorte compuesta por 135 pacientes con CCR y 65 pacientes con otros tipos de cáncer. Excluimos del análisis las variables género y edad ya que había sido omitida en el registro de alguno de los pacientes (Tabla 14).

En el modelo, tanto PIM1 como p53 mantienen su significación multivariante a la hora de discriminar pacientes de CCR frente a pacientes con otros tipos de cáncer. PIM1 mantiene su coeficiente negativo, lo que revela alguna interacción con otra variable. Aunque EDIL3 y GTF2B no son significativos y su coeficiente está cercano a 0 (no efecto, $OR=1$), cambian de signo en el modelo sugiriendo una interacción molecular con otro de los AAT que se encuentran en el modelo, un fenómeno ya descrito anteriormente [222].

Tabla 14: Regresión logística multivariante en Luminex para la discriminación de pacientes de CCR frente a pacientes con otros tipos de cáncer.

Parámetro	Coefficiente estimado	Error estándar	Wald Chi-Square	Valor de p
Intercepto	0.2833	0.4112	0.4745	0.4909
EDIL3	-0.00003	0.000076	0.1943	0.6594
GTF2B	0.000114	0.000076	2.2253	0.1358
HCK	0.000051	0.000036	1.9658	0.1609
p53	0.000125	0.000037	11.2449	0.0008
PIM1	-0.00012	0.000055	5.1124	0.0238
STK4	0.000044	0.000043	1.0500	0.3055

La existencia de parámetros significativamente independientes en Luminex nos indica que el algoritmo basado en Luminex funciona incluso al distinguir aquellos pacientes de CCR de pacientes con otros tipos de cáncer. La ausencia de parámetros en ELISA, por el contrario, induce a pensar que su rendimiento será pobre al descartar pacientes de enfermedades relacionadas. Para comprobarlo, comparamos el rendimiento de ambos algoritmos y representamos sus curvas ROC (Figura 38).

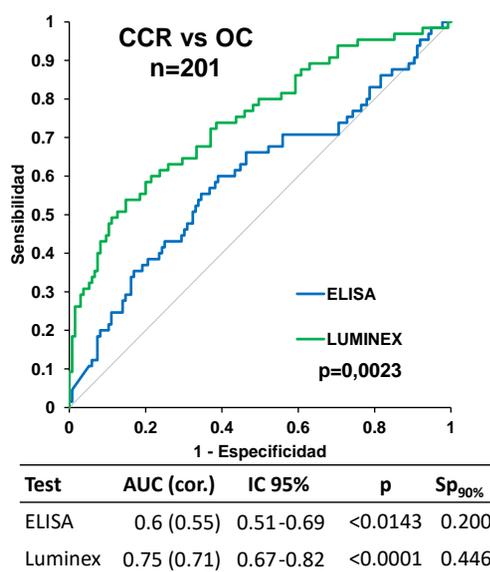


Figura 37: Especificidad frente a otros tipos de cáncer del algoritmo diagnóstico de CCR basado en autoanticuerpos representado a través de curvas ROC. Luminex mantiene una capacidad predictiva importante frente a una importante pérdida de la AUC de ELISA. Se detalla el valor de AUC y su valor corregido por *bootstrapping* entre paréntesis y el valor de especificidad fijando la sensibilidad al 90%. Cor.: corregido

Las curvas ROC revelaron un mejor comportamiento de Luminex para diagnóstico (0,74 vs 0,60, $p=0,0023$). Los valores de AUC corregidos presentaron similar magnitud. La AUC corregida de Luminex se mantuvo superior a 0,70, confirmando su capacidad de discriminar a pacientes con otros tipos de cáncer y su utilidad en poblaciones externas. Sin embargo, la AUC de ELISA se corrigió en un valor de 0,55, manifestando la inferioridad de esta técnica para discriminar a pacientes de otros tipos de cáncer.

3.11. Utilidad del modelo para la detección temprana de CCR

Dado que uno de los principales problemas en el cáncer de colon es su diagnóstico tardío, estudiamos la capacidad diagnóstica del modelo en la detección en estadios tempranos frente a pacientes sanos (Figura 38). Para dilucidar el papel de cada AAT tanto en pacientes tempranos como en no metastásicos, estimamos los coeficientes mediante una regresión logística multivariante (Tabla 15).

Tabla 15: Regresión logística multivariante en Luminex para la discriminación de pacientes tempranos (estadios I-II) frente a pacientes sanos.

Parámetro	Coefficiente estimado	Error estándar	Wald Chi-Square	Valor de p
Intercepto	-4.0937	0.9822	17.3706	<.0001
EDIL3	0.000197	0.000140	1.9731	0.1601
GTF2B	-0.00011	0.000074	2.0602	0.1512
HCK	0.000182	0.000055	10.7093	0.0011
p53	0.000093	0.000048	3.8254	0.0505
PIM1	-0.00011	0.000066	2.6599	0.1029
STK4	0.000052	0.000064	0.6758	0.4110
Edad	0.0529	0.0156	11.4542	0.0007
Sexo	-0.3271	0.4618	0.5017	0.4787

La detección de pacientes tempranos (estadios NO, I-II) supuso una ligera pérdida de significación en el algoritmo de Luminex ya que solo HCK mantiene una alta significación mientras que p53 se queda en el umbral. Esto pone de manifiesto una mayor relevancia de HCK para la detección de pacientes tempranos que en la detección de pacientes totales, como vimos anteriormente (Tabla 13). Por otro lado, la regresión del algoritmo de Luminex sobre los pacientes no metastásicos también confirma a HCK como AAT independiente (Tabla 16).

Tabla 16: Regresión logística multivariante en Luminex para la discriminación de pacientes de CCR no metastásicos (I-II-III) frente a pacientes sanos.

Parámetro	Coefficiente estimado	Error estándar	Wald Chi-Square	Valor de p
Intercepto	-4.2758	0.9229	21.4641	<.0001
EDIL3	0.000243	0.000132	3.4044	0.0650
GTF2B	-0.00012	0.000069	3.1230	0.0772
HCK	0.000172	0.000050	11.9905	0.0005
p53	0.000141	0.000040	12.1419	0.0005
PIM1	-0.00011	0.000057	3.4317	0.0640
STK4	0.000084	0.000056	2.2293	0.1354
Edad	0.0600	0.0144	17.3272	<.0001
Sexo	-0.1560	0.4081	0.1461	0.7023

Además, tanto las regresiones sobre pacientes no metastásicos (Tabla 16) como sobre el total de los pacientes (Tabla 13), incluyen a p53 como AAT significativamente independiente. Este hecho revela que es un AAT cuya significación depende de la presencia de pacientes tardíos. Por otra parte, al igual que en la regresión sobre pacientes tempranos, PIM1 pierde su significación aunque mantiene su coeficiente negativo, hasta

colocarse en la magnitud de EDIL3 y GTF2B, que podríamos considerar en el umbral de la significación ($0,05 < p < 0,10$).

Al igual que en resultados previos, tanto en la detección de estadios tempranos (I-II) como en estadios no metastásicos (I-II-III), la detección por Luminex es significativamente superior a la detección por ELISA, mostrando valores mucho más altos de especificidad cuando se fijaba la sensibilidad a un 90%, 64% y 67% frente a un 34% y 36%, respectivamente. Llama la atención que a especificidades altas (92-96%), la sensibilidad del algoritmo de Luminex se dispara hasta un 60%, lo que reduce de manera drástica los falsos negativos de este test. La corrección de la AUC del algoritmo de Luminex, tanto en estadios tempranos como no metastásicos, es menor a dos centésimas. Esta escasa corrección sugiere la escalabilidad de los resultados obtenidos a un universo muestral más amplio.

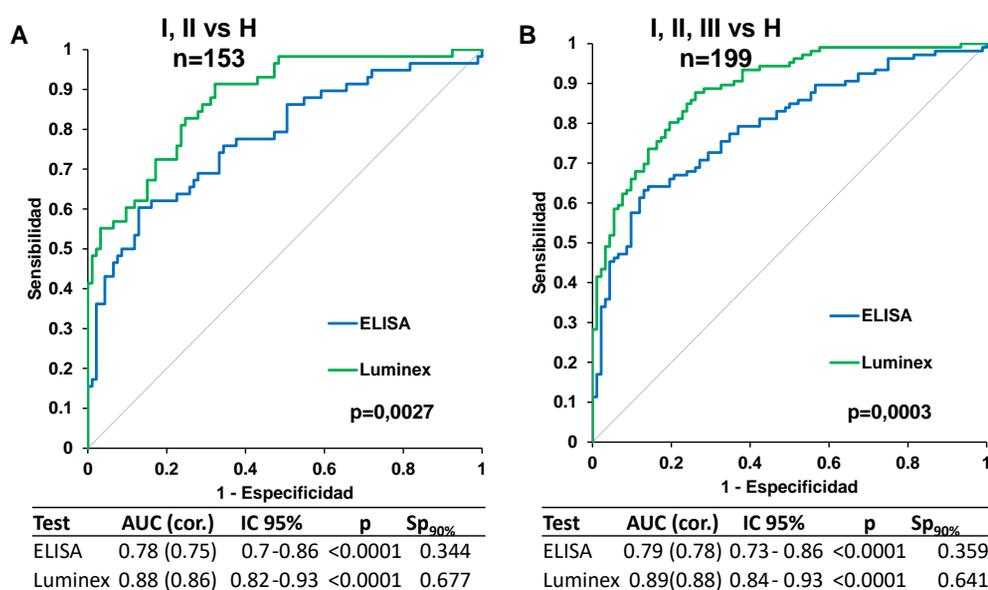


Figura 38: Capacidad diagnóstica de la detección temprana de CCR. Se detalla el valor de AUC y su valor corregido por *bootstrapping* entre paréntesis y el valor de especificidad fijando la sensibilidad al 90% para Luminex y para ELISA. A. Detección de fases no invasivas del tumor I y II. B. Detección de fases no metastásicas del tumor I, II y III.

3.12. Evaluación de la implementación clínica de un test diagnóstico basado en Luminex

Para profundizar en el uso de Luminex como método de cribado poblacional buscamos el punto de corte del polinomio que opera con los niveles de autoanticuerpos y otras variables analizadas (Tabla 17). Este polinomio se denomina logit, y el punto de corte seleccionado determina su sensibilidad, especificidad, su valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) así como su precisión diagnóstica (*accuracy*) [140].

Como posibles escenarios reales, utilizamos las comparativas CCR vs H y CCR vs “todos controles” por considerarlas de mayor interés y más representativas de una población general. Para cada una de las dos poblaciones, supusimos dos puntos de corte que definían sensibilidades aceptables para una prueba de diagnóstico y que son habituales en la literatura para el diagnóstico molecular: 95% y 90%. Para el cálculo de los parámetros clínicos, asumimos una prevalencia del cáncer colorrectal a cinco años de 89.705 casos sobre

los 581.688 casos sobre todos los cánceres excluyendo cáncer de piel no melanoma [5, 295, 296]. Equiparamos este porcentaje de prevalencia al que podría sufrir la población de riesgo que se sometería a una prueba de cribado. La prevalencia sobre el total de población española mayor de 15 años es de 226,3 casos de cada 100.000 ciudadanos.

Tabla 17: Utilidad clínica del algoritmo diagnóstico propuesto.

Escenario	Sens	Valor de corte del logit	Espec	IC 95% (especificidad)		LR+	LR-	VPP	VPN
CCR vs H	0.902	-0.48934122	0.677	0.573	- 0.771	2.79	0.15	0.337	0.974
	0.955	-0.91657961	0.602	0.495	- 0.702	2.4	0.08	0.304	0.986
CCR vs resto	0.902	-0.72409767	0.564	0.475	- 0.650	2.07	0.17	0.273	0.969
	0.955	-1.0188505	0.226	0.158	- 0.306	1.23	0.2	0.183	0.965

LR+: Ratio de probabilidad positiva, LR-: Ratio de probabilidad negativa, VPP: Valor predictivo positivo VPN: Valor predictivo negativo

Las ratios positivas de probabilidad superaron el 2 en los tres primeros supuestos, dada la especificidad superior al 55% que mostraban, lo que supone un incremento notable y significativo de las probabilidades de contraer CRC después de un resultado positivo en el test. Solo en el caso de CCR vs resto fijando la sensibilidad al 95% el ratio de probabilidad positiva baja del 2, con una especificidad del 23%.

En todos los casos se superó un VPP (complementario de la FDR, *False Discovery Rate*) de 0,15, validando la prueba para un cribado sobre población de riesgo sin provocar excesivos costes al sistema sanitario por falsos positivos, según directrices anteriormente publicadas [140]. Del mismo modo, en todos los casos el cVPN (también conocida como *FOR*, *False Omission Rate*) es menor a 0,035, minimizando la cantidad de personas que proporcionando un resultado negativo del test, desarrollarían la enfermedad.

En conjunto, nuestros datos sugieren que el método de detección de autoanticuerpos de CCR basado en Luminex podría ser utilizado como método de cribado poblacional para facilitar la detección de individuos que sufren lesiones tumorales de cáncer de colon en las primeras etapas de la enfermedad. Globalmente, este método de detección podría utilizarse en poblaciones de riesgo, e individuos mayores de 50 años que no quieran hacerse una colonoscopia.

4. Estudio de la asociación de los autoanticuerpos con el pronóstico de los pacientes de CCR

Como último objetivo de esta Tesis Doctoral, decidimos estudiar el valor pronóstico de los autoanticuerpos en pacientes de CCR ya diagnosticados. Debido a la gran variabilidad en la evolución de los pacientes con CCR que ocasiona situaciones de sobre- e infra-tratamiento quirúrgico, farmacológico o radioterápico, encontrar un panel de AAT asociado al pronóstico y supervivencia de los pacientes de CCR, permitiría personalizar el tratamiento de los pacientes de CCR.

Así, hemos estudiado el valor de los autoanticuerpos para determinar la capacidad de predecir una recaída temprana (anterior a 2 años), una recaída tardía (anterior a 5 años), y hemos realizado estudios de pronóstico en relación al intervalo libre de enfermedad (ILE) y a supervivencia global (SG) utilizando una cohorte de 95 pacientes (Tabla 18). A partir de los resultados previos de diagnóstico, decidimos incluir los

siguientes AAT en este estudio: AKT1, EDIL3, FGFR4, GTF2B, HCK, IRAK4, MAPKAPK3, p53, PAK1, PIM1, PRKD2, SRC, STK4 y TRIM21; usando GST y EBNA-1 como control negativo y positivo, respectivamente.

4.1. Características clínicas de la cohorte de pacientes del estudio

Los 95 pacientes reclutados fueron tratados con cirugía paliativa, radical (o curativa) o exploratoria en un 16,84%, 82,11% y 1,05%, respectivamente (Tabla 18). Después del tratamiento, esta cohorte fue seguida durante más de diez años para obtener datos de supervivencia global. Adicionalmente, 75 de los 95 pacientes a los cuales se les había realizado cirugía radical con el objetivo de curar la enfermedad disponían de datos de seguimiento de intervalo libre de enfermedad.

Tabla 18: Descripción clinicopatológica de la cohorte de estudio.

Estadio AJCC	n	Género		Edad Mediana (RIC)*	Localización del tumor primario		
		Hombres	Mujeres		Recto (%)	Colon izquierdo (%)	Colon derecho (%)
Casos totales	95	62	33	66 (14)	38 (40%)	34 (36%)	23 (24%)
I	13	12	1	67 (14)	6 (16%)	5 (15%)	2 (9%)
II	34	23	11	67,5 (14)	10 (26%)	14 (41%)	10 (43%)
III	29	17	12	66 (18)	15 (39%)	9 (26%)	5 (22%)
IV	19	10	9	65 (17)	7 (18%)	6 (18%)	6 (26%)

*RIC, rango intercuartílico.

El periodo de seguimiento de los 95 pacientes engloba el intervalo desde la cirugía posterior al diagnóstico hasta la última visita médica o el fallecimiento del paciente. Durante este periodo, se registraron 16 recaídas en la cohorte ILE (de 75 pacientes) y 34 fallecimientos en la cohorte SG (de 95 pacientes). La mediana del seguimiento en la cohorte ILE fue de 77,7 meses (rango 1,53-148,7), mientras que un 20% de los pacientes había sido censurado antes de 60 meses de seguimiento y un 81,3% de los pacientes había sido censurado antes del mes 120 desde su diagnóstico. Por otro lado, la mediana de seguimiento de los pacientes de la cohorte SG (para la totalidad de pacientes) fue de 75,7 meses, con un rango de seguimiento entre 0,26 y 148,7 meses. El 30,5% de los pacientes había sido censurado antes de 60 meses, mientras que antes de los 120 meses había sido censurado el 66% de los pacientes.

Las causas de censura en la cohorte de estudio incluyen alta (9%), exitus postoperatorio (muerte a causa del tratamiento, 1%), muerte por otras causas (21%), muerte por toxicidad (1%) y pacientes cuyo seguimiento se perdió por causas desconocidas (1%). Del total de 95 pacientes un 33% de los pacientes habían fallecido a causa del cáncer y un 34% permanecían vivos sin enfermedad al final del seguimiento.

Con el fin de asegurar que nuestra muestra experimental era representativa de los pacientes de CCR, se realizaron regresiones de Cox univariadas para ILE y SG de los datos clinicopatológicos. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en función del sexo, de la localización del tumor, ni del estadio (I-III). Las variables edad (mayor y menor de 50 años) y estadio IV se utilizaron como controles positivos, dada su relevancia en pronóstico [297]. Los pacientes menores de 50 años presentaban mayor tendencia a la recidiva (Figura 39A), aunque no presentaron diferencias en la mortalidad (Figura 39B). Los pacientes no metastásicos presentaron una mayor probabilidad de supervivencia y un mejor ILE

(Figura 39). En conjunto, este comportamiento de las variables demográficas comprueba que la cohorte no está sesgada y es apta para la validación de biomarcadores asociados a pronóstico.

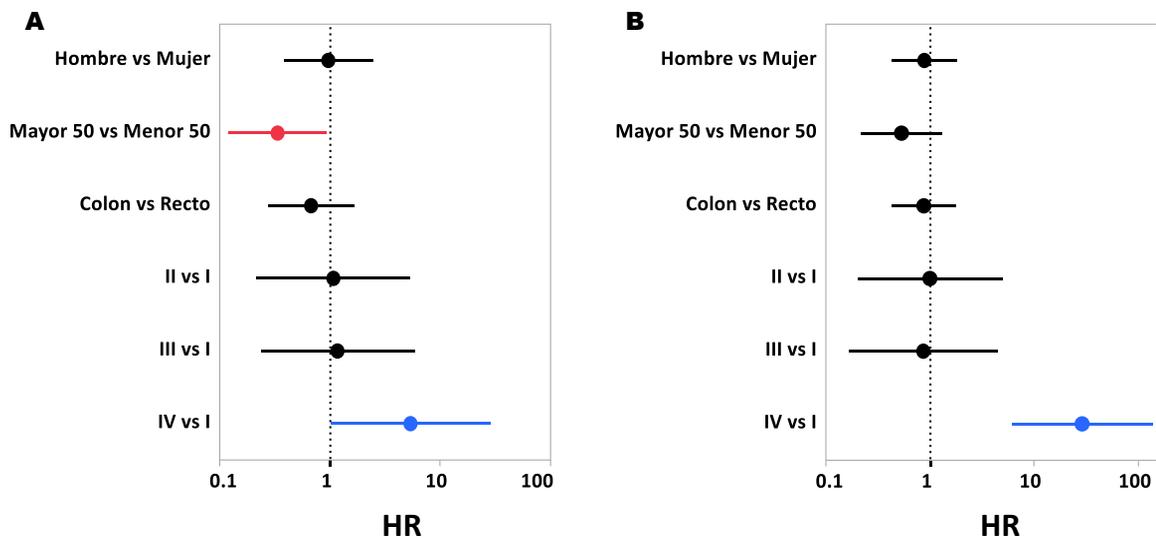


Figura 39: Diagrama de bosque representando HR, Hazard Ratio en función de los parámetros clinicopatológicos. A. Intervalo libre de enfermedad. B. Supervivencia global. Las variables asociadas a un mal pronóstico se representan en azul, y a un buen pronóstico en rojo. Las variables no significativas se muestran en negro.

4.2. Determinación de los valores de corte de reactividad para cada AAT

Para conferir reproducibilidad a las pruebas inmunológicas, así como determinar la utilidad clínica de los AAT, es necesario estandarizarlas y establecer valores de corte que definan el resultado positivo o negativo de la reactividad frente a un AAT. El nivel de autoanticuerpos para cada AAT fue determinado mediante ELISA indirecto. Para su calibrado y normalización se utilizaron diluciones seriadas de la mezcla maestra de sueros empleada en la cohorte de optimización descrita en materiales y métodos. Las diluciones seriadas de esta mezcla de sueros permitieron normalizar las absorbancias indicadas (Tabla 19) y establecer un título de anticuerpos específico para cada paciente y AAT (Tabla 20). La normalización por GST permite desechar las interacciones inespecíficas que podrían provocar un falso positivo, provocando valores más pequeños que las absorbancias crudas y la existencia de un cero técnico, que ocurre cuando el paciente no presenta una reactividad específica hacia ese antígeno.

Para identificar grupos de alto y bajo riesgo según el nivel de autoanticuerpos, los pacientes fueron clasificados como reactivos o no reactivos para cada AAT. Esta dicotomización se realizó a través de un valor de corte del título de anticuerpos obtenido a partir del suero maestro. Dicho valor de corte se determinó siguiendo el método descrito previamente [280], que relaciona la serie de datos con la variable respuesta censurada. Este método determina el punto de corte óptimo como aquel valor de la serie de datos que obtiene la separación más significativa entre las dos categorías de la variable respuesta, basándose para ello en el log-rank test. Aplicamos el método a todos los autoantígenos utilizando como variable respuesta la supervivencia global y el intervalo libre de enfermedad. Cuando el método fue capaz de optimizar un valor de corte que ofrecía una separación significativa entre dos grupos de supervivencia, dicho valor de corte fue idéntico para diferenciar tanto las variables intervalo libre de enfermedad como supervivencia global (Tabla 19).

Tabla 19: Reactividad específica frente a cada uno de los AAT de los pacientes de la cohorte de pronóstico.

Paciente	AAT (absorbancia normalizada)									
	STK4	EDIL3	AKT1	IRAK4	TRIM21	SRC	p53	MAPKAPK3	GTF2B	PIM1
s100	0,103	0,098	0,039	0,044	0,142	0,086	0,076	0,199	0,164	0,034
s101	0,171	0,420	0,185	0,189	0,095	0,083	0,050	0,268	0,286	0,100
s105	0,000	0,132	0,028	0,026	0,187	0,172	0,141	0,178	0,162	0,013
s106	0,129	0,515	0,464	0,426	0,134	0,196	0,049	0,250	0,352	0,181
s107	0,190	0,203	0,146	0,157	0,077	0,096	0,202	0,298	0,446	0,054
s108	0,198	0,479	0,150	0,190	0,062	0,273	0,223	0,365	0,522	0,184
s109	0,214	0,049	0,054	0,130	0,070	0,054	0,290	0,175	0,206	0,000
s110	0,328	0,510	0,281	0,807	0,066	0,105	0,257	0,333	1,138	0,134
s111	0,000	0,264	0,374	0,002	0,057	0,254	0,144	0,114	0,265	0,621
s112	0,385	0,430	0,042	0,255	0,123	0,257	0,501	0,094	0,813	0,031
s113	0,125	0,314	0,301	0,145	0,096	0,239	0,361	0,207	0,233	0,047
s114	0,051	0,244	0,140	0,000	0,146	0,114	0,125	0,148	0,384	0,000
s115	0,103	0,150	0,083	0,015	0,134	0,372	0,136	0,237	0,217	0,035
s116	0,064	0,395	0,083	0,122	0,063	0,687	0,048	0,287	0,345	0,020
s117	0,063	0,352	0,044	0,076	0,089	0,350	0,159	0,241	0,209	0,008
s118	0,082	0,281	0,058	0,030	0,169	0,278	0,213	0,223	0,412	0,032
s119	0,196	0,090	0,086	0,386	0,110	0,128	0,273	0,285	0,318	0,000
s120	0,390	0,264	0,068	0,141	0,068	0,223	0,134	0,151	0,180	0,050
s121	0,597	0,071	0,018	0,559	0,068	0,903	0,125	0,023	0,191	0,000
s123	0,071	0,356	0,000	0,007	0,099	0,156	0,147	0,159	0,118	0,000
s124	0,135	0,324	0,357	0,061	0,275	0,285	0,345	0,299	0,990	0,091
s125	0,526	0,515	0,415	0,463	0,067	0,429	0,118	0,427	0,437	0,196
s126	0,128	0,138	0,000	0,000	0,029	0,195	0,068	0,115	0,183	0,000
s127	0,171	0,283	0,028	0,120	0,137	0,427	0,229	0,234	0,339	0,048
s128	0,000	0,000	0,017	0,017	0,139	0,224	1,207	0,219	1,924	0,027
s129	0,153	0,316	0,261	0,467	0,120	0,182	0,145	0,246	0,208	0,009
s130	0,136	0,317	0,177	0,098	0,151	0,296	0,310	0,337	0,466	0,040
s132	0,028	0,156	0,000	0,000	0,101	0,513	0,249	0,096	0,180	0,000
s134	0,054	0,262	0,056	0,095	0,136	0,163	0,123	0,202	0,306	0,009
s135	0,270	0,334	0,141	0,127	0,129	0,213	0,207	0,252	0,560	0,139
s137	0,102	0,273	0,149	0,072	0,124	0,209	0,143	0,233	0,260	0,072
s138	0,127	0,246	0,124	0,112	0,047	0,171	0,336	0,284	0,451	0,000
s139	0,190	0,284	0,161	0,088	0,461	0,398	0,181	0,189	0,332	0,044
s140	0,182	0,521	0,386	0,185	0,280	0,355	0,174	0,316	0,526	0,094
s141	0,217	0,459	0,219	0,339	0,100	0,265	0,394	0,323	0,406	0,096
s142	0,106	0,218	0,154	0,003	0,234	0,228	0,320	0,175	0,559	0,046
s143	0,228	0,278	0,095	0,142	0,062	0,160	0,172	0,293	0,934	0,053
s144	0,178	0,214	0,338	0,104	0,078	0,122	0,097	0,135	0,340	0,101
s145	0,051	0,134	0,021	0,055	0,121	0,055	0,088	0,119	0,178	0,027
s146	0,046	0,158	0,102	0,062	0,105	0,166	0,254	0,099	0,173	0,067
s147	0,127	0,387	0,389	0,127	0,233	0,379	0,283	0,241	0,095	0,098
s148	0,237	0,588	0,189	0,176	0,160	0,116	0,182	0,348	0,251	0,105
s149	0,000	0,077	0,205	0,717	0,054	0,000	0,307	0,067	0,637	0,000
s150	0,142	0,335	0,164	0,082	0,265	0,239	0,286	0,190	0,298	0,040
s151	0,091	0,186	0,053	0,041	0,129	0,464	0,133	0,093	0,147	0,031
s152	0,049	0,175	0,100	0,060	0,089	0,206	0,019	0,148	0,128	0,089
s153	0,260	0,390	0,136	0,141	0,102	0,341	0,187	0,307	0,418	0,041
s154	0,215	0,479	0,375	0,464	0,138	0,299	0,349	0,344	0,293	0,139
s155	0,095	0,220	0,002	0,003	0,540	0,396	0,326	0,166	0,343	0,000
s156	0,059	0,212	0,011	0,046	0,478	0,216	0,360	0,185	0,633	0,051
s157	0,184	0,229	0,084	0,750	0,201	0,186	1,673	0,181	2,964	0,026
s158	0,255	0,566	0,335	0,332	0,260	0,382	0,216	0,413	3,175	0,179
s159	0,317	0,183	0,079	0,019	0,218	0,184	0,386	0,412	0,287	0,043
s160	0,020	0,061	0,053	0,054	0,214	0,044	0,096	0,060	0,548	0,000

s161	0,265	0,368	0,158	0,361	0,173	0,270	0,063	0,300	0,716	0,102
s162	0,033	0,114	0,340	0,114	0,116	0,112	0,108	0,164	0,093	0,000
s163	0,286	0,351	0,272	0,356	0,044	0,133	2,078	0,435	2,997	0,000
s164	0,004	0,066	0,000	0,078	0,101	0,107	0,669	0,168	2,427	0,000
s165	0,283	0,380	0,331	0,854	0,063	0,288	0,510	0,356	1,793	0,092
s166	0,156	0,119	0,098	0,342	0,145	0,232	0,112	0,308	0,767	0,023
s167	0,049	0,255	0,101	0,109	0,218	0,235	0,452	0,146	1,751	0,003
s168	0,020	0,060	0,021	0,006	0,209	0,153	0,144	0,157	0,355	0,000
s170	0,303	0,232	0,158	0,239	0,111	0,091	0,173	0,442	0,455	0,000
s171	0,105	0,208	0,457	0,306	0,171	0,086	0,188	0,298	1,759	0,000
s36	0,990	0,835	0,577	0,569	0,335	0,460	0,000	1,078	0,216	0,183
s40	0,091	0,319	0,232	0,169	0,279	0,142	0,368	0,209	0,667	0,065
s52	0,022	0,259	0,266	0,237	0,228	0,270	0,193	0,240	0,409	0,053
s53	0,022	0,055	0,190	0,000	0,075	0,200	0,098	0,000	0,783	0,000
s55	0,063	0,146	0,050	0,111	0,244	0,278	0,186	0,154	0,312	0,000
s57	0,338	0,440	0,211	0,272	0,220	0,311	0,004	0,224	0,173	0,052
s58	0,226	0,205	0,198	1,036	0,146	0,057	0,077	0,225	0,147	0,090
s61	0,000	0,024	0,355	0,111	0,000	0,138	0,000	0,108	0,000	0,000
s63	0,367	0,153	0,202	0,156	0,207	0,226	0,141	0,170	0,374	0,052
s64	0,118	0,400	0,184	0,907	0,178	0,334	0,034	0,303	0,319	0,002
s67	0,079	0,387	0,230	0,189	0,382	0,176	0,252	0,140	0,502	0,034
s68	0,191	0,139	0,058	0,209	0,176	0,149	0,240	0,175	0,933	0,000
s69	0,119	0,317	0,126	0,169	0,236	0,672	0,255	0,323	1,095	0,074
s70	0,121	0,177	0,084	0,271	0,143	0,160	0,090	0,203	0,140	0,021
s72	0,166	0,355	0,127	0,741	0,196	0,146	0,200	0,228	0,795	0,057
s73	0,251	0,344	0,259	0,892	0,124	0,124	0,117	0,311	0,252	0,045
s74	0,301	0,057	0,103	1,012	0,072	0,272	0,042	0,238	0,292	0,000
s75	0,189	0,166	0,132	0,126	0,213	0,076	0,149	0,170	0,220	0,054
s77	0,149	0,080	0,043	0,030	0,241	0,143	0,254	0,231	0,198	0,004
s79	0,104	0,143	0,144	0,118	0,251	0,125	0,209	0,259	0,295	0,022
s80	0,137	0,170	0,024	0,674	0,273	1,265	0,143	0,174	0,170	0,026
s82	0,160	0,213	0,200	0,185	0,296	0,357	0,316	0,208	0,984	0,044
s84	0,078	0,324	0,170	0,206	0,121	0,322	0,427	0,222	1,111	0,031
s85	0,129	0,149	0,254	0,866	0,233	0,240	0,201	0,254	0,153	0,610
s86	0,160	0,266	0,095	0,165	0,217	0,188	0,048	0,325	0,212	0,151
s87	0,161	0,111	0,111	0,092	0,111	0,116	0,033	0,105	0,191	0,000
s88	0,648	0,666	0,405	0,787	0,000	0,745	0,056	1,335	0,859	0,000
s89	0,195	0,313	0,114	0,622	0,163	0,197	0,163	0,502	0,067	0,041
s90	0,190	0,168	0,100	0,054	0,341	0,362	0,234	0,249	0,469	0,024
s91	0,113	0,259	0,115	0,151	0,213	0,107	0,070	0,407	0,621	0,023
s92	0,000	0,092	0,000	0,584	0,097	0,397	0,109	0,000	0,208	0,000
s93	0,179	0,225	0,131	0,142	0,000	0,128	0,574	0,437	1,939	0,000
s94	0,102	0,228	0,224	0,446	0,237	0,137	0,167	0,158	0,239	0,079
s96	0,122	0,148	0,000	0,155	0,182	0,136	0,311	0,153	0,320	0,000
s97	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,165	0,000	1,835	0,000
s98	0,077	0,214	0,231	0,171	0,175	0,211	0,098	0,171	0,044	0,029

Valores de absorbancia normalizados de los AAT estudiados determinados mediante ELISA en la cohorte de 95 pacientes de CCR con más de 10 años de seguimiento.

Los valores de corte para considerar un paciente reactivo para un AAT determinado oscilaron entre 1/20 (p53) y 1/870 (STK4), con la mayoría de los valores concentrados entre 1/300 y 1/600. Con estos valores de corte, pudimos observar una frecuencia o prevalencia de pacientes reactivos a cada AAT comprendida entre el 14% (p53) y el 65% (MAPKAPK3) de la población total del estudio. La mayoría de los AAT (6) tenían una prevalencia de pacientes reactivos entre el 35% y 50% de los pacientes totales. Estos valores fueron utilizados durante todo el estudio de pronóstico para considerar si un paciente era reactivo o no (Tabla 20).

Tabla 20: Valores de corte determinados para cada AAT.

AAT	Valor de corte*	Frecuencia de pacientes reactivos	
		ILE	SG
AKT1	465	26%	26%
EDIL3	535	38%	35%
GTF2B	126	38%	37%
IRAK4	524	38%	36%
MAPKAPK3	300	62%	65%
p53	20	12%	14%
PIM1	173	47%	45%
SRC	334	56%	54%
STK4	870	50%	48%
TRIM21	448	45%	49%

*Valor de Corte: Dilución a partir de la cual se considera un paciente reactivo.

El algoritmo de determinación del valor de corte analizó todos los valores posibles para HCK, FGFR4, PRKD2 y PAK1. Sin embargo, no se encontró ninguna asociación estadísticamente significativa con las tendencias de supervivencia mediante la prueba log-rank y fueron descartados de ulteriores análisis (Figura 40). Tampoco resultaron significativas las proteínas control GST y EBNA-1.

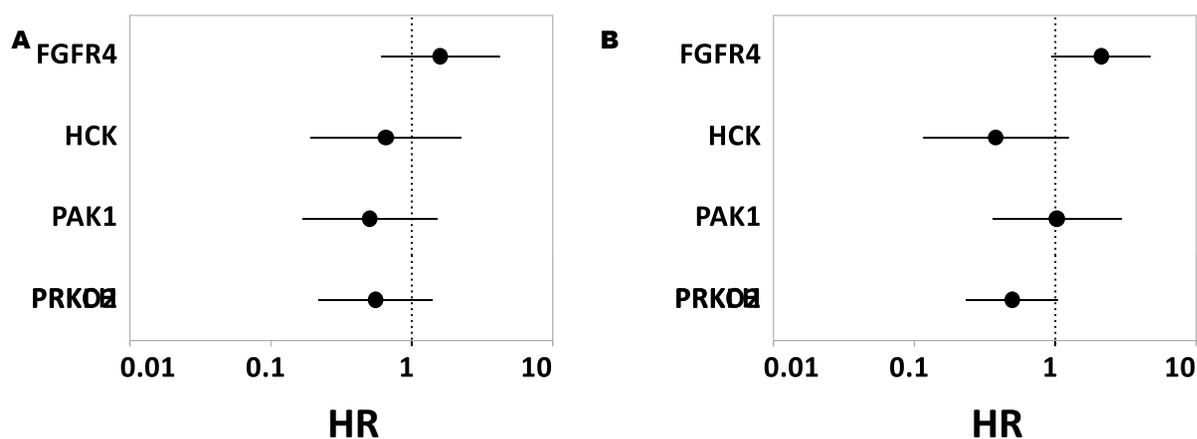


Figura 40: Diagrama de bosque representando el efecto (HR) de los AAT estadísticamente no significativos en el pronóstico de los pacientes de CCR. Razón de riesgo (Hazard Ratio, HR) de los AAT descartados en estudios ulteriores sobre la supervivencia ILE (A) o SG (B). Dada la nula significación de estos AAT se omiten sus valores en análisis posteriores (Tabla 20).

4.3. Valor de los autoanticuerpos en el pronóstico de recidivas tempranas

Actualmente, uno de los principales retos en el manejo de los pacientes diagnosticados de CCR es la detección de aquellos que sufrirán una recidiva temprana y que podrían beneficiarse de la personalización del tratamiento quimioterápico adyuvante [105]. Por ello, valoramos la capacidad de los AAT para pronosticar una recaída temprana, aquella que se produce en los dos años siguientes a la cirugía. Realizamos una regresión logística con los pacientes con ILE no censurados antes de dos años (n=71), dividiéndolos en dos grupos: un grupo compuesto por pacientes sin recidivas a los dos años (n=62), y otro grupo compuesto por aquellos pacientes cuya recidiva tuvo lugar antes de los dos años (n=9).

La regresión logística permite estimar la OR que se asigna a cada una de las variables independientes o pronosticadoras. A cada variable independiente se le asigna un valor de referencia, que en los AAT hemos asumido como la presencia de autoanticuerpos por encima del valor de corte establecido previamente. En consecuencia, la OR compara la probabilidad de recidiva antes de dos años de los pacientes reactivos frente a los no reactivos para cada AAT (Tabla 20). Si el IC del OR incluye el valor 1, se puede descartar que esta variable tenga un papel predictor en el modelo establecido. La OR de una regresión univariada nos permite comparar cada AAT con otros AAT y con el resto de variables como edad, género o localización del tumor primario, para ordenar el efecto que ejerce cada uno de ellas (Figura 41).

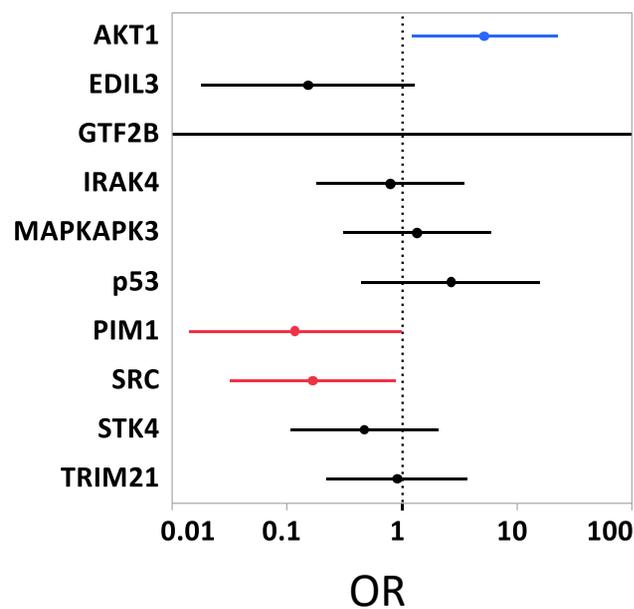


Figura 41: Diagrama de bosque representando el valor (OR) de los diferentes autoanticuerpos en la predicción de recaída tempranas. Diagrama de bosque que muestra los OR y su IC al 95% en escala logarítmica mediante análisis univariado. Los autoantígenos asociados a mal pronóstico se representan en azul. Los asociados a buen pronóstico se representan en rojo. Las variables no significativas se muestran en negro.

Obtuvimos OR significativas para SRC, PIM1 y AKT1. Mientras que niveles altos de SRC y PIM1 estaban asociados a menores probabilidades de recidiva ($OR=0,169$ y $0,117$ respectivamente), niveles altos de AKT1 indicaban una probabilidad de recaída temprana cinco veces más alta que los pacientes con niveles bajos de AKT1 ($OR= 5,29$) (Figura 41). Como era de esperar, los AAT relevantes son diferentes a los obtenidos en diagnóstico dada la diferente información que ofrecen.

La regresión logística provoca una indeterminación matemática en los coeficientes obtenidos para GTF2B. El intervalo de confianza de la OR de GTF2B va de 0 a ∞ , con una estimación central que tiende a 0. Una tabla de contingencia de GTF2B revela que en nuestra cohorte de 71 pacientes no hay ningún paciente reactivo con recaída antes de dos años desde el diagnóstico. Este 0 impide realizar una estimación de coeficientes por el método de máxima verosimilitud y produce el intervalo de confianza virtualmente infinito, ya que produce una indeterminación matemática y provoca este artefacto estadístico. No obstante, la inexistencia de pacientes reactivos con recidiva indica que los autoanticuerpos frente a GTF2B están asociados a un mejor pronóstico.

Tras comprobar el valor individual de los AAT en la predicción de recidiva durante los dos años siguientes al diagnóstico, procedimos a desarrollar un panel de AAT que pueda ser utilizado en la práctica clínica en forma de kit predictivo.

4.4. Predicción de la recidiva temprana a partir de la regresión multivariante

Con el fin de construir una herramienta de detección de la recaída temprana en pacientes en los dos años posteriores al diagnóstico, decidimos utilizar una regresión logística multivariante. De manera análoga a la metodología utilizada en diagnóstico, utilizamos los datos de reactividad de cada AAT sin dicotomizar en forma de título (datos continuos). La regresión logística multivariante nos permite estudiar si los efectos de los AAT son independientes entre sí y del resto de variables como edad, género o localización del tumor primario. Previamente, fue necesario seleccionar el número mínimo de variables para evitar la aparición de artefactos. Esta selección se realizó con la librería “rms”. Dicha selección siguió la metodología por pasos que incluye en el modelo todas las variables iniciales y que son sucesivamente eliminadas hasta que el modelo alcanza un criterio de convergencia establecido (metodología *backwards stepwise*) (Tabla 21). Como criterio de convergencia se estableció el llamado Criterio de Información de Akaike (AIC). Este método de selección se implementó con técnicas de remuestreo (*bootstrap*) que permite una validación interna no sesgada [292] utilizada previamente [222]. Excluimos GTF2B del proceso de selección para incluirla posteriormente a tenor de la indeterminación descrita anteriormente.

Tabla 21: Regresión multivariante obtenida para recidiva temprana incluyendo los parámetros clínicopatológicos.

Parámetro	Valor de referencia	Coefficientes estimados	ES [^]	Estadístico Wald Chi-Square	p (Pr > ChiSq)
Intercepto		1,8949	2,7580	0,4720	0,4921
AKT1		244,0	173,5	1,9771	0,1597
PIM1		-319,7	146,8	4,7416	0,0294
Edad	Mayor 50 vs menor 50	-0,0407	0,0409	0,9899	0,3198
Sexo	Mujer vs Hombre	-0,3247	0,4968	0,4272	0,5134
Estadio	II vs I	-0,9766	1,1310	0,7457	0,3878
Estadio	III vs I	-0,4868	1,1264	0,1868	0,6656
Estadio	IV vs I	0,7197	1,9082	0,1422	0,7061
Localización	colon vs recto	-0,2984	0,9142	0,1065	0,7441

[^]ES, Error estándar. Los grados de libertad de los diferentes parámetros son 1.

El algoritmo seleccionó PIM1 y AKT1 junto con los datos clínico-patológicos (Tabla 21). El modelo de regresión logística para pronóstico permite apreciar que solo PIM1 es independiente del resto de variables predictoras (esto es, considerando un nivel de significación de 0,05, que su coeficiente de regresión estimado es estadísticamente diferente de cero, considerando que el resto de variables predictoras están presentes en el modelo) (Tabla 21). No obstante, aunque el coeficiente de AKT1 no sea estadísticamente distinto de cero en presencia del resto de predictores (PIM1, edad, etc.), su presencia en el panel mejora el modelo. La probabilidad de recidiva con un cáncer de colon reveló ser sensiblemente menor que con cáncer de recto (coeficiente=-0,298), fenómeno ampliamente descrito en la literatura [298], lo que confirmó los resultados obtenidos. Si bien en el análisis univariante SRC es significativo, su presencia en el modelo predictivo de manera combinada con el resto de parámetros no mejora el modelo.

Para comprobar la utilidad de PIM1 y AKT1 como herramienta de detección de recidiva precoz, construimos una curva ROC con la combinación lineal descrita por la regresión logística con $AUC=0,81$ (Figura 42).

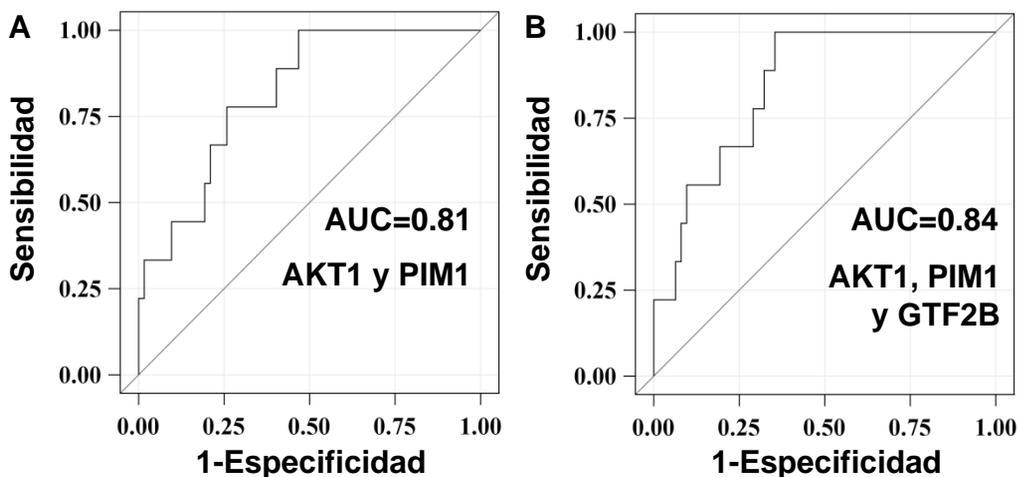


Figura 42: Identificación de pacientes de CCR que sufrirán recidiva temprana. A. Curva ROC a partir del modelo obtenido en la Tabla 21. Su sensibilidad al 90% de especificidad fijada es del 30%. B. Curva ROC para el modelo mejorado a través de la inclusión de GTF2B. Su sensibilidad al 90% de especificidad fijada es del 55%.

Para comprobar si GTF2B era un AAT de utilidad en el pronóstico de la recidiva temprana, decidimos incluirlo en una ulterior combinación y construimos su correspondiente curva ROC, obteniendo un $AUC=0,84$ que mejoraba la anterior. Por tanto, esta herramienta diagnóstica era capaz de detectar casi dos tercios de los casos con recidiva, sin incluir a los pacientes que no lo hicieron (Figura 42B).

4.5. Valor de los autoanticuerpos en la predicción de recidiva tardía y curación

Actualmente, el seguimiento mínimo de los pacientes con CCR debe alargarse hasta los 5 años; a partir de los cuales se entiende que el paciente está curado [299]. Por ello repetimos el procedimiento anterior para determinar la capacidad de los AAT para identificar a aquellos pacientes de CCR sin recidiva a los 5 años. Ajustamos una regresión logística univariada sobre los pacientes no censurados a los 5 años ($n=66$) asumiendo como valor de referencia para los AAT la presencia de autoanticuerpos por encima del valor de corte establecido en su dicotomización (Figura 43).

Los resultados de la regresión establecieron OR significativas para PIM1, p53 y GTF2B (Figura 43). Mientras que los niveles altos de GTF2B y PIM1 estaban asociados a menores probabilidades de recidiva ($OR=0,094$ y $0,24$ respectivamente), aquellos pacientes con niveles altos de p53 presentaban una probabilidad de recaída tardía casi 6 veces más alta que los pacientes con bajos niveles de p53 ($OR= 5,818$).

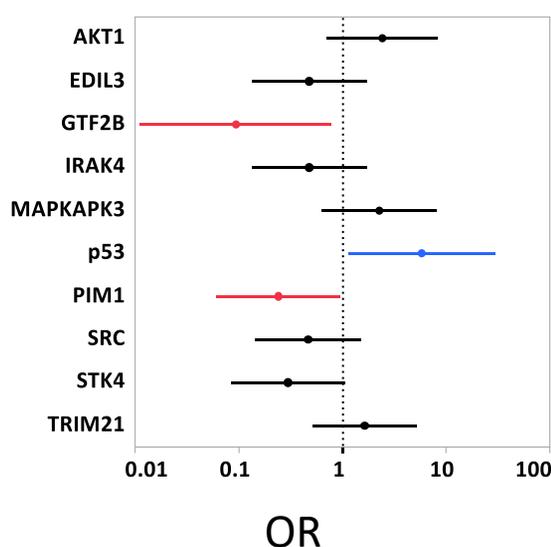


Figura 43: Diagrama de bosque representando el efecto (OR) de los autoanticuerpos frente a AAT en la aparición de recaídas tardías. Diagrama de bosque mostrando el OR de cada AAT y su IC 95% en escala logarítmica obtenido mediante el análisis univariado. Los autoantígenos asociados a mal pronóstico se representan en azul mientras que los asociados a buen pronóstico se representan en rojo. Las variables no significativas se muestran en negro.

El análisis conjunto de la recidiva a 2 y a 5 años indica que la asociación a pronóstico de cada AAT se mantiene a lo largo de la enfermedad (Tabla 22). GTF2B y PIM1 son antígenos cuya asociación a buen pronóstico se mantiene estadísticamente significativa en ambos marcos temporales. Sin embargo, nuestra muestra no nos permite obtener significación estadística para todos los AAT. Ejemplo de esto es SRC, cuyo efecto se diluye a lo largo del tiempo sin que nuestro estudio haya podido demostrar un efecto significativo en la recidiva a 5 años. AKT1 y p53 mantienen su asociación a mal pronóstico en ambos estudios, si bien AKT1 solo es estadísticamente significativo en la recidiva anterior a 2 años y p53 solo a 5 años.

Tabla 22: Resultado de la regresión logística univariada para cada uno de los AAT a dos y cinco años.

AAT	Recidiva temprana			Recidiva tardía		
	OR	OR	IC 95% ⁺	OR	OR	IC 95% ⁺
AKT1	5,209*	1,212	22,383	2,424	0,709	8,292
EDIL3	0,152	0,018	1,288	0,479	0,134	1,709
GTF2B	2,7941E-6	2,7941E-6	1E12	0,094*	0,011	0,771
IRAK4	0,792	0,181	3,468	0,479	0,134	1,709
MAPKAPK3	1,351	0,309	5,911	2,259	0,634	8,047
p53	2,667	0,448	15,858	5,818*	1,135	29,814
PIM1	0,117*	0,014	0,994	0,24*	0,061	0,955
SRC	0,168*	0,032	0,881	0,467	0,144	1,509
STK4	0,469	0,107	2,044	0,299	0,084	1,064
TRIM21	0,91	0,223	3,715	1,633	0,513	5,195

⁺OR IC 95%, Intervalo de confianza al 95% para la estimación de la OR. *AAT significativos en recidiva temprana o tardía

4.6. Valor de los autoanticuerpos a lo largo del intervalo libre de enfermedad

A continuación quisimos valorar la relación entre los AAT y el ILE a lo largo del periodo de observación. El estudio anterior fue realizado en puntos temporales determinados (2 y 5 años), a diferencia de este, que valora más de 10 años de seguimiento de la cohorte de pacientes. En este estudio longitudinal es necesario tener en cuenta la información que aportan los pacientes cuyo seguimiento ha sido censurado o truncado.

Como estudio exploratorio y descriptivo de cada AAT, se representaron las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier y, suponiendo riesgos proporcionales, se compararon las curvas mediante el test no paramétrico de log-rank. Posteriormente, se aplicó una regresión de Cox univariada para estimar las razones de riesgo de recaída (HR) para cada AAT. Estas herramientas estadísticas permiten analizar el efecto de los AAT en la aparición de recidivas a lo largo del tiempo en los pacientes estudiados.

Utilizamos los datos de supervivencia libre de enfermedad para estimar la asociación de cada AAT por separado con la capacidad de recidiva del CCR. Los 75 pacientes de la cohorte ILE (ver apartado 4.1 de resultados) fueron incluidos en el estudio de seguimiento. La muestra experimental dispuso de datos de supervivencia libre de enfermedad y se compuso en su mayoría de pacientes en estadios I, II y III, debido al mal pronóstico de los pacientes en estadio IV.

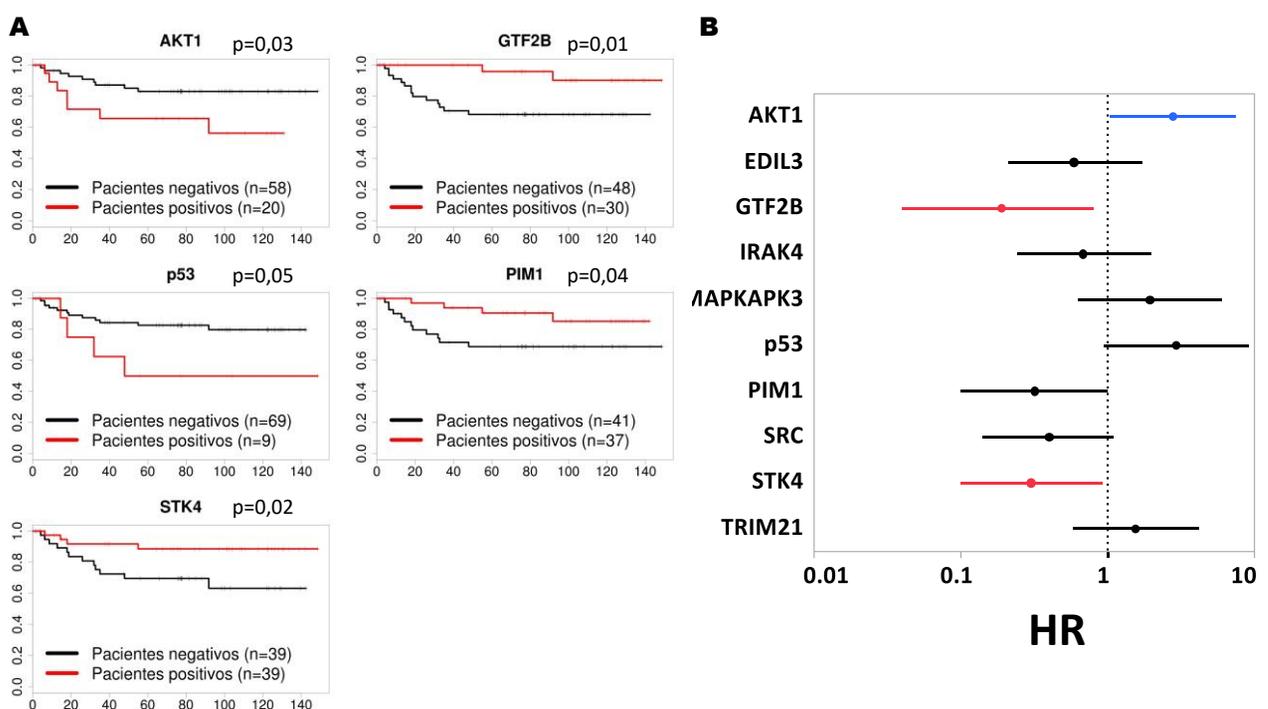


Figura 44: Predicción del riesgo de recidiva durante el seguimiento de CCR. A. Curvas de ILE de Kaplan-Meier y significación mediante prueba de log-rank. B. Diagrama de bosque para el efecto de los autoanticuerpos específicos de cada AAT según regresión de Cox univariada para ILE. Los autoantígenos asociados a mal pronóstico se representan en azul. Los asociados a buen pronóstico se representan en rojo. Las variables no significativas se muestran en negro.

El análisis de datos censurados permite incluir a todos los pacientes sin necesidad de excluir aquellos cuyo seguimiento haya sido interrumpido, obteniendo mayor significación estadística. Por otra parte, también permite observar la relevancia de los AAT a lo largo de 150 meses de seguimiento mediante curvas de Kaplan-Meier (Figura 44). Para comparar el efecto de los AAT con otros datos clínico-patológicos de referencia, realizamos un análisis previo para las variables género, localización de tumor y estadio al diagnóstico (Figura 39).

Encontramos una correlación significativa ($p < 0,05$) entre el intervalo libre de enfermedad y los niveles de autoanticuerpos frente a STK4, GTF2B, AKT1, p53 y PIM1 utilizando Kaplan-Meier y la prueba log-rank (Figura 44A). Mediante regresión de Cox univariada, pudimos comparar y ordenar el efecto de los AAT. Los

biomarcadores GTF2B y STK4 mostraron una asociación significativa al nivel de confianza del 95% hacia menor HR lo que indica un menor riesgo de recaída en pacientes con mayores niveles de autoanticuerpos para dichos AAT (Figura 44B). En esta regresión, SRC y PIM1 revelaron una asociación en el mismo sentido con menor fiabilidad (confianza del 90%). Para estos 4 AAT, los valores de HR variaron entre 0,19 (GTF2B) y 0,4 (SRC). Por otra parte, AKT1 se asoció a un mayor riesgo de recaída (HR = 2,78). Aunque p53 revelaba un alto HR y un mayor riesgo de recaída, el tamaño muestral no permitía encontrar una asociación estadísticamente significativa, dado que solo había 9 pacientes positivos para este AAT (Tabla 20).

Como vimos anteriormente (Figura 39), ni el género de los pacientes ni la localización del tumor primario mostraron una influencia estadísticamente significativa sobre la probabilidad de recidiva en este estudio. Como era de esperar, el estadio y la edad al diagnóstico sí condicionaron las probabilidades de recidiva. Así, cuando el paciente era diagnosticado en estadio IV o antes de los 50 años, las probabilidades de recidiva aumentaron significativamente.

Como se reveló en el análisis a 2 y 5 años, no todos los AAT se comportaron de la misma manera. Unos niveles altos de autoanticuerpos frente a GTF2B, PIM1, SRC y STK4 disminuyeron significativamente las probabilidades de recaída en los 3 análisis, mientras que los autoanticuerpos frente a AKT1 y p53 se asociaron a escasas probabilidades de supervivencia (Figura 44A). El análisis estadístico de la importancia de p53 no demostró diferencias significativas en la regresión de Cox, pero sí en la regresión logística. Finalmente, el AAT con mayor asociación a supervivencia libre de enfermedad resultó ser GTF2B (HR= 0,2), lo que está en consonancia con los resultados obtenidos en el estudio de recaída a 2 y 5 años realizado mediante regresión logística.

4.7. Valor de los autoanticuerpos en el pronóstico de supervivencia global

Para determinar la asociación de cada uno de los AAT con el fallecimiento de los pacientes desde su diagnóstico, utilizamos los datos de supervivencia global y técnicas de análisis de datos censurados de manera análoga a la anterior. Estas técnicas permiten aumentar la muestra y observar la relevancia de los AAT respecto al fallecimiento de los pacientes a lo largo del seguimiento de 150 meses. El total de 95 pacientes de la cohorte de seguimiento fue incluido en este estudio, aportando pacientes de todos los estadios (I-IV) y con diferentes tratamientos (cirugía exploratoria, radical o paliativa).

Para buscar diferencias en supervivencia global en función de los niveles de autoanticuerpos, representamos el grupo de pacientes reactivos (rojo) y no reactivos (negro) con curvas de Kaplan-Meier para cada AAT (Figura 45A). Se supusieron riesgos proporcionales, por lo que se aplicó el test de log-rank a las curvas de supervivencia previamente representadas y la regresión de Cox univariada (Figura 45).

Los autoanticuerpos frente a PIM1, SRC, GTF2B, MAPKAPK3, STK4, TRIM21, EDIL3 e IRAK4 revelaron una relación significativa con la supervivencia global del paciente (Figura 45A). Se observó un comportamiento diferente entre los distintos biomarcadores. Mientras que altos niveles de autoanticuerpos frente a EDIL3, GTF2B, IRAK4, PIM1, SRC y STK4 se asociaron significativamente con mayor probabilidad de supervivencia, la presencia de anticuerpos frente a MAPKAPK3 y TRIM21 se asoció significativamente a escasas probabilidades de supervivencia mediante el test de log-rank (Figura 45A).

Aplicando la regresión de Cox univariada, pudimos comparar y ordenar el efecto de cada autoanticuerpo sobre la SG (Figura 45B). Los AAT asociados a mejor pronóstico por sí mismos resultaron ser EDIL3 y GTF2B (HR = 0,35), seguidos en efecto decreciente por STK4, PIM1, SRC e IRAK4 (HR hasta 0,45). Por otra parte, MAPKAPK3 y TRIM21 (HR=2,25 y 2,28; respectivamente) se asociaron a más del doble de riesgo de muerte cuando el paciente era positivo para alguno de ellos. Ni la edad al diagnóstico ni el género de los pacientes presentaron significación a la hora de condicionar el riesgo de fallecimiento (Figura 39). Como era de esperar, el estadio del paciente condicionó el riesgo de fallecimiento durante su seguimiento, siendo este mayor cuando el paciente era diagnosticado en estadio IV, validando la metodología estadística utilizada.

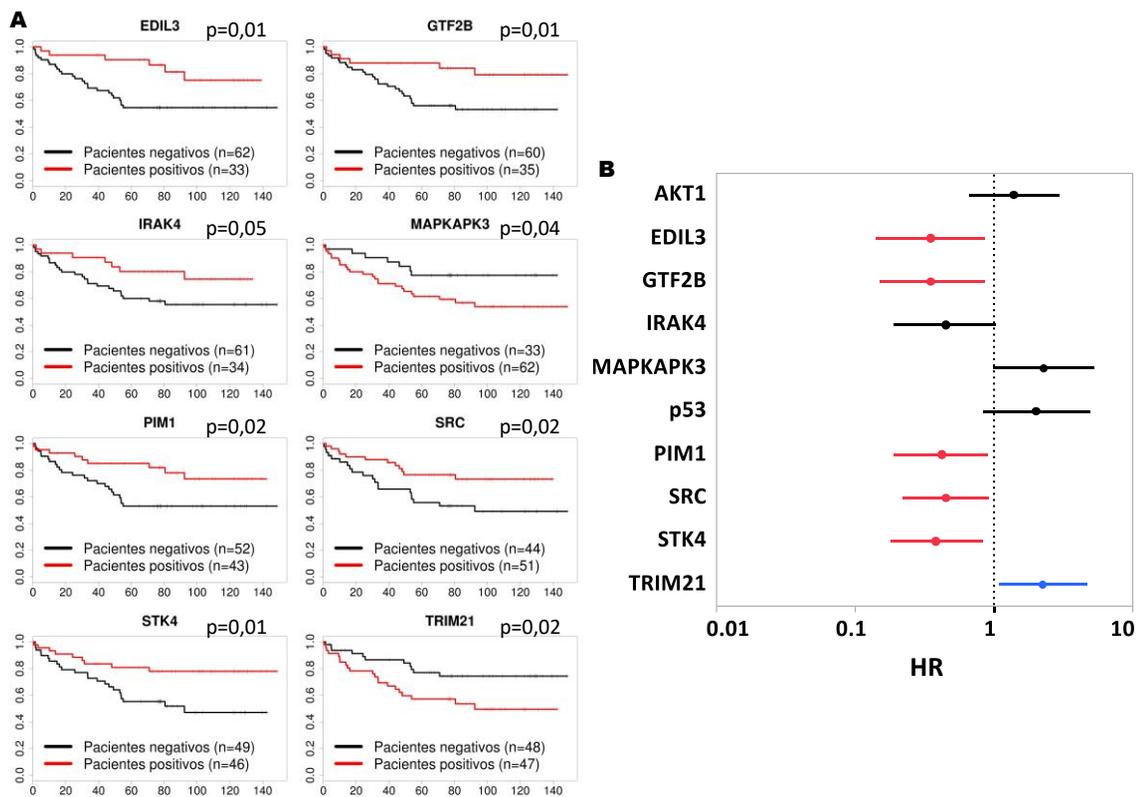


Figura 45: Los niveles de autoanticuerpos específicos condicionan el riesgo de fallecimiento de los pacientes de CCR. A. Curvas de SG de Kaplan-Meier y significación mediante la prueba de log-rank. B. Diagrama de bosque para el efecto de los autoanticuerpos específicos de cada AAT según la regresión de Cox univariada para SG. Los autoantígenos asociados a mal pronóstico se representan en azul. Los asociados a buen pronóstico se representan en rojo. Las variables no significativas se muestran en negro.

El comportamiento de los AAT respecto a la supervivencia global era similar al observado en intervalo libre de enfermedad (Figura 45B). El AAT asociado a mejor pronóstico resultó ser GTF2B (HR= 0,35), cuyos niveles elevados de autoanticuerpos se asociaron a buen pronóstico tanto en recidiva temprana, tardía, censurada o supervivencia global (Figura 45).

Se comparó el efecto de los distintos AAT sobre la recaída o el fallecimiento por enfermedad (Tabla 23). Los AAT asociados a buen pronóstico coincidieron tanto en ILE como SG. Los AAT asociados a mal pronóstico de manera significativa son distintos: anticuerpos frente a AKT1 se limitaron a incrementar el riesgo de recaída (ILE), mientras que los autoanticuerpos frente a MAPKAPK3, IRAK4, EDIL3 y TRIM21 solo se asociaron a una menor supervivencia global. Por otro lado, la asociación a buen o mal pronóstico de los autoanticuerpos se mantiene para cada AAT en cada análisis realizado. Por ejemplo, aunque AKT1 y p53 no son

estadísticamente significativos en ILE y SG, su asociación a un peor pronóstico se mantiene con diferente significación estadística.

Tabla 23: Influencia de los AAT en ILE y SG calculada a través de regresión de Cox univariada.

AAT	Intervalo Libre de Enfermedad			Supervivencia Global		
	HR [§]	HR IC 95% ⁺	Valor de p	HR [§]	HR IC 95% ⁺	Valor de p
AKT1	2,78	1,03 7,49	0,043*	1,39	0,66 2,93	0,392
EDIL3	0,59	0,21 1,71	0,331	0,35	0,14 0,85	0,02*
GTF2B	0,19	0,04 0,8	0,026*	0,35	0,15 0,86	0,022*
IRAK4	0,68	0,24 1,97	0,481	0,45	0,19 1,04	0,061
MAPKAPK3	1,94	0,63 6,02	0,251	2,28	0,98 5,26	0,055
p53	2,92	0,94 9,09	0,065	2,01	0,83 4,90	0,124
PIM1	0,32	0,10 1,01	0,051*	0,42	0,19 0,90	0,026*
SRC	0,4	0,14 1,09	0,072	0,45	0,22 0,91	0,028*
STK4	0,3	0,10 0,92	0,035*	0,38	0,18 0,83	0,015*
TRIM21	1,55	0,58 4,17	0,383	2,25	1,09 4,68	0,029*

[§]HR, *Hazard Ratio* referida a pacientes reactivos respecto de los no reactivos, por tanto si HR <1 el AAT es de buen pronóstico, y si HR >1, el AAT está asociado a mal pronóstico. ⁺HR IC 95%, Intervalo de Confianza al 95% de probabilidad. *AAT significativos en la predicción de recidiva o fallecimiento.

4.8. Identificación de AAT independientes para la predicción de ILE y SG

En este apartado identificaremos aquellos AAT que sean independientes tanto entre sí, como del resto de variables clinicopatológicas y que podrían estar asociados tanto a recidiva como a fallecimiento: edad, sexo, estadio, y localización del tumor primario. Los AAT independientes son los candidatos más apropiados para mejorar los actuales estándares de pronóstico, estimación del riesgo de recidiva y fallecimiento a lo largo del seguimiento.

Para mejorar la eficiencia de la regresión de Cox multivariante, realizamos primero una selección de variables utilizando el paquete *rms*, de modo análogo a la selección para recidiva temprana (ver sección 4.4). Posteriormente, añadimos a la selección el resto de variables clinicopatológicas. Finalmente, ajustamos una regresión de Cox multivariante bajo el modelo de riesgos proporcionales sobre los pacientes no metastásicos, n=75 tanto en ILE como en SG. Prescindimos de los pacientes metastásicos dado que el fuerte efecto de la metástasis en la supervivencia de cáncer colorrectal podría enmascarar el efecto de otras variables.

En nuestra población de estudio, la localización del tumor primario no fue un factor estadísticamente significativo de ILE independiente de los demás, en contraposición a otros estudios previos [298]. Para confirmar estos datos, realizamos el análisis desdoblado la variable localización tanto en colon *vs* recto (Tabla 24), como en colon izquierdo *vs* recto *vs* colon derecho obteniendo resultados similares (no se muestran datos). Es probable que el reducido tamaño de la muestra no haya podido demostrar significación estadística para la localización de tumor primario.

A partir de los resultados de la regresión multivariante observamos que STK4 y GTF2B se mantenían como variables independientes significativamente asociadas a buen pronóstico. Al tener en cuenta la interacción con otros parámetros, observamos la asociación independiente a buen pronóstico de los niveles de

autoanticuerpos dirigidos contra SRC, cuya significación no era detectada en el análisis. Respecto a los AAT de mal pronóstico, MAPKAPK3 sustituyó a AKT1 como factor independiente, relegando el papel de AKT1 a una variable dependiente de otro parámetro incluido en la regresión (o combinación de ellos) y mejorando el pronóstico del conjunto de variables (Tabla 24).

Tabla 24: Estimación de las HR para ILE de los AAT seleccionados mediante regresión multivariante de Cox.

Parámetros	HR [§]	HR IC 95% ⁺		Pr > ChiSq
STK4	0,206*	0,0316	0,049	0,87
SRC	0,119*	0,0061	0,026	0,546
MAPKAPK3	6,725*	0,0156	1,434	31,53
p53	4,481	0,0821	0,826	24,301
GTF2B	0,113*	0,027	0,016	0,781
AKT1	3,885	0,0767	0,865	17,458
Sexo	1,083	0,907	0,286	4,102
Edad	0,981	0,5204	0,925	1,04
Loc. Tumor				
colon vs recto	0,431	0,1626	0,132	1,405
Estadio				
II vs I	1,704	0,5976	0,235	12,333
III vs I	1,552	0,6548	0,226	10,66

[§] HR, Hazard Ratio, + HR IC 95%, Intervalo de Confianza al 95% de probabilidad. *AAT significativos en la predicción de recidiva. El C-index sobre la muestra es de 0,868 mientras que su valor corregido es de 0,765.

Aplicamos esta misma metodología para encontrar aquellos AAT independientes asociados a supervivencia global (Tabla 25). Al igual que para ILE, la localización del tumor primario no resultó ser un factor estadísticamente independiente (Tabla 25). De los AAT significativos en la regresión univariada (EDIL3, GTF2B, IRAK4, p53, PIM1, SRC, STK4, MAPKAPK3 y TRIM21), solo STK4, SRC y MAPKAPK3 permanecieron independientes, lo que hace al resto de variables dependientes entre sí o de las variables clinicopatológicas recogidas. STK4 y SRC mantienen su asociación a buen pronóstico y menor riesgo de relapso que observamos en la regresión univariada para ILE, mientras que la existencia de autoanticuerpos hacia MAPKAPK3 está asociada a un mayor riesgo de fallecimiento.

El C-index mide la capacidad de ajuste de una regresión de Cox a la serie de valores experimentales. Para ello, estima la probabilidad de que para dos pacientes aleatorios, aquél que tenga mayor probabilidad de una mayor supervivencia, efectivamente sobrevivirá durante más tiempo. En ambas regresiones los valores nativos y corregidos del C-index son similares y suficientemente altos, por lo que los dos modelos son igualmente extrapolables a otras poblaciones. Pese a contar con un menor número de pacientes, el C-index de ILE no parece notablemente inferior al de SG. Las variables no significativas en ambas regresiones no aportan *a priori* ningún valor extra en el pronóstico de la enfermedad, por lo que no son incluidas en un primer diseño del algoritmo predictivo; aunque podrían mejorar el rendimiento del algoritmo al añadirlas posteriormente. Por ello, STK4, GTF2B, SRC y MAPKAPK3 serán los AAT utilizados como punto de partida para explorar el valor de diferentes combinaciones en ILE. Respecto a la supervivencia global, STK4, SRC y MAPKAPK3 serían suficientes para establecer diferentes grupos de riesgo de supervivencia global.

Tabla 25: Estimación de las HR para SG de los AAT seleccionados regresión multivariante de Cox.

Parámetros		HR [§]	HR IC 95% ⁺		Pr > ChiSq
STK4		0,0068*	0,071	0,011	0,482
SRC		0,0071*	0,15	0,038	0,596
MAPKAPK3		0,0049*	10,384	2,035	52,997
p53		0,1712	4,196	0,538	32,728
GTF2B		0,0838	0,206	0,034	1,235
Sexo		0,7707	1,269	0,256	6,304
Edad		0,3795	0,971	0,91	1,036
Loc. Tumor					
colon vs	recto	0,2186	0,407	0,097	1,704
Estadio					
II vs	I	0,6333	0,619	0,087	4,43
III vs	I	0,2794	0,321	0,041	2,517

§HR, *Hazard Ratio*, + IC 95%, Intervalo de Confianza al 95% de probabilidad. *AAT significativos en la predicción de fallecimiento. Su C-index es de 0,860, mientras que el corregido es de 0,766.

4.9. Propuesta y validación de paneles de AAT para la predicción de recaída y fallecimiento

Para definir paneles pronósticos que determinen el riesgo de cada uno de los pacientes, es necesario agruparlos en cohortes o grupos de riesgo, con el fin de poder comparar supervivencia de los grupos a lo largo del tiempo. Estas cohortes se conocen como grupos de riesgo, y para determinar a cuál de ellos pertenece cada paciente, utilizamos los resultados de la regresión de Cox para construir un algoritmo clasificador según la reactividad de los AAT: STK4, SRC, MAPKAPK3 y GTF2B en ILE y STK4, SRC y MAPKAPK3 en SG. Estos AAT implican la utilización en un mismo panel de biomarcadores asociados a buen y mal pronóstico. Para ello, tuvimos que asignar un estado favorable (reactivo o no reactivo) que se asociaba a un mayor período libre de enfermedad o supervivencia global para cada AAT.

Tabla 26: Papel de los autoanticuerpos en ILE indicándose el estado favorable o desfavorable para cada AAT.

AAT	Asociación al pronóstico	Dilución de corte	HR [§]	Estado Favorable*
GTF2B	Buena	1/126	0,113	Reactivo
MAPKAPK3	Buena	1/300	6,725	No Reactivo
SRC	Mala	1/334	0,119	Reactivo
STK4	Buena	1/870	0,206	Reactivo

§HR, *Hazard Ratio*, *El estado favorable se correspondía cuando el suero era reactivo en aquellos AAT con HR>1 y no reactivo en aquellos AAT con HR<1.

Para definir el panel pronóstico asociado a ILE, los 75 pacientes de la cohorte de ILE fueron agrupados en cinco posibles grupos según el número de estados favorables (cero, uno, dos, tres o cuatro) que mostrase cada paciente para los 4 AAT (Tabla 26). En primer lugar, representamos la supervivencia de cada uno de los 5 grupos de riesgo con gráficos de Kaplan-Meier, lo que nos permitió observar que el grupo de ningún estado favorable y el grupo de sólo un estado favorable solapaban sus supervivencias. Del mismo modo, el de tres

estados favorables y el de cuatro estados favorables también presentaban tendencias de supervivencia similares.

Teniendo en cuenta la similitud entre algunos grupos de supervivencia, agrupamos los cinco grupos de ILE según los estados favorables en 3 tendencias: una tendencia caracterizada por un alto riesgo de sufrir recidiva, compuesta por pacientes con uno o ningún AAT en estado favorable; otra tendencia de riesgo medio compuesta por pacientes con dos AAT en estado favorable; y una de bajo riesgo compuesta por tres o cuatro AAT en estado favorable (Figura 46). Al representar las tendencias de alto riesgo, riesgo medio y bajo riesgo mediante curvas de Kaplan-Meier obtuvimos las siguientes tasas de recidiva a 60 meses: 100% para el grupo de bajo riesgo, 87% para el grupo de riesgo medio y 56% el grupo de alto riesgo (valor de $p=0,0003$) (Figura 46A).

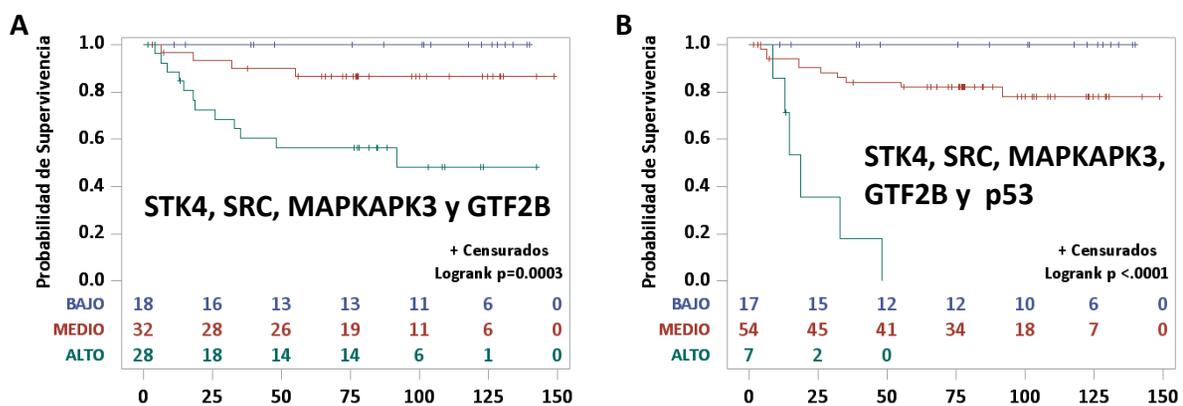


Figura 46: Intervalo libre de enfermedad de los tres grupos de riesgo establecidos en función de los niveles de autoanticuerpos frente a los AAT indicados. A. Grupos de riesgo no solapantes dependiendo del número de AAT favorables del panel compuesto por STK4, SRC, MAPKAPK3 y GTF2B. B. Grupos de riesgo no solapantes al añadir p53 al panel anterior.

Dado que el papel de p53 en supervivencia es todavía objeto de debate en la literatura [141, 237, 300], decidimos comprobar su efecto en los grupos de supervivencia. Para ello, y como se hizo al principio del apartado, se asignó un papel favorable cuando p53 ($HR=4,481$, valor de $p=0,08$) poseía una reactividad menor que la establecida anteriormente (dilución 1/20 del suero patrón). Añadiendo este AAT, obtuvimos del mismo modo 3 tendencias de supervivencia: alto, medio y bajo riesgo. La de alto riesgo se componía por pacientes con uno o ningún AAT en estado favorable. La de riesgo medio, de dos o tres AAT en estado favorable y finalmente una de bajo riesgo compuesta por cuatro o los cinco AAT en estado favorable. Al representar estas tres tendencias en un gráfico de Kaplan-Meier obtuvimos tasas de recidiva a 24 meses de 100%, 90% para grupos de riesgo leve y moderado, y de 36% para el grupo de riesgo severo, constituyendo una excelente herramienta para predecir las probabilidades de recidiva temprana del cáncer de colon (Figura 46B).

Nuestro panel de 5 AAT ha sido capaz de discriminar tendencias de supervivencia, y detectar aquellos casos que presentarán recidiva de intervalo (que se presenta entre 6 y 60 meses después del diagnóstico). El panel compuesto por los 5 AAT es particularmente restrictivo, dado que los pacientes clasificados como “grupo de alto riesgo” por este panel sufren recidiva antes de 60 meses, y el número de pacientes detectados es menor al 10% aunque con una alta especificidad. El panel de 4 AAT identifica a un mayor número de pacientes como

“grupo de riesgo” (n=26), aunque la tasa de recidiva no es tan alta, ya que alcanza el 45% de recaídas en 60 meses para posteriormente estabilizarse. Tanto el panel de 4 AAT como el de 5 AAT identifican un número similar de pacientes de bajo riesgo de recidiva (18 y 17, respectivamente), que no recaen durante todo el seguimiento. Trasladar estos resultados a la práctica clínica permitiría suprimir o relajar la quimioterapia con el fin de aumentar la calidad de vida del paciente.

Tabla 27: Estado favorable o desfavorable para cada AAT en SG.

AAT	Asociación al pronóstico	Dilución de corte	HR	Estado Favorable
MAPKAPK3	Mala	1/300	10,384	No reactivo
SRC	Buena	1/334	0,15	Reactivo
STK4	Mala	1/870	0,071	Reactivo

Dado que la combinación STK4, SRC, MAPKAPK3, GTF2B y p53 separa los grupos de riesgo mejor que la combinación STK4, SRC, MAPKAPK3 y GTF2B, serán necesarios estudios ulteriores que comparen de manera prospectiva la tasa de supervivencia a 60 meses de ambas combinaciones.

Finalmente, para definir el panel pronóstico asociado a supervivencia global, clasificamos los 95 pacientes en 4 grupos según el número de estados favorables que acumulasen entre los 3 AAT (Tabla 27).

Definidos estos grupos, representamos su supervivencia a través de gráficos de Kaplan-Meier y observamos que los pacientes que tenían 1 y 2 estados favorables, apenas presentaban diferencias entre ellas (no se muestran datos). Por esta razón agrupamos los cuatro grupos en 3 tendencias de supervivencia: alto riesgo de fallecimiento, riesgo moderado y bajo riesgo. La tendencia de alto riesgo se componía por pacientes con ningún AAT en estado favorable. La de riesgo medio requería uno o dos AAT y la de bajo riesgo los tres AAT en estado favorable. Al representar estas tres tendencias mediante Kaplan-Meier obtuvimos una tasa del 20% de supervivencia a los 60 meses para el grupo de alto riesgo, identificando muy bien a los pacientes de cada grupo (Figura 47A).

Dados los pocos pacientes en el grupo favorable en este algoritmo (Figura 47A), se decidió repartir el grupo intermedio entre grupo de bajo riesgo (con dos y tres AAT en estado favorable) y grupo de alto riesgo (con uno o ningún AAT en estado favorable) (Figura 47B). Al representar las dos tendencias mediante curvas de Kaplan-Meier obtuvimos una tasa del 53% de supervivencia a los 60 meses para el grupo de alto riesgo, lo que suponía una pérdida de la especificidad respecto al ensayo anterior (valor de $p=0,0001$) (Figura 47B).

Finalmente, como hicimos anteriormente incluimos también p53 y GTF2B en la construcción de un algoritmo de pronóstico de la SG con el fin de mejorar la discriminación de los grupos de riesgo. Para ello utilizamos los valores de corte previamente determinados para asignar roles favorables o desfavorables.

Utilizando STK4, SRC, MAPKAPK3, p53 y GTF2B, obtuvimos 3 tendencias de supervivencia. La tendencia de alto riesgo se componía por pacientes con uno o ningún AAT en estado favorable. La de riesgo medio requería de dos o tres AAT y finalmente la de bajo riesgo requería cuatro o cinco AAT en estado favorable. Al representar estas tres tendencias en un gráfico de Kaplan-Meier obtuvimos una tasa del 57% de supervivencia a 24 meses y del 0% a 60 meses, confiriendo una alta especificidad a los resultados del test (valor de $p=0,0001$) (Figura 47C).

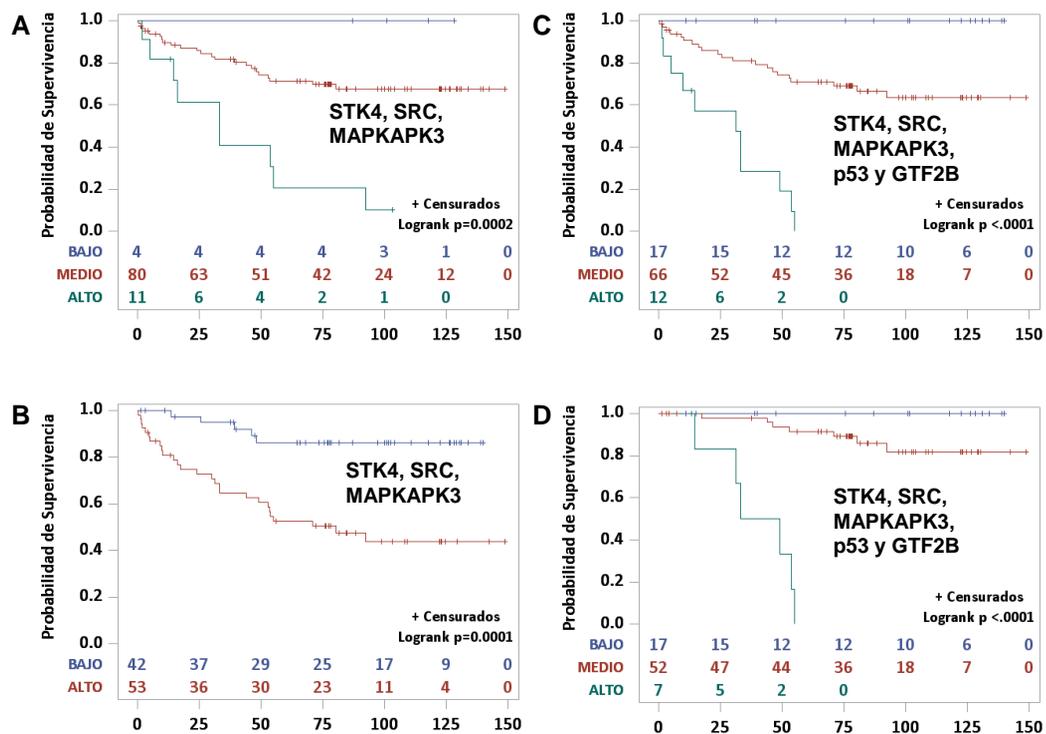


Figura 47: SG de los diferentes grupos de riesgo. A. Tendencias de supervivencia para los 3 grupos de riesgo utilizando el panel STK4, SRC, MAPKAPK3. B. Tendencias de supervivencia para 2 grupos de riesgo dependiendo del número de AAT favorables. C. Tres grupos de riesgo al añadir p53 y GTF2B al panel anterior. D. Tendencias de supervivencia de los grupos de riesgo utilizando STK4, SRC, MAPKAPK3, p53 y GTF2B sobre población no metastásica.

Como los resultados de la regresión multivariante provienen de una subcohorte no metastásica, quisimos comprobar que el panel de AAT no estaba detectando pacientes con estadio IV. Para ello, representamos las mismas tendencias de pacientes únicamente con estadios I, II y III obteniendo resultados similares y demostrando su utilidad. Observamos que la población de bajo riesgo se mantuvo sin fallecimientos a lo largo del estudio, y que la población de riesgo moderado conservó su supervivencia por encima del 90% durante todo el estudio (98% y 92%, a 24 y 60, meses respectivamente) (Figura 47D). Así, descartamos que el grupo de alto riesgo estuviese constituido primordialmente por pacientes metastásicos (estadio IV), ya que estos se encontraban primordialmente en el grupo de riesgo medio (un 74% de pacientes metastásicos frente a un 26% en riesgo alto).

Si bien la combinación de STK4, SRC y MAPKAPK3 detecta 11 de los 12 casos de alto riesgo detectados mediante la combinación de STK4, SRC, MAPKAPK3, p53 y GTF2B. Esta última combinación permite identificar más de 4 veces los casos de buen pronóstico (17 vs 4) que los que no fallecen a lo largo de los 150 meses de seguimiento. Por tanto, el modelo de 5 AAT estratifica de manera más precisa los tres grupos de riesgo que componen nuestra cohorte de estudio.

En conjunto, la implementación de pruebas basadas en la cuantificación de autoanticuerpos frente a STK4, SRC, MAPKAPK3, GTF2B y p53 permitiría adaptar y personalizar la quimioterapia adyuvante de los pacientes al aumentar la información obtenida al diagnóstico sobre su riesgo de recidivas y potencial supervivencia. La personalización de la terapia oncológica supondría un importante ahorro para el sistema sanitario, tanto en cuanto a la administración de dosis innecesarias como en cuanto a la toxicología de

aquellos tratamientos prescindibles. En cuanto a los pacientes de CCR, estos mejorarían su calidad de vida y aquellos pacientes de alto riesgo aumentarían su supervivencia mediante una vigilancia más intensa.

En resumen, en esta Tesis Doctoral hemos optimizado la expresión recombinante de los AAT, observando que los AAT producidos en *E. coli* se caracterizan por un mejor rendimiento. Posteriormente observamos como la respuesta humoral frente al CCR se anticipa a sus síntomas gracias a los modelos murinos de inducción química de CCR. También nos permitieron explorar las alteraciones moleculares que originaban la respuesta y ver como esta evolucionaba a lo largo de la progresión tumoral, compartiendo perfil inmunológico con los pacientes. Estos resultados justificaron comprobar el valor diagnóstico de los AAT, para lo que construimos una firma de 6 AAT capaz de alcanzar una AUC = 0,80 en una población compuesta por pacientes, individuos sanos, pacientes de otros tipos de cáncer y enfermedades inflamatorias intestinales utilizando la tecnología Luminex. Finalmente, desarrollamos un panel de 5 AAT para su uso en pronóstico capaz de diferenciar 3 grupos de riesgo, de los cuales el de bajo riesgo mantenía el 98% de supervivencia durante el seguimiento y el de alto riesgo presentaba tasas de supervivencia inferiores al 30% a los 4 años de ser diagnosticado.

Globalmente esta Tesis Doctoral aporta evidencias suficientes que justifican la utilización de los AAT en la rutina clínica tanto para el diagnóstico como para el pronóstico de pacientes con CCR y el inicio de estudios piloto para su aprobación y comercialización.

Discusión

NO SLEEP, NO CHANCE, NO NEED, FORGET ABOUT IT

ONE LIFE, LIVE FREE, BIG DREAMS, WE'RE ALL ABOUT 'EM

YOU & I – CRYSTAL FIGHTERS

En esta Tesis Doctoral se ha analizado en profundidad la utilidad de la respuesta humoral específica frente al CCR para el diagnóstico y pronóstico de la patología. Para ello, hemos estudiado la respuesta humoral frente a AAT en muestras humanas y de modelos murinos de CCR. Antes de empezar dichos estudios analizamos el efecto que tenía la plataforma de expresión de los AAT en la capacidad de detectar autoanticuerpos de CCR. Aunque la producción de AAT recombinantes en *E. coli* es un procedimiento sencillo, rápido y económico [267, 268], nos planteamos que las proteínas expresadas en células de insecto Sf9 podrían mejorar el reconocimiento de los autoanticuerpos respecto a las de *E. coli* [164], ya que Sf9 puede reproducir más fielmente que *E. coli* la estructura nativa del AAT que se expresa en células humanas [163]. Por tanto, se produjeron las proteínas en bacterias y en células de insecto y se determinó que los AAT producidos en bacteria permitían detectar más eficientemente y con mayor sensibilidad los autoanticuerpos. Por ello, en los experimentos encaminados a determinar la capacidad diagnóstica y pronóstica de los autoanticuerpos de CCR y el análisis de la respuesta humoral en modelos murinos utilizamos los AAT producidos en bacteria.

La menor desnaturalización de los AAT producidos en Sf9 explicaría su peor reconocimiento debido a un posible enmascaramiento de los epítomos, un fenómeno descrito particularmente en ensayos de ELISA indirecto [261]. La evolución del tumor a través de la presión que ejerce el sistema inmune, o proceso de inmunoección del tumor, puede seleccionar epítomos que no se encuentran accesibles en la estructura nativa de la proteína, también el microambiente tumoral o estado de la proteína pueden afectar a la accesibilidad y despliegue de aquellos [181, 203]. Una estructura desnaturalizada podría ser más similar a la situación en la que se encuentran los AAT en el tumor, implicando una mayor accesibilidad a los epítomos que podrían ocultarse en el interior de la estructura nativa de la proteína. También, los cambios en el plegamiento de las proteínas explicarían que ciertos AAT como PIM1 o AKT1, presenten diferente comportamiento en Luminex o en ELISA, ya que la inmovilización covalente puede desnaturalizar las proteínas total o parcialmente. Nuestros resultados nos llevan a pensar que la producción de AAT más similares a los nativos conduce a un peor rendimiento a la hora de detectar autoanticuerpos, y en consecuencia, los AAT producidos en *E. coli* permitirían unir mejor los autoanticuerpos de los pacientes de CCR en comparación con aquellos producidos en Sf9.

Por otra parte, observamos una gran variabilidad en la detección de autoanticuerpos en función de las impurezas del lote de purificación. La unión inespecífica a trazas de *E. coli* ya se ha descrito previamente [301], y nosotros observamos como aumentaba el número de falsos positivos en el test. Además, la inmovilización del AAT en poliestireno puede provocar inespecificidades en los ensayos serológicos debidas a la presencia de IgM heterólogas y lípidos tanto en ELISA como en Luminex [241, 301, 302]. La normalización mediante la cuantificación de la inespecificidad con GST ha demostrado su utilidad tanto en nuestros resultados como en otros estudios [303, 304], aunque provoca que los valores de absorbancia cruda sean más bajos de lo normal así como la existencia de o técnico, que ocurre cuando el paciente no presenta una reactividad específica hacia ese antígeno. Esto requiere utilizar un equipo de alta sensibilidad, que permite que el test tenga mayor especificidad al desechar interacciones inespecíficas. Una vez optimizada la expresión de los AAT y descartada la utilización de AAT producidos en células de insecto, procedimos a analizar la respuesta autoinmune frente al cáncer colorrectal en modelos animales, y posteriormente determinar la capacidad de los autoanticuerpos de CCR para el diagnóstico y pronóstico de pacientes.

Dado que el acceso a colecciones preclínicas de sueros es difícil, la utilidad de los autoanticuerpos para la detección temprana del CCR ha sido cuestionada durante mucho tiempo. En general, muestras del mismo paciente, antes y después del desarrollo de tumores y durante todas las fases del tumor no suelen estar disponibles, lo que hace prácticamente imposible determinar el momento exacto en el que aparecen los autoanticuerpos y determinar su correlación con la progresión tumoral; algo que pudimos observar con el estudio de la inmunidad en modelos murinos. Para ello, hipotetizamos que los modelos murinos de CCR desarrollarían al igual que ocurre en pacientes humanos una respuesta humoral frente a CCR. Esto supondría la ventaja de que la carcinogénesis inducida químicamente permitiría estudiar en qué momento de la formación y progresión tumoral aparecen los autoanticuerpos frente a antígenos asociados a tumor de CCR. También permitiría estudiar su evolución a lo largo de la progresión tumoral, comparar el papel que desempeñan entre ellos y examinar las bases moleculares del desarrollo de la respuesta inmune.

Es de destacar que este trabajo supone el primer estudio de la respuesta humoral frente al cáncer en modelos murinos, y nos permitió esclarecer la utilidad de los autoanticuerpos para la detección precoz del CCR. Encontramos que los autoanticuerpos se producían en los ratones tratados que desarrollaban lesiones neoplásicas, produciéndose en etapas muy tempranas de la patología y evolucionando en paralelo a la progresión de la enfermedad [141, 237]. La homogeneidad genética y la minimización de los factores ambientales de los modelos murinos de carcinogénesis suprimen la variabilidad observada en la respuesta humoral en humanos, lo que resulta en una mayor reproducibilidad de los resultados [141, 237]. Esta reproducibilidad permite comparar el rendimiento diagnóstico de diferentes autoanticuerpos, como ya se ha hecho con otros biomarcadores como los microRNA circulantes [305]. No obstante, de los tres modelos murinos analizados únicamente el modelo combinado AOM/DSS provocó tumores en el 100% de los ratones de manera homogénea después de 9 semanas de tratamiento. Durante el tratamiento observamos el desarrollo de displasias que durante el periodo de descanso progresaron a pequeños adenomas con infiltraciones y diferentes niveles de inflamación. Esto indica que durante el período de descanso, la inflamación resultante facilitaría el avance de la carcinogénesis. Tanto los adenocarcinomas observados al final del tratamiento con AOM/DSS, como los adenomas que aparecieron en las semanas intermedias confirmaron la secuencia displasia – adenoma – adenocarcinoma, asociada a aneuploidía e inestabilidad cromosómica, observada en el modelo AOM/DSS [90]. La carcinogénesis producida por la acción conjunta de AOM y DSS acelera y uniformiza la aparición de tumores en el colon distal, similares a la vía de Vogelstein y a las lesiones encontradas en pacientes humanos [48].

El uso por separado de AOM y de DSS confirmó el valor predictivo de los autoanticuerpos, ya que solo presentaron respuesta humoral a los AAT aquellos ratones que desarrollaban lesiones tumorales [237]. Las diferencias observadas en los niveles de los autoanticuerpos y en la incidencia y gravedad de las lesiones tumorales sugerían que los tres tratamientos resultan en respuestas histológicas diferentes y por tanto también serológicas. A tiempo final las diferencias también podrían ser explicadas por estrés inflamatorio o diferentes vías de carcinogénesis (tumores polipoides *vs* planos). No obstante, los análisis histológicos no mostraron diferencias estadísticamente significativas en la incidencia de los distintos tipos de tumores entre los modelos murinos de CCR utilizados: AOM/DSS, AOM y DSS.

En el caso del modelo AOM las diferencias histológicas pueden deberse a que la administración i.p., pese a ser sencilla y no requerir anestesia, es inexacta en cuanto a la cavidad y cantidad finalmente administrada. Esto provoca que los resultados se caractericen por su variabilidad y no se observen tumores en el 100% de los ratones, lo que recuerda al cáncer esporádico. Pese a esto, el modelo de AOM presentó lesiones en más del 90% de los ratones tratados, aunque en diferentes tiempos, probablemente fruto de la variabilidad comentada; lo que se reflejó en una inducción de la respuesta humoral también a diferentes tiempos. La heterogeneidad de la incidencia ya se describió previamente [305], y también podría explicar la heterogeneidad en el momento de aparición del tumor y, por tanto, de la respuesta inmune frente a él. La ausencia de lesiones exclusivamente displásicas sugiere una secuencia adenoma-adenocarcinoma, que estaría caracterizada por una alta prevalencia de inestabilidad de microsatélites de bajo grado [306]. En concreto, se ha descrito la ausencia de alteraciones en K-Ras o en APC y también de aneuploidía o inestabilidad cromosómica en este modelo de cáncer, mientras que se ha encontrado β -catenina acumulada en el núcleo [306], sugiriendo una vía diferente a la propuesta por Vogelstein. La ausencia de ciclos de inflamación por acción del DSS provocaría que los ratones tratados con AOM inicien el tumor en diferentes momentos del tratamiento y los tumores se encontrasen en diferentes estadios a lo largo de los diferentes puntos temporales de análisis, por lo que no nos fue posible establecer una dinámica de progresión tumoral.

En el caso de DSS, aunque se observó una inflamación en el 100% de los ratones que se extendía por todo el colon, el tratamiento con DSS provocó tumores solo en un 50% de los ratones tratados. En este modelo, la carcinogénesis depende directamente de la respuesta inflamatoria. La cantidad de agua con DSS que beben los ratones condiciona el número, tamaño, prevalencia y avance de los tumores, ya que se observaron lesiones de diversa extensión y profundidad, rodeados por una intensa inflamación. Estos resultados confirman que este modelo de carcinogénesis mimetiza la colitis ulcerosa y carcinogénesis que sufren pacientes con EII [96]. El 50% de los ratones mimetiza dicha carcinogénesis a través de una vía de displasia progresiva provocada por la regeneración epitelial y productos inflamatorios (como las especies súper reactivas de oxígeno) en la que no se involucran mutágenos externos (el DSS es negativo en el test de Ames). Esta vía de carcinogénesis provoca una mayor prevalencia de adenoma plano como han revelado nuestros experimentos y otros estudios [85, 307]. Otros modelos de EII, como los ratones *knock out* para IL-10, también presentan una frecuencia tumoral del 50% sin describirse inestabilidad cromosómica o mutaciones en p53 [90], separándolo de los modelos de AOM y AOM/DSS.

Gracias a que no todos los ratones tratados con DSS desarrollan tumores, se pudo confirmar la alta correlación entre la formación de tumores y la inducción de autoanticuerpos. En aquellos ratones que no desarrollaron tumor, no fue detectada respuesta humoral alguna [237]. Solo los ratones que desarrollaron tumor presentaron niveles detectables de autoanticuerpos. Por otra parte, los mayores niveles de autoanticuerpos en DSS respecto a AOM sugerirían que la inflamación acelera la formación de autoanticuerpos, afectando bien la presentación de antígenos o la activación del sistema inmune.

En los tres modelos de ratón utilizados, la respuesta humoral frente a CCR presentó un perfil de reactividad similar al observado en pacientes. Los autoanticuerpos frente a CCR en modelos murinos y en pacientes humanos se dirigían frente a los mismos autoantígenos, lo que sugiere una implicación de los AAT en el inicio y progresión tumoral. La identidad de los autoantígenos humanos con sus ortólogos murinos sugiere

que las vías moleculares que conducen a la respuesta humoral están conservadas en modelos murinos. Dado que el AAT NY-ESO-1 no dispone de ortólogo murino, esto explicaría la baja respuesta a este AAT en ratones. Por tanto, los modelos murinos de CCR permitirán comparar AAT de diferentes estudios siempre que haya un ortólogo en el genoma del ratón, lo que además permitirá la estandarización y validación de AAT descubiertos a través de diferentes estudios para dar su salto a fases clínicas. Sin embargo, no encontramos respuesta humoral para algunos AAT descritos en humanos, como AKT1 o PIM1, pese a presentar identidades del 98 y 86% respectivamente. La ausencia de reactividad en los ortólogos de ratones en AAT descritos en humanos podría deberse a que la mayoría de AAT utilizados han sido descubiertos en experimentos con sueros proveniente de estadios avanzados y metastásicos [182, 215]. Estos sueros de estadios avanzados no pueden obtenerse en los modelos basados en AOM y DSS al no desarrollar metástasis. AKT1 y PIM1 no resultaron ser relevantes para el diagnóstico pero sí, y de manera independiente para la predicción de recidiva temprana (anterior a dos años). La recidiva no es un proceso evaluable en modelos murinos, por lo que probablemente el papel de estos AAT esté reservado a los CCR con mal pronóstico y mayor probabilidad de recaer en un breve periodo de tiempo.

El desarrollo del CCR ocurre como resultado de múltiples alteraciones genéticas acumulativas. En consecuencia, la respuesta humoral frente a cada uno de los AAT podría ocurrir de manera seriada. Pudimos observar que el orden de aparición de los autoanticuerpos frente a p53, GTF2B, MAPKAPK3, STK4 y, por último, EDIL3, se mantuvo en la inducción por AOM, DSS y AOM/DSS. En concreto, los autoanticuerpos frente a GTF2B y p53 se detectaron antes que la aparición de lesiones tumorales, permitiendo que los niveles de autoanticuerpos frente a p53 se asociasen con el grado de las lesiones en los tres grupos experimentales ensayados en las primeras 10 semanas de tratamiento, con niveles de anticuerpos anti-p53 más altos cuanto más grave era la lesión tumoral. En concreto, los modelos murinos AOM/DSS y DSS presentaron niveles de autoanticuerpos detectables 21 días después del inicio del tratamiento, previos a cualquier sintomatología. El modelo AOM es más tardío, en consonancia con el desarrollo más tardío del tumor y la aparición de la carcinogénesis a diferentes tiempos. La prelación temporal de los autoanticuerpos para el diagnóstico clínico del CCR es un fenómeno sugerido en humanos y en otras publicaciones contemporáneas [308], existiendo estudios que intentan diagnosticar estadios tempranos del CCR a través de firmas de autoanticuerpos [222]. Todo ello convierte al modelo AOM/DSS en una herramienta muy útil para identificar AAT que reconocen autoanticuerpos antes de la aparición de las lesiones cancerosas. La respuesta temprana humoral confirma la sensibilidad del sistema inmunológico y sugiere que solo unas pocas células tumorales, no detectables por otros medios, son necesarias para el procesamiento local de antígenos asociados a tumor por el sistema inmune.

Las causas que provocan la respuesta humoral en cáncer han sido ampliamente hipotetizadas y son todavía desconocidas. La sobreexpresión, tanto a nivel de mRNA como de proteína en el tejido tumoral, es uno de los eventos moleculares más estudiados que dan lugar a la respuesta humoral en CCR, tanto en los AAT que hemos estudiado, p53 y STK4 [215, 237] o PIM1 y MAPKAPK3 [182], como en otros AAT como RHAMM y ADO34 [309], o BCP-20, BCP-33 y BCP41 [310]. También se observó una disminución de la expresión en las formas canónicas de las proteínas GTF2B y SRC. Así, en GTF2B pudimos observar que la producción de mRNA se mantenía, pese a la pérdida de proteína observada mediante WB (Figura 27). Por otra parte, en estudios anteriores se han descrito mutaciones en pacientes de CCR para este gen que podrían explicar su

inhibición o su inmunogenicidad [44]. También observamos la expresión aberrante en tejido tumoral de MAPKAPK3, que no es detectable por WB en el colon distal de ratones control pero aparece abundantemente en los modelos de AOM, DSS y AOM/DSS. Este hecho también lo observamos para la isoforma de 53 kDa de EDIL3 en los modelos murinos DSS y AOM/DSS de CCR. En ningún experimento fuimos capaces de detectar esta isoforma en los ratones control, lo que podría sugerir que es una isoforma propia de otro tejido o específica de desarrollo, similar a lo que ocurre con la proteína de desarrollo embrionario CEA. Publicaciones previas del grupo no encontraron expresión de PIM1 y MAPKAPK3 en tejido normal adyacente o distal al tumor de CCR de biopsias humanas [182], lo que concuerda con la hipótesis de que estos AAT no se expresan en el colon no afectado y su expresión se ve inducida en condiciones tumorales. Por otro lado, el WB frente a EDIL3 reveló un aumento de una isoforma truncada y específica murina de 23 kDa común a los 3 modelos de carcinogénesis [311]. Esto se debería a una proteólisis post-traducciona, que podría explicar el inicio de la respuesta humoral, lo que podría determinarse a través de mapeo de epítomos.

El papel de los autoanticuerpos frente a p53 y su relación con su abundancia, localización y presencia de mutaciones es complejo, como lo demuestra la cantidad de estudios al efecto. La existencia de mutaciones en p53 en los tumores provocados por AOM/DSS está escasamente documentada [70, 93, 312-314]. Sin embargo son frecuentes en el modelo DSS [93]. En este modelo, la mutación tiene lugar durante el paso de la displasia de bajo grado a alto grado, previa a la malignización del tejido. La pérdida de p53 parece un evento clave en la carcinogénesis mediada por DSS y displasia, puesto que aquellos ratones con el alelo salvaje tienen una menor incidencia de displasia y cáncer, mientras que los adenomas planos tienen una mayor incidencia de mutaciones [307]. La pérdida de p53 antes de la displasia en el modelo DSS sugiere que la carcinogénesis tiene lugar a través de una vía diferente a la canónica y similar a la de pacientes de colitis ulcerosa e implicaría la pérdida de p53 [315]. Otros modelos murinos de displasia progresiva, como el IL10^{-/-}, presentan una sobreexpresión de p53 en tejido maligno y premaligno, y su cariotipo presenta estabilidad cromosómica [90]. En cualquier caso la presencia de autoanticuerpos no da indicios sobre las mutaciones en p53, ya que se ha descartado que afecten al reconocimiento de autoanticuerpos en suero [221]. Así, para p53, la presencia de autoanticuerpos puede explicarse por el aumento significativo en la expresión de su mRNA de p53 y la acumulación de su proteína en los modelos AOM/DSS y DSS en la cepa FBV/N, como se ha publicado previamente [70, 237, 313, 316]. Aunque nosotros no observamos su sobreexpresión en el modelo DSS, se ha descrito su sobreexpresión en dichos modelos utilizando otras cepas de ratón [98, 316, 317]. No obstante, también hay estudios que no han encontrado un aumento de expresión de p53 en AOM/DSS [69].

En estadios intermedios del desarrollo tumoral (a 70 días del tratamiento con AOM y DSS, así como a 250 días del tratamiento con DSS) hemos observado elevados niveles de proteína de p53, coincidiendo con elevados niveles de autoanticuerpos frente a este AAT. En el modelo de AOM, a final de tratamiento no hemos encontrado un aumento de expresión de la proteína p53, lo que concuerda con la ausencia de autoanticuerpos frente a p53 en estadios tardíos del desarrollo del tumor (250 días después del inicio del protocolo AOM) (Figura 27). Esto nos lleva a pensar que los autoanticuerpos frente a p53 reflejan la cantidad de p53 dentro del tumor. Este proceso de tolerancia inmunológica se conoce como seroconversión, y ha sido previamente descrito para p53 en pacientes de CCR. Entre las causas que lo provocan, se encuentran la resección quirúrgica y curación del tumor [318]; lo que provocó en otros estudios que la respuesta inmune frente a p53 disminuyese en el 78% de los pacientes seropositivos para p53 después de la cirugía [319].

También en cáncer de mama, se ha observado una pérdida rápida y duradera de los autoanticuerpos circulantes asociados al tumor después de la resección del tumor y tratamiento con quimioterapia neoadyuvante [221]. En los modelos de AOM y DSS observamos un fenómeno similar con los autoanticuerpos frente a EDIL3. Otros estudios han descrito cómo otros AAT asociados a CCR pasan por una seroconversión espontánea en pacientes metastásicos. Ha sido el caso de MUC1 utilizando técnicas fluorescentes de alta sensibilidad [239, 318].

La aparición de autoanticuerpos previa a la sintomatología tumoral en ratones y en estadios tempranos de la carcinogénesis, así como las variaciones observadas en los niveles de autoanticuerpos en función de la progresión tumoral, sugiere el uso de los autoanticuerpos de CCR no solo como biomarcadores útiles para el diagnóstico sino también para el seguimiento y monitorización de pacientes de CCR [320]. Por todo ello, decidimos analizar el valor de la respuesta humoral de CCR para el diagnóstico y pronóstico de los pacientes, desarrollando para ello nuevas metodologías de detección múltiple y simultánea de autoanticuerpos.

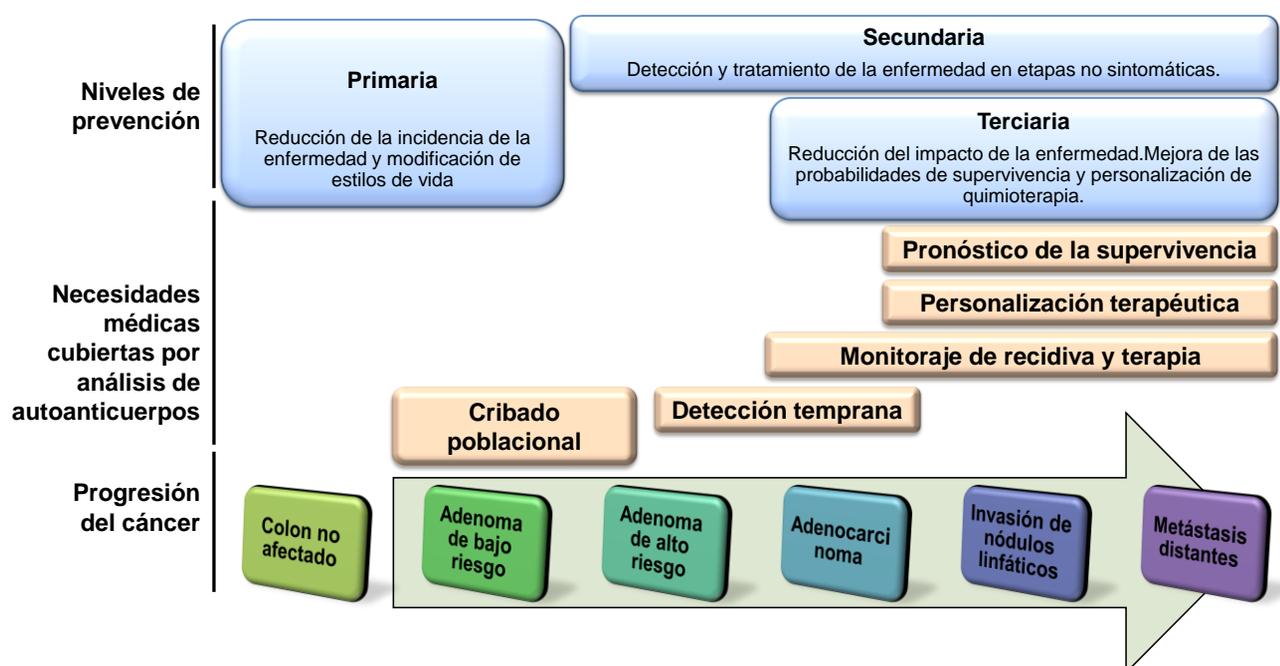


Figura 48: Utilidad de los autoanticuerpos para el diagnóstico y pronóstico de CCR.

Pese a los esfuerzos en la búsqueda de biomarcadores, solo un bajo número se ha estudiado en profundidad para determinar su utilidad real en diagnóstico clínico, estadiaje y consecuente valor pronóstico. Esto provoca una importante necesidad médica sin cubrir más allá del diagnóstico de CCR (Figura 48), ya que hay un 20% de pacientes en estadio II que presentan recidiva, así como un 15% de los pacientes en estadio III que se beneficiarían del tratamiento quimioterápico adyuvante [320]. Hipotetizamos que la complejidad de la respuesta humoral podría contribuir no solo a un diagnóstico temprano de la patología, sino también contribuir a detectar el estadio del paciente y a la correcta interpretación y prescripción de tratamiento según el riesgo y pronóstico estimado del paciente, desarrollando para ello un panel de autoanticuerpos que estratificase el riesgo del paciente diagnosticado, una metodología no explorada hasta ahora en CCR.

El uso de autoanticuerpos como biomarcadores, evita el inconveniente de generar anticuerpos de captura o patrones de SRM (monitorización por reacción simple) necesarios para la detección de biomarcadores

proteómicos [320]. Su rendimiento diagnóstico ha superado a otros tipos de biomarcadores circulantes, como los microRNA, que han obtenido valores de AUC=0.803 [321]. Hoy en día, los marcadores en heces u orina todavía requieren avanzar en sus estudios [322], y pese a su baja invasividad, su implementación compleja en chequeos rutinarios redundante en una peor adherencia y cumplimiento [323], como ya ha ocurrido en otros países que han implementado estrategias de cribado no sistematizadas para la detección de CCR [324, 325].

El diagnóstico de CCR a través de autoanticuerpos requiere la determinación simultánea de diversos AAT, ya que la sensibilidad individual de cada uno de ellos oscila entre el 10 y el 40% [219, 253, 322]. Por ello, se deben desarrollar nuevos inmunoensayos para detectar simultáneamente múltiples autoanticuerpos de CCR. Durante la realización de esta Tesis Doctoral, hemos participado en el desarrollo de biosensores [249] y desarrollado el uso de Luminex para la detección de CCR. El biosensor nanoplasmonico desarrollado, basado en una superficie de nanodiscos de oro [246], se funcionalizó con GTF2B y EDIL3, permitiendo monitorizar la detección directa de los autoanticuerpos específicos en tiempo real. Este estudio abre nuevos caminos tecnológicos para la determinación de autoanticuerpos de forma múltiple en dispositivos miniaturizados. Por otro lado, Luminex permite la detección simultánea en un único pocillo de hasta 500 analitos, lo que permite reducir comparando con ELISA el número de placas a utilizar para la detección de múltiples autoanticuerpos gracias a su sistema de microesferas de fluorescencia única. Además, permite una cuantificación más robusta, de mayor rango dinámico y en menos tiempo que el ELISA.

En esta Tesis Doctoral adaptamos y optimizamos la tecnología Luminex para detectar la respuesta humoral frente a CCR, y analizar la capacidad diagnóstica de los autoanticuerpos de CCR. Para ello, utilizamos una colección de 307 sueros de pacientes con CCR, individuos control y pacientes con otros tipos de cáncer y enfermedades gastrointestinales. La optimización en Luminex permitió determinar los parámetros relativos a la dilución del suero problema, el tampón de bloqueo o la dilución del anticuerpo secundario. Estos parámetros afectan directamente a la detección de los niveles de autoanticuerpos en el suero, por lo que es necesario encontrar el equilibrio que maximice la señal frente al ruido. Nuestra carga de antígeno optimizada fue de 15 μg de AAT por Mb, algo elevada en comparación con estudios previos (4-6 μg) en otro tipo de enfermedades utilizando proteínas de similar masa molecular (30-60 kDa) que los AAT de CCR [274, 326]. Además, encontramos que la dilución óptima de los sueros (1/50) para la detección de autoanticuerpos resultó ser más concentrada que en otros estudios (1/200) [274].

En los experimentos de optimización pudimos comprobar el mayor rango dinámico de Luminex respecto al ELISA, ya que las diluciones seriadas fueron detectadas hasta 1/800, algo que no fuimos capaces de detectar en ELISA. El mayor rango dinámico redundaría en una mayor separación entre la señal específica y el ruido de fondo, aumentando las medias de las diferentes cohortes y mejorando la significación de los AAT. En los experimentos de optimización utilizando diluciones seriadas, no observamos el denominado efecto gancho ("*hook effect*") [327], provocado por una concentración saturante de analito (o anticuerpo primario) que da lugar a una lectura menor que el límite superior de detección. Esto supone un problema a la hora de generar algoritmos e incrementa la tasa de falsos negativos.

Al medir varios AAT en multiplex, observamos una menor señal en los sueros normales, lo que supone una menor cantidad de uniones inespecíficas respecto a ELISA. Esto es de particular interés en las

determinaciones de autoanticuerpos indirectas, a diferencia de otras técnicas que necesitan pares de autoanticuerpos (captura y detección, como el ELISA en sándwich), están sujetas a mayor inespecificidad. Dicha inespecificidad puede deberse a la presencia de moléculas que sean reconocidas erróneamente por el anticuerpo secundario, como las trazas de *E. coli*, o a la inespecificidad de las IgM, otros autoanticuerpos heterófilos o lípidos que aumentan las uniones inespecíficas [328].

Validar el método de diagnóstico mediante Luminex requirió la determinación de 9 autoanticuerpos y 2 controles en 307 muestras séricas [329]. La determinación mediante Luminex permitió cuantificar en un solo pocillo cada muestra sérica, mientras que en ELISA significó el uso de 4 placas por AAT, resultando en más de 3400 pocillos repartidos en 44 placas. Luminex redujo el número de placas totales a 4 y por tanto disminuyó la probabilidad de error humano, la carga de trabajo, coste, material, tiempo y variabilidad técnica. La determinación simultánea de AAT disminuye el número de mediciones a realizar, lo que evita problemas de reproducibilidad como por ejemplo la carga de suero en cada pocillo, evitando imprecisiones. Además, los anticuerpos de referencia (en nuestro caso anti-GST) son medidos simultáneamente con los analitos experimentales, lo que permite normalizar de una manera más exacta los resultados.

La distribución de los datos recogidos mediante Luminex hizo evidente la presencia de una menor cantidad de datos discordantes (“*outliers*”) en el ensayo, lo que supone mayor robustez de los datos y una disminución del error de medida, ya que Luminex determina 80 microesferas por AAT y muestra, lo que se traduce en 79 duplicados técnicos. Esta robustez en la determinación reduce su coeficiente de variación, lo que unido a un mayor rango dinámico explica el mejor comportamiento del Luminex. La detección de autoanticuerpos fue específica para 7 de los 9 AAT determinados de forma multiplex mediante Luminex. Además, Luminex superó a ELISA en todos los rendimientos estadísticos, aportando más información en aquellos AAT relevantes, lo que se traducía en una mejora de sus AUC's. En consecuencia Luminex retuvo un mayor número de AAT significativos en las regresiones multivariantes [329]. Sin embargo, también observamos que AKT1 y PIM1 perdieron significación respecto a ELISA. La unión covalente a las microesferas Luminex podría explicar estos resultados, ya que las uniones covalentes podrían impedir la interacción con los autoanticuerpos, un fenómeno observado previamente en otras patologías [274]. La inmovilización a la microesfera podría desnaturalizar parcialmente la proteína dificultando el reconocimiento, y provocando la pérdida de epítomos conformacionales. Esto es habitual si la relación proteína/soporte es excesivamente alta. La inmovilización por interacciones hidrofóbicas del ELISA reduce drásticamente esa relación, permitiendo múltiples orientaciones del AAT sobre la placa de poliestireno sin forzar la desnaturalización, lo que podría explicar la diferencia de significación.

Aunque menos pronunciada en Luminex que en otras técnicas de inmunodetección, también observamos el fenómeno de interferencia de anticuerpos heterólogos, que puede darse en matrices complejas como suero o plasma y que provoca el enmascaramiento de las señales dando lugar a falsos negativos [328]. Se han descrito otros sistemas de microesferas que prescinden del poliestireno como los SeroMAP o VeraCode, que reducen la cantidad de uniones inespecíficas habituales en sangre o suero. No obstante, los estudios publicados en CCR para este último sistema que incluyen la cuantificación simultánea de CEA y GDF15 y los niveles de autoanticuerpos frente a p53 no superan una sensibilidad del 54%, aunque se caracterizan por una gran especificidad [241]. La inmovilización covalente de los AAT a las microesferas y su almacenaje en azida

sódica permiten la fabricación de lotes de microesferas con una caducidad superior a 2 meses [274, 326]. Este hecho, unido a que las microesferas se caracterizan por una mayor robustez para detectar autoanticuerpos, facilitaría la transferencia industrial de un potencial kit de diagnóstico basado en microesferas y su uso en ensayos clínicos. Entre los AAT seleccionados, encontramos algunos anteriormente descritos a través de diversas técnicas lo que supone una validación de nuestra metodología. Un ejemplo puede ser la validación de p53 como AAT de CCR utilizando ELISA [330] o microesferas holográficamente codificadas (VeraCode) [241].

La capacidad de detección de etapas asintomáticas del CCR es clave, ya que su pronóstico y mortalidad está principalmente asociado a su estadiaje [13, 320]. Esto es de particular importancia, ya que la detección presintomática del cáncer es la que resulta en una mayor reducción de la mortalidad [331]. En concreto, detectar CCR temprano en población de riesgo (mayores de 50 años) incrementaría las tasas de supervivencia [115, 123, 128]. En el contexto de la detección temprana (estadios I y II), nuestro panel diagnóstico se caracterizó por una AUC=0,81 similar a otras AUC anteriormente publicadas con un menor número de pacientes [222]. Es de destacar que apenas hay estudios clínicos en CCR enfocados a la detección temprana, únicamente el panel de seis biomarcadores circulantes (CEA, CYFRA 21-1, ferritin, osteopontin (OPN), seprase y autoanticuerpos frente a p53) obtenía un 69% de sensibilidad a una especificidad fijada del 95% [323], el cual está en un orden de magnitud similar al nuestro del 60%, considerando que cuenta con un menor número de pacientes (n=220).

Aunque nuestra cohorte de validación no contó con muestras previas al diagnóstico, el rendimiento de detección de casos tempranos (estadios I- II) fue excelente. Este experimento representó una generalización del uso clínico, ya que son los pacientes tempranos aquellos de mayor número y con menor tasa de detección. La dificultad de obtener muestras de suero de pacientes previas al diagnóstico, justifica que solo unos pocos estudios contemporáneos a nuestro trabajo describan el uso de autoanticuerpos en el diagnóstico del cáncer antes de que tenga lugar [308, 332, 333]. Por ejemplo, en cáncer de pulmón se utilizaron sueros recogidos 1 año antes del diagnóstico para identificar autoanticuerpos frente a Anexina I, 14-3-3 Theta y LAMR1 [333]. En cáncer de mama, se detectaron anticuerpos frente a p53, c-myc y MUC1 entre 7 y 27 meses antes del diagnóstico [332]. Esto se debe a que la producción de autoanticuerpos se produce antes de los síntomas [219], lo que permite su detección en la fase asintomática [141]. En CCR los datos más recientes apuntan hacia la presencia de autoanticuerpos frente a p53 al menos entre 1 y 3.8 años antes del diagnóstico clínico para pacientes [308].

La regresión logística seleccionó a EDIL3, GTF2B, HCK, PIM1, STK4 y p53 como aquellos AAT que conjuntamente sumaban la mayor capacidad diagnóstica, descartando AAT redundantes. Este panel fue utilizado para detectar los casos de CCR tanto frente a pacientes sanos como incluyendo pacientes con enfermedades relacionadas, e incluso sin tener en cuenta la edad. Como resultado, con una sensibilidad superior al 95%, se obtuvo una especificidad del 60%. Con el objetivo de corregir el sobreajuste (“*overfitting*”), las AUC obtenidas fueron corregidas a través de una validación interna mediante “*bootstrapping*”, que mantuvieron el buen rendimiento de las pruebas diagnósticas, aunque es recomendable una validación externa en estudios posteriores. Los resultados de nuestro panel de autoanticuerpos confirman los estudios anteriores desarrollados en nuestro laboratorio [182, 215, 237], al reproducir estos

resultados en mayores muestras clínicas independientes y con pacientes relacionados como EII u otros cánceres. El uso de una cohorte multicéntrica equilibrada en cuanto al género y la edad a lo largo de los diferentes grupos experimentales y estadios nos garantiza la robustez de nuestro panel de diagnóstico para su uso en una población generalizada, tanto en términos de género como edad. Además, los resultados obtenidos están en el mismo orden de magnitud que los biomarcadores proteicos más relevantes para CCR hasta la fecha [320], como TFF3 o GDF-15, con sensibilidades entre el 54% y el 78% respectivamente, que no pudieron corregirse por remuestreo [334]. Wild et al. utilizaron en 2010 una cohorte monocéntrica mayor y similar en composición (n=1037) para validar 6 biomarcadores séricos (entre los cuales se encuentra anti-p53) mediante ELISA, alcanzando sensibilidades individuales entre 20% y 40% para un 95% de especificidad, y 70% para su combinación [323].

En cualquier caso resulta complejo establecer comparaciones directas entre estudios dadas las diferencias metodológicas entre ellos. Nuestro estudio destaca por disponer de: i) una segunda cohorte de validación o corrección de los resultados por remuestreo; ii) un valor de corte establecido, y iii) pacientes control cuya colonoscopia confirma su ausencia de CCR. Nuestros criterios coinciden con los propuestos actualmente para que los estudios puedan ser comparados [320]. Además establecimos valores de corte a través de técnicas estadísticas que asegurasen una especificidad mínima del panel y utilizamos el remuestreo por “*bootstrapping*” para poder extrapolar nuestros resultados a una población externa representativa de la población global.

Por otra parte, nuestro panel diagnóstico discriminó pacientes con CCR frente a otros tipos de cáncer con una AUC de 0,75 y una especificidad del 44%; de las mayores para un método basado en autoanticuerpos e indicando que nuestro panel de autoanticuerpos es específico de CCR. Además, nuestro panel destacó por una elevada sensibilidad a la hora de diferenciar pacientes de CCR frente a aquellos con enfermedad inflamatoria intestinal (EII). A pesar del escaso número de pacientes con EII, los resultados fueron estadísticamente significativos. Por ello y aunque estos datos deben analizarse con cautela, nuestros resultados empujan a la realización de estudios de mayor tamaño muestral que confirmen la especificidad de nuestro panel ante enfermedades relacionadas.

Comparando nuestros resultados con los requerimientos para pruebas de cribado, nuestro VPP de 30.4% sobre población de riesgo dobla dichos requerimientos [140] y está por encima los valores entre 5.2% y 18.7% obtenido para los RCT pivotaes de la FOBT de guayacol [335-338] y del 10% obtenido para la FIT [339], comparadores estándares para la Comisión Europea [340, 341]. Otras pruebas como la multidetección de DNA fecal tienen un VPP del 24% [3]. Por ello, la implementación de nuestro panel de diagnóstico en un cribado poblacional tendría como objetivo primario la detección de CCR en fases asintomáticas ya que: i) mejora la efectividad de detección, al combinar sensibilidad y baja invasividad, ii) resultaría en un ahorro muy significativo al sistema nacional de salud, dados los crecientes costes de los tratamientos [342], y iii) su implementación no supone daño iatrogénico al 94% de ciudadanos que no contraerán CCR a lo largo de su vida [322], a la vez que es implementable en los chequeos rutinarios sin requerir ninguna acción por parte del paciente, aumentando la tasa de detección respecto a la colonoscopia [113, 343]. Esto supondría una mejora clara respecto a los métodos actuales de detección como la colonoscopia, caracterizados por su invasividad, alto coste o incapacidad de detección temprana, así como la inhabilitación del paciente y baja

laboral durante su realización [123, 344]. El efecto de la adherencia sobre el rendimiento del cribado se ha demostrado en nuestro país [123] y en los Países Bajos [124], dado el rechazo que expresaban los pacientes ante una colonoscopia primaria y sus posibles riesgos.

En una implementación piloto de nuestro panel de diagnóstico, sería necesario fijar la sensibilidad al 90-95% para evitar la pérdida de falsos negativos [345], y evaluar su especificidad manteniendo fija una alta sensibilidad [113, 343]. Por otra parte, para el tratamiento temprano, la caracterización molecular del tumor es irrelevante, ya que la intervención quirúrgica suele ser suficiente en los estadios I y IIA del desarrollo [320]. En conjunto, las características de nuestro panel de diagnóstico reúnen las características necesarias para el cribado poblacional al identificar a pacientes tanto tempranos como tardíos y discriminar aquellos con enfermedades relacionadas. El desarrollo del test diagnóstico basado en Luminex requeriría su implementación ciega ante un comparador como FOBT, única prueba de detección cuyos ensayos aleatorizados han demostrado su utilidad en diagnóstico temprano mediante cribado [118, 335, 337, 338, 346]. Este estudio evaluaría la capacidad de detección de adenocarcinomas o adenomas de alto riesgo [320, 322] y definiría aquella población de riesgo para la cual estaría indicada esta prueba, lo que evitaría someter a cirugía a ciudadanos con escasas probabilidades de contraer CCR [347], y podría determinar la frecuencia de pruebas requerida. Anteriormente se han desarrollado estudios similares que validaron la superioridad de la FIT frente a la gFOBT [116]. Actualmente, la gFOBT requiere su uso cada 1 o 2 años, mientras que la mayor precisión de FIT lo amplía hasta 3, reduciendo costes de implementación [348]. Aunque el uso de dos muestras por cribado ha mejorado la tasa de detección en gFOBT o FIT [349], la vida media y persistencia de los autoanticuerpos en sangre hace pensar que no sería necesaria, limitando los costes generados y aumentando su coste–efectividad [350].

El otro gran objetivo de esta Tesis Doctoral fue el estudio sobre la asociación de la respuesta inmune humoral de los pacientes de CCR con su pronóstico. Para ello, empleamos una población de sueros de 95 pacientes con cáncer colorrectal en diferentes estadios. Esta cohorte de estudio era representativa de la población general de pacientes diagnosticados de CCR: i) los pacientes jóvenes menores de 50 años presentaron mayor tendencia a la recidiva, aunque no presentaron diferencias en la mortalidad, en línea con resultados anteriores [297], y ii) los pacientes no metastásicos presentaron una mayor probabilidad de supervivencia y un mejor ILE (Figura 39).

La personalización de la terapia oncológica según el riesgo del paciente supone un importante ahorro para el sistema sanitario [141], tanto en cuanto a tratamientos innecesarios como en cuanto a la toxicología administrada a los pacientes que provoca la quimioterapia adyuvante. En cuanto a los pacientes de CCR, aquellos pacientes de alto riesgo experimentarían una mejora de la calidad de vida y un aumento de la supervivencia, ya que su vigilancia podría ser más intensiva. Así, será posible incrementar la posología en aquellas personas en mayor riesgo y por otro lado, reducirla en aquellas personas con menor riesgo, reduciendo la aparición de efectos secundarios. En esta Tesis Doctoral hemos desarrollado el primer trabajo que relaciona los niveles de autoanticuerpos con su valor pronóstico y supervivencia en cáncer colorrectal. No obstante, serían necesarios ulteriores estudios multicéntricos que permitan estratificar a los pacientes según su riesgo y respuesta a terapia. El método de determinación del valor de corte que dividía entre pacientes reactivos o no reactivos a un determinado AAT mejoró la significación en todos los AAT respecto de

otros métodos de determinación ([280] para una revisión de métodos), como la división por mediana y percentil 75 utilizados en otros estudios [304]. El valor de corte determina la prevalencia de los anticuerpos frente a un AAT. Las prevalencias obtenidas oscilaban entre el 12% y el 65% dependiendo del AAT, en un orden de magnitud similar al descrito en otros estudios [351]. En concreto, observamos una prevalencia de autoanticuerpos frente a p53 del 14%, algo menor al 24% determinado en estudios anteriores en diferentes tipos de cáncer [250], aunque dentro del 10-40% de prevalencia observado habitualmente en este tipo de biomarcadores [181].

Aunque el análisis de datos censurados permitió incluir a todos los pacientes sin necesidad de excluir aquellos cuyo seguimiento fue interrumpido, el tamaño de la cohorte permitió obtener datos significativos en recidiva temprana y tardía. Aunque algunos AAT tuvieron significaciones cercanas a $p=0,05$ en el análisis univariado, su asociación positiva o negativa se mantuvo durante los análisis de recidiva temprana, tardía, ILE y SG. Estos datos apoyan realizar estudios con cohortes más grandes que podrían otorgar mejor significación a estos AAT.

La asociación de los autoanticuerpos a un mejor o peor pronóstico nos permite extraer indicios sobre su rol en el avance del tumor. Comprobamos que altos niveles de anticuerpos frente a PIM1, GTF2B, STK4 y SRC estaban asociados a un mejor pronóstico de los pacientes de CCR, y en el caso de PIM1, GTF2B y STK4 tanto a nivel de mortalidad como de recurrencia. Otros autoanticuerpos, como los desarrollados frente a dsDNA con 55 pacientes también pronostican una mejor supervivencia frente al cáncer colorrectal [352]. Estos hechos concuerdan con la hipótesis de que los autoanticuerpos específicos de cáncer desarrollan un papel protector similar al que desempeñan frente a infecciones bacterianas, y que reflejaría la infiltración de linfocitos T específicos de antígeno en CCR, que también están asociados a una mejor supervivencia [353]. También reflejarían la infiltración de leucocitos eosinófilos, asociados a una mejora en el pronóstico tanto en ILE como SG del paciente de CCR independientemente de su estadio [291]. Los leucocitos eosinófilos están involucrados en la iniciación y desarrollo de la respuesta innata y adaptativa [354], así como en la respuesta inmunológica frente al tumor activándose a través de la IL2 e IL5 [355, 356]. En otros tipos de cánceres, como cáncer de mama [233], páncreas [304], próstata [234] o glioblastoma [357], se ha descrito la asociación entre altos niveles de autoanticuerpos y un mayor intervalo libre de supervivencia.

Por otro lado, pudimos observar que altos niveles de autoanticuerpos frente a AKT1 y p53 aumentaban el riesgo de padecer una recaída. De una manera análoga, MAPKAPK3 y TRIM21 (HR=2,25 y 2,28, respectivamente) tenían un efecto similar en la mortalidad, asociándose altos niveles de autoanticuerpos a tener más del doble de riesgo de fallecimiento. La asociación a un peor pronóstico de los autoanticuerpos específicos de tumor también ocurre en enfermedades autoinmunitarias como lupus o artritis reumatoide [180], mientras que la asociación de los autoanticuerpos frente a p53 con un peor pronóstico de cáncer colorrectal ya se había documentado previamente [353, 358-360]. Por otro lado se ha descrito que la sobreexpresión de p53 está asociada a un menor ILE [300]. Este hecho encajaría con nuestros resultados, tanto en los obtenidos en el estudio de pronóstico como en los modelos murinos de CCR, ya que hemos visto que la sobreexpresión de p53 inicia la respuesta humoral. No obstante su papel en otros cánceres como el de ovario parece estar en entredicho, publicándose la asociación de altos niveles de autoanticuerpos frente a p53 tanto a mal pronóstico [361] como a buen pronóstico [362]. La asociación con un peor pronóstico podría

estar relacionada con el hecho de que una sobreactivación del sistema inmune facilitaría el crecimiento del tumor, lo que podría explicar el comportamiento de este tipo de AAT, como se ha observado en cáncer de pulmón y mesotelioma [363].

Es de reseñar que este es el primer estudio que describe el papel pronóstico de AAT más allá de p53 en CCR. La existencia de autoanticuerpos asociados tanto a buen como a mal pronóstico ya se describió en 51 pacientes de cáncer de ovario y 62 pacientes de cáncer de páncreas [301]. La asociación a buen o mal pronóstico de los AAT podría explicarse también a través de los distintos momentos de aparición de los autoanticuerpos. Los estudios con modelos murinos de CCR revelaron que algunos autoanticuerpos que aparecían antes en el proceso tumoral tendían a disminuir en una etapa tardía de la enfermedad, como se podía observar claramente para p53 en los modelos de ratón AOM y DSS. Esto implicaría que bajos niveles de autoanticuerpos estuviesen asociados a un mayor avance de la enfermedad, y por tanto a un peor pronóstico. En nuestro estudio de supervivencia, el peor pronóstico se asociaría con bajos niveles de PIM1, GTF2B, STK4 y SRC, de los cuales, STK4 y GTF2B son anticuerpos de aparición temprana en nuestro estudio de la carcinogénesis murina.

Además, comparamos el valor de los AAT entre sí para seleccionar aquellos AAT no redundantes y combinarlos en un panel útil para determinar el pronóstico de los pacientes con CCR. Esto supone un método inédito de descubrimiento y desarrollo de un panel de autoanticuerpos para pronóstico, que podría ser aplicado en otros tipos de cáncer o en enfermedades autoinmune, ya que no hemos encontrado estudios que sigan una metodología similar. La selección de variables no sesgada del tipo jerárquico-parsimoniosa (“*stepwise*”) [292] ha sido ampliamente utilizada en múltiples estudios para la selección de variables no redundantes e independientes [222, 291]. Debido al debate en la comunidad científica sobre métodos de selección [364], empleamos el conocimiento biológico previo para iterar diferentes modelos a partir de la combinación propuesta. Tanto en SG como en ILE, se incluyeron variables estadísticamente significativas en el modelo multivariado que no eran significativas en el modelo univariado, como es el caso de SRC. Esto se debe a que su estimación del coeficiente o HR (y por tanto la estimación de su efecto) puede estar sesgada o enmascarada por la omisión de una o varias covariables con las que están negativamente correlacionadas (ver [292] para una revisión). Este fenómeno puede darse en bases de datos complejas en las que hay variables negativamente correlacionadas [365], algo que ocurre en nuestro caso, con AAT asociados a buen o a mal pronóstico. Esto hace que sea necesario ampliar el número de variables que se utilizan en el análisis multivariante, como ha sido descrito anteriormente [364].

Otro de los hallazgos más reseñables de este estudio, consistió en encontrar que el panel pronóstico basado únicamente en AKT1, PIM1 y GTF2B fue capaz de detectar casi dos tercios de los casos de pacientes de CCR que presentarían recidiva, apenas detectando pacientes que no recaerían como falsos positivos, aspecto de gran valor en una enfermedad ya diagnosticada y en donde el coste del falso positivo sería alto [345]. Este panel de detección de la recidiva temprana sería de gran utilidad para identificar el 6% de pacientes diagnosticados con CCR que sufren recidiva de intervalo, aquella que ocurre entre 6 y 60 meses después del diagnóstico de la enfermedad [105], con el objetivo de intensificar su vigilancia y considerar la administración de quimioterapia adyuvante en su tratamiento. En cáncer de colon no existen otros estudios,

sin embargo en cáncer de ovario fue posible detectar recidivas 9,07 meses antes de que tuvieran lugar [366]. Para ello, los investigadores utilizaron 3 antígenos desplegados en fagos e impresos en micromatrices.

El uso de los “estados favorables” de los AAT STK4, SRC, MAPKAPK3, GTF2B y p53 para agrupar a pacientes según su nivel de riesgo también fue utilizado previamente en cáncer renal y cáncer de pulmón [258, 279]. Este abordaje discriminó 3 grupos de riesgo tanto en ILE como en SG y su significación mejoró las metodologías anteriores para elaborar métodos de pronóstico donde solo utilizaron 2 tendencias de supervivencia y AAT asociados a buen pronóstico [301, 304]. La identificación de pacientes que sufren cánceres más agresivos y con mayor propensión a una recaída de la enfermedad y por tanto con mayor riesgo de fallecimiento por cáncer es imprescindible para adaptar las terapias al riesgo de cada paciente después del diagnóstico y la intervención quirúrgica [367]. Nuestro panel basado en STK4, SRC, MAPKAPK3, GTF2B y p53 permite identificar a aquellos pacientes de CCR de alto riesgo de sufrir tanto recidiva como fallecimiento, lo que extrapolado a su utilidad en clínica, permitiría adaptar y personalizar la quimioterapia adyuvante a cada paciente de CCR en función de los niveles de autoanticuerpos que tenga.

Otro resultado destacable consistió en demostrar la utilidad pronóstica tanto en población no metastásica como en población total del panel compuesto por STK4, SRC, MAPKAPK3, GTF2B y p53, lo que nos aseguró que nuestro panel no era dependiente de la variable estadio. Además, la corrección por remuestreo ofrece una caída del C-index de 0.10 unidades tanto para ILE como SG, lo que significa que el test es extrapolable a poblaciones externas, además de demostrar su robustez [368]. Aunque es habitual incluirla en publicaciones de referencia [258], la corrección por remuestreo no se ha descrito en los estudios que valoran la capacidad pronóstica de otros biomarcadores moleculares de CCR como MMP11 y CD147 [369], EPCAM [370], PDXL1 [371] o CTNNB1 [372], por lo que es difícil realizar comparaciones con nuestro estudio.

Pese a nuestra validación interna por remuestreo, una validación externa confirmaría el poder y utilidad pronóstica de esta prueba y permitiría compararla con el estándar actual, el CEA [2, 173, 174] y verificar si la implementación de pruebas pronósticas basadas en la cuantificación de los niveles de autoanticuerpos frente a STK4, SRC, MAPKAPK3, GTF2B y p53 permitiría adaptar y personalizar la quimioterapia adyuvante según el riesgo de recidivas y potencial supervivencia aportando más información de la que dispone el facultativo. Para el seguimiento de paciente, está disponible la endoscopia y las pruebas por tomografía computerizada. Para el seguimiento y pronóstico, los valores de CEA circulantes podrían alertar de una recurrencia curable [373]. No obstante, el coste de ambas técnicas y el número de pruebas necesario para obtener beneficios en términos de supervivencia de los pacientes todavía son objeto de debate, abriendo un espacio de oportunidad para nuevas tecnologías pronósticas que permitan personalizar los regímenes terapéuticos [3, 374].

En conjunto, esta Tesis Doctoral ha analizado la respuesta inmune humoral frente al CCR tanto en modelos murinos como en pacientes de CCR para su uso en diagnóstico y pronóstico, lo que nos ha permitido estudiar y caracterizar cada uno de los AAT identificados, las alteraciones moleculares que dan lugar a esta respuesta inmune, observar como evolucionan los niveles de autoanticuerpos y cómo estos pueden ser útiles para desarrollar paneles de AAT que identifiquen casos de CCR temprano o estimen grupos de riesgo en función de la supervivencia. Este trabajo lleva a los AAT a las puertas de estudios clínicos aleatorizados y producción piloto de los paneles diagnósticos y pronósticos de CCR.

Conclusions

SO IT'S OVER? I DIDN'T REALIZE,

IT'S SO MUCH COLDER, BUT IT WAS NO SURPRISE.

CHANGING OF THE SEASONS - TWO DOOR CINEMA CLUB

1. Los AAT producidos en *E. coli* son mejor reconocidos por los autoanticuerpos de CCR que aquellos producidos en células de insecto Sf9.
2. Los tres modelos murinos de CCR mimetizan la respuesta humoral observada en pacientes humanos.
3. Los modelos murinos de CCR han permitido determinar que la respuesta humoral es específica de cáncer, ya que sólo se produce en aquellos ratones que desarrollan lesiones neoplásicas,
4. La respuesta humoral en ratones tiene lugar en eventos muy tempranos de la tumorigénesis y aumenta en función de la progresión tumoral, validando su uso para el diagnóstico preclínico y temprano del CCR, cuando todavía no es detectable por otras técnicas
5. Tanto en los modelos murinos como en pacientes humanos los autoanticuerpos se dirigen frente a las mismas proteínas, lo que sugiere que están involucradas en la formación y progresión del CCR.
6. La generación de autoanticuerpos se asocia en general con una mayor expresión de mRNA o proteína en tejido afectado por CCR, aunque puedan existir otros mecanismos.
7. Se ha desarrollado y optimizado un método para la detección múltiple de autoanticuerpos basado en Luminex que mejora técnicamente la capacidad del ELISA, en base a su mayor rango dinámico y centuplicado técnico.
8. El panel diagnóstico obtenido mediante Luminex mejoró significativamente la detección de los autoanticuerpos respecto al ELISA, y discriminó pacientes con CCR de individuos sanos, de pacientes con enfermedades relacionadas y de pacientes con otros tipos de cáncer, demostrando su especificidad.
9. El ensayo Luminex ha sido validado clínicamente con ratios de probabilidad positiva (LR+) superiores a 2 y especificidades superiores al 50%, cuando se fijaba la sensibilidad al 90%, por lo que podría ser implementado para rutina clínica hospitalaria para cribados poblacionales y detección temprana de pacientes con CCR.
10. Los niveles de autoanticuerpos se asocian con el pronóstico de los pacientes de CCR.
11. En general, altos niveles de autoanticuerpos frente a STK4, SRC, MAPKAPK3, GTF2B, PIM1 y EDIL3 están asociados con un mejor pronóstico de los pacientes con CCR. Únicamente los autoanticuerpos frente a MAPKAPK3 y p53 están asociados con menores tasas de supervivencia.
12. La implementación de pruebas serológicas basadas en la cuantificación de los niveles de autoanticuerpos frente a STK4, SRC, MAPKAPK3, GTF2B y p53 podría ser utilizada en rutina clínica para determinar el pronóstico de los pacientes de CCR con el fin de adaptar y personalizar su tratamiento en el momento del diagnóstico de la enfermedad.

Bibliografía

SAVE UP ALL THE GLITTER FROM THE GROUND, GIANTS HOLD US, THE FUTURE CAN BE FOUND

LOOK AT STARS, SEE THE CRADLE WE CAME FROM, RIGHT FROM THE START, LET ELECTRIC IN AGAIN AGAIN

WE WERE YOUNG - MONARCHY

1. Ferlay, J., et al., *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008*. Int J Cancer, 2010. **127**(12): p. 2893-917.
2. Duffy, M.J., et al., *Tumour markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines for clinical use*. Eur J Cancer, 2007. **43**(9): p. 1348-60.
3. Kuipers, E.J. and M.C. Spaander, *Colorectal Cancer Screening by Colonoscopy, CT-Colonography, or Fecal Immunochemical Test*. J Natl Cancer Inst, 2016. **108**(2): p. 15065.
4. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*. Int J Cancer, 2015. **136**(5): p. E359-86.
5. SEOM, S.E.d.O.M., *Las Cifras del Cáncer en España 2014*, S.E.d.O. Médica, Editor. 2014.
6. Staton, C.A., et al., *The angiogenic switch occurs at the adenoma stage of the adenoma carcinoma sequence in colorectal cancer*. Gut, 2007. **56**(10): p. 1426-32.
7. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
8. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
9. Tanaka, T., *Development of an inflammation-associated colorectal cancer model and its application for research on carcinogenesis and chemoprevention*. Int J Inflam, 2012. **2012**: p. 658786.
10. Ponz de Leon, M., et al., *Aetiology of colorectal cancer and relevance of monogenic inheritance*. Gut, 2004. **53**(1): p. 115-22.
11. Foersch, S. and M.F. Neurath, *Colitis-associated neoplasia: molecular basis and clinical translation*. Cell Mol Life Sci, 2014. **71**(18): p. 3523-35.
12. Ogino, S., et al., *Molecular pathological epidemiology of colorectal neoplasia: an emerging transdisciplinary and interdisciplinary field*. Gut, 2011. **60**(3): p. 397-411.
13. Cunningham, D., et al., *Colorectal cancer*. Lancet, 2010. **375**(9719): p. 1030-47.
14. Bingham, S.A., et al., *Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study*. Lancet, 2003. **361**(9368): p. 1496-501.
15. Chan, A.T. and E.L. Giovannucci, *Primary prevention of colorectal cancer*. Gastroenterology, 2010. **138**(6): p. 2029-2043 e10.
16. Bouvard, V., et al., *Carcinogenicity of consumption of red and processed meat*. Lancet Oncol, 2015. **16**(16): p. 1599-600.
17. Song, M., W.S. Garrett, and A.T. Chan, *Nutrients, foods, and colorectal cancer prevention*. Gastroenterology, 2015. **148**(6): p. 1244-60 e16.
18. Botteri, E., et al., *Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis*. JAMA, 2008. **300**(23): p. 2765-78.
19. Botteri, E., et al., *Cigarette smoking and adenomatous polyps: a meta-analysis*. Gastroenterology, 2008. **134**(2): p. 388-95.

20. Liang, P.S., T.Y. Chen, and E. Giovannucci, *Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis*. *Int J Cancer*, 2009. **124**(10): p. 2406-15.
21. Buchanan, D.D., et al., *Risk factors for colorectal cancer in patients with multiple serrated polyps: a cross-sectional case series from genetics clinics*. *PLoS One*, 2010. **5**(7): p. e11636.
22. Fedirko, V., *Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies*. *Ann. Oncol.*, 2011. **22**: p. 1958-1972.
23. Guraya, S.Y., *Association of type 2 diabetes mellitus and the risk of colorectal cancer: A meta-analysis and systematic review*. *World J Gastroenterol*, 2015. **21**(19): p. 6026-31.
24. Doubeni, C.A., et al., *Contribution of behavioral risk factors and obesity to socioeconomic differences in colorectal cancer incidence*. *J Natl Cancer Inst*, 2012. **104**(18): p. 1353-62.
25. Dahm, C.C., *Dietary fiber and colorectal cancer risk: a nested case-control study using food diaries*. 2010. **102**: p. 614-626.
26. Arem, H., et al., *Physical activity and cancer-specific mortality in the NIH-AARP Diet and Health Study cohort*. *Int J Cancer*, 2014. **135**(2): p. 423-31.
27. World Cancer Research Fund International, W., *Continuous update project report. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of colorectal cancer, in Diet And Cancer Report*. 2011.
28. Algra, A.M. and P.M. Rothwell, *Effects of regular aspirin on long-term cancer incidence and metastasis: a systematic comparison of evidence from observational studies versus randomised trials*. *Lancet Oncol*, 2012. **13**(5): p. 518-27.
29. Andersen, V. and U. Vogel, *Systematic review: interactions between aspirin, and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and polymorphisms in relation to colorectal cancer*. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 2014. **40**: p. 147-159.
30. Nan, H., *Association of aspirin and NSAID use with risk of colorectal cancer according to genetic variants*. *JAMA*, 2015. **313**: p. 1133-1142.
31. Bardou, M., A. Barkun, and M. Martel, *Effect of statin therapy on colorectal cancer*. *Gut*, 2010. **59**(11): p. 1572-85.
32. Liu, Y., *Association between statin use and colorectal cancer risk: a meta-analysis of 42 studies*. *Cancer Causes Control*, 2014. **25**: p. 237-249.
33. Limsui, D., *Postmenopausal hormone therapy and colorectal cancer risk by molecularly defined subtypes among older women*. *Gut*, 2012. **61**: p. 1299-1305.
34. Umar, A., et al., *Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability*. *J Natl Cancer Inst*, 2004. **96**(4): p. 261-8.
35. Lynch, P.M., et al., *A follow-up study of colonic epithelial proliferation as a biomarker in a Native-American family with hereditary nonpolyposis colon cancer*. *J Natl Cancer Inst*, 1991. **83**(13): p. 951-4.
36. Thibodeau, S.N., G. Bren, and D. Schaid, *Microsatellite instability in cancer of the proximal colon*. *Science*, 1993. **260**(5109): p. 816-9.
37. Popat, S., R. Hubner, and R.S. Houlston, *Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(3): p. 609-18.

38. Vasen, H.F., et al., *The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC)*. Dis Colon Rectum, 1991. **34**(5): p. 424-5.
39. Guidoboni, M., et al., *Microsatellite instability and high content of activated cytotoxic lymphocytes identify colon cancer patients with a favorable prognosis*. Am J Pathol, 2001. **159**(1): p. 297-304.
40. Dolcetti, R., et al., *High prevalence of activated intraepithelial cytotoxic T lymphocytes and increased neoplastic cell apoptosis in colorectal carcinomas with microsatellite instability*. Am J Pathol, 1999. **154**(6): p. 1805-13.
41. Ishikawa, T., et al., *Tumor-specific immunological recognition of frameshift-mutated peptides in colon cancer with microsatellite instability*. Cancer Res, 2003. **63**(17): p. 5564-72.
42. Groden, J., et al., *Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene*. Cell, 1991. **66**(3): p. 589-600.
43. Winawer, S.J., et al., *Risk of colorectal cancer in the families of patients with adenomatous polyps. National Polyp Study Workgroup*. N Engl J Med, 1996. **334**(2): p. 82-7.
44. Sjoblom, T., et al., *The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers*. Science, 2006. **314**(5797): p. 268-74.
45. Moran, A., et al., *Differential colorectal carcinogenesis: Molecular basis and clinical relevance*. World J Gastrointest Oncol, 2010. **2**(3): p. 151-8.
46. Vogelstein, B., et al., *Genetic alterations during colorectal-tumor development*. N Engl J Med, 1988. **319**(9): p. 525-32.
47. Kinzler, K.W. and B. Vogelstein, *Lessons from hereditary colorectal cancer*. Cell, 1996. **87**(2): p. 159-70.
48. Cho, K.R. and B. Vogelstein, *Genetic alterations in the adenoma--carcinoma sequence*. Cancer, 1992. **70**(6 Suppl): p. 1727-31.
49. Lengauer, C., K.W. Kinzler, and B. Vogelstein, *Genetic instabilities in human cancers*. Nature, 1998. **396**(6712): p. 643-9.
50. Grady, W.M., *Genomic instability and colon cancer*. Cancer Metastasis Rev, 2004. **23**(1-2): p. 11-27.
51. Grady, W.M. and J.M. Carethers, *Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis*. Gastroenterology, 2008. **135**(4): p. 1079-99.
52. Gollin, S.M., *Mechanisms leading to chromosomal instability*. Semin Cancer Biol, 2005. **15**(1): p. 33-42.
53. Worthley, D.L., et al., *Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(28): p. 3784-91.
54. Triantafyllidis, J.K., G. Nasioulas, and P.A. Kosmidis, *Colorectal cancer and inflammatory bowel disease: epidemiology, risk factors, mechanisms of carcinogenesis and prevention strategies*. Anticancer Res, 2009. **29**(7): p. 2727-37.
55. Weisenberger, D.J., et al., *CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer*. Nature genetics, 2006. **38**(7): p. 787-793.

56. Jass, J.R., *Molecular heterogeneity of colorectal cancer: Implications for cancer control*. Surg Oncol, 2007. **16 Suppl 1**: p. S7-9.
57. Imai, K. and H. Yamamoto, *Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics*. Carcinogenesis, 2008. **29**(4): p. 673-680.
58. Kolodner, R.D., et al., *Germ-line msh6 mutations in colorectal cancer families*. Cancer Res, 1999. **59**(20): p. 5068-74.
59. Woerner, S.M., et al., *Microsatellite instability of selective target genes in HNPCC-associated colon adenomas*. Oncogene, 2005. **24**(15): p. 2525-35.
60. Duval, A. and R. Hamelin, *Mutations at Coding Repeat Sequences in Mismatch Repair-deficient Human Cancers Toward a New Concept of Target Genes for Instability*. Cancer Res, 2002. **62**(9): p. 2447-2454.
61. Markowitz, S., et al., *Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability*. Science, 1995. **268**(5215): p. 1336-8.
62. Souza, R.F., et al., *Microsatellite instability in the insulin-like growth factor II receptor gene in gastrointestinal tumours*. Nat Genet, 1996. **14**(3): p. 255-7.
63. Yoshitaka, T., et al., *Mutations of E2F-4 trinucleotide repeats in colorectal cancer with microsatellite instability*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **227**(2): p. 553-7.
64. Rampino, N., et al., *Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype*. Science, 1997. **275**(5302): p. 967-9.
65. Sweetser, S., T.C. Smyrk, and A. Sugumar, *Serrated polyps: critical precursors to colorectal cancer*. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2011. **5**(5): p. 627-35.
66. Kornbluth, A. and D.B. Sachar, *Ulcerative colitis practice guidelines in adults*. American College of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. Am J Gastroenterol, 1997. **92**(2): p. 204-11.
67. Greenstein, A.J., *Cancer in inflammatory bowel disease*. Mt Sinai J Med, 2000. **67**(3): p. 227-40.
68. Jess, T., C. Rungoe, and L. Peyrin-Biroulet, *Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a meta-analysis of population-based cohort studies*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2012. **10**(6): p. 639-45.
69. Tanaka, T., et al., *A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate*. Cancer Sci, 2003. **94**(11): p. 965-73.
70. Rosenberg, D.W., C. Giardina, and T. Tanaka, *Mouse models for the study of colon carcinogenesis*. Carcinogenesis, 2009. **30**(2): p. 183-96.
71. Foersch, S., M.J. Waldner, and M.F. Neurath, *Colitis and colorectal cancer*. Dig Dis, 2012. **30**(5): p. 469-76.
72. Eberhart, C.E., et al., *Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas*. Gastroenterology, 1994. **107**(4): p. 1183-8.
73. Greten, F.R., et al., *IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer*. Cell, 2004. **118**(3): p. 285-96.

74. Kumar, A., et al., *Nuclear factor- κ B: its role in health and disease*. Journal of Molecular Medicine, 2004. **82**(7): p. 434-448.
75. Cooper, H.S. and J.H. Yardley, *Colonic "precancer" in Crohn's disease*. Gastroenterology, 1981. **80**: p. 578-84.
76. Jess, T., et al., *Decreasing risk of colorectal cancer in patients with inflammatory bowel disease over 30 years*. Gastroenterology, 2012. **143**(2): p. 375-81 e1;
77. Castano-Milla, C., M. Chaparro, and J.P. Gisbert, *Systematic review with meta-analysis: the declining risk of colorectal cancer in ulcerative colitis*. Aliment Pharmacol Ther, 2014. **39**(7): p. 645-59.
78. Dukes, C., *Histological Grading of Rectal Cancer: (Section of Pathology)*. Proc R Soc Med, 1937. **30**(4): p. 371-6.
79. Dukes, C.E., *The classification of cancer of the rectum*. The Journal of Pathology and Bacteriology, 1932. **35**(3): p. 323-332.
80. Astler, V.B. and F.A. Coller, *The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum*. Ann Surg, 1954. **139**(6): p. 846-52.
81. American Cancer Society. *How is colorectal cancer staged?* 2015 08/13/2015.
82. Sobin, L.H., M.K. Gospodarowicz, and C. Wittekind, *International Union against cancer. TNM classification of malignant tumours*. Chichester, West Sussex, UK; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell.
83. Gunderson, L.L., et al., *Revised TN categorization for colon cancer based on national survival outcomes data*. J Clin Oncol, 2010. **28**(2): p. 264-71.
84. Neufert, C., C. Becker, and M.F. Neurath, *An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression*. Nat Protoc, 2007. **2**(8): p. 1998-2004.
85. Okayasu, I., et al., *Dysplasia and carcinoma development in a repeated dextran sulfate sodium-induced colitis model*. J Gastroenterol Hepatol, 2002. **17**(10): p. 1078-83.
86. Corpet, D.E. and F. Pierre, *How good are rodent models of carcinogenesis in predicting efficacy in humans? A systematic review and meta-analysis of colon chemoprevention in rats, mice and men*. Eur J Cancer, 2005. **41**(13): p. 1911-22.
87. Nambiar, P.R., et al., *Preliminary analysis of azoxymethane induced colon tumors in inbred mice commonly used as transgenic/knockout progenitors*. Int J Oncol, 2003. **22**(1): p. 145-50.
88. Fichtner-Feigl, S., R. Kesselring, and W. Strober, *Chronic inflammation and the development of malignancy in the GI tract*. Trends Immunol, 2015. **36**(8): p. 451-9.
89. Zaki, M.H., M. Lamkanfi, and T.D. Kanneganti, *The Nlrp3 inflammasome: contributions to intestinal homeostasis*. Trends Immunol, 2011. **32**(4): p. 171-9.
90. Gerling, M., et al., *Characterization of chromosomal instability in murine colitis-associated colorectal cancer*. PLoS One, 2011. **6**(7): p. e22114.
91. Terzic, J., et al., *Inflammation and colon cancer*. Gastroenterology, 2010. **138**(6): p. 2101-2114 e5.

92. Suzuki, R., et al., *Sequential observations on the occurrence of preneoplastic and neoplastic lesions in mouse colon treated with azoxymethane and dextran sodium sulfate*. *Cancer Sci*, 2004. **95**(9): p. 721-7.
93. De Robertis, M., et al., *The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies*. *J Carcinog*, 2011. **10**: p. 9.
94. Morton, D.B., et al., *Refining procedures for the administration of substances. Report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. British Veterinary Association Animal Welfare Foundation/Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments/Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals/Universities Federation for Animal Welfare*. *Lab Anim*, 2001. **35**(1): p. 1-41.
95. Clapper, M.L., H.S. Cooper, and W.C. Chang, *Dextran sulfate sodium-induced colitis-associated neoplasia: a promising model for the development of chemopreventive interventions*. *Acta Pharmacol Sin*, 2007. **28**(9): p. 1450-9.
96. Wirtz, S., et al., *Chemically induced mouse models of intestinal inflammation*. *Nat Protoc*, 2007. **2**(3): p. 541-6.
97. Meira, L.B., et al., *DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice*. *J Clin Invest*, 2008. **118**(7): p. 2516-25.
98. Cooper, H.S., et al., *Dysplasia and cancer in the dextran sulfate sodium mouse colitis model. Relevance to colitis-associated neoplasia in the human: a study of histopathology, B-catenin and p53 expression and the role of inflammation*. *Carcinogenesis*, 2000. **21**(4): p. 757-68.
99. Okayasu, I., et al., *A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice*. *Gastroenterology*, 1990. **98**(3): p. 694-702.
100. Pawa, N., T. Arulampalam, and J.D. Norton, *Screening for colorectal cancer: established and emerging modalities*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2011. **8**(12): p. 711-22.
101. Harewood, G.C. and D.A. Ahlquist, *Fecal occult blood testing for iron deficiency: a reappraisal*. *Dig Dis*, 2000. **18**(2): p. 75-82.
102. Cappell, M.S., *The pathophysiology, clinical presentation, and diagnosis of colon cancer and adenomatous polyps*. *Med Clin North Am*, 2005. **89**(1): p. 1-42.
103. Thompson, M.R., et al., *Predictive value of common symptom combinations in diagnosing colorectal cancer*. *Br J Surg*, 2007. **94**(10): p. 1260-5.
104. Heo, C.-K., Y.Y. Bahk, and E.-W. Cho, *Tumor-associated autoantibodies as diagnostic and prognostic biomarkers*. *BMB reports*, 2012. **45**(12): p. 677.
105. Samadder, N.J., et al., *Characteristics of missed or interval colorectal cancer and patient survival: a population-based study*. *Gastroenterology*, 2014. **146**(4): p. 950-60.
106. Gupta, A.K., D.E. Brenner, and D.K. Turgeon, *Early detection of colon cancer: new tests on the horizon*. *Mol Diagn Ther*, 2008. **12**(2): p. 77-85.
107. Burt, R.W., *Colorectal cancer screening*. *Curr Opin Gastroenterol*, 2010. **26**: p. 466-470.
108. Burt, R.W., et al., *NCCN clinical practice guidelines in oncology. Colorectal cancer screening*. *J Natl Compr Canc Netw*, 2010. **8**(1): p. 8-61.

109. Hewitson, P., et al., *Cochrane systematic review of colorectal cancer screening using the fecal occult blood test (hemoccult): an update*. *Am J Gastroenterol*, 2008. **103**(6): p. 1541-9.
110. Boss, N. and C.S. Argilaga, *Diccionario médico Roche*. 1993: Doyma.
111. Ahnen, D.J., *The American College of Gastroenterology Emily Couric Lecture—The Adenoma–Carcinoma Sequence Revisited: Has the Era of Genetic Tailoring Finally Arrived?*. *The American journal of gastroenterology*, 2011. **106**(2): p. 190-198.
112. Segura, A., *Cribado del cáncer colorrectal: no es lo mismo predicar que dar trigo, ni se empieza la casa por el tejado*. *Gaceta Sanitaria*, 2011. **25**(4): p. 331-332.
113. Kuipers, E.J., T. Rosch, and M. Bretthauer, *Colorectal cancer screening—optimizing current strategies and new directions*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2013. **10**(3): p. 130-42.
114. Schreuders, E.H., et al., *Colorectal cancer screening: a global overview of existing programmes*. *Gut*, 2015. **64**(10): p. 1637-49.
115. van Rossum, L.G., et al., *Random comparison of guaiac and immunochemical fecal occult blood tests for colorectal cancer in a screening population*. *Gastroenterology*, 2008. **135**(1): p. 82-90.
116. Tinmouth, J., I. Lansdorp-Vogelaar, and J.E. Allison, *Faecal immunochemical tests versus guaiac faecal occult blood tests: what clinicians and colorectal cancer screening programme organisers need to know*. *Gut*, 2015: p. gutjnl-2014-308074.
117. Towler, B.P., et al., *Screening for colorectal cancer using the faecal occult blood test, hemoccult*. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2000. **2**: p. CD001216.
118. Scholefield, J.H., et al., *Nottingham trial of faecal occult blood testing for colorectal cancer: a 20-year follow-up*. *Gut*, 2012. **61**(7): p. 1036-40.
119. Ouyang, D.L., et al., *Noninvasive testing for colorectal cancer: a review*. *Am J Gastroenterol*, 2005. **100**(6): p. 1393-403.
120. Hol, L., *Screening for colorectal cancer: randomised trial comparing guaiac-based and immunochemical faecal occult blood testing and flexible sigmoidoscopy*. *Gut*, 2009. **59**: p. 62-68.
121. Levi, Z., et al., *A higher detection rate for colorectal cancer and advanced adenomatous polyp for screening with immunochemical fecal occult blood test than guaiac fecal occult blood test, despite lower compliance rate. A prospective, controlled, feasibility study*. *Int J Cancer*, 2011. **128**(10): p. 2415-24.
122. Parra-Blanco, A., et al., *Diagnostic accuracy of immunochemical versus guaiac faecal occult blood tests for colorectal cancer screening*. *J Gastroenterol*, 2010. **45**(7): p. 703-12.
123. Quintero, E., et al., *Colonoscopy versus fecal immunochemical testing in colorectal-cancer screening*. *N Engl J Med*, 2012. **366**(8): p. 697-706.
124. Kapidzic, A., et al., *Attendance and yield over three rounds of population-based fecal immunochemical test screening*. *Am J Gastroenterol*, 2014. **109**(8): p. 1257-64.
125. Cottet, V., et al., *Colonoscopic screening of first-degree relatives of patients with large adenomas: increased risk of colorectal tumors*. *Gastroenterology*, 2007. **133**(4): p. 1086-92.
126. Rex, D.K., et al., *American College of Gastroenterology guidelines for colorectal cancer screening 2009 [corrected]*. *Am J Gastroenterol*, 2009. **104**(3): p. 739-50.

127. Gellad, Z., *Personalisation of colorectal cancer screening*. *Lancet Oncol*, 2013. **14**(8): p. 673-5.
128. Edwards, B.K., et al., *Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2006, featuring colorectal cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates*. *Cancer*, 2010. **116**(3): p. 544-73.
129. Zauber, A.G., et al., *Colonoscopic polypectomy and long-term prevention of colorectal-cancer deaths*. *N Engl J Med*, 2012. **366**(8): p. 687-96.
130. Corley, D.A., *Adenoma detection rate and risk of colorectal cancer and death*. *N Engl J Med*, 2014. **370**: p. 1298-1306.
131. Loberg, M., et al., *Long-term colorectal-cancer mortality after adenoma removal*. *N Engl J Med*, 2014. **371**(9): p. 799-807.
132. Brenner, H., et al., *Protection from colorectal cancer after colonoscopy: a population-based, case-control study*. *Ann Intern Med*, 2011. **154**(1): p. 22-30.
133. Scholefield, J.H., *ABC of colorectal cancer: screening*. *BMJ*, 2000. **321**(7267): p. 1004-6.
134. Thompson, M.R., et al., *Flexible sigmoidoscopy and whole colonic imaging in the diagnosis of cancer in patients with colorectal symptoms*. *Br J Surg*, 2008. **95**(9): p. 1140-6.
135. Hoff, G., et al., *Risk of colorectal cancer seven years after flexible sigmoidoscopy screening: randomised controlled trial*. *BMJ*, 2009. **338**: p. 1846.
136. Atkin, W.S., et al., *Once-only flexible sigmoidoscopy screening in prevention of colorectal cancer: a multicentre randomised controlled trial*. *Lancet*, 2010. **375**(9726): p. 1624-33.
137. Kim, D.H., et al., *CT colonography versus colonoscopy for the detection of advanced neoplasia*. *N Engl J Med*, 2007. **357**(14): p. 1403-12.
138. Pooler, B.D., et al., *CT Colonography Reporting and Data System (C-RADS): benchmark values from a clinical screening program*. *AJR Am J Roentgenol*, 2014. **202**(6): p. 1232-7.
139. de Wijkerslooth, T.R., et al., *Burden of colonoscopy compared to non-cathartic CT-colonography in a colorectal cancer screening programme: randomised controlled trial*. *Gut*, 2012. **61**(11): p. 1552-9.
140. Wentzensen, N. and S. Wacholder, *From differences in means between cases and controls to risk stratification: a business plan for biomarker development*. *Cancer Discov*, 2013. **3**(2): p. 148-57.
141. Barderas, R., R. Villar-Vázquez, and J.I. Casal, *Colorectal Cancer Circulating Biomarkers*, in *Biomarkers in Cancer*, V.R. Preedy and V.B. Patel, Editors. 2015, Springer Netherlands. p. 1-21.
142. Gottlieb, S. and J. Woodcock, *A regulatory perspective on in vitro diagnostics*. *Nat Biotechnol*, 2006. **24**(8): p. 927-9.
143. Coyle, V.M. and P.G. Johnston, *Genomic markers for decision making: what is preventing us from using markers?* *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2010. **7**(2): p. 90-97.
144. Shalon, D., S.J. Smith, and P.O. Brown, *A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization*. *Genome Res*, 1996. **6**(7): p. 639-45.
145. Sorlie, T., et al., *Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(19): p. 10869-74.

146. Dhanasekaran, S.M., et al., *Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer*. Nature, 2001. **412**(6849): p. 822-6.
147. Thykjaer, T., et al., *Identification of gene expression patterns in superficial and invasive human bladder cancer*. Cancer Res, 2001. **61**(6): p. 2492-9.
148. DeRisi, J., et al., *Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer*. Nat Genet, 1996. **14**(4): p. 457-60.
149. Buchen, L., *Cancer: Missing the mark*. Nature, 2011. **471**(7339): p. 428-32.
150. van 't Veer, L.J., et al., *Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer*. Nature, 2002. **415**(6871): p. 530-6.
151. Sadanandam, A., J. Gray, and D. Hanahan, *Reply to Colorectal cancer classification based on gene expression is not associated with FOLFIRI response*. Nat Med, 2014. **20**(11): p. 1231-2.
152. Sadanandam, A., et al., *A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy*. Nat Med, 2013. **19**(5): p. 619-25.
153. Sadanandam, A., et al., *Reconciliation of classification systems defining molecular subtypes of colorectal cancer: interrelationships and clinical implications*. Cell Cycle, 2014. **13**(3): p. 353-7.
154. Karapetis, C.S., et al., *K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer*. N Engl J Med, 2008. **359**(17): p. 1757-65.
155. Khambata-Ford, S., et al., *Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab*. J Clin Oncol, 2007. **25**(22): p. 3230-7.
156. Grutzmann, R., et al., *Sensitive detection of colorectal cancer in peripheral blood by septin 9 DNA methylation assay*. PLoS One, 2008. **3**(11): p. e3759.
157. Church, T.R., et al., *Prospective evaluation of methylated SEPT9 in plasma for detection of asymptomatic colorectal cancer*. Gut, 2014. **63**(2): p. 317-25.
158. Ahlquist, D.A., et al., *Stool DNA and occult blood testing for screen detection of colorectal neoplasia*. Ann Intern Med, 2008. **149**(7): p. 441-50.
159. Bosch, L.J., et al., *Molecular tests for colorectal cancer screening*. Clin Colorectal Cancer, 2011. **10**(1): p. 8-23.
160. Imperiale, T.F., *Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer screening*. N Engl J Med, 2014. **370**: p. 1287-1297.
161. Mischak, H., et al., *Recommendations for biomarker identification and qualification in clinical proteomics*. Sci Transl Med, 2010. **2**(46): p. 46ps42.
162. Villanueva, J., et al., *Differential exoprotease activities confer tumor-specific serum peptidome patterns*. J Clin Invest, 2006. **116**(1): p. 271-84.
163. Barderas, R., I. Babel, and J.I. Casal, *Colorectal cancer proteomics, molecular characterization and biomarker discovery*. Proteomics Clin Appl, 2010. **4**(2): p. 159-78.
164. Casal, J.I. and R. Barderas, *Identification of cancer autoantigens in serum: toward diagnostic/prognostic testing?* Mol Diagn Ther, 2010. **14**(3): p. 149-54.

165. Gomella, L.G., et al., *Screening for prostate cancer: the current evidence and guidelines controversy*. *Can J Urol*, 2011. **18**(5): p. 5875-83.
166. Greene, K.L., et al., *Prostate specific antigen best practice statement: 2009 update*. *J Urol*, 2013. **189**(1 Suppl): p. S2-S11.
167. Wolf, A.M., et al., *American Cancer Society guideline for the early detection of prostate cancer: update 2010*. *CA Cancer J Clin*, 2010. **60**(2): p. 70-98.
168. Schroder, F.H., et al., *Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study*. *N Engl J Med*, 2009. **360**(13): p. 1320-8.
169. Collins, M.M. and M.J. Barry, *Controversies in prostate cancer screening. Analogies to the early lung cancer screening debate*. *JAMA*, 1996. **276**(24): p. 1976-9.
170. Duffy, M.J., *Evidence for the clinical use of tumour markers*. *Ann Clin Biochem*, 2004. **41**(Pt 5): p. 370-7.
171. Duffy, M.J. and J. Crown, *A personalized approach to cancer treatment: how biomarkers can help*. *Clin Chem*, 2008. **54**(11): p. 1770-9.
172. Duffy, M.J., et al., *Clinical utility of biochemical markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines*. *Eur J Cancer*, 2003. **39**(6): p. 718-27.
173. Locker, G.Y., et al., *ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer*. *J Clin Oncol*, 2006. **24**(33): p. 5313-27.
174. Levin, B., et al., *Emerging technologies in screening for colorectal cancer: CT colonography, immunochemical fecal occult blood tests, and stool screening using molecular markers*. *CA Cancer J Clin*, 2003. **53**(1): p. 44-55.
175. Leman, E.S., *Initial analysis of colon cancer-specific antigen CCSA-3 and CCSA-4 as colorectal cancer-associated serum markers*. *Cancer Res*, 2007. **67**: p. 5600-5605.
176. Walgenbach-Brunagel, G., *The use of a colon cancer associated nuclear antigen CCSA-2 for the blood-based detection of colon cancer*. *J Cell Biochem*, 2008. **104**: p. 286-294.
177. Hurst, N.G., *Elevated serum matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) concentration predicts the presence of colorectal cancer in symptomatic patients*. *Br J Cancer*, 2007. **97**: p. 971-977.
178. Kim, H.J., *Identification of S100A8 and S100A9 as serological markers for colorectal cancer*. *J Proteome Res*, 2009. **8**: p. 1368-1379.
179. Barderas, R., et al., *In-depth characterization of the secretome of colorectal cancer metastatic cells identifies key proteins in cell adhesion, migration, and invasion*. *Mol Cell Proteomics*, 2013. **12**(6): p. 1602-20.
180. Anderson, K.S. and J. LaBaer, *The sentinel within: exploiting the immune system for cancer biomarkers*. *J Proteome Res*, 2005. **4**(4): p. 1123-33.
181. Murphy, M.A., J.J. O'Leary, and D.J. Cahill, *Assessment of the humoral immune response to cancer*. *J Proteomics*, 2012. **75**(15): p. 4573-9.
182. Babel, I., et al., *Identification of tumor-associated autoantigens for the diagnosis of colorectal cancer in serum using high density protein microarrays*. *Mol Cell Proteomics*, 2009. **8**(10): p. 2382-95.

183. van Heijningen, E.M., et al., *Features of adenoma and colonoscopy associated with recurrent colorectal neoplasia based on a large community-based study*. *Gastroenterology*, 2013. **144**(7): p. 1410-8.
184. Balaguer, F., et al. *Prevención del cáncer colorrectal*. 2015.
185. Martinez, M.E., et al., *A pooled analysis of advanced colorectal neoplasia diagnoses after colonoscopic polypectomy*. *Gastroenterology*, 2009. **136**(3): p. 832-41.
186. Lieberman, D.A., et al., *Guidelines for colonoscopy surveillance after screening and polypectomy: a consensus update by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer*. *Gastroenterology*, 2012. **143**(3): p. 844-57.
187. Hassan, C., et al., *Post-polypectomy colonoscopy surveillance: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Guideline*. *Endoscopy*, 2013. **45**(10): p. 842-51.
188. Wu, C.C., et al., *Overexpression and elevated plasma level of tumor-associated antigen 90K/Mac-2 binding protein in colorectal carcinoma*. *Proteomics Clin Appl*, 2008. **2**(12): p. 1586-95.
189. Fentz, A.K., et al., *Detection of colorectal adenoma and cancer based on transthyretin and C3a-desArg serum levels*. *Proteomics Clin Appl*, 2007. **1**(6): p. 536-44.
190. Adam, J.K., B. Odhav, and K.D. Bhoola, *Immune responses in cancer*. *Pharmacol Ther*, 2003. **99**(1): p. 113-32.
191. Reuschenbach, M., M. von Knebel Doeberitz, and N. Wentzensen, *A systematic review of humoral immune responses against tumor antigens*. *Cancer Immunol Immunother*, 2009. **58**(10): p. 1535-44.
192. von Mensdorff-Pouilly, S., et al., *Reactivity of natural and induced human antibodies to MUC1 mucin with MUC1 peptides and n-acetylgalactosamine (GalNAc) peptides*. *Int J Cancer*, 2000. **86**(5): p. 702-12.
193. Ersvaer, E., et al., *Cyclin B1 is commonly expressed in the cytoplasm of primary human acute myelogenous leukemia cells and serves as a leukemia-associated antigen associated with autoantibody response in a subset of patients*. *Eur J Haematol*, 2007. **79**(3): p. 210-25.
194. Suzuki, H., et al., *T cell-dependent antibody responses against aberrantly expressed cyclin B1 protein in patients with cancer and premalignant disease*. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(4): p. 1521-6.
195. Covini, G., et al., *Immune response to cyclin B1 in hepatocellular carcinoma*. *Hepatology*, 1997. **25**(1): p. 75-80.
196. Hanash, S., *Harnessing immunity for cancer marker discovery*. *Nat Biotechnol*, 2003. **21**(1): p. 37-8.
197. Dunn, G.P., et al., *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(11): p. 991-8.
198. Curigliano, G., *Immunity and autoimmunity: revising the concepts of response to breast cancer*. *Breast*, 2011. **20 Suppl 3**: p. S71-4.
199. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting*. *Immunity*, 2004. **21**(2): p. 137-48.

200. Nishikawa, H., et al., *CD4+ CD25+ T cells responding to serologically defined autoantigens suppress antitumor immune responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(19): p. 10902-6.
201. Wang, H.Y., et al., *Tumor-specific human CD4+ regulatory T cells and their ligands: implications for immunotherapy*. Immunity, 2004. **20**(1): p. 107-118.
202. Sahin, U., et al., *Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(25): p. 11810-3.
203. Schreiber, R.D., L.J. Old, and M.J. Smyth, *Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion*. Science, 2011. **331**(6024): p. 1565-70.
204. Carey, T.E., et al., *Cell surface antigens of human malignant melanoma: mixed hemadsorption assays for humoral immunity to cultured autologous melanoma cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**(9): p. 3278-82.
205. Dippold, W.G., et al., *Cell surface antigens of human malignant melanoma: definition of six antigenic systems with mouse monoclonal antibodies*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(10): p. 6114-8.
206. Scanlan, M.J., et al., *Characterization of human colon cancer antigens recognized by autologous antibodies*. Int J Cancer, 1998. **76**(5): p. 652-8.
207. Caron, M., G. Choquet-Kastylevsky, and R. Joubert-Caron, *Cancer immunomics using autoantibody signatures for biomarker discovery*. Molecular & Cellular Proteomics, 2007. **6**(7): p. 1115-1122.
208. Gunawardana, C.G. and E.P. Diamandis, *High throughput proteomic strategies for identifying tumour-associated antigens*. Cancer Lett, 2007. **249**(1): p. 110-9.
209. Tan, H.T., et al., *Serum autoantibodies as biomarkers for early cancer detection*. FEBS journal, 2009. **276**(23): p. 6880-6904.
210. Scanlan, M.J., et al., *Cancer-related serological recognition of human colon cancer: identification of potential diagnostic and immunotherapeutic targets*. Cancer Res, 2002. **62**(14): p. 4041-7.
211. Zaenker, P. and M.R. Ziman, *Serologic autoantibodies as diagnostic cancer biomarkers—a review*. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 2013.
212. Madrid, F.F., et al., *Improved approach to identify cancer-associated autoantigens*. Autoimmunity reviews, 2005. **4**(4): p. 230-235.
213. Wang, X., et al., *Autoantibody signatures in prostate cancer*. N Engl J Med, 2005. **353**(12): p. 1224-35.
214. Chatterjee, M., et al., *Diagnostic markers of ovarian cancer by high-throughput antigen cloning and detection on arrays*. Cancer Res, 2006. **66**(2): p. 1181-90.
215. Babel, I., et al., *Identification of MST1/STK4 and SULF1 proteins as autoantibody targets for the diagnosis of colorectal cancer by using phage microarrays*. Mol Cell Proteomics, 2011. **10**(3): p. M110 001784.
216. Nam, M.J., et al., *Molecular profiling of the immune response in colon cancer using protein microarrays: occurrence of autoantibodies to ubiquitin C-terminal hydrolase L3*. Proteomics, 2003. **3**(11): p. 2108-15.

217. Routsias, J.G., A.G. Tzioufas, and H.M. Moutsopoulos, *The clinical value of intracellular autoantigens B-cell epitopes in systemic rheumatic diseases*. Clin Chim Acta, 2004. **340**(1-2): p. 1-25.
218. Qiu, J., et al., *Development of natural protein microarrays for diagnosing cancer based on an antibody response to tumor antigens*. J Proteome Res, 2004. **3**(2): p. 261-7.
219. Casiano, C.A., M. Mediavilla-Varela, and E.M. Tan, *Tumor-associated antigen arrays for the serological diagnosis of cancer*. Mol Cell Proteomics, 2006. **5**(10): p. 1745-59.
220. Chen, Y., et al., *Autoantibodies to Ca²⁺ binding protein Calnuc is a potential marker in colon cancer detection*. Int J Oncol, 2007. **30**(5): p. 1137-1144.
221. Anderson, K.S., et al., *Application of protein microarrays for multiplexed detection of antibodies to tumor antigens in breast cancer*. J Proteome Res, 2008. **7**(4): p. 1490-9.
222. Barderas, R., et al., *An optimized predictor panel for colorectal cancer diagnosis based on the combination of tumor-associated antigens obtained from protein and phage microarrays*. J Proteomics, 2012. **75**(15): p. 4647-55.
223. Bouwman, K., et al., *Microarrays of tumor cell derived proteins uncover a distinct pattern of prostate cancer serum immunoreactivity*. Proteomics, 2003. **3**(11): p. 2200-7.
224. Hudson, M.E., et al., *Identification of differentially expressed proteins in ovarian cancer using high-density protein microarrays*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(44): p. 17494-9.
225. Chen, G., et al., *Autoantibody profiles reveal ubiquilin 1 as a humoral immune response target in lung adenocarcinoma*. Cancer Res, 2007. **67**(7): p. 3461-7.
226. Chapman, C.J., et al., *Autoantibodies in lung cancer: possibilities for early detection and subsequent cure*. Thorax, 2008. **63**(3): p. 228-33.
227. Orenes-Pinero, E., et al., *Serum and tissue profiling in bladder cancer combining protein and tissue arrays*. J Proteome Res, 2010. **9**(1): p. 164-73.
228. Crawford, L.V., D.C. Pim, and R.D. Bulbrook, *Detection of antibodies against the cellular protein p53 in sera from patients with breast cancer*. Int J Cancer, 1982. **30**(4): p. 403-8.
229. Lam, S., et al., *EarlyCDT-Lung: an immunobiomarker test as an aid to early detection of lung cancer*. Cancer Prev Res (Phila), 2011. **4**(7): p. 1126-34.
230. Smith, R.A., et al., *Cancer screening in the United States, 2015: a review of current American cancer society guidelines and current issues in cancer screening*. CA Cancer J Clin, 2015. **65**(1): p. 30-54.
231. Bach, P.B., et al., *Benefits and harms of CT screening for lung cancer: a systematic review*. JAMA, 2012. **307**(22): p. 2418-29.
232. Moyer, V.A., *Screening for lung cancer: US Preventive Services Task Force recommendation statement*. Annals of internal medicine, 2014. **160**(5): p. 330-338.
233. Mange, A., et al., *Serum autoantibody signature of ductal carcinoma in situ progression to invasive breast cancer*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(7): p. 1992-2000.
234. O'Rourke, D.J., et al., *Autoantibody signatures as biomarkers to distinguish prostate cancer from benign prostatic hyperplasia in patients with increased serum prostate specific antigen*. Clin Chim Acta, 2012. **413**(5-6): p. 561-7.

235. Staff, C., et al., *A Phase I safety study of plasmid DNA immunization targeting carcinoembryonic antigen in colorectal cancer patients*. *Vaccine*, 2011. **29**(39): p. 6817-22.
236. Pelaez-Garcia, A., et al., *FGFR4 role in epithelial-mesenchymal transition and its therapeutic value in colorectal cancer*. *PLoS One*, 2013. **8**(5): p. e63695.
237. Barderas, R., et al., *Sporadic colon cancer murine models demonstrate the value of autoantibody detection for preclinical cancer diagnosis*. *Sci Rep*, 2013. **3**: p. 2938.
238. Kijanka, G., et al., *Human IgG antibody profiles differentiate between symptomatic patients with and without colorectal cancer*. *Gut*, 2010. **59**(1): p. 69-78.
239. Pedersen, J.W., et al., *Seromic profiling of colorectal cancer patients with novel glycopeptide microarray*. *Int J Cancer*, 2011. **128**(8): p. 1860-71.
240. Harding, A., *Lab Devices Get Smaller, More Intuitive, Less Expensive*. *Science*, 2011. **332**(6025): p. 113-115.
241. Ostendorff, H.P., et al., *Multiplexed VeraCode bead-based serological immunoassay for colorectal cancer*. *J Immunol Methods*, 2013. **400-401**: p. 58-69.
242. Waterboer, T., et al., *Multiplex human papillomavirus serology based on in situ-purified glutathione s-transferase fusion proteins*. *Clin Chem*, 2005. **51**(10): p. 1845-53.
243. Bouali, S., et al., *P53 and PTEN expression contribute to the inhibition of EGFR downstream signaling pathway by cetuximab*. *Cancer Gene Ther*, 2009. **16**(6): p. 498-507.
244. Hill, R.T., *Plasmonic biosensors*. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol*, 2015. **7**(2): p. 152-68.
245. Long, Y.-T. and C. Jing, *Localized Surface Plasmon Resonance Based Nanobiosensors*. 2014: Springer.
246. Otte, M.A., et al., *Guiding light in monolayers of sparse and random plasmonic meta-atoms*. *ACS Nano*, 2011. **5**(11): p. 9179-86.
247. Soler, M., et al., *Highly sensitive dendrimer-based nanoplasmonic biosensor for drug allergy diagnosis*. *Biosens Bioelectron*, 2015. **66**: p. 115-23.
248. Marie, R., et al., *Generic surface modification strategy for sensing applications based on AuSiO₂ nanostructures*. *Biointerphases*, 2007. **2**(1): p. 49-55.
249. Soler, M., et al., *Label-free nanoplasmonic sensing of tumor-associated autoantibodies for early diagnosis of colorectal cancer*. *Anal Chim Acta*, 2016. **930**: p. 31-8.
250. Shimada, H., et al., *Titration of serum p53 antibodies in 1,085 patients with various types of malignant tumors: a multiinstitutional analysis by the Japan p53 Antibody Research Group*. *Cancer*, 2003. **97**(3): p. 682-9.
251. Pepe, M.S., et al., *Phases of biomarker development for early detection of cancer*. *J Natl Cancer Inst*, 2001. **93**(14): p. 1054-61.
252. Koziol, J.A., et al., *Recursive partitioning as an approach to selection of immune markers for tumor diagnosis*. *Clin Cancer Res*, 2003. **9**(14): p. 5120-5126.
253. Belousov, P.V., et al., *Cancer-associated antigens and antigen arrays in serological diagnostics of malignant tumors*. *Biochemistry (Mosc)*, 2008. **73**(5): p. 562-72.

254. Katchman, B.A., et al., *Proteomic mapping of p53 immunogenicity in pancreatic, ovarian, and breast cancers*. *Proteomics Clin Appl*, 2016. **10**(7): p. 720-31.
255. Chen, H., et al., *Blood autoantibodies against tumor-associated antigens as biomarkers in early detection of colorectal cancer*. *Cancer letters*, 2014. **346**(2): p. 178-187.
256. Karp, N.A. and K.S. Lilley, *Design and analysis issues in quantitative proteomics studies*. *Proteomics*, 2007. **7 Suppl 1**(S1): p. 42-50.
257. Dai, L., et al., *Using immunomic approach to enhance tumor-associated autoantibody detection in diagnosis of hepatocellular carcinoma*. *Clinical Immunology*, 2014. **152**(1): p. 127-139.
258. Heng, D.Y., et al., *Prognostic factors for overall survival in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with vascular endothelial growth factor-targeted agents: results from a large, multicenter study*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(34): p. 5794-5799.
259. Lu, C., et al., *Prognostic factors in resected stage I non-small-cell lung cancer: a multivariate analysis of six molecular markers*. *J Clin Oncol*, 2004. **22**(22): p. 4575-83.
260. Murphy, M.A., et al., *Epitope presentation is an important determinant of the utility of antigens identified from protein arrays in the development of autoantibody diagnostic assays*. *J Proteomics*, 2012. **75**(15): p. 4668-75.
261. Schmetzer, O., et al., *Quality of recombinant protein determines the amount of autoreactivity detected against the tumor-associated epithelial cell adhesion molecule antigen: low frequency of antibodies against the natural protein*. *J Immunol*, 2005. **174**(2): p. 942-52.
262. Wind, T.C., et al., *Measuring carbonic anhydrase IX as a hypoxia biomarker: differences in concentrations in serum and plasma using a commercial enzyme-linked immunosorbent assay due to influences of metal ions*, in *Ann Clin Biochem*. 2011. p. 112-20.
263. Evans, G.O., *Removal of blood from laboratory mammals and birds*. *Lab Anim*, 1994. **28**(2): p. 178-9.
264. Sambrook, J.F. and E. Maniatis, *T. 1989, Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Laboratory Press, New York, 1989.
265. Francis, D.M. and R. Page, *Strategies to optimize protein expression in E. coli*. *Curr Protoc Protein Sci*, 2010. **Chapter 5**: p. Unit 5 24 1-29.
266. Zerbs, S., A.M. Frank, and F.R. Collart, *Bacterial systems for production of heterologous proteins*. *Methods Enzymol*, 2009. **463**: p. 149-68.
267. Studier, F.W., *Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system*. *J Mol Biol*, 1991. **219**(1): p. 37-44.
268. Studier, F.W., et al., *Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes*. *Methods Enzymol*, 1990. **185**: p. 60-89.
269. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
270. Schneider, C.A., W.S. Rasband, and K.W. Eliceiri, *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis*. *Nat Methods*, 2012. **9**(7): p. 671-5.
271. Barderas, R., et al., *High expression of IL-13 receptor alpha2 in colorectal cancer is associated with invasion, liver metastasis, and poor prognosis*. *Cancer Res*, 2012. **72**(11): p. 2780-90.

272. Bartolome, R.A., et al., *Cadherin-17 interacts with alpha2beta1 integrin to regulate cell proliferation and adhesion in colorectal cancer cells causing liver metastasis*. *Oncogene*, 2014. **33**(13): p. 1658-69.
273. Koressaar, T. and M. Remm, *Enhancements and modifications of primer design program Primer3*. *Bioinformatics*, 2007. **23**(10): p. 1289-91.
274. Maat, P., et al., *Multiplex serology of paraneoplastic antineuronal antibodies*. *J Immunol Methods*, 2013. **391**(1-2): p. 125-32.
275. Wong, J., et al., *Rapid detection of antibodies in sera using multiplexed self-assembling bead arrays*. *J Immunol Methods*, 2009. **350**(1-2): p. 171-82.
276. Planatscher, H., et al., *Systematic reference sample generation for multiplexed serological assays*. *Sci Rep*, 2013. **3**: p. 3259.
277. Reipert, B.M., et al., *Increase in autoantibodies against Fas (CD95) during carcinogenesis in the human colon: a hope for the immunoprevention of cancer?* *Cancer Immunol Immunother*, 2005. **54**(10): p. 1038-42.
278. Mattioni, M., et al., *Serum p53 antibody detection in patients with impaired lung function*. *BMC Cancer*, 2013. **13**: p. 62.
279. Healey, G.F., et al., *Signal stratification of autoantibody levels in serum samples and its application to the early detection of lung cancer*. *J Thorac Dis*, 2013. **5**(5): p. 618-25.
280. Budczies, J., et al., *Cutoff Finder: a comprehensive and straightforward Web application enabling rapid biomarker cutoff optimization*. *PLoS One*, 2012. **7**(12): p. e51862.
281. R Core Team, *R: A language and environment for statistical computing*. 2014, R Foundation for Statistical Computing.
282. Freedman, D.A., *Statistical models: theory and practice*. 2009: cambridge university press.
283. Hosmer Jr, D.W. and S. Lemeshow, *Applied logistic regression*. 2004: John Wiley & Sons.
284. Cook, N.R., *Statistical evaluation of prognostic versus diagnostic models: beyond the ROC curve*. *Clin Chem*, 2008. **54**(1): p. 17-23.
285. Metz, C.E., *Basic principles of ROC analysis*. *Semin Nucl Med*, 1978. **8**(4): p. 283-98.
286. Zhou, X.-H., D.K. McClish, and N.A. Obuchowski, *Statistical methods in diagnostic medicine*. Vol. 569. 2009: John Wiley & Sons.
287. Hajian-Tilaki, K., *Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical Diagnostic Test Evaluation*. *Caspian J Intern Med*, 2013. **4**(2): p. 627-35.
288. DeLong, E.R., D.M. DeLong, and D.L. Clarke-Pearson, *Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach*. *Biometrics*, 1988. **44**(3): p. 837-45.
289. Harrell, F.E., *Regression modeling strategies: with applications to linear models, logistic regression, and survival analysis*. 2013: Springer Science & Business Media.
290. Venables, W.N. and B.D. Ripley, *Modern applied statistics with S-PLUS*. 2013: Springer Science & Business Media.

291. Fernandez-Acenero, M.J., et al., *Prognostic influence of tumor-associated eosinophilic infiltrate in colorectal carcinoma*. *Cancer*, 2000. **88**(7): p. 1544-8.
292. Zhao, F., *Bootstrap Variable Selection and Model Validation for Cox's*. 1998.
293. Harrell, F.E., K.L. Lee, and D.B. Mark, *Tutorial in biostatistics multivariable prognostic models: issues in developing models, evaluating assumptions and adequacy, and measuring and reducing errors*. *Statistics in medicine*, 1996. **15**: p. 361-387.
294. Quintero, O.L., et al., *Autoimmune disease and gender: plausible mechanisms for the female predominance of autoimmunity*. *J Autoimmun*, 2012. **38**(2-3): p. J109-19.
295. AECC, A.E.C.e.C. *Incidencia del cáncer de colon*. 2015 16 / 12 / 2014 30/10/2015].
296. Bray, F., et al., *Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008*. *Int J Cancer*, 2013. **132**(5): p. 1133-45.
297. Lin, J.T., et al., *Outcome of colorectal carcinoma in patients under 40 years of age*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2005. **20**(6): p. 900-5.
298. Lee, H., et al., *Recurrence pattern depends on the location of colon cancer in the patients with synchronous colorectal liver metastasis*. *Ann Surg Oncol*, 2014. **21**(5): p. 1641-6.
299. Steele, S.R., et al., *Time-dependent estimates of recurrence and survival in colon cancer: clinical decision support system tool development for adjuvant therapy and oncological outcome assessment*. *Am Surg*, 2014. **80**(5): p. 441-53.
300. Galindo Gallego, M., et al., *Prognostic influence of p53 nuclear overexpression in colorectal carcinoma*. *Diseases of the colon & rectum*, 2000. **43**(7): p. 971-975.
301. Gnjatic, S., et al., *Seromic profiling of ovarian and pancreatic cancer*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(11): p. 5088-93.
302. Waterboer, T., P. Sehr, and M. Pawlita, *Suppression of non-specific binding in serological Luminex assays*. *J Immunol Methods*, 2006. **309**(1-2): p. 200-4.
303. Macdonald, I.K., et al., *Development and validation of a high throughput system for discovery of antigens for autoantibody detection*. *PLoS One*, 2012. **7**(7): p. e40759.
304. Bracci, P.M., et al., *Serum autoantibodies to pancreatic cancer antigens as biomarkers of pancreatic cancer in a San Francisco Bay Area case-control study*. *Cancer*, 2012. **118**(21): p. 5384-94.
305. Kunte, D.P., et al., *Dysregulation of microRNAs in colonic field carcinogenesis: implications for screening*. *PLoS One*, 2012. **7**(9): p. e45591.
306. Guda, K., et al., *Carcinogen-induced colon tumors in mice are chromosomally stable and are characterized by low-level microsatellite instability*. *Oncogene*, 2004. **23**(21): p. 3813-21.
307. Chang, W.C., et al., *Loss of p53 enhances the induction of colitis-associated neoplasia by dextran sulfate sodium*. *Carcinogenesis*, 2007. **28**(11): p. 2375-81.
308. Pedersen, J.W., et al., *Early detection of cancer in the general population: a blinded case-control study of p53 autoantibodies in colorectal cancer*. *Br J Cancer*, 2013. **108**(1): p. 107-14.
309. Line, A., et al., *Characterisation of tumour-associated antigens in colon cancer*. *Cancer Immunol Immunother*, 2002. **51**(10): p. 574-82.

310. Song, M.H., et al., *Identification of BCP-20 (FBXO39) as a cancer/testis antigen from colon cancer patients by SEREX*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011. **408**(2): p. 195-201.
311. Hidai, C., et al., *Cloning and characterization of developmental endothelial locus-1: an embryonic endothelial cell protein that binds the $\alpha\beta 3$ integrin receptor*. *Genes & development*, 1998. **12**(1): p. 21-33.
312. Takahashi, M. and K. Wakabayashi, *Gene mutations and altered gene expression in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rodents*. *Cancer Sci*, 2004. **95**(6): p. 475-80.
313. Nambiar, P.R., et al., *Genetic signatures of high- and low-risk aberrant crypt foci in a mouse model of sporadic colon cancer*. *Cancer Res*, 2004. **64**(18): p. 6394-401.
314. Suzui, M., et al., *Infrequent Ha-ras mutations and absence of Ki-ras, N-ras, and p53 mutations in 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat oral lesions*. *Mol Carcinog*, 1995. **14**(4): p. 294-8.
315. Itzkowitz, S.H. and X. Yio, *Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2004. **287**(1): p. G7-17.
316. Cui, X., et al., *Resveratrol suppresses colitis and colon cancer associated with colitis*. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2010. **3**(4): p. 549-59.
317. Arai, N., et al., *Enhanced epithelial cell turnover associated with p53 accumulation and high p21WAF1/CIP1 expression in ulcerative colitis*. *Mod Pathol*, 1999. **12**(6): p. 604-11.
318. Jarius, S., et al., *Testing for antibodies to human aquaporin-4 by ELISA: sensitivity, specificity, and direct comparison with immunohistochemistry*. *J Neurol Sci*, 2012. **320**(1-2): p. 32-7.
319. Ochiai, H., et al., *Reevaluation of serum p53 antibody as a tumor marker in colorectal cancer patients*. *Surg Today*, 2012. **42**(2): p. 164-8.
320. de Wit, M., et al., *Proteomics in colorectal cancer translational research: biomarker discovery for clinical applications*. *Clin Biochem*, 2013. **46**(6): p. 466-79.
321. Luo, X., et al., *Identification and evaluation of plasma microRNAs for early detection of colorectal cancer*. *PLoS One*, 2013. **8**(5): p. e62880.
322. Ahlquist, D.A., *Molecular detection of colorectal neoplasia*. *Gastroenterology*, 2010. **138**(6): p. 2127-39.
323. Wild, N., et al., *A combination of serum markers for the early detection of colorectal cancer*. *Clin Cancer Res*, 2010. **16**(24): p. 6111-21.
324. Inadomi, J.M., et al., *Adherence to colorectal cancer screening: a randomized clinical trial of competing strategies*. *Arch Intern Med*, 2012. **172**(7): p. 575-82.
325. Van Dam, L., et al., *The price of autonomy: should we offer individuals a choice of colorectal cancer screening strategies?* *Lancet Oncol.*, 2013. **14**: p. e38-e46.
326. Fhied, C., S. Kanangat, and J.A. Borgia, *Development of a bead-based immunoassay to routinely measure vimentin autoantibodies in the clinical setting*. *J Immunol Methods*, 2014. **407**: p. 9-14.
327. Jassam, N., et al., *The hook effect: a need for constant vigilance*. *Ann Clin Biochem*, 2006. **43**(Pt 4): p. 314-7.

328. Wang, Y., et al., *Improvement for identification of heterophile antibody interference and AFP hook effect in immunoassays with multiplex suspension bead array system*. Clin Chim Acta, 2013. **426**: p. 68-74.
329. Villar-Vazquez, R., et al., *Development of a novel multiplex beads-based assay for autoantibody detection for colorectal cancer diagnosis*. Proteomics, 2016. **16**(8): p. 1280-90.
330. Liu, W., et al., *Evaluation of tumour-associated antigen (TAA) miniarray in immunodiagnosis of colon cancer*. Scand J Immunol, 2009. **69**(1): p. 57-63.
331. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2008*. CA Cancer J Clin, 2008. **58**(2): p. 71-96.
332. Chapman, C., *Autoantibodies in breast cancer: their use as an aid to early diagnosis*. Ann Oncol, 2007. **18**: p. 868-873.
333. Qiu, J., et al., *Occurrence of autoantibodies to annexin I, 14-3-3 theta and LAMR1 in prediagnostic lung cancer sera*. J Clin Oncol, 2008. **26**(31): p. 5060-6.
334. Xue, H., et al., *Identification of serum biomarkers for colorectal cancer metastasis using a differential secretome approach*. Journal of proteome research, 2009. **9**(1): p. 545-555.
335. Mandel, J.S., et al., *The effect of fecal occult-blood screening on the incidence of colorectal cancer*. N Engl J Med, 2000. **343**(22): p. 1603-7.
336. Kewenter, J., et al., *Results of screening, rescreening, and follow-up in a prospective randomized study for detection of colorectal cancer by fecal occult blood testing. Results for 68,308 subjects*. Scand J Gastroenterol, 1994. **29**(5): p. 468-73.
337. Kronborg, O., et al., *Randomised study of screening for colorectal cancer with faecal-occult-blood test*. Lancet, 1996. **348**(9040): p. 1467-71.
338. Hardcastle, J.D., et al., *Randomised controlled trial of faecal-occult-blood screening for colorectal cancer*. Lancet, 1996. **348**(9040): p. 1472-7.
339. Hol, L., et al., *Screening for colorectal cancer: randomised trial comparing guaiac-based and immunochemical faecal occult blood testing and flexible sigmoidoscopy*. Gut, 2010. **59**(1): p. 62-8.
340. Segnan, N., et al., *European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening and diagnosis*. 2010: Publications Office of the European Union.
341. von Karsa, L., J. Patnick, and N. Segnan, *European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening and diagnosis. First Edition--Executive summary*. Endoscopy, 2012. **44 Suppl 3**: p. SE1-8.
342. Lansdorp-Vogelaar, I., et al., *Effect of rising chemotherapy costs on the cost savings of colorectal cancer screening*. J Natl Cancer Inst, 2009. **101**(20): p. 1412-22.
343. Kuipers, E.J., *Colorectal cancer: screening--one small step for mankind, one giant leap for man*. Nat Rev Clin Oncol, 2014. **11**(1): p. 5-6.
344. Duffy, M.J., et al., *Tumor markers in colorectal cancer, gastric cancer and gastrointestinal stromal cancers: European group on tumor markers 2014 guidelines update*. Int J Cancer, 2014. **134**(11): p. 2513-22.
345. Burgueño, M., J. García-Bastos, and J. González-Buitrago, *Las curvas ROC en la evaluación de las pruebas diagnósticas*. Med Clin (Barc), 1995. **104**(17): p. 661-70.

346. Hoff, G., *Colorectal cancer screening in an expanding panorama of screening programmes*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2010. **24**(4): p. 521-7.
347. Sackett, D.L., *The arrogance of preventive medicine*. Canadian Med A J, 2002. **167**(4): p. 363-4.
348. Van Roon, A.H.C., *Random comparison of repeated faecal immunochemical testing at different intervals for population-based colorectal cancer screening*. Gut, 2012. **62**: p. 409-415.
349. Van Roon, A.H.C., *Diagnostic yield improves with collection of 2 samples in fecal immunochemical test screening without affecting attendance*. Clin. Gastroenterol. Hepatol., 2011. **9**: p. 333-339.
350. Goede, S.L., et al., *Cost-effectiveness of one versus two sample faecal immunochemical testing for colorectal cancer screening*. Gut, 2013. **62**(5): p. 727-34.
351. Desmet, C., et al., *Multiplexed immunoassay for the rapid detection of anti-tumor-associated antigens antibodies*. Analyst, 2011. **136**(14): p. 2918-24.
352. Syrigos, K.N., et al., *The prognostic significance of autoantibodies against dsDNA in patients with colorectal adenocarcinoma*. Anticancer Res, 2000. **20**(6B): p. 4351-3.
353. Pedersen, J.W., et al., *Cancer-associated autoantibodies to MUC1 and MUC4--a blinded case-control study of colorectal cancer in UK collaborative trial of ovarian cancer screening*. Int J Cancer, 2014. **134**(9): p. 2180-88.
354. Rothenberg, M.E. and S.P. Hogan, *The eosinophil*. Annu Rev Immunol, 2006. **24**(1): p. 147-74.
355. Porta, C., M. Moroni, and M. De Amici, *Eosinophils and serum eosinophilic cationic proteins in interleukin-2-based immunotherapy for cancer*. Br J Haematol, 1998. **100**(3): p. 607-9.
356. Tajima, K., et al., *Cellular localization of interleukin-5 expression in rectal carcinoma with eosinophilia*. Hum Pathol, 1998. **29**(9): p. 1024-8.
357. Pallasch, C.P., et al., *Autoantibodies against GLEA2 and PHF3 in glioblastoma: tumor-associated autoantibodies correlated with prolonged survival*. Int J Cancer, 2005. **117**(3): p. 456-9.
358. Tang, R., et al., *Humoral response to p53 in human colorectal tumors: a prospective study of 1,209 patients*. Int J Cancer, 2001. **94**(6): p. 859-63.
359. Suppiah, A., et al., *Anti-p53 autoantibody in colorectal cancer: prognostic significance in long-term follow-up*. Int J Colorectal Dis, 2008. **23**(6): p. 595-600.
360. Lubin, R., et al., *p53 antibodies in patients with various types of cancer: Assay, identification, and characterization*. Clin Cancer Res, 1995. **1**(12): p. 1463-1469.
361. Angelopoulou, K. and E.P. Diamandis, *Detection of the TP53 tumour suppressor gene product and p53 auto-antibodies in the ascites of women with ovarian cancer*. Eur J Cancer, 1997. **33**(1): p. 115-21.
362. Goodell, V., et al., *Antibody immunity to the p53 oncogenic protein is a prognostic indicator in ovarian cancer*. J Clin Oncol, 2006. **24**(5): p. 762-768.
363. Mishalian, I., et al., *Tumor-associated neutrophils (TAN) develop pro-tumorigenic properties during tumor progression*. Cancer Immunol Immunother, 2013. **62**(11): p. 1745-56.

364. Flom, P.L. and D.L. Cassell. *Stopping stepwise: Why stepwise and similar selection methods are bad, and what you should use*. in *NorthEast SAS Users Group Inc 20th Annual Conference: 11-14th November 2007; Baltimore, Maryland*. 2007.
365. Lo, S.K., et al., [*Non-significant in univariate but significant in multivariate analysis: a discussion with examples*]. *Changgeng Yi Xue Za Zhi*, 1995. **18**(2): p. 95-101.
366. Chatterjee, M., et al., *Tumor autoantibodies as biomarkers for predicting ovarian cancer recurrence*. *Cancer Biomark*, 2012. **11**(2-3): p. 59-73.
367. Jaras, K. and K. Anderson, *Autoantibodies in cancer: prognostic biomarkers and immune activation*. *Expert Rev Proteomics*, 2011. **8**(5): p. 577-89.
368. Tripepi, G., et al., *Statistical methods for the assessment of prognostic biomarkers (Part I): discrimination*. *Nephrol Dial Transplant*, 2010. **25**(5): p. 1399-401.
369. Tian, X., et al., *Expression of CD147 and matrix metalloproteinase-11 in colorectal cancer and their relationship to clinicopathological features*. *J Transl Med*, 2015. **13**: p. 337.
370. Kim, J.H., et al., *Clinicopathologic, molecular, and prognostic implications of the loss of EPCAM expression in colorectal carcinoma*. *Oncotarget*, 2016. **7**(12): p. 13372-87.
371. Larsson, A., et al., *Overexpression of podocalyxin-like protein is an independent factor of poor prognosis in colorectal cancer*. *Br J Cancer*, 2011. **105**(5): p. 666-72.
372. Maurel, J. and A. Postigo, *Prognostic and Predictive Biomarkers in Colorectal Cancer. From the Preclinical Setting to Clinical Practice*. *Curr Cancer Drug Targets*, 2015. **15**(8): p. 703-15.
373. Jeffery, G.M., B.E. Hickey, and P. Hider, *Follow-up strategies for patients treated for non-metastatic colorectal cancer*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2002. **1**(1): p. CD002200.
374. Primrose, J.N., et al., *Effect of 3 to 5 years of scheduled CEA and CT follow-up to detect recurrence of colorectal cancer: the FACS randomized clinical trial*. *JAMA*, 2014. **311**(3): p. 263-70.

Anexos y publicaciones

AND EVEN THOUGH I TRIED, IT ALL FELL APART

WHAT IT MEANT TO ME WILL EVENTUALLY BE A MEMORY OF A TIME

I TRIED SO HARD.

IN THE END – LINKIN PARK

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, los resultados obtenidos se han publicado en una serie de artículos cuyas referencias aparecen completas a continuación:

- Villar-Vázquez R, Padilla G, Fernández-Aceñero MJ, Suárez A, Fuente E, Pastor C, Calero M, Barderas R, Casal JI. *Development of a novel multiplex beads-based assay for autoantibody detection for colorectal cancer diagnosis*. *Proteomics*, 2016; 16(8):1280-90.
- Barderas R, Villar-Vázquez R, Casal JI; *Colorectal Cancer Circulating Biomarkers*. Book Chapter, pp1-21. Eds. Víctor R. Preedy, Vinood B. Patel Springer Netherlands 2015.
- Barderas R*, Villar-Vázquez R*, Fernández-Aceñero MJ, Babel I, Peláez-García A, Torres S, Casal JI. *Sporadic colon cancer murine models demonstrate the value of autoantibody detection for preclinical cancer diagnosis*. *Sci Rep*, 2013; 3:2938. * Contribución Equivalente

Además, durante la realización de la tesis doctoral he colaborado en otros proyectos del grupo como se puede observar en las siguientes publicaciones:

- Soler M, Estevez MC, Villar-Vázquez R, Casal JI, Lechuga LM; *Label-free Nanoplasmonic Sensing of Tumor-Associate Autoantibodies for Early Diagnosis of Colorectal Cancer*, *Analytica Chimica Acta*, 2016; 930:31-8.
- Torres S, Bartolomé RA, Mendes M, Barderas R, Fernandez-Aceñero MJ, Peláez-García A, Peña C, Lopez-Lucendo M, Villar-Vázquez R, de Herreros AG, Bonilla F, Casal JI. *Proteome profiling of cancer-associated fibroblasts identifies novel proinflammatory signatures and prognostic markers for colorectal cancer*. *Clin Cancer Res*. 2013; 19(21):6006-19.
- Barderas R, Mendes M, Torres S, Bartolomé RA, López-Lucendo M, Villar-Vázquez R, Peláez-García A, Fuente E, Bonilla F, Casal JI. *In-depth characterization of the secretome of colorectal cancer metastatic cells identifies key proteins in cell adhesion, migration, and invasion*. *Mol Cell Proteomics*. 2013; 12(6):1602-20.
- Barderas R, Babel I, Díaz-Uriarte R, Moreno V, Suárez A, Bonilla F, Villar-Vázquez R, Capellá G, Casal JI. *An optimized predictor panel for colorectal cancer diagnosis based on the combination of tumor-associated antigens obtained from protein and phage microarrays*. *J Proteomics*. 2012; 75(15):4647-55