



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Exosomes i microRNAs en biòpsia líquida com a biomarcadors pronòstic del càncer de colon

Sandra Santasusagna Canal

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

TESI DOCTORAL

PROGRAMA DE DOCTORAT EN MEDICINA I RECERCA TRANSLACIONAL

**EXOSOMES I microRNAs EN BIÒPSIA LÍQUIDA COM A
BIOMARCADORS PRONÒSTIC DEL CÀNCER DE COLON**

Tesi presentada per Sandra Santasusagna Canal

Per optar al grau de Doctor per la Universitat de Barcelona

Directors: Prof. Dr. Mariano Monzó Planella i Dr. Alfons Navarro Ponz

Dept. De Cirurgia i Especialitats Medicoquirúrgiques

Facultat de medicina - Universitat de Barcelona

Barcelona, 6 d'Abril de 2018

Als meus pares,

Al meu germà

AGRAÏMENTS

M'agradaria fer un petit agraïment a totes les persones que en algun moment han format part d'aquesta carrera de fons que acaba amb la presentació de la present tesi doctoral. A tots ells els agraeixo el seu suport, ànims i, sobretot, afecte.

En primer lloc, agrair als meus dos directors de tesi, al Prof. Marià Monzó i al Dr. Alfons Navarro, la oportunitat de realitzar aquesta tesi doctoral en el seu grup de recerca. Al Prof. Monzó, agrair-li eternament la seva confiança i els seus savis consells. Per mi és un referent acadèmic amb una brillant carrera científica, però sobretot, és una gran persona. Al Dr. Navarro, agrair-li el seu suport i ajuda en la meva formació com a investigadora, així com també la seva confiança en mi i en els resultats obtinguts.

Al grup de càncer de colon de l'Hospital Municipal de Badalona per la seva participació i implicació en aquest treball. Aquesta investigació no hauria estat possible sense les mostres biològiques, les dades recollides i la dedicació incessant de la Dra. Isabel Moreno i el servei d'Oncologia Mèdica i Cirurgia.

A la Universitat de Barcelona per concedir-me la beca APIF (*Ajut de Personal Investigador en Formació*) que ha permès dedicar-me exclusivament a desenvolupar aquesta tesi doctoral. Al Departament de Cirurgia i Especialitats Medicoquirúrgiques per donar-me la oportunitat d'impartir classes al llarg de tot el període doctoral als graus de Medicina, Infermeria i Enginyeria Biomèdica. La transmissió de coneixement és un aspecte fonamental per la formació d'un bon investigador.

Al Dr. Josep M^a Potau, Dr. Jose-Luis López Negre i Dr. Jordi Ribes per transmetre'm el seu esperit vocacional, el seu gran coneixement i la seva predisposició per ajudar en tot moment. A la Rennè pel seu suport i ajuda en la redacció dels articles. A la Dra. Carme Ros per donar-me la oportunitat de conèixer a una persona tant vàlida i sàvia, capaç de transmetre'm el seu esperit lluitador i perseverant. Carme, gràcies pels teus consells, per ser tant autèntica i propera i, sobretot, per confiar-me la teva amistat i fer-me sentir part d'un equip.

Als meus companys de laboratori. A la Tània per ensenyar-me en els meus inicis i aconsellar-me sempre que ho he necessitat. A la Rosa, per la seva tendresa. A la Rut, per ser la meva guia i confident des del meu primer dia al laboratori. A la Carme, pel primer "bon dia" de cada dia, per fer més agradables les classes que hem compartit i per veure en ella un referent d'esforç i constància. A la Dolors, per la seva disposició i entrega sempre que l'he necessitat. A la Marina pel seu positivisme i càlid somriure que fan que el dia canviï de color. Al Marc per ser el meu pilar en els moments més durs; per ajudar-me i animar-me, per confiar sempre en mi i, sobretot, per il·luminar cada dia. Al Joan per ser una gran persona, el millor soci amb qui compartir aquesta experiència tant nostra, per la seva paciència, serenitat i saviesa infinita, per la seva eterna ajuda i el seu afecte tant pur i sincer. Per tot això, i per molt més: GRÀCIES, Joan.

Agraïments

Al Jorge per ser una de les millors persones que he tingut el plaer de conèixer al llarg d'aquesta etapa. A l'Anna, al Jordi i a la Sara pels bons moments compartits al laboratori. A l'Oriol i a l'Andrés per la seva vitalitat contagiosa i el seu constant esperit investigador. A la Glòria, la Cristina i la Trini pel seu bon humor i la seva ajuda en els laboriosos tràmits administratius.

Als amics de sempre i als més especials. A la Marta Badosa perquè passen els anys i segueixes aquí. A la Marta Milà, per la teva amistat, l'etern suport i confiança en mi. A la Laura, pels anys d'amistat i per tot el que hem disfrutat juntes i el què ens queda per compartir. A l'Irene per la seva autenticitat i admiració pel meu esforç i pels seus savis consells de vida. A la Montse per la seva bondat, dolçor i alegria tant enèrgica i pura.

A la família Muñoz-Argente per la seva amabilitat i generositat. Especialment, al Carlos, per ser el millor amic que he pogut tenir en aquest període tant complex. Gràcies pel teu suport diari, paciència i comprensió. Gràcies per proporcionar-me calma en moments d'histèria. Gràcies pel teu amor, per estar al meu costat i compartir la teva vida amb mi.

A tota la meva família. A la meva àvia Rosa, per cuidar sempre de nosaltres i ensenyar-me que el més important a la vida és ser una bona persona. El seu dolç record sempre m'acompanya. Al meu avi Enric, per ser el guia de la nostra família, un refent de valentia i un punt d'anclatge al tornar a casa. Al meu tiet Lluís, una persona treballadora però sobretot lluitadora que no esperava mai res a canvi. A la meva tieta Dolors, per contagiar-me la seva vitalitat i mantenir al poble informat amb històries d'"orgull de neboda", però sobretot per valorar-me i sentir que està sempre al meu costat. A la meva cosina i germana, Marta. A la innocència, la felicitat i l'amor personificat: la Isona, l'Oleguer i l'Hugo.

Als meus pares Josep i Lourdes, per donar-m'ho tot. Gràcies pels valors amb els que ens heu educat. Gràcies per estar SEMPRE al meu costat i pel vostre suport incondicional en tot allò que m'he proposat. Gràcies al meu pare, per estar constantment pendent de mi, protegir-me i mostrar-me el seu afecte en les petites coses de cada dia. Gràcies a la meva mare, per TOT, pel seu amor infinit, per escoltar-me, aconsellar-me i abraçar-me, per forjar uns vincles fermes i eterns. Per ser la persona més completa que conec i la millor mare de l'univers.

I, finalment, al meu germà Marc. Gràcies per ser com ets, sempre TANT especial. Gràcies per estar incondicionalment al meu costat i pintar de color els dies. Gràcies per la teva immensa paciència, per fer-me sentir estimada, admirada i valorada. Gràcies per ensenyar-me a ser millor persona. Gràcies per teixir una història única de germans. Gràcies per ser el meu germà, el millor germà.

Ha sigut difícil, però al final ho hem aconseguit. Aquesta tesi també és vostra.

"Live as if you were to die tomorrow. Learn as if you were to live forever"

Mahatma Gandhi

ÍNDEX

Índex

Abreviatures.....	15
1. Introducció	23
1.1 Generalitats del càncer colorectal	23
1.1.1 Epidemiologia i etiologia	23
1.1.1.1 Epidemiologia.....	23
1.1.1.2 Etiologia.....	25
1.1.2 Classificació del càncer colorectal	28
1.1.2.1 Càncer colorectal esporàdic	28
1.1.2.2 Càncer colorectal hereditari.....	29
1.1.3 Origen cel·lular del càncer colorectal.....	33
1.1.3.1 Model “ <i>Bottom-up</i> ”	38
1.1.3.2 Model “ <i>Top-down</i> ”	39
1.1.4 Biologia molecular del càncer colorectal	40
1.1.4.1 Alteracions genètiques.....	40
1.1.4.2 Alteracions epigenètiques.....	45
1.1.4.3 Classificació molecular segons el Consorci de Subtipus de càncer colorectal	47
1.1.5 Diagnòstic, estadiatge, pronòstic i tractament	49
1.1.5.1 Diagnòstic.....	49
1.1.5.2 Estadiatge.....	51
1.1.5.3 Pronòstic	55
1.1.5.4 Tractament.....	56
1.2 Biòpsia líquida	64
1.2.1 La vascularització del colon com un model apte per l’estudi de la biòpsia líquida ...	65
1.2.2 Sang perifèrica i sang procedent del tumor	68
1.2.3 Importància dels microRNAs i dels exosomes en la biòpsia líquida.....	69
1.3 Comunicació cel·lular: Vesícules extracel·lulars.....	70
1.3.1 Exosomes.....	72
1.3.1.1 Biogènesi, secreció i reconeixement dels exosomes	72
1.3.1.2 Contingut general dels exosomes	75
1.3.1.3 Funció dels exosomes en càncer.....	76
1.3.1.4 Exosomes en càncer de colon	80
1.4 ARNs no codificants.....	84
1.4.1 microRNAs.....	85
1.4.1.1 Història i característiques.....	85
1.4.1.2 Identificació de dianes de microRNAs.....	87

1.4.1.3 Biogènesis.....	87
1.4.1.4 Mecanisme d'acció.....	89
1.4.5 microRNAs en càncer	92
1.4.6 microRNAs en càncer colorectal	95
2. Hipòtesi i objectius.....	105
2.1 Fonaments de la hipòtesi.....	105
2.2 Hipòtesi	105
2.3 Objectius	106
2.3.1 Objectiu general.....	106
2.3.2 Objectius específics.....	106
3. Resultats.....	109
3.1 Article primer: <i>“Differential miR-21 expression in plasma from mesenteric versus peripheral veins”</i>	109
Resum.....	109
Article <i>“Differential miR-21 expression in plasma from mesenteric versus peripheral veins”</i>	111
3.2 Article segon: <i>“Exosomal microRNAs isolated from plasma of mesenteric veins linked to liver metastases in resected patients with colon cancer”</i>	119
Resum.....	119
Article <i>“Exosomal microRNAs isolated from plasma of mesenteric veins linked to liver metastases in resected patients with colon cancer”</i>	121
3.3 Article tercer: <i>“miR-328 mediates a metabolic shift in colon cancer cells by targeting SLC2A1/GLUT1”</i>	132
Resum.....	132
Article <i>“miR-328 mediates a metabolic shift in colon cancer cells by targeting SLC2A1/GLUT1”</i>	133
3.4 Article quart: <i>“Proteomic analysis of liquid biopsy from tumor-draining vein indicates that high expression of exosomal ECM1 is associated with relapse in stage I-III colon cancer”</i> ..	140
Resum.....	140
Article <i>“Proteomic analysis of liquid biopsy from tumor-draining vein indicates that high expression of exosomal ECM1 is associated with relapse in stage I-III colon cancer”</i>	141
4. Discussió.....	151
5. Conclusions	161
Bibliografia	165

Annexes	193
Annex 1. Revisions dels articles publicats	193
Article primer	193
Article segon.....	196
Article tercer.....	202
Article quart	204
Annex 2. Participació en congrés internacional al que ha donat lloc la tesi.....	206
Pòster “ <i>Exosomal ECM1 protein expression in plasma from the tumor-draining vein (mesenteric vein) and time to relapse in colon cancer patients</i> ”	207
Annex 3. Altres publicacions en les que he participat durant el període de tesi.....	208
Annex 4. Altres congressos en els que he participat durant el període de tesi.....	210
Annex 5. Protocols	212
1. Processament de mostres	212
2. Extracció d’ARNs totals en teixit	212
3. Extracció de microRNAs totals en plasma i continguts en exosomes.....	213
4. Estudi de microRNAs diferencialment expressats en plasma i associats a la recaiguda	214
5. Aïllament i caracterització d’exosomes circulants en plasma.....	215
6. Quantificació de microRNAs lliures en plasma i continguts en exosomes.....	216
7. Estudi <i>in vitro</i> amb les línies cel·lulars SW480 i LOVO	217
8. Estudi de la regulació de miR-328 sobre <i>SLC2A1/GLUT1</i>	217
9. Extracció i quantificació de proteïna	219
10. Western blot d’exosomes circulants en plasma i de línies cel·lulars	220
11. Estudi proteòmic dels exosomes.....	222
12. Anàlisi dels nivells d’ARNm.....	222
13. Anàlisi estadístic	222
14. Anàlisi de l’estat mutacional de <i>KRAS</i>	223

ABREVIATURES

Abreviatures

5-FU	5-Fluorouracil
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ACF	<i>Aberrant Crypt Focus</i>
ADN	Àcid desoxiribonucleic
AGO2	<i>Argonaute 2</i>
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
APAF1	<i>Apoptotic protease activating factor 1</i>
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
ARID1A	<i>AT-rich interactive domain-containing protein 1A</i>
ARN	Àcid ribonucleic
BAX	<i>BCL2-associated X protein</i>
BCL2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bmi1	<i>BMI1 Polycomb Ring Finger Oncogene</i>
BRAF	<i>B-Raf Proto-Oncogene</i>
BRG1	<i>Brahma-related gene 1</i>
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CAFs	<i>Cancer associated fibroblasts</i>
CC	Càncer de colon
CBCs	<i>Crypt base columnar cells</i>
CCHNP	Càncer de colon hereditari no polipòsic
CCHP	Càncer colorrectal hereditari polipòsic
CCL2	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 2</i>
CCR	Càncer colorectal
CDH1	<i>Cadherin 1</i>
CDK4	<i>Cyclin-dependent kinase 4</i>
CDKN2A/p16	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A/ INK4 family member p16 protein</i>
CDX1	<i>Homeobox tipus caudal-1</i>
CEA	Antigen carcinoembrionic
CEBPA	<i>CCAAT/enhancer binding protein alpha</i>
CIMP	CpG island methylator phenotype
CIN	<i>Chromosome instability</i>

Abreviatures

CK1	<i>Casein kinase 1</i>
CLL	Leucèmia limfocítica crònica
CMS1-4	<i>Consensus Molecular Subtypes 1-4</i>
c-MYC	<i>Proto-Oncogene C-Myc</i>
COX-2	<i>Cyclooxygenase 2</i>
CPCNP	Càncer de pulmó de cèl·lula no petita
CRNDE-h	<i>Human lncRNA colorectal neoplasia differentially expressed</i>
<i>Cryo-TEM</i>	Crio microscopia electrònica de transmissió
ctADN	ADN tumoral circulat
ctARN	ARN tumoral circulat
CTC	Colonografia per tomografia computada
CTCs	Cèl·lules tumorals circulants
CTNNB1	<i>Catenin (Cadherin-Associated Protein), Beta 1</i>
DCC	<i>Deleted in Colorectal Carcinoma</i>
DCEB	Enema de bari de doble contrast
DGCR8	<i>DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8</i>
DICER	<i>Rinonuclease Type III</i>
DNMT3	<i>DNA Methyltransferase 3 Alpha</i>
DTL	<i>Denticleless E3 Ubiquitin Protein Ligase Homolog</i>
Dvl	<i>Dishevelled Segment Polarity Protein 1</i>
EB1	<i>APC-binding protein EB1</i>
EE	<i>Early endosome</i>
EGFL7	<i>Epidermal Growth Factor-Like Protein 7</i>
EGFRvIII	<i>Epidermal Growth Factor Receptor III</i>
EMT	Transició Epiteli-Mesènquima
ENCODE	<i>Encyclopaedia of DNA Elements</i>
ESCRT	<i>Endosomal Sorting Complex Required for Transport</i>
EUCAN	<i>European and Canada Project</i>
Ev	<i>Extracelular vesicle</i>
FIT	<i>Fecal immunochemical test</i>
FL	5-FU + leucovorí
FOLFOX	5-FU, leucovorí i oxaliplatí
FOXO4	<i>Forkhead Box O4</i>
FRA1	<i>FOS-like antigen 1</i>

FXR1	<i>Fragile X Mental Retardation Syndrome-Related Protein 1</i>
gFOBT	<i>guaiac-based Fecal occult blood test</i>
GSK-3 β	<i>Glycogen synthase kinase 3β</i>
GSTP1	<i>Glutathione S-Transferase Pi 1</i>
<i>H. Sapiens</i>	<i>Homo Sapiens</i>
HDAC	<i>Histone deacetylase</i>
hDLG	<i>Human disk large protein</i>
HER2	<i>Human epidermal growth factor 2</i>
hnRNP E2	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein E2</i>
HSP70	<i>Heat shock protein 70</i>
HSP90	<i>Heat shock protein 90</i>
IGF IIR	<i>Insulin-like growth factor receptor-II</i>
IL-6	<i>Interleuquin 6</i>
ILV	<i>Intraluminal vesicles</i>
ISC	<i>Intestinal Stem Cells</i>
KRAS	<i>Kirstein rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LncRNA	<i>Long non-coding RNAs</i>
LRP	<i>LDL Receptor Related Protein</i>
LSD1	<i>Lysine (K)-specific demethylase 1A</i>
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
mARN	ARN missatger
MET	<i>MET Proto-Oncogene (hepatocyte growth factor receptor)</i>
MHC II	<i>Major Histocompatibility Complex II</i>
MIF	<i>Macrophage migration inhibitory factor</i>
miRNA	microRNA
MMP9	<i>Matrix Metallopeptidase 9</i>
MMR	<i>DNA Mismatch repair</i>
MOSAIC	<i>Multicenter International Study of Oxaliplatin, Fluorouracil, and Leucovorin in the Adjuvant Treatment of Colon Cancer</i>
MSI	<i>Microsatellite instability</i>
MVB	<i>Multivesicular body</i>
ncARN	Àcids ribonucleics no codificants
NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>
NF-kB	<i>Nuclear Factor Kappa B</i>

Abreviatures

nm	Nanòmetres
OncomiR	miRNA oncogènic
PACT	<i>PKR protein activator</i>
PAF	Poliposis adenomatosa familiar
PAFA	Poliposis adenomatosa familiar atenuada
PAK2	<i>RAC1 Activated Kinase 2</i>
PAM	Poliposis associada al gen MYH
PDCD4	<i>Programmed cell death factor 4</i>
PET	Tomografia per emissió de positrons
PHB	<i>Arabidopsis thaliana homeobox protein 14</i>
PHV	<i>Arabidopsis thaliana homeobox-leucine zipper protein 9</i>
PKM2	<i>Pyruvate kinase isozymes M2</i>
PMS2	<i>Mismatch repair endonuclease</i>
Pol II	<i>RNA Polimerase II</i>
Pre-miRNA	miRNA precursor
Pri-miRNA	miRNA primari
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
Rac1	<i>Ras-Related C3 Botulinum Toxin Substrate 1</i>
RB	Retinoblastoma
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RT-PCR	Reacció en cadena de la polimerasa mitjançant retrotranscriptassa
SEER	<i>The Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program of the National Cancer Institute</i>
SERPINA1	<i>Serpin Family A Member 1</i>
SERPINF2	<i>Serpin Family F Member 2</i>
SIX1	<i>Sine Oculis Homeobox Homolog 1</i>
SMAD2/4	<i>SMAD family member 2</i>
SMARCC2	<i>SWI/SNF Related, Matrix Associated, Actin Dependent Regulator Of Chromatin Subfamily C Member 2</i>
SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors</i>
SPJ	Síndrome de Peutz-Jeghers
STAT3	<i>Signal Transducer And Activator Of Transcription 3</i>
STK-11	<i>Serine/Threonine Kinase 11</i>
SWI/SNF	<i>SWItch/Sucrose Non-Fermentable</i>

TA	<i>Transit Amplyfing</i>
TAMs	<i>Tumor-Associated Macrophages</i>
TC	Tomografia computada
Tcf-1	<i>Transcription Factor 1</i>
TCF-4	<i>Transcription Factor 4</i>
TEP	<i>Tumor Educated Platelets</i>
TG2	<i>Transglutaminase 2</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TGF- β RI i II	<i>Transforming growth factor beta receptor I and II</i>
Tip60	<i>Acetyltransferase KAT5</i>
TLR	<i>Toll Like Receptor</i>
TNF α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
TNM	Tumor, Nòdul, Metàstasis
TP53	<i>Tumour protein P53</i>
TRBP	<i>Tar RNA-binding protein</i>
TSAP6	<i>Tumor suppressor-activated pathway 6</i>
TSP1	<i>Thrombospondin 1</i>
TTR	Temps a la recaiguda
UICC	<i>International Union Against Cancer</i>
UTR	<i>Untranslated region</i>
VM	Vena mesentèrica
VMI	Vena mesentèrica inferior
VMS	Vena mesentèrica superior
VP	Vena perifèrica
WB	<i>Western blot</i>
Wnt	<i>Wingless-type MMTV integration site family</i>
XELOX	Capecitabina i oxaliplatí
XPO5	<i>Exportin-5</i>

INTRODUCCIÓ

1. Introducció

1.1 Generalitats del càncer colorectal

1.1.1 Epidemiologia i etiologia

1.1.1.1 Epidemiologia

El càncer colorectal (CCR) presenta una alta incidència i elevada mortalitat. És una de les neoplàsies més freqüents en els països occidentals, representant quasi el 10% del total de càncers a nivell mundial. Ocupa el tercer lloc en incidència en ambdós sexes, en el cas dels homes es troba per darrera del càncer de pròstata i pulmó, mentre que en el cas de les dones es troba per darrera del càncer de mama i pulmó [1] i representa la quarta causa de mort relacionada amb càncer a nivell mundial [2]. Gràcies als perfils temporals i les projeccions demogràfiques, es preveu que la incidència mundial de CCR augmenti un 60% donant lloc a més de 2.2 milions de nous casos que s'associaran a 1.1 milions de morts degudes al CCR per l'any 2030 [2].

Durant el 2017, als Estats Units d'Amèrica s'estimen uns 95.520 casos nous de càncer de colon i 39.910 casos de càncer de recte, així com també s'esperen 50.260 morts causades per CCR [1]. L'alta incidència ha anat decreixent degut a la millora de les tècniques de detecció precoç que han permès eliminar els pòlips (creixements anormals del teixit que sorgeixen de la capa interior o mucosa del colon i sobresurten al canal intestinal) abans de que aquests progressin a càncer i quan el tractament sol ser més exitós, així com també degut a l'augment de l'espectre terapèutic. Del 2005 al 2014, segons la SEER, la taxa d'incidència ha disminuït un 3% per any, així com la taxa de mortalitat també s'ha vist disminuïda un 2.5% en ambdós sexes (Figura 1A) [1]. El percentatge de supervivència als 5 anys després del diagnòstic de CCR és del 64.9% (Figura 1B) [1].

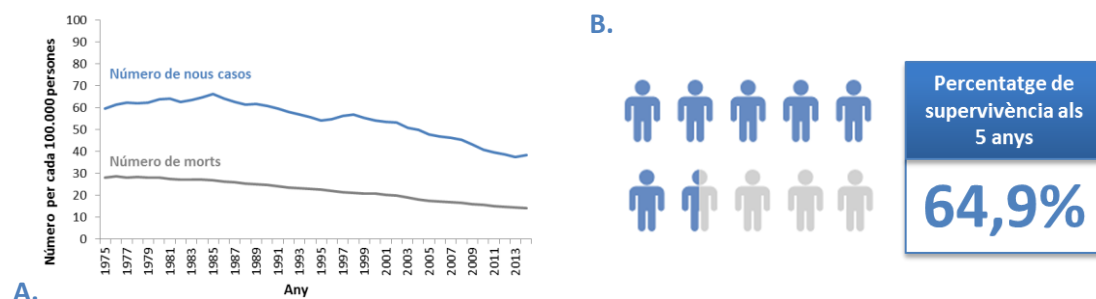


Figura 1. (A) Històric del nombre de nous casos i morts per 100.000 persones des del 1975 al 2014. **(B)** Supervivència als 5 anys des del diagnòstic de CCR. El gris representa les defuncions associades a CCR. El blau representa la supervivència als 5 anys o més després del diagnòstic de CCR. Dades obtingudes de SEER, 2007-2013 [1].

L'edat mitjana al diagnòstic és als 67 anys i un 90% dels pacients tenen més de 50 anys en el moment del diagnòstic, però també pot aparèixer en persones joves. Els casos que apareixen a edats temperanes solen tenir predisposició genètica. La major incidència es registra a Europa, Amèrica del Nord, Oceania i Japó, mentre que la incidència és més baixa a Àfrica i alguns països d'Àsia (Figura 2) [2, 3]. Als Estats Units d'Amèrica, la població més afectada és l'afroamericana. Durant el període del 2010-2014, aquest grup presentà una incidència un 25% major que la població blanca i un 45% major que els asiàtics o originaris del Pacífic (Figura 3) [4].

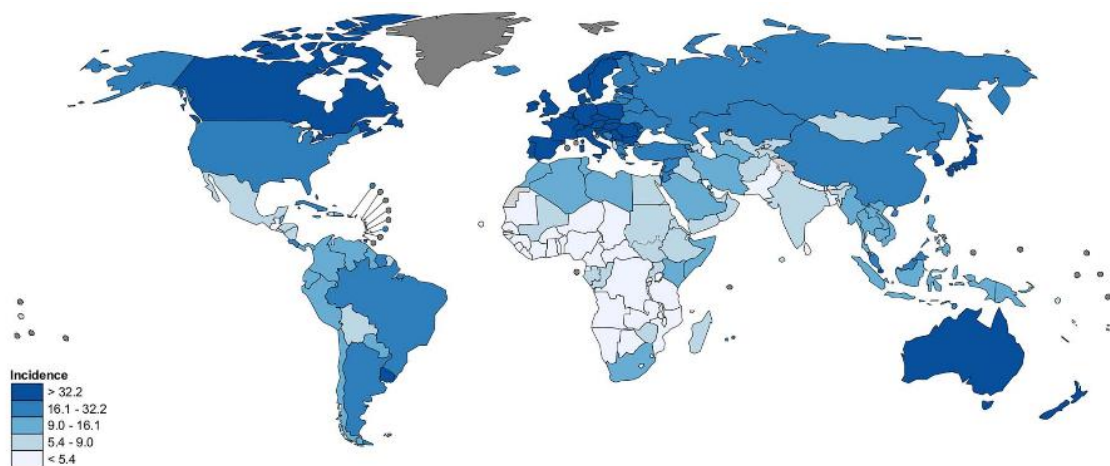


Figura 2. Taxes d'incidència del CCR a nivell mundial (edat ajustada d'acord a l'estàndard mundial de població, per 100.000 habitants) en homes al 2012 [3].

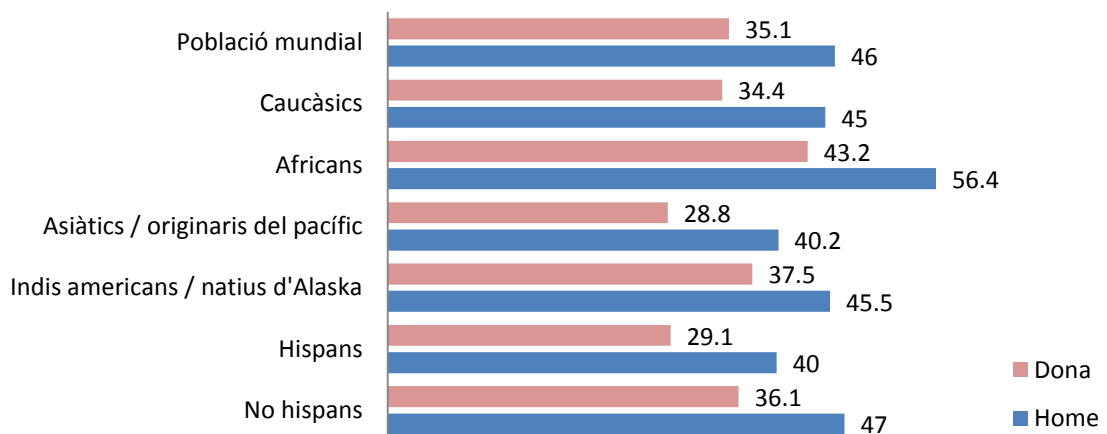


Figura 3. Número de casos de CCR per 100.000 habitants per ètnia i sexe [4].

A Europa, el CCR ocupa el segon lloc en incidència en ambdós sexes [5] i a Espanya la primera posició [6] (41.441 casos), en el cas dels homes es troba per darrera del càncer de pròstata, mentre que en el cas de les dones es troba per darrera del càncer de mama, essent en aquest

país la segona causa de mort relacionada amb càncer (15.449 casos). El 80% dels CCR es troben en el colon i el 20% restants en el recte.

A partir de les dades del projecte EUCAN, la taxa d'incidència de CCR a Espanya estimada a l'any 2012 era superior a la mitjana dels països de la Unió Europea [7].

1.1.1.2 Etiologia

S'estima que aproximadament un 4.6% d'homes (1 de 22) i un 4.2% de dones (1 de 24) seran diagnosticats de CCR al llarg de la seva vida. Existeixen molts factors que poden augmentar o disminuir el risc de patir un CCR, alguns d'aquests són factors modificables i d'altres no. Els factors no modificables inclouen els factors hereditaris o familiars, pòlips adenomatosos i antecedents familiars de patologies associades a inflamació crònica de l'intestí. D'altra banda, els factors de risc modificables són aquells que quan es canvien poden disminuir el risc de patir CCR, per exemple realitzar exercici físic, prevenir la obesitat, disminuir el consum de carn vermella o altres carns processades, deixar de fumar i reduir la ingesta d'alcohol [8].

El risc de patir un CCR augmenta amb l'edat. La mitjana d'edat al diagnòstic pel càncer de colon (CC) és de 67 anys en homes i 72 anys en dones, mentre que pel càncer de recte és de 63 anys en ambdós sexes. Durant el període comprès entre el 2010-2014, més del 90% dels casos diagnosticats corresponien a persones de més de 50 anys. En conseqüència podem afirmar que l'edat és un dels principals factors de risc en el CCR [8].

El sexe masculí presenta un major risc de patir (30%) i de morir (40%) degut a un CCR respecte el sexe femení. Els motius que expliquin aquests fet encara no estan ben estudiats, però en part s'atribueixen a la diferent exposició als factors de risc i a les hormones sexuals, ja que estudis recents relacionen els nivells d'estrogen amb el risc de desenvolupar CC [9, 10].

La predisposició genètica o malalties de base com la diabetis tipus II o malalties inflamatòries intestinals (Malaltia de Crohn i Colitis ulcerosa) també augmenten el risc de CCR. Així doncs, familiars de primer ordre (pare, germà o fill) a una persona amb antecedents de CCR augmenten de 2 a 4 vegades la probabilitat de desenvolupar aquesta malaltia, especialment si el familiar va patir el càncer de jove (Taula 1).

Els síndromes hereditaris representen el 5% de tots els CCR, ja que la majoria s'originen per mutacions espontànies, i s'associen a alteracions de certs gens. El síndrome hereditari de CCR més comú és el síndrome de Lynch, també anomenat càncer de colon hereditari no polipòsic (CCHNP), que representa el 2-4% dels casos i està causat per mutacions en els gens reparadors de l'ADN. La poliposis adenomatosa familiar (PAF) és el següent síndrome més comú de

predisposició genètica de CCR i representa l' 1% de tots els casos de CCR. Aquest es caracteritza per la formació de centenars a milers de pòlips en el colon i recte degut a mutacions en el gen *APC (Adenomatous polyposis coli)* [8].

La dieta té un paper fonamental i cada vegada es té més en compte ja que s'estima que un 70% dels CCR són evitables només amb mesures dietètiques i nutricionals [11]. Les dietes riques en grassa i pobres en fruita i verdura, amb una escassa aportació de calci, folat i fibra s'han relacionat amb l'increment del risc de CCR. Alhora, el consum de carn vermella i processada, o de carn molt feta o cuinada en contacte directe amb el foc també es considera un factor de risc associat al CCR. D'altra banda, el consum de fibra, fruita i vegetals, all, làctics o macronutrients com els folats, calci i vitamina D sembla que actuen com a factors protectors tot disminuint el risc de CCR (Taula 1) [12].

La obesitat és un altre factor de risc en ambdós sexes, sobretot la obesitat abdominal. En canvi, l'exercici físic es considera un factor protector ja que es suggereix que practicar-lo 30 minuts al dia disminueix un 11% el risc de CCR (Taula 1). En ambdós casos, la hiperinsulinèmia juga un paper important i la seva presència augmenta el risc d'aparició de les lesions precursors del CCR, els adenomas colorectals [12].

L'alcohol (> 100 grams setmanals [13]) i el tabac també s'han descrit com a potencials inductors de la formació de pòlips augmentant així el risc de patir CCR (Taula 1). Alguns estudis indiquen que una mitjana de 2 a 3 begudes alcohòliques al dia augmenta un 20% el risc de CCR, mentre que més de 3 begudes al dia pot suposar un augment de fins a un 40% [14]. Aquesta associació és major en homes que en dones, potser degut a les diferències hormonals relacionades amb el metabolisme de l'alcohol. Pel que fa al tabac, malgrat l'associació sembla ser major en càncer de recte que en CC [15-17], el seu consum pot duplicar el risc de desenvolupar CCR respecte a les persones no fumadores [18], així com també s'associa a una menor supervivència, sobretot en pacients fumadors ja diagnosticats [19, 20].

Existeixen evidències científiques que demostren l'existència de factors protectors que cal tenir en compte alhora de prevenir tal patologia. Alguns d'aquests són l'ús regular i prolongat d'aspirina i altres anti-inflamatoris no esteroïdals [21-23], anticonceptius orals [24, 25] i biofosfonats orals [26].

Taula 1. Risc relatiu dels factors de risc associats al CCR [8].

Factors que augmenten el risc		Risc relatiu*
Herència i història mèdica		
Història familiar		
Familiar de primer ordre afectat		2.2
Més d'un familiar afectat		4.0
Familiar amb diagnòstic anterior als 45 anys		3.9
Malaltia inflamatòria de l'intestí		1.7
Diabetis		1.3
Factors conductuals		
Consum d'alcohol (mitjana diària)		
Entre 2 i 3 begudes		1.2
Més de 3 begudes		1.4
Obesitat (índex de massa corporal $\geq 30 \text{ kg/m}^2$)		1.3
Consum de carn vermella (100 g/dia)		1.2
Consum de carn processada (50g/dia)		1.2
Fumadors (Habitual vs. No fumador)		1.2
Factors que disminueixen el risc		Risc relatiu*
Activitat física		0.7
Consum de làctics (400 g/dia)		0.8
Consum de llet (200 g/dia)		0.9

* El risc relatiu compara el risc de malaltia entre persones amb una exposició particular al risc i persones sense aquesta exposició. El risc relatiu dels factors dietètics compara el consum més alt amb el consum més baix. Si el risc relatiu és superior a 1.0, el risc és més alt entre les persones exposades i les no exposades. Els riscos relatius inferiors a 1.0 indiquen un efecte protector. Adaptat de [8].

1.1.2 Classificació del càncer colorectal

El CCR es classifica principalment en CCR esporàdic i CCR hereditari. La majoria dels tumors colorectals s'inclouen dins dels tumors de tipus esporàdic (75-80%), en els quals no existeix cap etiologia de predisposició aparent, i només un 5-10% són deguts a mutacions heretades presents en gens associats a càncer (Figura 4).

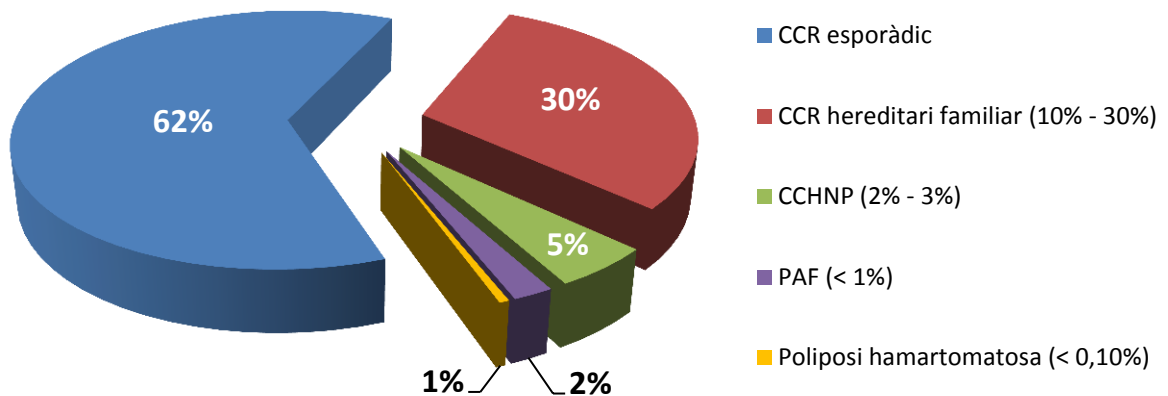


Figura 4. Proporcions dels diferents subtipus de CCR en la població.

1.1.2.1 Càncer colorectal esporàdic

El CCR esporàdic apareix en pacients amb una mitjana d'edat de 70-75 anys i, aproximadament el 70% d'aquests ocorren en el colon esquerre.

Tal i com ja va descriure el model genètic de múltiples etapes de Vogelstein al 1990, el CCR esporàdic s'origina quan una mucosa normal acumula un conjunt de canvis genètics que ocasionen la pèrdua de gens supressors tumorals i l'activació d'oncogens. Varis estudis descriuen que la seqüència adenoma-carcinoma s'inicia per la mutació del gen *APC*, característica dels estadis inicials, i seguidament es van acumulant múltiples mutacions en diferents gens com ara *KRAS* (*Kirstein rat sarcoma*) i *TP53* (*Tumour protein-53*) [4-15], presents en els estadis més avançats de la patologia [27]. No obstant, s'ha descrit que l'acumulació de les mutacions de tots tres gens només apareix en un 7% dels CCR, suggerint que altres gens han d'estar involucrats en el procés [28]. Es coneixen tres processos fonamentals que participen en el procés del CCR esporàdic: la inestabilitat cromosòmica (CIN), la inestabilitat de microsatèl·lits (MSI) i el fenotip d'illes CpG metilades (CIMP).

En primer lloc, la CIN, s'esdevé en el 70-85% dels casos de CCR esporàdic i és el procés que genera delecions, duplicacions i reagrupaments cromosòmics, generalment en gens involucrats en la replicació i reparació de l'ADN. Aquest mecanisme resulta en l'acumulació de desordres cromosòmics que poden donar lloc a un cariotip aneuploide, una pèrdua d'heterozigotat en

loci de gens supressors tumorals, com ara el 5q, 17p i 18q, o bé a reordenaments cromosòmics [29, 30]. Els tumors originats per la via CIN es caracteritzen per presentar cúmuls de mutacions en gens específics, com ara *APC*, *KRAS*, *PIK3CA*, *BRAF*, *SMAD4* i *TP53*, i consegüentment activar vies crítiques relacionades amb la carcinogènesis.

En segon lloc, la MSI, s'esdevé en el 15% dels casos de CCR esporàdic i és el procés pel qual s'acumulen un gran nombre de mutacions puntuals en regions curtes d'ADN que es repeteixen en tàndem degut a la inactivació del sistema de reparació d'aparellaments erronis de l'ADN (MMR, de l'anglès "mismatch repair") [31]. En la majoria dels casos esporàdics (>80%), la MSI apareix quan la regió promotora de *MLH1* és silenciada per una hipermetilació de les illes CpG [32]. En conseqüència, es perd l'expressió de *MLH1* i *MSH2* i dels seus factors d'unió (*MSH6* i *PMS2*, respectivament).

En tercer lloc, CIMP, s'edevé en el 30-40% dels casos de CCR esporàdic i és el procés que genera una àmplia metilació de les illes CpG. Malgrat els CCR CIMP-positius acostumen a presentar MSI degut a la metilació del promotor de *MLH1*, més del 50% també s'han descrit com a tumors microsatèl·lit-estables. En ambdós casos, aquests tipus de tumors presenten mutacions en el gen *BRAF* [33, 34], però actualment encara no existeix un consens que determini el panell òptim de metilació en els llocs CpG per a considerar que un CCR esporàdic s'ha originat seguint la via de CIMP.

Al llarg del desenvolupament del CCR esporàdic, generalment predomina un dels tipus d'inestabilitat genòmica prèviament descrits, tot i que la MSI i el CIMP sovint coexisteixen [35].

1.1.2.2 Càncer colorectal hereditari

El CCR hereditari es pot subclassificar en dos tipus en funció de l'etiologia d'origen aparent: el CCR amb història familiar però que no segueix un patró d'herència conegut i el CCR hereditari amb un patró d'herència definit.

D'una banda, el CCR amb història familiar fa referència a aquella situació en la que existeixen antecedents familiars de CCR, però no es compleixen ni els criteris clínics ni els moleculars dels síndromes hereditaris coneguts. És ben conegut que l'existència d'antecedents familiars de CCR augmenta el risc de desenvolupar aquesta neoplàsia i que aquest risc varia en funció del nombre de familiars afectats, l'edat al diagnòstic i el grau de parentesc.

D'altra banda, el CCR hereditari és conseqüència d'alteracions genètiques heredades dels progenitors seguint un patró d'herència conegut. Tenir alguna d'aquestes alteracions no assegura el desenvolupament d'un CCR però sí que n'augmenta el risc respecte la població

general (Figura 5) [36]. Es calcula que només entre el 5 i el 10% dels tumors colorectals són hereditaris (principalment la PAF i el CCHNP).

1.1.2.3.1 Càncer colorectal hereditari no polipòsic

El CCHNP conté un subgrup heterogeni de patologies genètiques, essent el síndrome de Lynch el més comú (1-3% de tots els casos de CCHNP). També s'inclouen en aquest grup el síndrome de CCR de tipus X (2%) i el CCR associat a MUTYH (<1%) (Figura 5) [36].

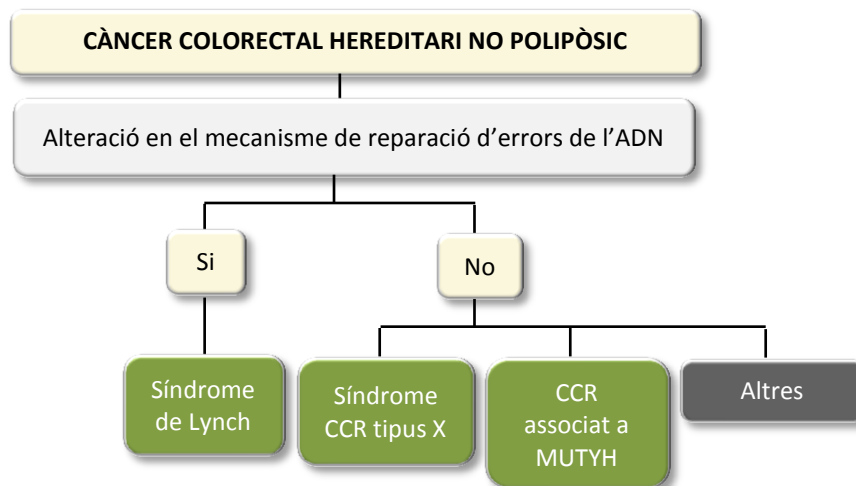


Figura 5. Classificació del CCR hereditari no polipòsic (CCHNP).

El síndrome de Lynch és un síndrome de susceptibilitat a CCR i a altres neoplàsies extracolòniques associades, el càncer d'úter, ovari, estòmac, intestí prim, vies biliars, pàncrees, conductes urinaris o cervell. Presenta una herència autosòmica dominant amb penetrància incompleta (80%), de manera que no totes les persones portadores de la mutació desenvoluparan la malaltia, tot i que sí que podrien transmetre-la als seus descendents.

En la majoria dels casos, aquest síndrome es diagnostica en pacients amb una mitjana d'edat de 45 anys, significativament abans que els casos de CCR esporàdic (65 anys) i afectant principalment al colon dret enlloc de l'esquerre [37].

El CCHNP apareix per mutacions en la línia germinal dels gens de reparació de bases mal aparellades (*Mismatch Repair*, MMR) de l'ADN: *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* i *PMS2*, entre d'altres; essent les mutacions en *MLH1* i *MSH2* les més freqüents (50 i 30%, respectivament), seguit de *MSH6* (10-15%); mentre que la freqüència més baixa de mutacions s'esdevé en el gen *PMS2* (5%) [38]. *MLH1* i *MSH2* representen la base sobre la qual es realitzen els estudis genètics clínics per determinar CCHNP en un individu [39, 40]. Alteracions en el mecanisme MMR donen lloc a MSI. La carcinogènesi generalment s'origina quan els errors ocorren en la regió codificant dels gens supressors de tumors, com ara *TGF-BRII*, *BAX*, *IGF2R*, *PTEN* o *CASP5*.

1.1.2.3.2 Càncer colorectal hereditari polipòsic

El CCR hereditari polipòsic (CCHP) es classifica en funció del fenotip de poliposis que manifesti el pacient, fet que implica la realització d'un test genètic i medicina personalitzada basada en la informació genòmica de cada individu (Figura 6).

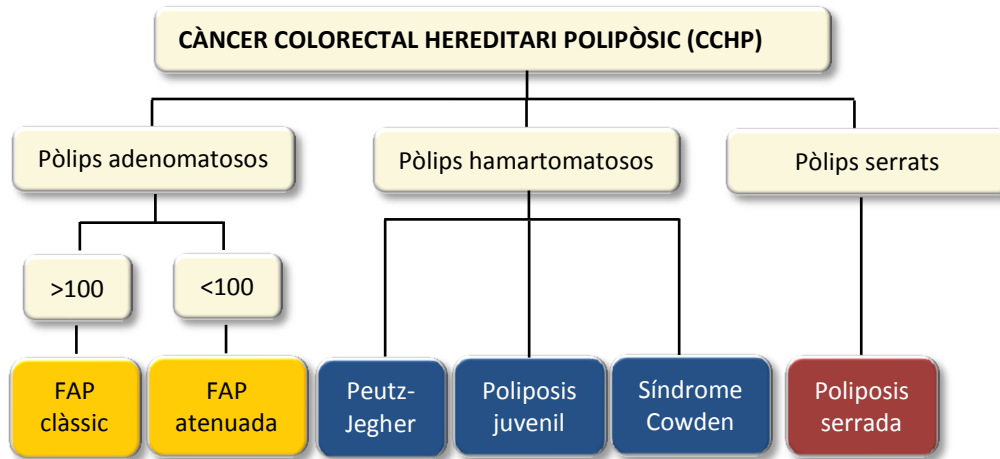


Figura 6. Classificació del CCR hereditari polipòsic (CCHP).

Els pòlips adenomatosos són els més freqüents (60-70%) i els que presenten major risc d'esdevenir malignes. Els pòlips hamartomatosos són lesions benignes formades per teixit epitelial i mesenquimal que apareixen com a conseqüència d'un procés inflamatori. Els pòlips serrats, clàssicament anomenats hiperplàsics, generalment estan associats a displàsia i es caracteritzen per presentar una morfologia de "dents de serra" en l'epiteli de la cripta [41].

Poliposis adenomatosa familiar

La PAF és la forma de poliposis més freqüent i representa un 1% de tots els casos de CCR. Presenta una herència autosòmica dominant i es caracteritza per l'aparició de més de 100 pòlips adenomatosos en el colon i el recte (poden ser més de 1000) a una edat molt temprana, elevant moltíssim el risc de desenvolupar un CCR, assolint un risc del 100% als 40-50 anys.

Més del 90% dels afectats presenten mutacions en *APC* [42]. Els pacients amb PAF hereden una còpia mutada del gen *APC* i al llarg de la seva vida se'ls inactiva l'altre còpia, fet que accelera la progressió a desenvolupar un CCR. La PAF es diagnostica a partir del primer any de vida, però és a partir dels 40 anys quan apareix el CCR si no es realitza un tractament adequat [43, 44].

Existeixen fenotips atenuats de la PAF clàssica, com són la PAF atenuada (PAFA) i la poliposis associada al gen *MYH* (PAM). Ambdues variants es caracteritzen per un menor nombre de pòlips adenomatosos (de 15 a 100 pòlips), localitzats en el colon dret i amb una edat d'aparició

de la poliposis i/o del CCR més tardana (10-15 anys després de la PAF clàssica). Malgrat ambdues variants comparteixen moltes característiques clíniques, difereixen entre si pel tipus d'herència mendeliana i el gen causant de la malaltia. D'una banda, la PAFA presenta un patró d'herència autosòmic dominant i està associada a mutacions en el gen *APC*, mentre que la PAM presenta un patró d'herència autosòmic recessiu i està causada per mutacions en el gen *MYH* [45].

Poliposis hamartomatosa

La poliposis hamartomatosa representa menys de l'1% dels casos de CCHP i afecta principalment a la població pediàtrica i adolescent. Aquests pòlips resulten d'una proliferació anormal de les cèl·lules del teixit d'origen i poden contenir components cel·lulars de qualsevol de les tres capes germinals que formen els intestins [46]. Alguns exemples d'aquesta malaltia són la Poliposis juvenil, associada a mutacions del gen *SMAD4* [47] i *BMP1A* [48], el síndrome de Cowden, associat a mutació de *PTEN* [49], i el síndrome de Peutz-Jeghers (SPJ). El SPJ és un trastorn genètic autosòmic dominant caracteritzat per múltiples pòlips hamartomatosos en el tracte gastrointestinal, sobretot a l'intestí prim. Els pòlips presenten un diàmetre de 0.1 a 5 cm i el nombre varia d'1 a 20 per cada segment del tracte gastrointestinal. Les manifestacions extraintestinals més característiques són les lesions mucocutànies, les quals donen lloc a taques d'hiperpigmentació a la boca, mans i peus, que solen presentar-se en la infància i desapareixen durant l'adolescència. Els pacients amb SPJ presenten una mutació en la serina treonina quinasa 11 (STK-11), un gen supressor tumoral present en la línia germinal [50].

Poliposis serrada

La poliposis serrada es caracteritza per la presència de nombrosos pòlips de morfologia serrada, que poden ser de gran mida, amb història familiar i un risc excepcionalment alt de presentar CCR. La base genètica segueix sent desconeguda de manera que, actualment, la definició és fenotípica i inclou un grup molt heterogeni de pacients [51].

1.1.3 Origen cel·lular del càncer colorectal

L'epiteli colònic té una notable capacitat d'autorenovació ràpida i continua gràcies a les cèl·lules mare intestinals del colon (ISC, de l'anglès "*Intestinal Stem Cells*"), les quals estan situades a la part més baixa de la cripta (Figura 7). Les ISC colòniques presenten una alta activitat *WNT*, característica que comparteixen amb les cèl·lules tumorals de CCR. Recentment, s'ha postulat que no existeix un únic grup de ISC colòniques, sinó que com a mínim, se'n defineixen dos: les cèl·lules columnars de la base de la cripta (CBCs) i les cèl·lules que proliferen lentament i alhora conserven els marcadors de cèl·lula mare. El descobriment d'un dels principals marcadors de cèl·lula mare colònica, *LGR5*, ha permès descriure que el grup de cèl·lules mare colòniques amb més activitat proliferativa són les CBCs.

Segons un estudi de Ritsma i col·laboradors al 2014, cada cripta conté aproximadament 16 cèl·lules mare les quals es divideixen diàriament i són *LGR5+*, i poden estar situades al centre de la cripta o a la porció ascendent d'aquesta. Aquest fet determinarà la seva capacitat de cèl·lula mare, essent les cèl·lules de la base les més capaces de retenir la capacitat de cèl·lula mare. Així doncs, es postula que la funcionalitat d'una cèl·lula mare colònica es defineix tant per la seva posició en la cripta com per l'expressió de determinades proteïnes clàssicament definides com a potencials marcadors de cèl·lula mare colònica [52].

Les cèl·lules filles immediatament adjacents a les ISC, anomenades cèl·lules d'amplificació transitòria (TA, de l'anglès "*Transit Amplifying*"), es divideixen cada 12-16 hores, donant lloc a unes 300 cèl·lules diàries que tindran una esperança de vida d'entre 2-4 dies, durant les quals proliferaran un nombre finit de vegades (aproximadament, unes 5 rondes de divisions cel·lulars) abans de diferenciar-se i migrar progressivament cap a la part més alta de la cripta. Les cèl·lules TA són les principals productores de cèl·lules epitelials (Figura 7) [53]. També existeixen altres cèl·lules especialitzades en la cripta, com ara les cèl·lules Globet que tenen una esperança de vida superior a la resta de 4-5 dies [53].

Estudis de seguiment de llinatge mitjançant marcadors típics de cèl·lula mare colònica han identificat un conjunt de cèl·lules dotades amb una llarga esperança de vida que poden actuar com a cèl·lules mare, tot desdiferenciant-se i repoblant la cripta en cas de que aquesta hagués patit un dany [54, 55]. Un dels marcadors d'aquest tipus cel·lular *Dll1* [56]. Aquest fet suggereix que hi ha un gran repertori de cèl·lules candidates a ser la cèl·lula d'origen del CCR.

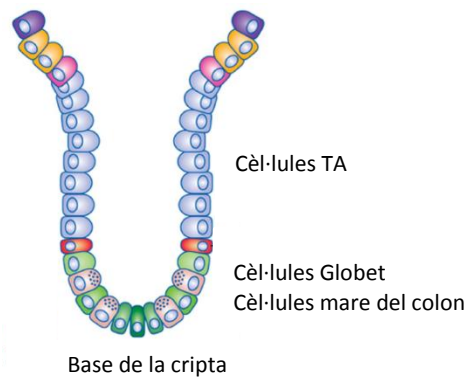


Figura 7. Localització i tipus de cèl·lules presents en la cripta colònica. Adaptat de [57].

Existeixen varies hipòtesis que pretenen explicar el desenvolupament del CCR. Inicialment, els estudis es basaven en un model de carcinogènesi postulat al 1975 [89] que defensa que els adenomes podrien formar-se a partir d'un únic nínxol de cèl·lules mare epitelials [58] capaç d'iniciar el procés tumoral per expansió clonal. Per tal de recolzar aquesta hipòtesi, s'ha estudiat la presència d'alteracions somàtiques en els diferents estadis de desenvolupament del CCR i s'ha pogut demostrar una composició clonal en tots els tumors colorectals humans examinats [27].

La presència de cadascuna d'aquestes alteracions o events mutacionals confereix un avantatge de creixement a la cèl·lula receptora que forma el tumor. I cada mutació addicional que apareix dona lloc a noves clones mutades, afavorint així l'heterogeneïtat tumoral.

Alternativament, les cèl·lules que formen el tumor primari poden presentar més d'una alteració genètica alhora, fet que suggereix que la cèl·lula ha incorporat tals mutacions degut a que li confereixen un avantatge selectiu de creixement. Aquesta hipòtesi es reafirma quan una mateixa mutació és identificada en molts tumors diferents. Una alteració somàtica important descrita en més del 50% dels tumors colorectals és la mutació del gen *KRAS*. Aquesta mutació podria ser la responsable de convertir un adenoma inicial a un de més agressiu mitjançant l'expansió clonal de la cèl·lula que ha adquirit tal mutació.

Com ja s'ha comentat anteriorment, a més de les mutacions puntuals (petites deleccions, insercions o substitucions d'un sol nucleòtid), els events mutacionals també poden ser canvis genètics majors com l'ampliació genètica o la pèrdua de cromosomes complets. D'una banda, s'han descrit alguns casos d'oncogens activats per ampliació genètica (*NEU*, *C-MYC* i *C-MYB*) en tumors de CCR [59-61]. D'altra banda, més freqüentment el que ocorre és la pèrdua d'un dels dos cromosomes parentals presents en les cèl·lules normals, els quals contenen gens supressors de tumors. Les pèrdues cromosòmiques més freqüents són les corresponents al cromosoma

5q (associat a la FAP) [62, 63], al cromosoma 17p [62, 64] i al cromosoma 18q [62, 64], però també s'han descrit deleccions cromosòmiques menys freqüents en 1q, 4p, 6p, 6q, 8p, 9q i 22q (Figura 8) [65].

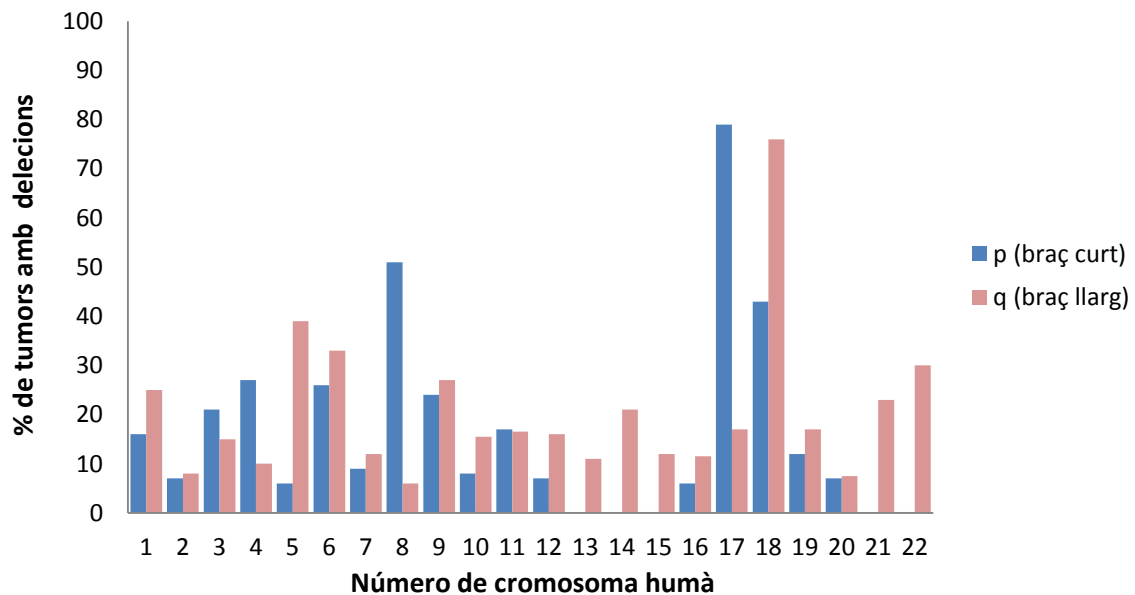


Figura 8. Freqüència de deleccions al·lèliques en els cromosomes individuals en el CCR [65].

Una altre alteració somàtica freqüent en el CCR és la desmetil·lació de l'ADN. L'estudi de l'ADN en els adenomes inicials revela la pèrdua d'1/3 dels grups metil (10-20 milions de grups metil per cèl·lula) en comparació a la mucosa normal del colon [66, 67]. Aquesta pèrdua pot resultar en la inhibició de la condensació dels cromosomes i l'aparició d'alteracions estructurals, així com també pot provocar alteracions en l'expressió genètica d'oncogens o gens supressors tumorals.

El conjunt de tots aquests mecanismes genètics descrits, juntament amb altres encara desconeguts, suggereixen que probablement el procés que facilita la progressió del CCR resulti d'ones d'expansió clonal de mutacions seqüencials que es van acumulant i afecten al balanç entre la proliferació cel·lular i l'apoptosis. Els orígens d'aquest procés sorgiren de Vogelstein i col·laboradors al 1990, que descrigueren el model molecular de la progressió del CCR conegut com "model Vogelstein", el qual postula que el CCR és el resultat d'acumular mutacions en gens supressors tumorals i oncogens que permeten la iniciació del procés tumoral i la conseqüent progressió [62].

Actualment, el model Vogelstein es manté vigent, tot i que es podria reforçar amb algunes modificacions ja que, contràriament a la proposta original, sembla que l'ordre en que

s'esdevenen les alteracions genètiques podria ser essencial [68]. En conseqüència, es suggereix que l'esdeveniment mutacional inicial és la pèrdua del gen *APC* i seguidament s'esdevenen mutacions addicionals en *KRAS*, *DCC*, *SMAD2/4* i/o *TP53* (Figura 9).

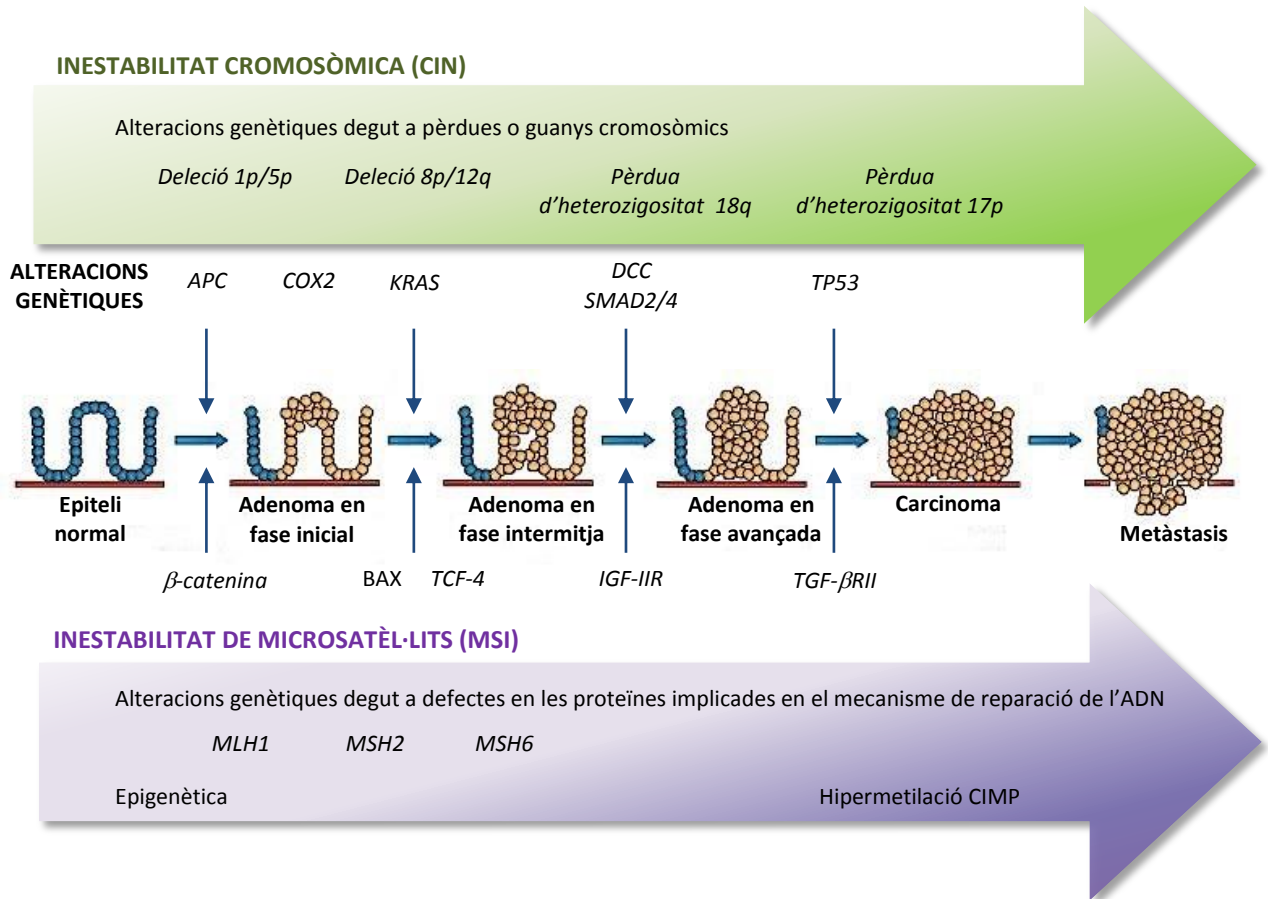


Figura 9. Característiques dels principals mecanismes que donen lloc a la progressió de l'epiteli normal a carcinoma colorectal.

L'adquisició d'aquestes mutacions generalment s'atribueix a errors en la replicació de l'ADN i a l'exposició a agents carcinogènics. Degut a l'alt grau de proliferació de les cèl·lules TA i la restringida zona de divisió de les ISCs colòniques, es postula que les cèl·lules TA serien més susceptibles a patir mutacions. No obstant, la seva curta esperança de vida (2-4 dies) redueix dràsticament el risc d'iniciar un tumor. Un mecanisme addicional per prevenir l'acumulació de mutacions en les cèl·lules de la cripta és l'anomenat "recanvi neutral" (de l'anglès, *neutral drift*) [69, 70]. Aquest mecanisme suggereix que cada cèl·lula ISC de la cripta colònica pot ser reemplaçada per qualsevol altre ISC veïna, a diferència del concepte clàssic de divisió asimètrica associat a les cèl·lules mare. En conseqüència, si la cripta colònica conté 5-6 ISC, una ISC normal sense cap mutació té una probabilitat d'1/5 (20%) de repoblar tota la cripta tot reemplaçant les altres ISCs. Un estudi de Vermeulen i col·laboradors del 2013 [71] descriu que

en la majoria de casos les ISCs mutades són reemplaçades per una ISC veïna sense mutació. Aquest fet explicaria perquè el CCR tarda anys a desenvolupar-se, inclòs en aquells pacients amb predisposició genètica (mutació en la línia germinal d' $APC^{mut/+}$).

La correcta identificació i aïllament de les cèl·lules mare colòniques responsables de l'origen de la formació del tumor continua sent un repte en la investigació del càncer [72]. Recentment s'han suggerit possibles marcadors per detectar i seguir les cèl·lules mare colòniques ISC com ara *Lgr5*, *CD133/Prominin1*, *Lrig1* i *Bmi1*, entre d'altres (Figura 10, Taula 2). Els resultats d'aquests estudis suggereixen que l'activació de la via de senyalització de *WNT* en les cèl·lules mare és suficient per la formació d'un adenoma en el model murí. A banda de les hipòtesis que senyalen les cèl·lules mare com a responsables de l'origen del procés tumoral, existeixen hipòtesis menys robustes que atribueixen la formació del tumor a les cèl·lules descendents o filles adjacents a les cèl·lules mare, anteriorment descrites com a cèl·lules TA. Els resultats d'aquests estudis indiquen que únicament l'activació de la via de senyalització de *WNT* en les cèl·lules TA és insuficient per desencadenar la formació d'un adenoma. Ara bé, si les cèl·lules TA acumulen events mutacionals seqüencials, s'activen vies de senyalització inflamatòries o ocorren canvis en el microambient intestinal, llavors sí que es podria iniciar la formació d'un adenoma de la mà de les cèl·lules TA [72]. L'equip de Greten i col·laboradors ha estudiat la capacitat de "desdiferenciació" de les cèl·lules TA i la seva relació amb l'activació de vies de senyalització inflamatòries, com ara la del $NFK\beta$ [73].

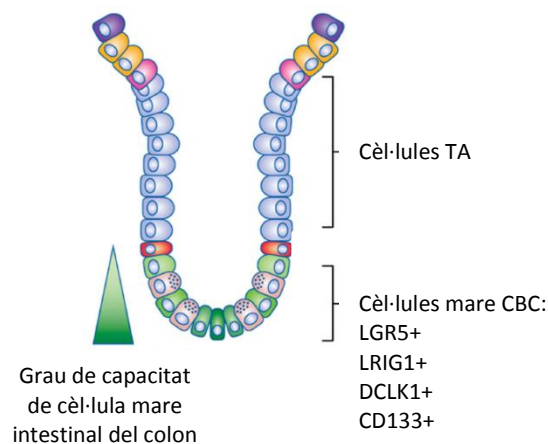


Figura 10. Visió de la cripta colònica. Les cèl·lules de la base de la cripta (CBC) es situen a la part més baixa de la cripta, enmig de les quals també hi trobem cèl·lules Paneth. A més de l'expressió de diversos marcadors de cèl·lula mare, la funcionalitat de les cèl·lules mare intestinals (ISC) està determinada per la seva localització, sent les CBC més centrals les que tenen més capacitat funcional. Adaptat de [57].

Taula 2. Estudis recents per investigar les cèl·lules capaces d'iniciar el procés tumoral del CCR (Figura 10). Adaptat de [74]. La mutació en el gen *CTNNB1* és una de les mutacions més freqüents capaç d'activar la via de senyalització de Wnt, la qual es relaciona amb el desenvolupament de tumors en el colon. Per tal d'estudiar l'efecte d'aquesta mutació, es generen models murins amb un al·lel salvatge i un al·lel mutat (delecció de l'exó 3) del gen *CTNNB1*. Els marcadors *Lgr5*, *CD133*, *Bmi1*, *Dclk1* i *Lrig1* són típics de cèl·lules mare del colon. El marcador Xbp1 és típic de cèl·lules diferenciades Lgr5- i s'activa constitutivament en condicions d'estrès cel·lular.

Cèl·lula diana	Marcador estudiat	Mutació induïda	Tumorigènesi	Referència	Conseqüència
Cèl·lules mare del colon	<i>Lgr5</i>	<i>Apc</i> ^{-/-}	Sí	(Barker <i>et al.</i> , 2009)	Activació de la via de senyalització <i>WNT</i> en cèl·lules mare: formació d'un adenoma.
	<i>CD133 (Prom1)</i>	<i>Ctnnb1</i> ^{ex3/+}	Sí	(Zhu <i>et al.</i> , 2009)	
	<i>Bmi1</i>	<i>Ctnnb1</i> ^{ex3/+}	Sí	(Sangiorgi i Capecchi, 2008)	
	<i>Dclk1</i>	<i>Apc</i> ^{-/-}	Només amb inflamació	(Westphalen <i>et al.</i> , 2014)	
	<i>Lrig1</i>	<i>Apc</i> ^{+/-}	Sí	(Powell <i>et al.</i> , 2012)	
Cèl·lules amplificadores de trànsit (TA)	Delecció condicional d' <i>Apc (Ah-cre)</i>	<i>Apc</i> ^{-/-}	Sí, però principalment microadenomes	(Barker <i>et al.</i> , 2009)	Activació de la via de senyalització de <i>WNT</i> en cèl·lules TA: formació d'un adenoma.
	Xbp1	<i>Ctnnb1</i> ^{ex3/+}	No	(Schwitalla <i>et al.</i> , 2013)	Les cèl·lules diferenciades no poden formar un adenoma per si soles, necessiten de l'activació de NFKβ i l'acumulació de mutacions.

Independentment de quina sigui la cèl·lula de la cripta que adquireixi la mutació inicial, aquesta començarà a colonitzar la base de la cripta provocant la substitució de la resta de cèl·lules mare del nínxol per cèl·lules mutades, fet que s'anomena “conversió monoclonal”. A continuació es suggereixen dos models per descriure el procés de propagació de la població clonal a través de la cripta intestinal.

1.1.3.1 Model “Bottom-up”

El model “Bottom-up” proposa que una cèl·lula mare de la part més baixa de la cripta és la primera cèl·lula transformada com a conseqüència de la diferenciació anòmala, que proliferarà i s'encarregarà de repoblar la totalitat de la cripta amb cèl·lules canceroses des de la base fins la part més alta de la cripta (Figura 11) [74-77].

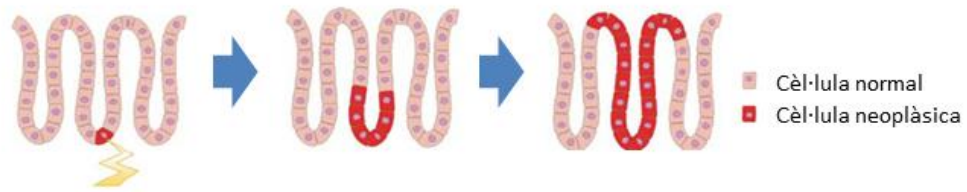


Figura 11. Model “Bottom-up”. Adaptat de [76].

1.1.3.2 Model “Top-down”

El model “Top-down” proposa que una cèl·lula diferenciada de la part més alta de la cripta és la primera cèl·lula transformada que pot adquirir el comportament de cèl·lula mare i difondrà lateralment i cap a la base de la cripta per malignitzar progressivament les cèl·lules adjacents (Figura 12) [74-77].

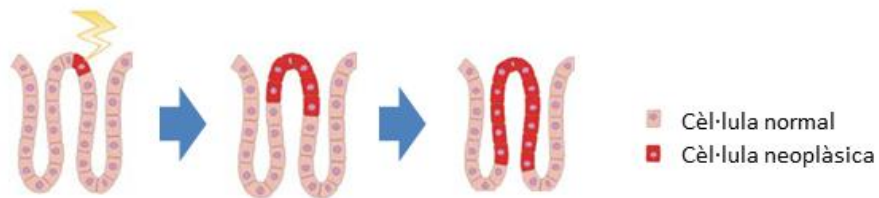


Figura 12. Model “Top-down”. Adaptat de [76].

1.1.4 Biologia molecular del càncer colorectal

Els estudis moleculars sobre el desenvolupament i la progressió dels tumors colorectals ha progressat activament durant les darreres dues dècades. Els processos carcinogenètics relacionats amb el CCR s'han associat amb determinades signatures genètiques i epigenètiques.

1.1.4.1 Alteracions genètiques

1.1.4.1.1 Mutacions en gens supressors de tumors i oncogens

Els mètodes de seqüenciació massiva realitzats en 4.742 pacients pel *Cancer Genome Atlas Network* [78] i l'Institut Broad [79] han permès ampliar el coneixement de les alteracions moleculars associades al CCR. Ambdós estudis confirmen que els gens *APC*, *KRAS*, *SMAD2/4* i *TP53*, clàssicament identificats com a potencials inductors del procés tumoral estan mutats en un alt percentatge de casos. No obstant, aquests gens no són suficients per explicar la totalitat de casos de CCR, per això tals estudis han identificat altres gens mutats amb una taxa significativament més alta a l'esperada en el CCR (Figura 13).

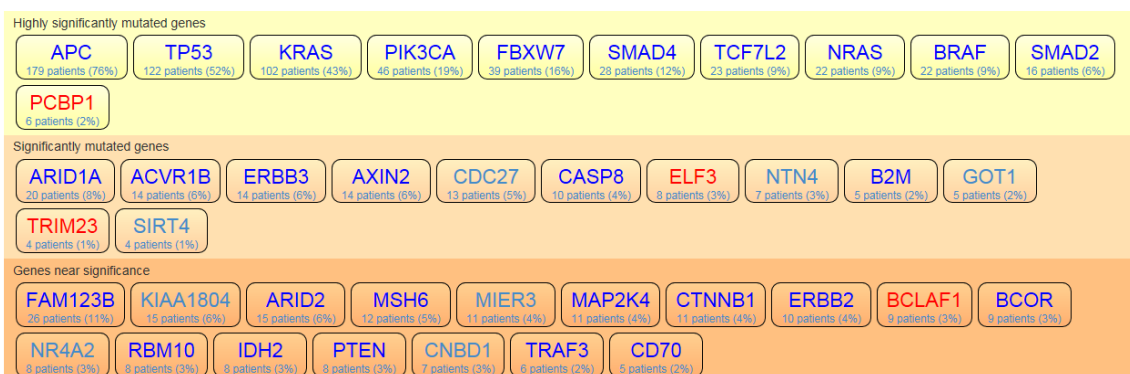


Figura 13. Gens mutats en el CCR identificats mitjançant la seqüenciació de l'exoma complet comparant parelles de mostres tumorals i normals. El color del nom del gen indica si aquest ja s'havia relacionat prèviament amb el CCR (blau), si és un nou gen altament relacionat amb el CCR (vermell) o si és un nou gen relacionat amb CCR (gris) [79].

Múltiples estudis han descrit que les mutacions que indueixen la progressió del CCR des de la formació del pòlip fins a l'estadi d'adenocarcinoma apareixen de forma seqüencial. Des de la seva descripció al 1987, es suggereix que, la primera lesió identificada en l'estadi més precoç del CCR és el focus de cripta aberrant (ACF) [80]. El potencial neoplàsic real d'aquesta lesió encara és poc conegut, però sembla que algunes d'aquestes lesions poden progressar cap a adenocarcinoma. A més, la majoria d'aquestes lesions presenten mutacions en *APC*, fet que sembla que els confereix més potencial per desencadenar el CCR [81].

Una altre alteració que apareix en les primeres fases del procés tumoral és la mutació del gen *APC*. Les alteracions en el gen *APC* ocorren en més del 80% dels adenomes i carcinomes colorectals esporàdics, així com també en la PAF [82], ja comentat anteriorment.

Gen *APC*

El gen *APC* és considerat un supressor tumoral ja que en condicions normals actua com un regulador negatiu de la via de senyalització *WNT* una de les principals cascades de regulació de les cèl·lules mare i altament associada a la carcinogènesis [83]. El gen *APC* es localitza al braç llarg del cromosoma 5 i codifica per una proteïna que conté múltiples dominis funcionals relacionats amb la unió d'una gran varietat de proteïnes intracel·lulars incloent la β -catenina, γ -catenina, sintasa de glicògen 3 β (GSK-3 β), axina, tubulina, EB1 i hDLG [82]. La proteïna β -catenina, codificada pel gen *CTNNB1*, és el principal component de la via *WNT*/ β -catenina. En condicions normals, la via no està activa i la proteïna β -catenina es troba reclutada pel complex de proteïnes conegut com a "complex de destrucció", format per la caseïna quinasa 1 (CK1), GSK-3 β , axina i *APC*; encarregats de fosforilar-la per posteriorment ser degradada pel proteasoma, impedit així les seves funcions com a factor de transcripció i en la interacció cèl·lula-cèl·lula (Figura 14A-via inactiva). En condicions tumorigèniques característiques d'un CCR, quan s'esdevé una mutació en el gen *APC*, la via de senyalització *Wnt*/ β -catenina s'activa degut a l'alteració de la unió d'*APC* amb β -catenina, de manera que aquesta queda lliure en el citoplasma i pot ser translocada al nucli per actuar com a factor de transcripció dels gens *C-MYC* [84], Ciclina D [85] i Tcf-1 [86] que codifiquen proteïnes involucrades en la proliferació i diferenciació cel·lular, manteniment de cèl·lules mare i resistència a apoptosi; afavorint així l'aparició de l'adenoma (Figura 14B-via activa) [87].

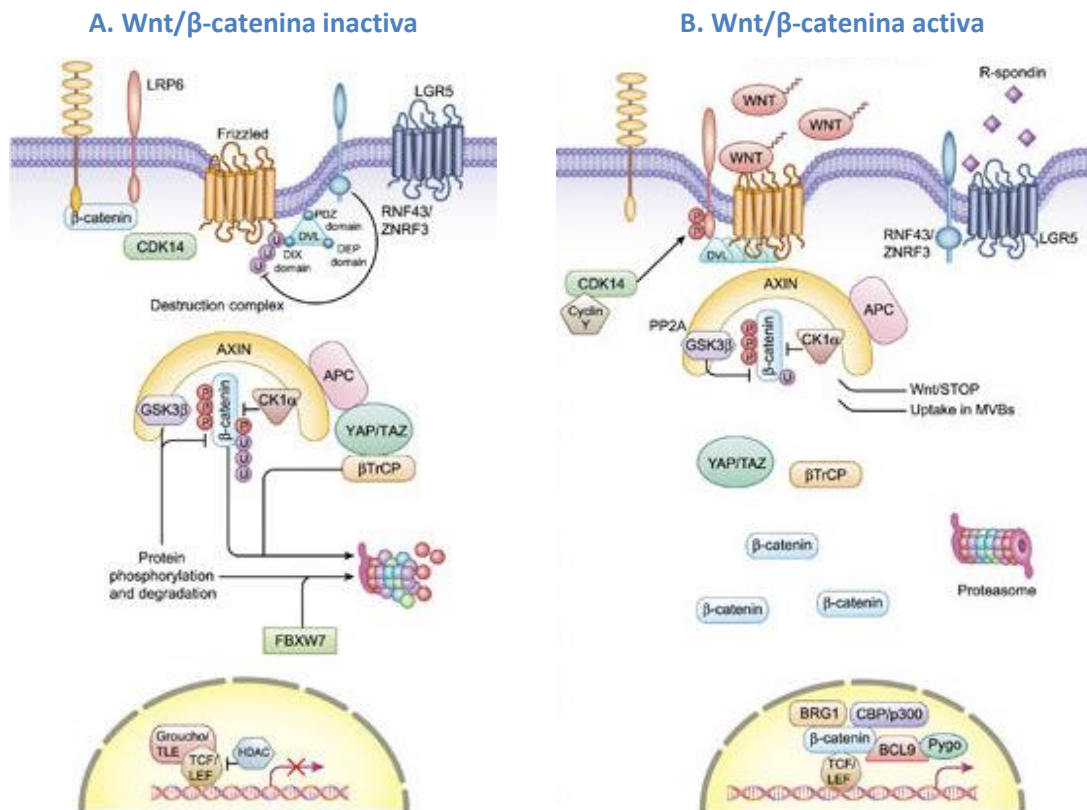


Figura 14. Representació de la via de senyalització Wnt/ β -catenina. **A.** En absència del lligant Wnt, la β -catenina és fosforil·lada i ubiquitinada pel complex de destrucció per ser posteriorment degradada pel proteasoma. **B.** En presència del lligand de Wnt, els receptors LRP recluten les proteïnes Dishevelled (Dvl) a la membrana plasmàtica, les quals inactiven el complex de destrucció encarregat de degradar la β -catenina. En conseqüència, es produeix una acumulació de β -catenina citoplasmàtica que serà translocada al nucli i activarà la transcripció de múltiples gens relacionats amb el procés carcinogènic. Adaptat de [83].

En les següents etapes, quan l'adenoma inicial progressa a adenoma més avançat, apareixen mutacions en diferents gens tals com *KRAS*, *SMAD2/4*, *DCC* i *TP53* que participaran en la formació del carcinoma [88].

Gen *KRAS*

El gen *KRAS* és considerat un oncogen situat al braç curt del cromosoma 12. Al voltant d'un 40% dels CCR presenten mutacions en els codons 12 i 13. Pertany a la família RAS encarregada de codificar proteïnes altament conservades que estan involucrades en la transmissió de senyals. Una de les principals funcions de la família RAS és l'activació de la via de senyalització *Raf-mitogen-activated protein kinase* (MAPK) directament relacionada amb la proliferació cel·lular [89]. Existeixen evidències de que les mutacions de *KRAS* sorgeixen a continuació de les mutacions d'*APC* i estan associades a lesions adenomatoses avançades. S'ha descrit que el 20% d'adenomes inicials amb mutació d'*APC* també contenen mutació de *KRAS*, mentre que aproximadament el 50% d'adenomes avançats tenen *KRAS* mutat [90, 91]. Per tant, sembla ser

que alteracions en *KRAS* potencien la tumorigènesi en fases tempranes tot afavorint el creixement de l'adenoma.

El gens de la regió 18q21, *SMAD2/4* i *DCC*, són tres gens considerats supressors tumorals candidats a patir mutacions associades a mal pronòstic en els pacients amb CCR. S'han descrit deleccions al·lèliques en la regió 18q21 en el 50% dels adenomes avançats i en el 70% dels carcinomes colorectals.

Gens *SMAD2/4* i *DCC*

D'una banda, els gens *SMAD2/4* codifiquen per proteïnes implicades en la via de senyalització del factor de creixement transformant beta (TGF- β) [92]. La via del TGF- β s'activa per la presència del lligant TGF- β en la membrana cel·lular, el qual permet la interacció de dos tipus de receptors, els de tipus I (TGF- β R-I) i els de tipus II (TGF- β R-II), donant lloc a un tetràmer que permetrà la translocació al nucli de *SMAD2/4* on activaran la transcripció gènica. Malgrat existeixen poques evidències de la relació de *SMAD2* i el CCR, s'han descrit un gran nombre d'alteracions estructurals en *SMAD4*, així com deleccions en homozigosis, mutació puntual i/o pèrdua d'expressió en un 20% dels adenomes i aquest percentatge augmenta en els carcinomes [93], fet que el relaciona amb l'aparició de metàstasis. D'altra banda, el gen *DCC* codifica per una proteïna transmembrana que podria actuar com a receptor d'una molècula implicada en la guia axonal, la netrina-1 [94, 95], però la funció d'aquest gen encara és controvertida. Alguns estudis proposen la implicació del gen *DCC* en diversos processos cel·lulars com la diferenciació [96, 97] i l'adhesió cel·lular [98, 99]. En relació al CCR, s'ha vist que l'expressió de *DCC* està disminuïda o absent en tumors de colon [27, 82] i que la freqüència de les alteracions en aquest gen augmenta en els tumors d'estadis més avançats, suggerint la seva relació en les fases més avançades del procés tumoral.

Gen *TP53*

El gen *TP53* és considerat un supressor tumoral ja que en condicions normals s'encarrega de reconèixer i reparar el dany, per això se l'anomena "el guardià del genoma". Es localitza al braç curt del cromosoma 17. S'ha descrit que més del 75% dels carcinomes colorectals presenten mutacions somàtiques en el gen *TP53*, donant lloc a la seva inactivació, fet que impedeix la reparació del dany en l'ADN i la conseqüent inducció d'apoptosi. La prevalença de les mutacions en aquest gen és molt menor en estadis inicials del CCR, fet que la seva inactivació s'associa a la progressió d'adenoma a carcinoma [100].

Filogenèticament el CCR es pot dividir en dos subtipus moleculars: CCR amb inestabilitat cromosòmica (CIN) i CCR amb inestabilitat de microsatèl·lits (MSI) (Figura 15).

1.1.4.1.2 Inestabilitat cromosòmica

La inestabilitat cromosòmica (CIN) es refereix a factors que alteren el nombre de cromosomes (aneuploidia o poliploidia) o l'estructura de fragments de cromosomes de la cèl·lula i, per tant, alteren un nombre estimat de gens de forma simultània (delecions o addicions). La CIN s'ha observat en el 80% dels CCR esporàdics i en el 85% de casos de FAP [101]. Els segments cromosòmics que es perden amb major freqüència en el CCR són el braç llarg del cromosoma 5 (5q en la regió del gen *APC*), tot i que la deleció en aquest cromosoma també s'ha associat a lesions benignes com els pòlips. En les etapes posteriors s'han descrit adenomes amb mutacions en el cromosoma 12 (12p en la regió del gen *KRAS*), en el braç curt del cromosoma 17 (17p en la regió del gen *TP53*) i en el braç llarg del cromosoma 18 (18q en la regió del gen *SMAD2/4* i *DCC*) [102]. Altres alteracions associades a la CIN observades en tumors de CCR són la pèrdua d'heterozigositat en els cromosomes 1p, 2p, 3p i 8p i el carotip aneuploide [101].

1.1.4.1.3 Inestabilitat de microsatèl·lits

Els microsatèl·lits són petits fragments d'ADN (de 2 a 5 parells de bases de longitud) que es repeteixen al llarg del genoma, generalment de 5 a 50 vegades [103]: les repeticions més freqüents en el genoma humà són el dinucleòtid Adenina-Citosina (AC). Si una repetició mostra diferències estables i heretables dins d'una població d'individus, es diu que les repeticions són polimòrfiques; mentre que pel contrari, si les repeticions són molt estables i no s'observen variacions d'aquestes al llarg de les generacions, es diu que el microsatèl·lit és monomòrfic [104].

S'han descrit insercions o pèrdues de microsatèl·lits en pacients que presenten un CCR, fet que es coneix com inestabilitat de microsatèl·lits (MSI). Aquests tumors presenten mutacions que inactiven la funció dels gens de reparació d'errors de l'ADN (MMR), com ara *hMSH2*, *hMLH1*, *hMLH6*, *hPMS1* i *hPMS2* [105], donant lloc a genomes hipermutats. Aquest fet és conegut com a "fenotip mutador".

La MSI es detecta en aproximadament el 15% de tots els CCR. D'aquests, el 5% s'associa al CCHNP i el 10% restant al CCR esporàdic resultant de la hipermetilació del promotor del gen supressor tumoral *MLH1*. De forma interessant, l'alta freqüència de MSI es correlaciona amb bon pronòstic en comparació amb la baixa freqüència de MSI o la CIN que s'associa a mal pronòstic [106, 107].

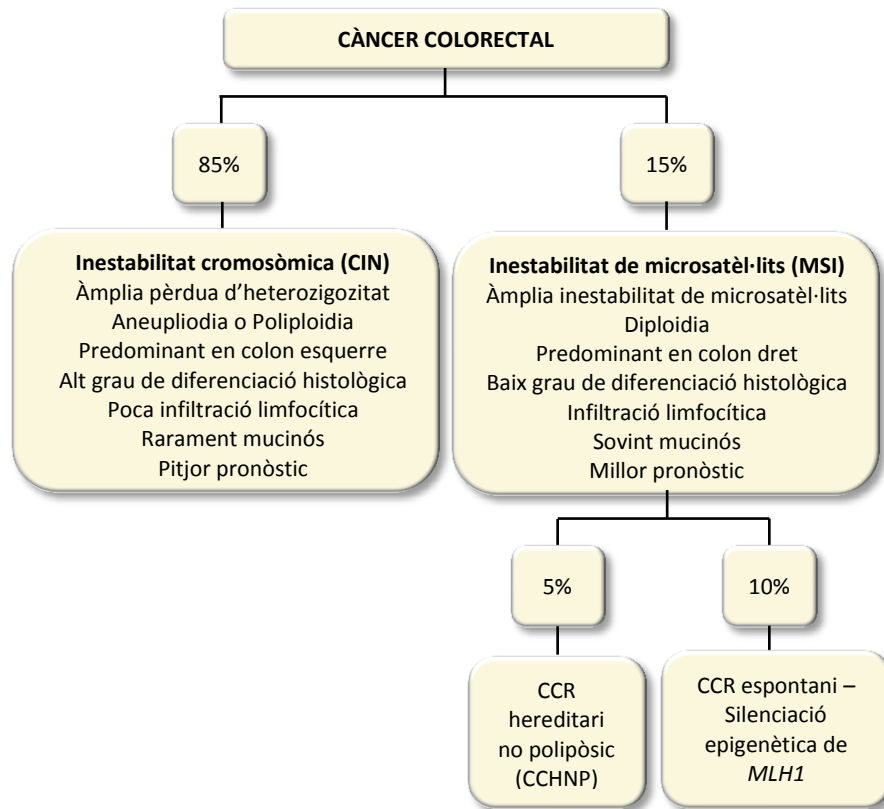


Figura 15. Classificació filogenètica dels subtipus moleculars del CCR.

Com ja s'ha comentat anteriorment, tradicionalment es creia que els mecanismes de CIN i MSI eren mútuament excloents, però recentment han sorgit evidències del contrari. Del 10 al 15% dels tumors que presenten CIN també presenten MSI [106], i en el CCR esporàdic la MSI està associada a l'adquisició de la mutació *BRAF* [108].

1.1.4.2 Alteracions epigenètiques

Les alteracions epigenètiques es defineixen com a canvis heretats en la seqüència de l'ADN, i possiblement reversibles, que alteren l'expressió gènica. Aquests poden anar precedits de mutacions genètiques com CIN i MSI. Les principals alteracions epigenètiques relacionades amb el CCR són la metilació de l'ADN, la modificació d'histones, la remodelació de la cromatina i els ARNs no codificants.

1.1.4.2.1 Metilació de l'ADN

L'ADN pot ser metilat en una base citosina per l'addició d'un grup metil. Una "illa CpG" és una regió amb una freqüència major de dinucleòtids CpG en comparació a la resta del genoma. Les illes CpG es troben en un 50-60% de les regions promotores dels gens. La metilació de l'ADN ocorre en aquestes illes CpG donant lloc al seu silenciament transcripcional. La hipermetilació aberrant d'aquestes illes CpG situades en els promotors gènics s'ha associat al silenciament

dels gens supressors tumorals, donant lloc al desenvolupament del càncer. En el CCR s'han descrit patrons d'hipermetilació diferents en l'epiteli normal de colon en funció de l'edat de l'individu (metilació de tipus A), així com també en l'epiteli tumoral en funció de les característiques del tumor (metilació de tipus C) [109]. En principi, la metilació de tipus A correspon a una situació normal derivada de l'edat de l'individu i afecta a gens que controlen el creixement i/o la diferenciació cel·lular, fet que recentment s'ha suggerit que podria ser un factor de predisposició a la tumorigènesis. Pel contrari, la metilació de tipus C resulta ser exclusiva dels tumors que presenten un fenotip d'illes CpG metilades (CIMP).

Aproximadament 1/3 dels CCR esporàdics presenten CIMP i ocorren majoritàriament en el colon proximal i en individus d'edat avançada, generalment dones. A més, s'ha descrit que aquests tumors tendeixen a ser *V600E BRAF* mutat i *KRAS*, *TP53* no mutat [33]. Existeixen diversos estudis en CCR que descriuen gens susceptibles a presentar CIMP així com *hMLH1* [101, 102, 110], *CDH1*, *CDKN2A/p16*, *TSP1* i *GSTP1* [100, 102, 109, 111].

1.1.4.2.2 Modificació d'histones

L'acetilació i la metilació d'histones són les principals alteracions d'histones estudiades en el CCR. El residu modificat, la localització de la histona i la categoria de l'alteració pronosticaran la supervivència del pacient.

D'una banda, alguns estudis relacionen la família d'histones deacetilases (HDAC) amb el procés carcinogènic del CCR, tot actuant sobre alguns gens supressors de tumors com el gen homeobox tipus caudal-1 (*CDX1*) [74] i la Sirtuina-3 [75]. D'altra banda, es suggereix que la desmetilasa específica Lisina 1 (*LSD1*) pot potenciar la proliferació, la invasió i la metàstasi en models murins de CCR, així com també se l'ha correlacionat positivament amb l'estadiatge i la infiltració nodular en pacients amb CCR [112]. Estudis immunohistoquímics correlacionen els patrons d'expressió de certes marques de metilació d'histones (per exemple, H3K9me2, H3K9me3, H3K27me2) amb característiques clinicopatològiques de pacients amb CCR, com la infiltració nodular i la metàstasi a distància [113-115]. A més, membres de la família de proteïnes del grup Polycomb, com ara Bmi1, s'han trobat elevades en pacients amb CCR i s'han correlacionat amb estadis avançats i carcinomes més agressius [116]. Finalment, a part de la modificació d'histones, la ubiquitinació d'histones també podria ser un mecanisme alternatiu de regulació genètica en el CCR. S'ha descrit que la lligasa d'ubiquitina *H2B* està mutada en tumors de CCR, mentre que la desubiquitinasa *H2B* es troba sobreexpressada i activament relacionada amb la proliferació cel·lular en el CCR [117].

1.1.4.2.3 Remodelació de la cromatina

Els complexos remodeladors de la cromatina orquestran molts processos fisiològics que inclouen la proliferació, autorenovació i diferenciació cel·lular tot mantenint un equilibri en l'activació-repressió de la cromatina [118]. L'alteració d'alguns membres que conformen la maquinària de remodelació de la cromatina s'han relacionat amb el procés tumoral del CCR. D'una banda, el gen *BRG1*, un membre del complex remodelador *SWI/SNF*, s'ha associat a la inducció de la metastàsis en el CCR, tot desregulant l'E-cadherina [119]. Mutacions en altres membres d'aquest complex, *ARID1A* i *SMARCC2*, també són freqüents en pacients amb CCR, especialment amb MSI [78, 120]. A més, estudis recents en models murins han permès identificar membres de la maquinària remodeladora de la cromatina, l'histona acetiltransferasa Tip60 i l'ATPasa p400, capaços d'induir la cascada de Wnt/ β -catenina i promoure la carcinogènesis en el CCR [121].

1.1.4.3 Classificació molecular segons el Consorci de Subtipus de càncer colorectal

Recentment, els anàlisis exhaustius del genoma en pacients amb CCR han demostrat que cada individu presenta un patró de mutacions úniques, cadascun amb una mediana de 76 mutacions no silencioses. En conseqüència, per tal de correlacionar el fenotip de la cèl·lula tumoral amb el comportament clínic i així escollir el tractament de forma racional amb teràpies diana específiques, el consorci de subtipus de CCR ha unificat 6 sistemes de classificació molecular independents del CCR, en un únic sistema anomenat "subtipus molecular consensuat (CMS)" que inclou 4 grups (CMS1-4) amb informació epigenètica, transcriptòmica, microambiental, genètica i clínica dels tumors (Taula 3) [122].

- **CMS1** (*Inestabilitat microsatèl·lit immune*, 14%), casos hipermutats, amb inestabilitat de microsatèl·lits i alta reacció immunològica.
- **CMS2** (*Epitelial canònic*, 37%), neoplasies amb fenotip epitelial, amb activació de les vies de senyalització de *WNT* i *MYC*.
- **CMS3** (*Epitelial metabòlic*, 13%), neoplasies amb fenotip epitelial amb alta desregulació metabòlica.
- **CMS4** (*Mesenquimal*, 23%), neoplasies amb alta activació del TGF- β , amb invasió estromal i angiogènesis.

Taula 3. Subtipus moleculars consensuats del CCR. Adaptat de [122].

	CMS1	CMS2	CMS3	CMS4
Nom alternatiu	<i>Inestabilitat microsatèl·lit immune</i>	<i>Epitelial canònic</i>	<i>Epitelial metabòlic</i>	<i>Mesenquimal</i>
Característiques principals	Hipermutat, MSI i alta activació immune	Epitelial, alta activació WNT i MYC	Epitelial i alta desregulació metabòlica	Alta activació TGFβ, invasió estromal i angiogènesis
Incidència	14%	37%	13%	23%
Alteracions genòmiques	MSI, alt nombre de mutacions	CIN, moderat/baix nombre de mutacions	CIN, moderat nombre de mutacions	CIN, baix nombre de mutacions
Lesions precursors	Pòlips serrats	Adenoma tubular	Adenoma tubular amb característiques serrades	Pòlips serrats
Alteracions epigenètiques	Alta metilació	Baixa metilació	Moderada metilació	Baixa metilació
Alteracions transcriptòmiques	Activació immune, JAK-STAT, Caspases	Activació WNT, MYC, EGFR, VEGF, integrines, TGFβ, IGF i IRS2, HNF4α, HER2 i ciclines	MMR, glutaminòlisis, lipidiogènesis, cicle cel·lular	Activació mesenquimal, sistema de complement, immunosupressió, integrines
Microambient estromal-immunitari	Pocs CAF, molt immunogènic, tendeix a la resposta immunològica adaptativa	Molt pocs CAFs, poc immunogènic, tendeix a la resposta immunològica innata	Pocs CAFs, molt immunogènic, tendeix a la resposta immunològica adaptativa	Molts CAFs, inflamació, tendeix a la resposta immunològica innata, EMT
Mutacions associades	<i>MSH6, RNF43, ATM, TGFB2, BRAF, PTEN</i>	<i>APC, KRAS, TP53, PIK3CA</i>	<i>APC, KRAS, TP53, PIK3CA</i>	<i>APC, KRAS, TP53, PIK3CA</i>
Alteracions clíniques i histopatològiques	Sòlid, trabecular, mucinós	Tubular	Papil·lar	Desmoplàsia prominent, estromal
Edat (anys)	69	66	67	64
Sexe	44% H, 56% D	58% H, 42% D	53% H, 47% D	55% H, 45% D
Localització	Proximal	Distal	Mixta	Distal
Estadi al diagnòstic (%)	I: 12 II: 44 III: 40 IV: 4	I: 13 II: 40 III: 39 IV: 8	I: 17 II: 41 III: 37 IV: 5	I: 8 II: 33 III: 47 IV: 12
Grau (%)	1: 15 2: 40 3: 45	1: 22 2: 73 3: 5	1: 20 2: 68 3: 12	1: 9 2: 72 3: 19

1.1.5 Diagnòstic, estadiatge, pronòstic i tractament

En estadis inicials, els pacients amb CCR no solen presentar símptomes, per tant, el cribatge és molt important per detectar possibles tumors en una etapa precoç. A mesura que avança el càncer, els símptomes s'evidencien amb sagnat rectal, sang a la femta, canvi en els hàbits intestinals, dolors còlics en l'abdomen inferior, disminució de la gana o pèrdua de pes.

1.1.5.1 Diagnòstic

Les revisions mèdiques periòdiques d'acord amb la situació personal, sexe, edat i salut de l'individu són necessàries ja sigui per trobar i extreure els possibles pòlips o be per detectar el càncer abans de presentar simptomatologia i quan el tractament podria ser més exitós [123]. Degut a l'alta incidència del CCR, els programes de cribatge nacionals sembla que són cost-efectius en la població de més de 50 anys, ja que representa el grup d'individus de major risc a desenvolupar un CCR.

La primera prova que es realitza és l'anàlisi de sang oculta en femta (FIT o gFOBT), si es detecta sang s'ha de detectar d'on prové ja que s'ha de tenir en compte que lesions benignes també poden ocasionar sagnats. L'últim congrés de *l'American Gastroenterological Association* va concloure que les rondes consecutives de cribatge basades en el test de sang oculta en femta, utilitzant el mètode immunològic, assoleixen un rendiment diagnòstic similar o superior als estudis endoscòpics [123]. En combinació amb aquest, sovint es duu a terme un examen rectal digital per buscar àrees anormals amb el tacte. Alternativament, existeix el test d'ADN en femta que permet detectar certs marcadors genètics indicadors de càncer. Així com en FIT i gFOBT, un resultat sospitos suggeriria fer una colonoscòpia.

Si els resultats de les proves de detecció suggereixen que hi ha càncer o símptomes sospitosos, es realitzarà un examen físic i analític del pacient. Si l'examen físic i els resultats de les proves sanguínies són normals, es paularan revisions posteriors de seguiment i control preventiu. Si pel contrari els resultats són anòmals, es suggerirà fer una evaluació completa del colon i recte mitjançant la prova diagnòstica per excel·lència: l'endoscòpia (colonoscòpia o sigmoidoscòpia). Freqüentment, el teixit anormal es pot biopsiar i/o extirpar durant la colonoscòpia o sigmoidoscòpia. Aquest teixit és estudiat i valorat per microscòpia en busca de cèl·lules canceroses per un patòleg.

A nivell de diagnòstic d'imatge, es recomana la colonografia per tomografia computada (CTC) que obté imatges 3D del colon, malgrat no permet biopsiar. No s'indica l'ús d'enema de bari de doble contrast (DCEB) degut a la baixa eficiència en comparació a la colonoscòpia i a la CTC. A més, si el resultat histològic confirma el diagnòstic de CCR, s'indica l'ús de la tomografia

computada (TC) de pit, abdomen i pelvis per determinar tant la profunditat de la invasió tumoral com les possibles metàstasis limfàtiques locoregionals. Lamentablement aquests mètodes identifiquen lesions grans i no tenen la possibilitat d'agafar biòpsies pel diagnòstic histològic.

A nivell molecular, es poden estudiar determinats gens en la biòpsia de teixit sospitós de ser tumoral. Els resultats d'aquest tests ajudaran a decidir les opcions de tractament i, fins i tot valorar la teràpia dirigida pel tipus de tumor diagnosticat.

La següent taula recull els principals mètodes de cribatge utilitzats pel CCR.

Taula 4. Principals mètodes de cribatge del CCR.

	Beneficis	Rendiment i complexitat*	Limitacions	Interval de temps de prova
Exàmens visuals				
Colonoscòpia	<ul style="list-style-type: none"> • Examina el colon sencer • Pot fer biòpsia i eliminar pòlips • Pot diagnosticar altres malalties • Requerit per a resultats anormals d'altres proves 	Rendiment: El més alt Complexitat: La més alta	<ul style="list-style-type: none"> • Completa neteja de l'intestí • Pot ser car • La sedació sol ser necessària • Major risc de patir infeccions en comparació amb altres proves 	10 anys
Colonografia tomogràfica computada (CTC)	<ul style="list-style-type: none"> • Examina el colon sencer • Bastant ràpida • Poques complicacions • Sedació no necessària • No invasiva 	Rendiment: Alt (per a pòlips de grans dimensions) Complexitat: Intermitja	<ul style="list-style-type: none"> • Completa neteja de l'intestí • No es poden treure pòlips ni realitzar biòpsies • Exposició a dosis baixa de radiació • La colonoscòpia és necessària si és positiva 	5 anys
Enema de bari de doble contrast (DCBE)	<ul style="list-style-type: none"> • Generalment examina el colon sencer • Poques complicacions • Sedació no necessària 	Rendiment: Alt (per a pòlips de grans dimensions) Complexitat: Alta	<ul style="list-style-type: none"> • Completa neteja de l'intestí • Alguns resultats positius són falsos • No es poden treure pòlips ni realitzar biòpsies • Exposició a dosis baixa de radiació • La colonoscòpia és necessària si es detecten anormalitats • Disponibilitat molt limitada 	5 anys
Sigmoidoscòpia flexible	<ul style="list-style-type: none"> • Bastant ràpida • Poques complicacions • Preparació mínima de l'intestí • No requereix sedació 	Rendiment: Alt per al recte i per la part inferior del colon Complexitat: Intermitja	<ul style="list-style-type: none"> • Neteja parcial de l'intestí • Visibilitat només de la tercera part del colon • No es poden treure pòlips de grans dimensions • Cert risc d'infecció intestinal • Lleugerament més efectiva quan es combina amb proves anuals de FIT/FOBT. • La colonoscòpia és necessària si és positiva • Disponibilitat limitada 	5 anys

Proves en femta				
Immunoquímica fecal (FIT)	<ul style="list-style-type: none"> • Sense neteja intestinal o sedació • Es pot realitzar a casa • Baix cost • No invasiva 	Rendiment: Intermitja per càncer Complexitat: Baixa	<ul style="list-style-type: none"> • Requereix múltiples mostres fecals • Es perden la majoria dels pòlips • Pot donar lloc a falsos positius • Lleugerament més efectiva quan es combina amb una sigmoidoscòpia flexible cada 5 anys • La colonoscòpia és necessària si és positiva 	Anual
Sang oculta en femta basada en guaiac (gFOBT)	<ul style="list-style-type: none"> • Sense neteja intestinal • Es pot realitzar a casa • Baix cost • No invasiva 	Rendiment: Intermitja per càncer Complexitat: Baixa	<ul style="list-style-type: none"> • Requereix múltiples mostres fecals • Es perden la majoria dels pòlips • Pot donar lloc a falsos positius • És necessària una prova preliminar de limitacions dietètiques • Lleugerament més efectiva quan es combina amb una sigmoidoscòpia flexible cada 5 anys • La colonoscòpia és necessària si és positiva 	Anual
Test d'ADN de femta (Cologuard®)	<ul style="list-style-type: none"> • Sense neteja intestinal • Es pot realitzar a casa • Requereix només una sola mostra de femta • No invasiva 	Rendiment: Intermitja per càncer Complexitat: Baixa	<ul style="list-style-type: none"> • Es perden la majoria dels pòlips • Més resultats amb falsos positius que altres proves • Cost superior a gFOBT i FIT • La colonoscòpia és necessària si és positiva 	3 anys, per recomanació del fabricant

* La complexitat implica la preparació del pacient, les molèsties, les instal·lacions i els equips necessaris i la incomoditat del pacient.

El seguiment inclou la colonoscòpia i la TC de pit, abdomen i pelvis a diferents temps depenent del risc de recaiguda del pacient. El ¹⁸FDG PET/TC no es recomana pel diagnòstic inicial però sí que pot ajudar a clarificar el diagnòstic i detectar les metàstasis. Finalment, la ressonància magnètica és el mètode d'elecció per valorar l'eficàcia de la quimioteràpia en els casos de CCR amb recaiguda hepàtica.

1.1.5.2 Estadiatge

Si els resultats de la biòpsia mostren que el pacient presenta CCR, serà necessari conèixer l'estadi de la malaltia per determinar el millor tractament. Des de la classificació de Dukes durant la primera meitat del segle XX [124], el sistema de classificació dels tumors colorectals ha tingut com a referència l'extensió anatòmica dels mateixos, descrivint-se en l'actualitat mitjançant tres paràmetres: T, N i M. En primer lloc, el paràmetre "T" descriu el grau

d'infiltració tumoral en la paret de l'intestí gros; en segon lloc, el paràmetre "N" indica el compromís dels ganglis limfàtics, i, finalment, el paràmetre "M" valora la presència de metàstasis a distància [121].

Els paràmetres "T", "N" o "M" complementen la seva informació mitjançant números. Els números més alts indiquen estadis més avançats. Després de la cirurgia i un cop determinades les categories T, N i M del pacient, es combina aquesta informació mitjançant un procés anomenat agrupació per estadis per tal d'assignar un estadi general. Així doncs, els tumors en estadis inicials se'ls assigna el número 0 (carcinoma *in situ*) i aquest es va incrementant d' 1 (I) a 4 (IV) en funció del grau de desenvolupament tumoral. Alguns estadis tenen associada una lletra "a", "b" o "c" que detalla un subestadi. Per tant, com més baix és el número, menys s'ha disseminat el tumor; i dins d'un estadi, una lletra menor correspon a un estadi menys avançat. (Taula 5, Figura 16).

Aquest sistema és un dels més utilitzats per l'estadificació del CCR i és acceptat i revisat periòdicament per l'*American Joint Committee on Cancer* (AJCC) i la *International Union Against Cancer* (UICC) [125].

Taula 5. Sistema de classificació clínica del TNM (8a edició) en el CCR proposat per *American Joint Cancer Committee* (AJCC) i *Union for International Cancer Control* (UICC). Adaptat de [125].

Categoria T (Tumor primari)	
T0	No hi ha evidència de tumor primari.
Tx	No es pot valorar la infiltració del tumor per falta d'informació.
Tis	El càncer es troba en la seva etapa inicial (Carcinoma <i>in situ</i>). El tumor es localitza a la capa muscular prima i interna de la mucosa.
T1	El tumor ha crescut a través de la capa muscular de la mucosa i s'extén fins la submucosa.
T2	El tumor ha crescut a través de la submucosa i s'extén fins la capa muscular pròpia.
T3	El tumor ha crescut a través de la capa muscular pròpia i s'extén cap a les capes més externes del colon i/o recte, però no a través d'elles.
T4a	El tumor ha crescut i s'ha infiltrat a través de la serosa.
T4b	El tumor ha crescut a través de la paret del colon i/o recte i invaeix els teixits o òrgans adjacents.
Categoria N (Ganglis limfàtics adjacents)	
N0	No hi ha evidència de ganglis limfàtics adjacents afectats.
Nx	No es pot valorar el nombre de ganglis afectats per falta d'informació.
N1	No es troben cèl·lules cancerígenes dins o prop d'1-3 ganglis limfàtics adjacents.
N1a	Es troben cèl·lules cancerígenes en 1 gangli limfàtic adjacent.
N1b	Es troben cèl·lules cancerígenes en 2-3 ganglis limfàtics adjacents.

N1c	Es troben petits dipòsits de cèl·lules cancerígenes (tumors satèl·lits) en la subserosa propera als ganglis limfàtics, però no als ganglis limfàtics en sí.
N2	Es troben cèl·lules cancerígenes en 4 o més ganglis limfàtics adjacents.
N2a	Es troben cèl·lules cancerígenes en 4-6 ganglis limfàtics adjacents.
N2b	Es troben cèl·lules cancerígenes en 7 o més ganglis limfàtics adjacents.
Categoria M (Metàstasi a distància)	
M0	No hi ha propagació distant.
MX	No es pot valorar l'existència de metàstasi en òrgans per falta d'informació.
M1a	El càncer s'ha propagat a un òrgan distant o a un grup de ganglis limfàtics distant.
M1b	El càncer s'ha propagat a més d'un òrgan distant o a un grup de ganglis limfàtics distants, o s'ha propagat a parts distants del peritoneu.
M1c	El càncer s'ha propagat al peritoneu amb/sense invasió d'òrgans.

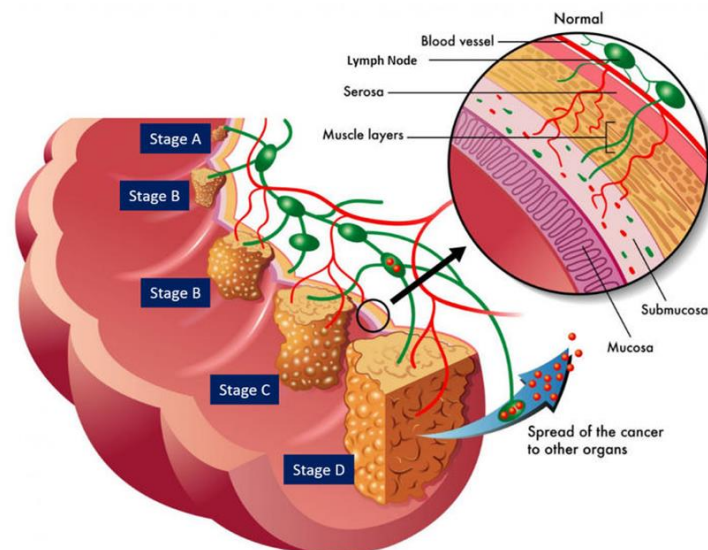


Figura 16. Progressió del CCR en els diferents estadis. Adaptat de [126].

El sistema TNM utilitza l'estadiatge patològic, i no l'estadiatge clínic, el qual només té en compte les proves realitzades abans de la cirurgia. L'estadiatge patològic es considera més precís per englobar la informació procedent del reconeixement mèdic, la biòpsia, els estudis per imatge i els resultats de la cirurgia. La combinació dels tres paràmetres que conformen el sistema TNM proporciona la base per prendre decisions terapèutiques (Taula 6) [125].

Taula 6. Sistema de classificació patològica del TNM en el CCR. Adaptat de [125].

Estadi anatómic	Grup pronòstic	Descripció de l'etapa
0	Tis, N0, M0	El tumor es troba en la seva etapa inicial (Carcinoma <i>in situ</i> o intramucós (Tis)). No ha atravesat la capa interna (mucosa) del colon o recte.
I	T1 o T2, N0, M0	El tumor ha atravesat la capa muscular de la mucosa fins la submucosa (T1), i també pot haver crescut fins la muscular pròpia (T2). El tumor no s'ha propagat als ganglis limfàtics adjacents (N0) ni s'ha propagat a regions distants (M0).
IIA	T3, N0, M0	El tumor ha invaït les capes més externes del colon o recte, però no les ha atravesat (T3). No s'ha propagat a òrgans adjacents, a ganglis limfàtics propers (N0) ni a regions distants (M0).
IIB	T4a, N0, M0	El tumor ha crescut a través de la paret del colon o recte, però no invaït altres teixits o òrgans adjacents (T4a). El tumor encara no s'ha propagat als ganglis limfàtics propers (N0) ni a regions distants (M0).
IIC	T4b, N0, M0	El tumor ha atravesat la paret del colon o recte i creix cap a teixits o òrgans adjacents (T4b). El tumor encara no s'ha propagat als ganglis limfàtics propers (N0) ni a regions distants (M0).
IIIA	T1 o T2, N1, M0	El tumor ha atravesat la mucosa fins la submucosa (T1) i també és possible que hagi crescut fins la capa muscular pròpia (T2). S'ha propagat a 1-3 ganglis limfàtics propers (N1a/N1b) o fins àrees de greix properes als ganglis limfàtics, però no ha assolit els ganglis pròpiament (N1c). No s'ha propagat a regions distants (M0).
	T1, N2a, M0	El tumor ha atravesat la mucosa fins la submucosa (T1). S'ha propagat a 4-6 ganglis limfàtics propers (N2a). No s'ha propagat a regions distants (M0).
IIIB	T3 o T4a, N1, M0	El tumor ha crescut fins les capes més externes del colon o recte (T3), o a través del peritoneu visceral (T4a), però no ha afectat als òrgans adjacents. Ha invaït 1-3 ganglis limfàtics propers (N1a o N1b) o fins àrees de greix properes als ganglis limfàtics, però no ha assolit els ganglis pròpiament (N1c). No s'ha propagat a regions distants (M0).
	T2 o T3, N2a, M0	El tumor ha crescut fins la muscular pròpia (T2) o fins les capes més externes del colon o recte (T3). S'ha propagat a 4-6 ganglis limfàtics propers (N2a). No s'ha propagat a regions distants (M0).
	T1 o T2, N2b, M0	El tumor ha crescut a través de la mucosa fins la submucosa (T1) i també és possible que hagi crescut fins la capa muscular pròpia (T2). S'ha propagat a 7 o més ganglis limfàtics propers (N2b). No s'ha propagat a regions distants (M0).
IIIC	T4a, N2a, M0	El tumor ha crescut a través de la paret del colon o recte (inclòs el peritoneu visceral), però no ha afectat als òrgans adjacents (T4a). S'ha propagat a 4-6 ganglis limfàtics propers (N2a). No s'ha propagat a regions distants (M0).

	T3 o T4a, N2b, M0	El tumor ha crescut fins les capes més externes del colon o recte (T3), o a través del peritoneu visceral (T4a), però no ha afectat als òrgans adjacents. S'ha propagat a 7 o més ganglis limfàtics propers (N2b). No s'ha propagat a regions distants (M0).
	T4b, N1 o N2, M0	El tumor ha crescut a través de la paret del colon o recte i s'ha unit o creix cap a altres teixits o òrgans adjacents (T4b). S'ha propagat com a mínim a 1 gangli limfàtic proper o fins a àrees de greix properes als ganglis (N1 o N2). No s'ha propagat a regions distants (M0).
IVA	Qualsevol T, qualsevol N, M1a	El tumor pot o no haver crescut a través de la paret del colon o recte (Qualsevol T). Pot o no haver-se propagat als ganglis limfàtics adjacents (qualsevol N). S'ha propagat a 1 òrgan distant (així com el fetge o pulmó) o a 1 grup distant de ganglis limfàtics (M1a).
IVB	Qualsevol T, qualsevol N, M1b	El tumor pot o no haver crescut a través de la paret del colon o recte. Pot o no haver-se propagat als ganglis limfàtics adjacents. S'ha propagat a més d'1 òrgan distant (així com el fetge o pulmó) o a 1 grup de ganglis limfàtics distants, o s'ha propagat a regions distants del peritoneu (M1b).
IVC	Qualsevol T, qualsevol N, M1c	El tumor pot o no haver crescut a través de la paret del colon o recte. Pot o no haver-se propagat als ganglis limfàtics adjacents. S'ha propagat a més d'1 òrgan distant (així com el fetge o pulmó) o a 1 grup de ganglis limfàtics distants, i s'ha propagat a regions distants del peritoneu (M1c).

1.1.5.3 Pronòstic

El pronòstic o perspectiva de supervivència dels pacients amb CCR es correlaciona amb l'estadi evolutiu del tumor en el moment del diagnòstic. Les taxes de supervivència normalment es basen en els resultats prèvis d'un gran nombre de persones que patiren la malaltia. Per tant, aquestes taxes només són estimacions que no poden predir el que succeirà en cada cas particular d'un individu.

El pronòstic de cada individu varia segons l'estadi del tumor (classificació TNM), les característiques histopatològiques del tumor, l'edat, els hàbits saludables, el rendiment del càncer, el tractament, etc. Per tant, és important conèixer el tipus i l'estadi del càncer d'un individu per estimar el seu pronòstic (Figura 17).

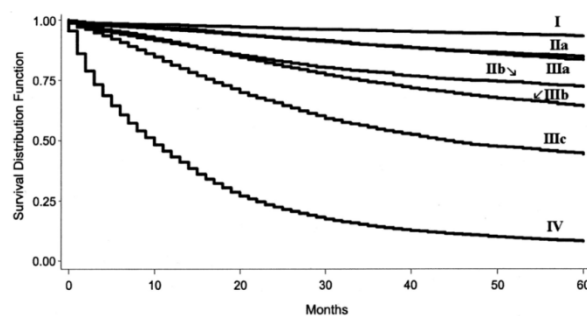


Figura 17. Comparació de la supervivència actual en funció de l'estadi tumoral [127].

Els percentatges presentats provenen de la última edició del manual d'estadificació de l'AJCC publicat al 2017 (Taula 7). Aquestes xifres es basen en un estudi del centre de dades del *National Cancer Institute SEER*, que tracta de persones diagnosticades de càncer de colon entre el 2004 i 2010 [6].

Taula 7. Supervivència als 5 anys després del diagnòstic de CCR, en funció de l'estadiatge. Adaptat de [6].

Estadi	T	N	M	Supervivència als 5 anys
0	Tis	N0	M0	> 95%
I	T1/T2	N0	M0	92%
IIA	T3	N0	M0	87%
IIB	T4a	N0	M0	63%
IIIA	T1/T2	N1/N2a	M0	89%
IIIB	T1 - T4a	N1 - N2b	M0	69%
IIIC	T3 - T4b	N1 - N2b	M0	53%
IV	T1 - T4b	N0 - N2b	M1	11%

Aquestes estadístiques es basen en una versió anterior del sistema TNM. En aquesta versió antiga no es considerava l'estadi IIC sinó que aquests eren considerats estadis IIB. A més, alguns tumors que actualment es consideren IIIC anteriorment es classificaven com a IIIB, mentre que altres que ara es consideren IIIB anteriorment es classificaven com a IIIC. Pel que fa als actuals estadis IVA i IVB, anteriorment ambdós subestadis eren considerats estadi IV.

Quan el tractament es realitza a una edat jove, molts pacients sobreviuen al menys 5 anys després del diagnòstic (aquest fet s'anomena supervivència als 5 anys). En molts casos, el CC és una malaltia curable quan es detecta a temps. Si el CC no reapareix als 5 anys després del diagnòstic, es considera curat. Els CC en estadis I, II i III són considerats potencialment curables. En canvi, generalment el CC en estadi IV no es considera curable, malgrat existeixen algunes excepcions.

1.1.5.4 Tractament

El pla de tractament és determinat per un equip multidisciplinari que inclou gastroenteròlegs, cirurgians gastrointestinals, oncòlegs, radiòlegs i patòlegs.

La cirurgia és el tractament d'elecció si el tumor primari encara està localitzat. L'extirpació quirúrgica pot ser curativa. La cirurgia ha d'extirpar el tumor amb amplis marges i almenys dotze ganglis limfàtics han de quedar disponibles per l'evaluació patològica.

Els pacients en estadi 0 (Tis, N0, M0) o I (T1-2, N0, M0) generalment presenten càncers que són part d'un pòlip. Generalment s'extirpa el pòlip localitzat (polipectomia) durant la colonoscòpia o es practica una cirurgia local, però no reben cap tractament addicional degut al seu baix percentatge de recaiguda i al reduït benefici que els suposa la neoadjuvència [125].

A partir de l'estadi IIA-C (qualsevol T, N1-2, M0) el càncer ja ha crescut a través de la paret del colon (Figura 16), però encara no ha compromès als ganglis limfàtics. Generalment, la cirurgia aïllada és el tractament més comú, tot i que pot recomenar-se fer tractament adjuvant (Figura 19). Aquest tractament s'administra després de l'extirpació del tumor primari, per així aconseguir reduir al màxim la possibilitat de recaiguda. El tractament adjuvant es recomana sobretot en pacients d'estadi II i III amb ganglis limfàtics positius (N1-2), que presenten alt risc de recaiguda i no tenen contraindicacions post-cirurgia (Figura 19). El tractament adjuvant estàndard des de la dècada del 1990 és la quimioteràpia basada únicament en fluoropirimidines, ja sigui per via intravenosa (5-Fluorouracil, 5-FU) o oral (Capecitabina), ja que s'ha demostrat que redueix el risc de recaiguda i millora la supervivència [72]. Segons les indicacions del *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) es considera combinar el tractament adjuvant estàndard, 5-FU/Capecitabina, amb o sense Oxaliplatí i/o Leucovorí en els pacients d'estadi II amb alt risc de recaiguda. Aquesta recomanació es basa en un important assaig clínic multicèntric (MOSAIC) que mostra un increment absolut del 7% en la supervivència lliure de malaltia als 5 anys després del règim amb Oxaliplatí (Figura 18) [72]. Estudis recents suggereixen que aquesta millora només s'esdevé en pacients menors de 70 anys [128, 129].

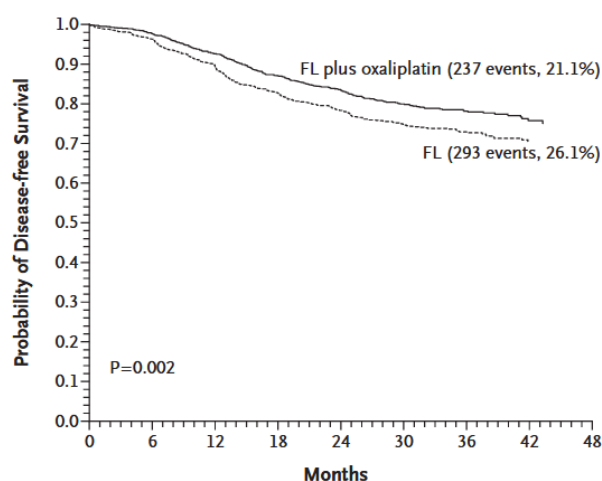


Figura 18. Estimació de la supervivència lliure de malaltia en pacients d'estadi II i III tractats amb 5-FU i Leucovorí (FL) +/- Oxaliplatí en l'assaig clínic MOSAIC [129].

Existeixen altres combinacions de fàrmacs possibles malgrat no existeixen evidències científiques que indiquin una millora en la supervivència [125]. De forma interessant, no tots els agents quimioterapèutics testats com a beneficiosos en pacients metastàsics, per exemple l'Irinotecan, són bons pel tractament adjuvant [74, 75]. De fet, estudis recents no descriuen cap efecte beneficiós al combinar fàrmacs diana amb la quimioteràpia estàndard en pacients d'estadi III. L'origen d'aquests estudis va sorgir de la millora en la supervivència que mostrà la combinació de Cetuximab (en pacients amb l'exó 2 de *KRAS* no mutat) o Bevacizumab amb la quimioteràpia estàndard en pacients de CC d'estadi avançat. No obstant, estudis posteriors en aquesta mateixa línia han descrit resultats poc efectius [81, 83, 130].

El tractament estàndard en pacients d'estadi III és la cirurgia acompanyada de quimioteràpia. Els règims de quimioteràpia proposats són FOLFOX (5-FU, Leucovorí i Oxaliplatí) o XELOX (Capecitabina i Oxaliplatí). Aquells pacients d'estadi III amb una salut compromesa per sotmetre's a la cirurgia sovint es tracten amb quimioteràpia aïllada i/o en combinació amb la radiació (Figura 19) [125]. La duració òptima de la quimioteràpia adjuvant és de 3 (per exemple, en estadi N1) a 6 mesos, en funció del risc de recaiguda del pacient.

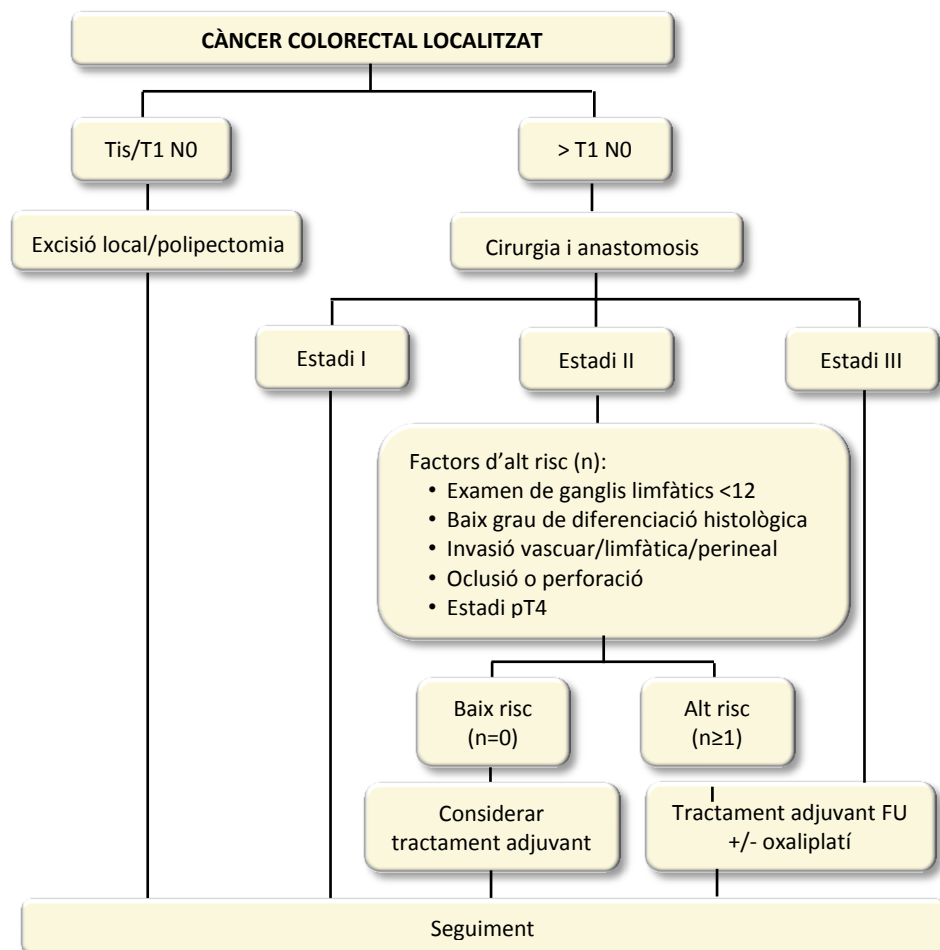


Figura 19. Algoritme de tractament pel CCR localitzat. FU, Fluorouracil; N, node; T, tumor; Tis, carcinoma *in situ*.

1.1.5.4.1 Marcadors pronòstic i predictius pel tractament adjuvant

Existeixen pocs marcadors pronòstic validats que siguin potencialment útils per guiar la decisió terapèutica a l'hora d'escollir el tractament adjuvant més òptim en pacients d'estadis II amb alt risc de recaure i després de sotmetre's a cirurgia. A continuació es proposen alguns dels marcadors recentment suggerits com a potencialment útils per a la individualització del tractament adjuvant en el CC.

Característiques patològiques

Diverses organitzacions capdavanteres com la Societat Americana d'Oncologia Clínica (ASCO) i la Societat Europea d'Oncologia Mèdica (ESMO) han identificat un conjunt de característiques clíniques d'alt risc que recolzen la quimioteràpia convencional combinada amb Oxaliplatí en pacients d'estadi II d'alt risc. Algunes d'aquestes característiques són les següents: tumors primaris pT4 [80, 92-94], perforació i/o obstrucció [121], invasió perineural i limfovascular [95, 97, 98] i menys de 12 ganglis limfàtics extirpats durant la cirurgia [72].

ctADN

Recentment s'ha proposat l'estudi de l'ADN circulant tumoral com a biomarcador pronòstic de recaiguda en pacients de CC. El ctADN permet detectar la malaltia mínima residual després de la cirurgia, fet que el fa potencialment útil per estratificar el risc de recaiguda en els pacients d'estadi II. En aquesta mateixa línia, un estudi de Tie i col·laboradors descriu que la majoria de pacients (79%) que patia recaiguda després de la cirurgia se'ls detectava ctADN tumoral [131]. No obstant, malgrat pronosticar la recaiguda, el ctADN no permet determinar el tipus de tractament adjuvant més adequat per a cada pacient d'estadi II.

Immunoscore

L'equip de Pagès i col·laboradors va publicar al 2009 que els pacients d'estadi I o II amb alta densitat de cèl·lules CD45RO⁺ i CD8⁺ en la regió del tumor presentaven millor pronòstic que aquells pacients amb baixa densitat de tals cèl·lules immunitàries, suggerint que l'immunoscore és un factor pronòstic independent de les característiques clínicopatològiques d'alt risc en estadis inicials de CCR [123]. Recentment, el grup de Galon ha validat l'esmentat immunoscore en pacients d'estadi I, II i III de CCR en un estudi multicèntric que inclou 1.336 pacients i, de forma interessant, descriu la capacitat d'identificar el subgrup de pacients d'estadi II d'alt risc, almenys en la cohort de pacients estudiada [124].

Defectes en el mecanisme de reparació d'errors de l'ADN i presència de MSI

L'estat del mecanisme de reparació d'errors de l'ADN és un factor pronòstic validat en els pacients de CC, especialment en estadis inicials. Els pacients d'estadi II amb MSI presenten

menor risc de recaiguda i millor pronòstic quan no se'ls administra tractament adjuvant [100, 132]. De fet, Sinicrope i col·laboradors descriu que el tractament adjuvant basat en 5-FU en pacients d'estadi II amb MSI no redueix l'aparició de metàstasis a distància [103]. No obstant, l'efecte pronòstic de l'estat del MMR, i la conseqüent aparició de MSI, en els pacients d'estadi III és menys robust [101, 102, 132], ja que aquests es beneficien de la quimioteràpia adjuvant amb 5-FU o Oxaliplatí, independentment de presentar o no MSI [101, 103, 104]. En conseqüència, en els pacients d'estadi III, l'estat del MMR no serà d'utilitat per prendre decisions terapèutiques.

Alguns estudis preclínic i clínic han descrit que els tumors amb MSI són més sensibles al ser tractats amb Irinotecan [105] o bé al combinar Bevacizumab amb el tractament adjuvant estàndard. No obstant, els subseqüents estudis retrospectius d'aquesta interacció mostren resultats conflictius [106-108, 133], suggerint que el valor pronòstic de MSI encara requereix ser validat en futurs estudis.

Expressió de *CDX2*

L'expressió del factor de transcripció *CDX2* s'ha descrit com un potencial biomarcador pronòstic ja que no només valora la probabilitat de recaure sinó que també pronostica el benefici del tractament adjuvant en pacients d'alt risc [120]. Recentment, l'estudi realitzat per Dalerba i col·laboradors associa la manca d'expressió de *CDX2* amb pitjor pronòstic en el subgrup de pacients d'estadi II amb alt risc de recaiguda, els quals es podrien beneficiar de la quimioteràpia adjuvant [79].

Mutacions de *BRAF*

La mutació *BRAF*^{V600E} ha estat validada com un factor pronòstic independent en estadis inicials de CC [101, 102, 109-111, 134, 135]. El risc addicional que representa la mutació *BRAF*^{V600E} ha de ser considerat en el context de l'estat del MMR (presència/absència de MSI) i la localització del tumor. Tant és així que els tumors amb mutació *BRAF*^{V600E} associats a pitjor pronòstic són microsatèl·lit-estable (absència de MSI) i estan situats al colon esquerre [102, 134]. L'estudi de Popovici i col·laboradors suggereix que aquest tipus tumoral augmenta 6 vegades el risc de mort en estadis inicials de CC [134]. Malgrat la mutació *BRAF*^{V600E} per si sola sembla ser la principal responsable del valor pronòstic en aquest subgrup de pacients, alguns estudis postulen que la presència de MSI confereix un efecte protector [101, 109], de manera que els tumors amb mutació *BRAF*^{V600E} i MSI s'associen a millor pronòstic en pacients d'estadis inicials [134].

Mutacions de KRAS

La mutació *KRAS* (en pacients sense mutació *BRAF*^{V600E}) s'associa a mal pronòstic. Cal destacar que la majoria d'estudis de *KRAS* s'han realitzat en pacients d'estadi III de CC de manera que l'impacte pronòstic de *KRAS* en estadis II encara és desconegut [100]. De forma interessant, la presència de mutacions en l'exó 2 de *KRAS* (codó 12 o 13, analitzat de forma estàndard) no mostra diferències a nivell de pronòstic al combinar Cetuximab amb la quimioteràpia estàndard [111]. A més, un estudi realitzat per Sinicope i col·laboradors descriu que l'addició de l'anticòs anti-*EGFR* al tractament adjuvant estàndard es va associar a pitjor pronòstic en pacients d'estadi III sense mutació en *KRAS* [78]. En conseqüència, recentment s'ha descrit que, a més del protocol recomanat de forma estàndard que és l'anàlisi de l'exó 2 de *KRAS* (codons 12 i 13), abans de pautar un tractament basat en l'anticòs monoclonal anti-*EGFR*, els pacients d'estadi III haurien de sotmetre's a un anàlisi ampliat del gen *RAS* [78] amb l'objectiu d'examinar addicionalment les següents mutacions:

- *KRAS* exó 3 (codons 59 i 61) i 4 (codons 117 i 146).
- *NRAS* exó 2 (codons 12 i 13), 3 (codons 59 i 61), i 4 (codons 117 i 146).

Aquest fet es deu a que estudis clínics recents en fase II i III en pacients amb mutació de *RAS* en els exons 2, 3 i 4 no es poden beneficiar de la teràpia amb anti-*EGFR*. Malgrat les mutacions en *NRAS* són molt poc freqüents en els pacients metastàsics de CC (aproximadament 2%) només existeixen dos estudis que recolzen ampliar els tests mutacionals del gen *RAS* en aquest grup de pacients [112, 113]. En conseqüència aquest tipus de tractament només es podria considerar en pacients que presentin tumors sense mutació ni en *KRAS* ni *NRAS* en exó 2 (codons 12 i 13), 3 (codons 59 i 61), i 4 (codons 117 i 146) [78]. No obstant, cal tenir en compte que a més de l'anàlisi de l'estat mutacional de *RAS*, és necessari estudiar altres biomarcadors per pautar el tractament més adequat en aquest grup de pacients, ja que l'eficàcia de la teràpia monoclonal anti-*EGFR* és baixa tot i que *RAS* no estigui mutat [78].

Mutacions de PIK3CA

La mutació *PIK3CA* s'associa a bon pronòstic combinada amb l'ús periòdic d'aspirina a baixes dosis [115, 136]. No existeixen estudis preclínic que expliquin aquest fet de manera que calen investigacions futures i validacions prospectives que suportin aquesta associació.

Algunes circumstàncies han de ser tractades amb especial consideració. Aquest és el cas de la població anciana i el moment d'inici de la quimioteràpia adjuvant. En primer lloc, els pacients majors de 75 anys en estadi III sembla que es beneficien de la quimioteràpia adjuvant basada en fluoropirimidines [114, 116]; mentre que aquells en estadi II amb alt risc de recaiguda

encara no està ben definit, així com passa amb la resta de pacients més joves en aquest estadi tumoral. S'ha descrit que la població anciana no es beneficia de l'addició d'Oxaliplatí a la quimioteràpia estàndard, de fet cal tenir molt present la tolerància dels efectes adversos en aquest grup de pacients, ja que per exemple l'Oxaliplatí pot generar neurotoxicitat de forma prolongada i inhabilitant [117, 118]. En segon lloc, múltiples evidències suggereixen que el moment d'inici de la teràpia adjuvant és un factor pronòstic important [119, 137]. Generalment, el tractament s'inicia 6-8 setmanes després de la cirurgia, ja que de forma rutinària es considera que aquest s'ha de començar tant aviat com sigui possible. No obstant, s'ha descrit que el major benefici s'assoleix quan el tractament es comença al voltant de les 8 setmanes post-cirurgia [137].

Desafortunadament, malgrat la majoria de biomarcadors identificats actualment poden determinar el pronòstic en pacients d'estadi II d'alt risc, encara cap d'ells pot predir de forma acurada el tractament adjuvant més adequat ni tampoc el grau de benefici que aquest podria representar.

A continuació es proposa un resum dels tractaments adjuvants més freqüents per pacients d'estadi II d'alt risc, estadi III i/o estadi IV (Taula 8) [125]. Cal destacar que els pacients d'estadi IV amb disseminació metastàtica no acostumen a rebre cirurgia sinó que generalment el tractament d'elecció és la quimioteràpia i/o tractaments diana per intentar controlar el càncer.

Taula 8. Alguns dels protocols quimioterapèutics més freqüents. Adaptat de [125].

Tractament	Combinació	Nom comercial
FOLFOX	Leucovorí + 5-FU + Oxaliplatí	Eloxatín
FOLFIRI	Leucovorí + 5-FU + Irinotecan	Camptosar
CAPOX/XELOX	Capecitabin (Xeloda) + Oxaliplatí	
Diana de VEGF	FOLFOX/FOLFIRI o CapeOx + Bevacizumab	Avastin
	FOLFOX/FOLFIRI o CapeOx + Ziv-aflibercept	Zaltrap
	FOLFOX/FOLFIRI o CapeOx + Ramucirumab	Cyramza
Diana de EGFR	FOLFOX/FOLFIRI o CapeOx + Cetuximab	Erbix
	FOLFOX/FOLFIRI o CapeOx + Panitumumab	Vectibix
Altres combinacions	5-FU + Leucovorí +/- fàrmac diana	
	Capecitabina +/- fàrmac diana	
	Irinotecan +/- fàrmac diana	
	Cetuximab	
	Panitumumab	
	Regorafenib	Stivarga
	Trifluridina + Tipiracil	Lonsurf

L'elecció del tractament més adequat depèn de diversos factors, incloent els tractaments anteriors, l'estat global de salut i l'estadi patològic en sistema TNM. Si un d'aquests tractaments no és efectiu, cal provar-ne un altre. Finalment, pels càncers avançats, la radiació pot ajudar a prevenir o alleugerir alguns símptomes com el dolor [125].

1.2 Biòpsia líquida

Actualment, el perfil molecular dels càncers es realitza a partir d'ADN i/o ARN obtingut a partir de la biòpsia del teixit tumoral, fet que determina l'estratègia terapèutica a seguir. No obstant, és ben conegut que el perfil molecular dels tumors evoluciona ràpida i dinàmicament al llarg del temps en resposta a estímuls endògens i exògens exclusius de cada individu, fet que es coneix com a "heterogeneïtat tumoral". Es suggereix que algunes de les cèl·lules que formen el tumor, probablement aquelles que presentin característiques més malignes, seran capaces de separar-se de la massa tumoral i entrar a la circulació sanguínia: són les anomenades cèl·lules tumorals circulants (CTCs). Alhora, el tumor també allibera altres tipus moleculars, així com ADN (ctADN) i/o ARN tumoral circulant (ctARN, majoritàriament miRNAs), proteïnes i vesícules (freqüentment de tipus exosomal) (Figura 20) [138].

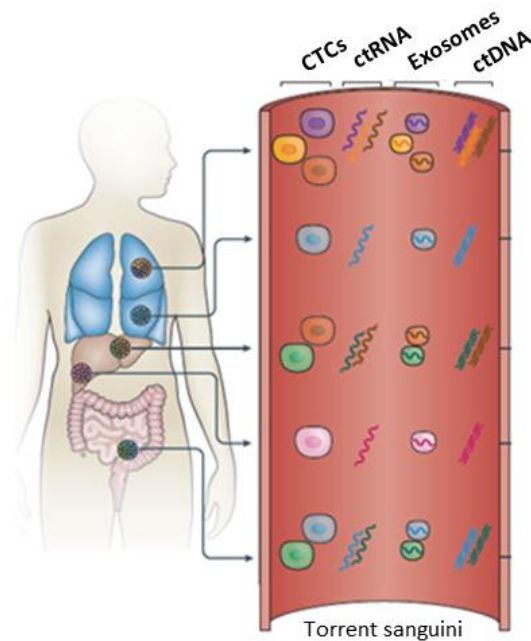


Figura 20. La biòpsia líquida captura la heterogeneïtat molecular característica del càncer. Els principals components derivats del tumor en sang inclouen ctADN i/o ctARN, exosomes i CTCs. Adaptat de [138].

Recentment s'ha descrit la possibilitat d'estudiar la diversitat molecular dels tumors sòlids mitjançant l'anàlisi sanguini del pacient, l'anomenada "biòpsia líquida". Aquest fet podria ser de gran utilitat per guiar el tractament del pacient, evitar la resistència als fàrmacs i valorar la malaltia mínima residual. Així doncs, el perfil molecular del tumor podria complementar-se amb la informació obtinguda d'algunes de les molècules que allibera el tumor primari, en el cas d'aquesta tesi es proposa l'estudi dels miRNAs lliures en sang o del contingut exosomal de miRNAs i proteïnes.

1.2.1 La vascularització del colon com un model apte per l'estudi de la biòpsia líquida

El colon o intestí gruixut té una longitud aproximada de 1.5 metres i s'extén al voltant de l'intestí prim. D'una banda, a nivell d'anatomia descriptiva, el colon es divideix en cec, apèndix cecal, colon ascendent, colon transvers, colon descendent, sigma i recte. D'altra banda, a nivell d'anatomia quirúrgica, el colon es divideix en colon dret (des de l'angle ileocecal fins que el colon transvers creua la segona porció del duodè), colon esquerre (des de la segona porció del duodè fins la cresta ilíaca), sigma (des de la cresta ilíaca fins a la tercera vèrtebra del sacre) i recte (des de la tercera vèrtebra sacre fins l'anell anorectal) [68].

La vascularització arterial i el drenatge venós del colon s'esdevé principalment per les arteries i venes mesentèriques (VM). En el cas que ens ocupa, interessa investigar el drenatge venós ja que l'estudi del circuit que segueix la sang que surt del colon permetrà determinar les seves subsegüents àrees de drenatge.

La vena mesentèrica superior (VMS) transcorre per la dreta de seva artèria homònima i resulta de la confluència de les venes següents: per la banda dreta, la vena còlica mitja, la vena còlica dreta, la vena ileocòlica i les venes cecals; i per la banda esquerre, les venes jejunal i ileals. (Figura 21) [68].

La vena mesentèrica inferior (VMI) transcorre per l'esquerre de la seva artèria homònima i neix caudal a la vena mesentèrica superior. Aquesta resulta de la confluència de les venes següents: la vena còlica esquerre, les venes sigmoidees i la vena rectal superior.

La vena mesentèrica inferior s'anastomosa amb la vena esplènica formant el tronc esplenomesentèric. La unió del tronc esplenomesentèric i la vena mesentèrica superior formen la vena porta (VP), la qual finalitza al fetge (Figura 21) [68].

Aquesta distribució venosa dóna lloc a diferents àrees de drenatge. D'una banda, les àrees de drenatge de la vena mesentèrica superior són les següents: per la banda dreta, el cec, el colon ascendent i la meitat dreta del colon transvers; i per la banda esquerre, el jejú i l'ili. D'altra banda, les àrees de drenatge de la vena mesentèrica inferior són les següents: la meitat esquerre del colon transvers, el colon descendent, el sigma i la part superior del recte.

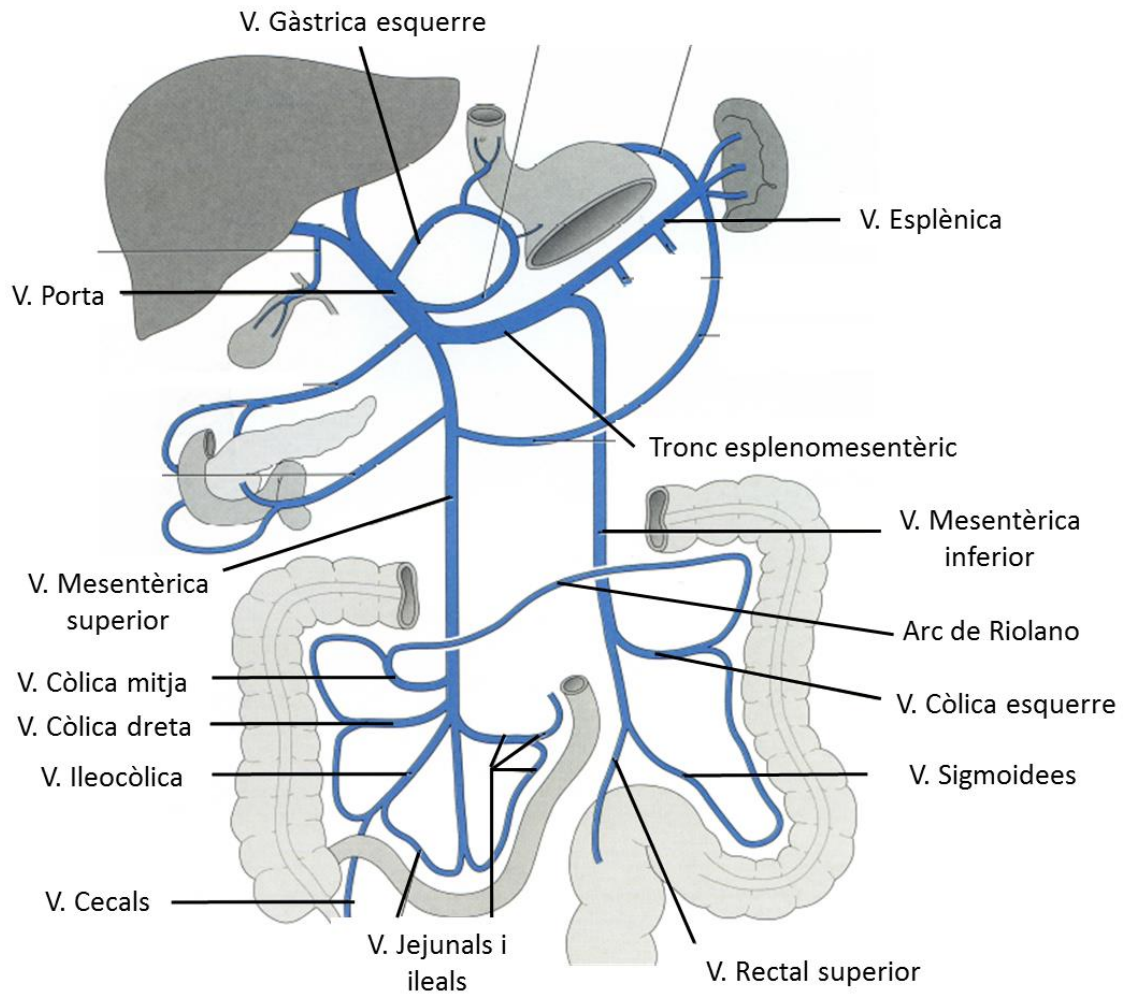


Figura 21. Drenatge venós del colon. Adaptat de [68].

L'anatomia vascular del colon permet fer d'aquest un bon model d'estudi de biomarcadors associats a la metàstasi hepàtica abans de que aquests arribin a l'òrgan diana, generalment el fetge. El coneixement de les àrees de drenatge venós del colon ens permet saber que si un tumor està localitzat en el colon dret, els possibles factors alliberats pel tumor circularan per la vena mesentèrica superior, mentre que si el tumor està localitzat en el colon esquerre aquests circularan per la vena mesentèrica inferior. El fet de que aquestes grans venes drenin a la vena porta, justifica que la major part de les metàstasis dels tumor de colon siguin hepàtiques, tot i que cal tenir en compte que l'existència de variacions anatòmiques podrien explicar l'aparició de metàstasis en altres òrgans (Figura 22).

Finalment, els tumors de recte drenen generalment a través de les venes ilíaqües i aquestes a la vena cava inferior; per això, són més freqüents les metàstasis pulmonars [139, 140].

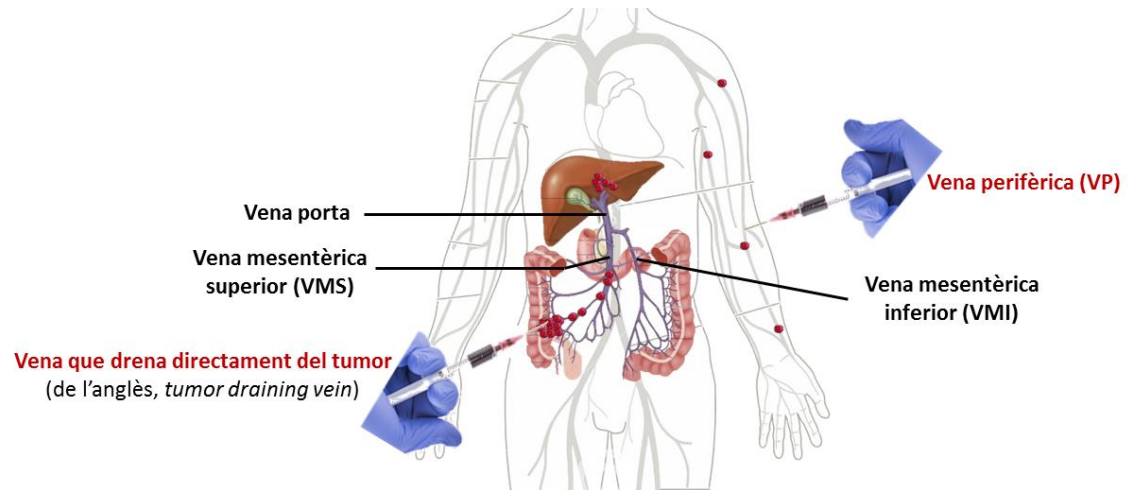


Figura 22. Ruta anatòmica de cèl·lules tumorals i les molècules derivades d'aquestes alliberades pel tumor primari de colon. El retorn venós del colon s'esdevé a través de les VM. Ambdues VM conflueixen a la vena porta, la qual porta la sang del fetge i d'aquí drena a la vena cava inferior i, finalment, arriba a les venes perifèriques (VP). Aquesta distribució anatòmica podria explicar l'alta freqüència de metàstasis hepàtiques associades als tumors primaris localitzats al colon.

1.2.2 Sang perifèrica i sang procedent del tumor

La metastàsis és un procés format per diferents etapes que resulta amb la disseminació de les cèl·lules malignes del tumor primari. Quan les cèl·lules tumorals derivades del tumor primari comencen a invair, procés conegut com a intravassació, les molècules resultats alliberades pel tumor (ctADN, ctARNs, CTCs, exosomes, etc) viatgen a través del torrent sanguini o del sistema limfàtic cap a l'òrgan diana a metastatitzar.

Recentment s'ha descrit la importància d'identificar biomarcadors tumorals involucrats en la formació del nínxol pre-metastàtic, és a dir, quan les molècules alliberades del tumor comencen a modular el microambient a distància però encara no s'ha desenvolupat el tumor metastàtic. No obstant, la majoria de treballs previs basen els seus estudis amb els components tumorals presents en la sang extreta per punció de l'avantbraç, els quals es detecten en molt poca quantitat i dificulta el seu anàlisi. En conseqüència, per tal d'estudiar les molècules alliberades pel tumor de colon localitzat, alguns grups d'investigació pioners en aquest camp han demostrat el gran avantatge que suposa obtenir sang procedent de la vena que drena directament el tumor primari (de l'anglès, *tumor draining vein*), que en el cas del colon és la vena mesentèrica (VM). Estudis recents suggereixen que les molècules aïllades de VM contribueixen a oferir informació més precisa del grau d'intravassació tumoral i, per tant, podrien ser un bon biomarcador pronòstic capaç de prediure pacients en risc de desenvolupar metastàsis, especialment en pacients d'estadis inicials de CC que encara no han recaigut (Figura 21) [138-141].

1.2.3 Importància dels microRNAs i dels exosomes en la biòpsia líquida

La biòpsia líquida permet l'obtenció i, conseqüent anàlisi, de diferents components cel·lulars derivats del tumor (ctADN, ctARN, CTCs, exosomes, etc.) en una gran varietat de fluids corporals com són la sang [140], orina [142], saliva [143] o líquid cefaloraquídi [144].

El present estudi es centra en la biòpsia líquida de sang procedent de la vena que drena el tumor (VM) i l'anàlisi de les molècules de miRNAs lliures i de les contingudes en exosomes.

D'una banda, la presència de ctARN en sang permet identificar perfils d'expressió gènica específics de cada tumor. Aquest fet és avantatjós respecte l'anàlisi de ctADN ja que les mutacions somàtiques presents en l'ADN només representen un subgrup d'alteracions moleculars associades a càncer però no inclouen tots els canvis d'expressió gènica resultants d'altres mecanismes com per exemple els derivats de l'efecte dels miRNAs. Els miRNAs són les molècules d'ARN lliure circulant en sang més abundants i també poden viatjar encapsulats en exosomes [145], cossos apoptòtics, complexos proteïna-miRNA [146] i plaquetes *tumor-educated* (TEP) [147]. Existeixen múltiples evidències del potencial dels miRNA com a biomarcadors diagnòstic i pronòstic [145, 148], entre d'altres perquè s'ha descrit que el perfil de miRNAs en sang correlaciona amb el perfil de miRNAs del tumor d'origen i, a més la composició exosomal de miRNAs difereix entre pacients i individus sans.

D'altra banda, els exosomes alliberats per cèl·lules tumorals tenen un paper important en l'intercanvi d'informació molecular entre cèl·lules, ja que s'ha descrit que contenen proteïnes i àcids nucleics –ADN, mARNs i miRNAs- que poden modular l'activitat de les cèl·lules receptores [149, 150]. En conseqüència, els exosomes podrien ser utilitzats com a biomarcadors tumorals. De fet, es postula que els miRNAs exosomals podrien estar involucrats en la progressió tumoral, per exemple, estimulants l'angiogènesis i induint el procés metastàtic [151].

Aquestes i d'altres evidències anticipen que estudis no gaire llunyans seran determinants per establir la biòpsia líquida a la clínica amb l'objectiu d'estudiar el perfil genètic basat en l'anàlisi sanguini de cada pacient, i així aconseguir estar més a prop de la medicina personalitzada.

1.3 Comunicació cel·lular: Vesícules extracel·lulars

La supervivència cel·lular està condicionada, entre d'altres factors, per la seva capacitat d'intercanviar missatges amb cèl·lules veïnes o distants a través de la secreció de vesícules extracel·lulars.

Les vesícules extracel·lulars (EVs, de l'anglès *Extracellular Vesicles*), són totes aquelles partícules cobertes de membrana cel·lular originades a l'interior de la cèl·lula emissora o per evaginació de la seva pròpia membrana plasmàtica, i excretades al medi extracel·lular per ser captades posteriorment per cèl·lules receptores. Aquestes estan formades per una bicapa lipídica que inclou proteïnes transmembrana i un citoplasma carregat amb proteïnes (factors de creixement, enzims, citocines, integrines, etc.), lípids, glucolípid i material genètic (ADN i ARN) [152]. En conseqüència, les EVs es poden considerar vehicles de transport intercel·lular ja que porten informació des de la cèl·lula d'origen a la cèl·lula diana, participant en nombroses funcions biològiques com per exemple la presentació d'antígens sense contacte cel·lular [153], la modificació del microambient i l'educació cel·lular a distància [154]. Aquestes funcions s'han agrupat denominant-se “comunicació cel·lular sense contacte directe” o “comunicació cel·lular indirecta”.

Existeixen diferents tipus de EVs en funció del seu origen subcel·lular i mida:

- D'una banda, les EVs formades a partir de l'evaginació de la membrana plasmàtica fins al seu despreniment complet s'anomenen microvesícules, ectosomes o micropartícules, i poden presentar mides molt diverses (100 a 1000 nanòmetres –nm- de diàmetre).
- D'altra banda, les EVs formades a l'interior dels cossos multivesiculars (MVB) s'anomenen exosomes, tenen una mida d'entre 30 a 100 nm, i s'alliberen al fusionar-se amb la membrana plasmàtica.
- Finalment, les EVs resultants de les cèl·lules que pateixen una mort programada i es destrueixen formant vesícules de major mida (1000 a 5000 nm), de morfologia i composició molt diversa, s'anomenen cossos apoptòtics (Figura 23) [155, 156].

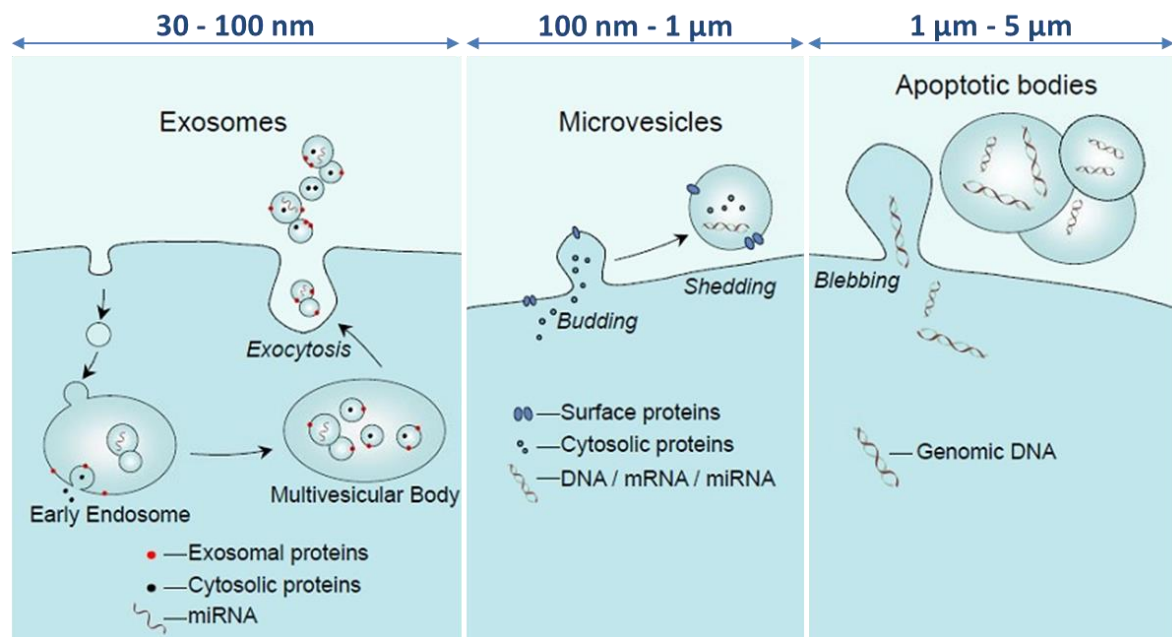


Figura 23. Diferents tipus de EVs. Adaptat de [156].

Totes les EVs presenten molècules de superfície que els permeten ser reconegudes per les seves cèl·lules receptores, amb les quals s'iniciarà un procés de senyalització mitjançant la unió receptor-ligand, podran ser internalitzades per endocitosi i/o fagocitosi o fins i tot podran fusionar-se amb la membrana de la cèl·lula receptora per alliberar el seu contingut al citosol d'aquesta.

Clàssicament, les EVs eren considerades desfets cel·lulars que no eren dignes d'estudi. No obstant, recentment la funcionalitat de les EVs, especialment dels exosomes, ha despertat un gran interès sobretot en la investigació oncològica.

1.3.1 Exosomes

Els exosomes són petites vesícules extracel·lulars esfèriques compreses entre 30-100 nm, que contenen una bicapa lipídica i es formen a partir de la membrana luminal dels MVB, els quals els alliberen constitutivament per fusió amb la membrana cel·lular [155, 157-160].

A principis de la dècada dels 80, Trams i col·laboradors encunyaren el terme *exosomes* per anomenar les vesícules derivades d'una línia tumoral que tenia capacitat 5' nucleotidasa [161]. Dos anys després, en el context d'estudis sobre el tràfic vesicular, Johnstone va descriure l'origen endosomal d'aquestes vesícules i la seva alliberació durant la maduració dels reticulòcits [162]. Al 1987 el grup de recerca de Johnstone ja suggerí la possibilitat d'aïllar aquestes microvesícules mitjançant la tècnica d'ultracentrifugació a 100.000g. Un gran avenç en aquest camp vingué de la mà de Raposo i col·laboradors que demostrà que els exosomes podien presentar antígens i activar als limfòcits T gràcies a les molècules del complex major d'histocompatibilitat II (MHC II) presents a la superfície de la seva membrana [163]. Deu anys després, Lötvall i col·laboradors descobriren que les EVs podien anar carregades de miRNAs i alliberar-los a les cèl·lules diana, despertant un gran interès per l'estudi de la comunicació cel·lular [164]. Des d'aleshores, l'estudi dels exosomes ha augmentat de forma exponencial, revelant la seva presència en varis fluids biològics humans [165], com ara semen [166], llet materna [167, 168], rentat broncoalveolar [169, 170], plasma [139], sèrum [171] i orina [172], entre d'altres. Aquests avenços han fet que els exosomes es considerin potencials biomarcadors de malaltia, i la identificació de molècules en la seva superfície o en el seu interior representa un camp molt interessant per l'estudi del càncer [173].

1.3.1.1 Biogènesi, secreció i reconeixement dels exosomes

1.3.1.1.1 Biogènesis

La biogènesi dels exosomes s'inicia amb un esdeveniment endocític a la membrana plasmàtica: la formació de les vesícules intraluminals (ILV). En aquest moment alguns lípids i proteïnes són reclutats per les ILVs en el que serà el seu citosol i aquest queda tancat en el seu interior, formant així l'endosoma primari. Durant la formació de les ILVs, l'endosoma es converteix en un MVB [174] (Figura 24).

Durant la formació de les ILVs, el mecanisme pel qual els exosomes seleccionen el contingut encara és força desconegut. Actualment, el mecanisme més ben descrit s'atribueix al complex ESCRT (de l'anglès, *Endosomal Sorting Complex Required for Transport*) i a la maquinària multimolecular reclutada a la membrana de l'endosoma per orquestrar la biogènesis del futur exosoma [175]. El complex ESCRT està format per 5 complexos diferents (ESCRT-0, -I, -II, -III,

Vps4) formats per moltes proteïnes associades, com per exemple Tsg101. El complex ESCRT-0 reconeix proteïnes en la membrana de l'endosoma, els complexos ESCRT-I i II es relacionen amb la deformació de la membrana cap a l'interior de l'endosoma per formar la ILV i la transferència de diferents compostos, i els complexos ESCRT-III i Vps4 estàn implicats en la excisió i dissociació del MVB de la membrana. Moltes proteïnes s'han vist implicades en aquest procés, fet que les fa candidates per ser utilitzades com a marcadors exosomals [176] (Taula 9).

Taula 9. Alguns dels marcadors més utilitzats per la detecció d'exosomes. Adaptat de [59] .

Nom	Grau d'enriquiment	Pes molecular (KDa)
Alix	Mig	96
Annexina II	Baix	38
Calnexina	Control negatiu	96
CD9	Alt	25
CD63	Alt	50-60
CD81	Alt	50-60
MHC-II	Alt	30
Tsg101	Mig	44

No obstant, existeixen indicis de mecanismes independents de ESCRT per a seleccionar el contingut del MVB. D'una banda, s'ha postulat un mecanisme basat en la composició lipídica específica de la membrana endosomal ja que s'ha descrit que les ceramides estan involucrades en la biogènesis dels exosomes [177]. D'altra banda, també s'ha demostrat que la formació de MVBs està controlada pels proteoglicans de sulfat de l'heparina sindecana i la seva sintetina citoplasmàtica adaptadora [178].

1.3.1.1.2 Secreció

Després de la formació del MVB, les proteïnes encarregades de guiar la seva degradació i/o secreció són les Rab GTPases [179, 180]. A continuació, els MVBs destinats a ser secretats han de fusionar-se amb membrana plasmàtica i alliberar-se definitivament a l'espai extracel·lular, convertint-se en exosomes [174, 181], un procés probablement mediat, almenys en part, per receptors SNARE (de l'anglès, *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*) [182]. A més, també s'ha descrit que l'augment de l'expressió de *TP53* i *PKM2*, juntament amb l'activació de la via del supressor tumoral *TSAP6*, contribueixen a la secreció d'exosomes en les cèl·lules tumorals [183, 184]. Cal destacar que l'acumulació de calci

intracel·lular i el canvi en el pH del microambient també s'ha demostrat que podria afectar a la secreció d'exosomes [185, 186].

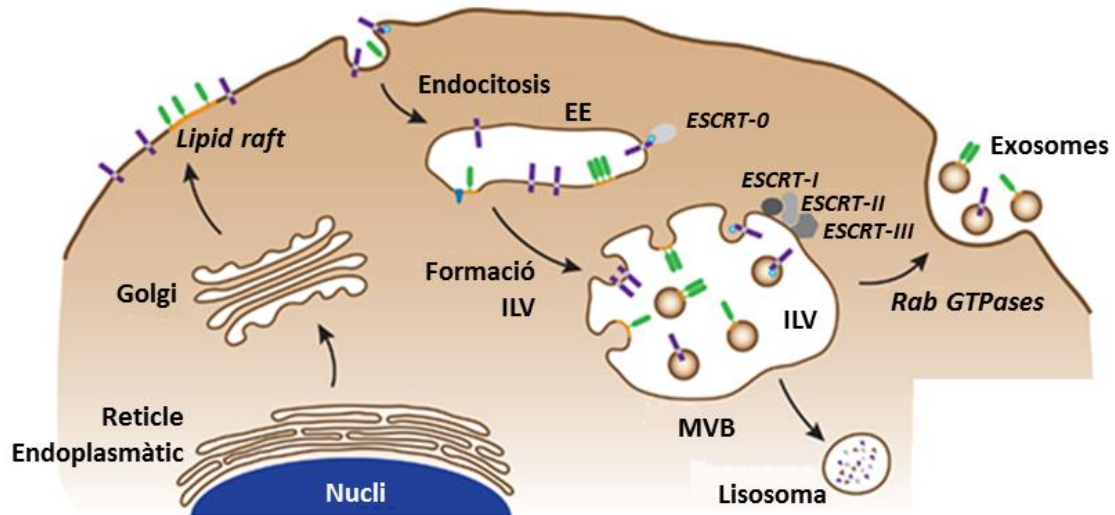


Figura 24. Biogènesi dels exosomes mediat pel complex ESCRT. Després de l'endocitosis en endosomes temprans (de l'anglès, *Early Endosomes* –EE–), la càrrega s'empaqueta en vesícules intraluminals (de l'anglès, *Intraluminal Vesicles* –ILV–), ILV dins del cos multivesicular (de l'anglès, *Multivesicular Body*–MVB–). Durant la biogènesi dels exosomes i abans de la seva alliberació, es carreguen proteïnes (ex, tetraspanines, proteïnes citosòliques, receptors), àcids nucleics (ex, mRNA, miRNA, ADN) i lípids (ex, esfingomielina, colesterol). A continuació, s'esdevindrà un procés regulat per les Rab GTPases que permet la fusió dels MVB a la membrana plasmàtica i l'alliberació de les ILV en forma d'exosomes. Adaptat de [60].

1.3.1.1.3 Reconeixement i internalització

Existeixen diferents mecanismes de reconeixement dels exosomes per les cèl·lules diana. El principal mecanisme és l'endocitosis [187, 188], però també es consideren la fusió directa de l'exosoma en la membrana de la cèl·lula diana, procés afavorit per pH baixos [186]; o la internalització mediada per lípids [189]; entre d'altres (Figura 25).

De forma interessant, hi ha estudis que demostren que el reconeixement dels exosomes per part de cèl·lules receptores és un procés que depèn d'energia. Un exemple d'aquest fet s'ha descrit en cèl·lules de càncer d'ovari, on el procés d'internalització dels exosomes és inhibit a 4°C [190].

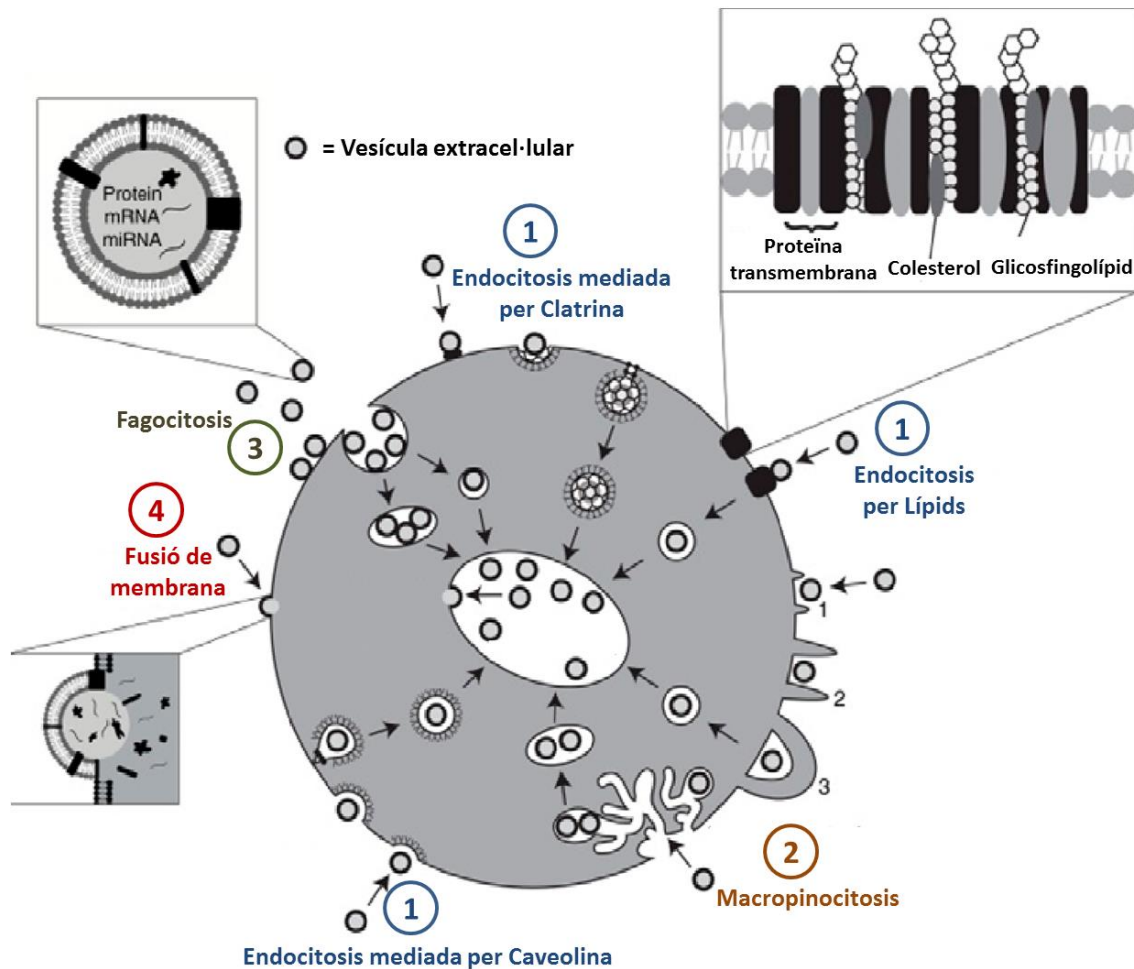


Figura 25. Vies implicades en la captació de les EVs per les cèl·lules diana [188]. Les cèl·lules receptores poden reconèixer i captar l'exosoma per diferents vies: (1) Endocitosis mediada per lípids (de l'anglès, *lipidraft*) o mediada per la unió a un receptor, (2) Macropinocitosis, (3) Fagocitosis i (4) Fusió amb la membrana plasmàtica de la cèl·lula diana. Adaptat de [188].

1.3.1.2 Contingut general dels exosomes

El contingut dels exosomes no es deu a l'atzar. La idea original de que les EVs, específicament els exosomes, transportaven una barreja atzarosa de molècules presents en el citoplasma de la cèl·lula original ha sigut refutada gràcies a l'estudi de Witwer i col·laboradors que descriu la presència de miRNAs en l'interior d'exosomes i demostra que aquests poden transferir-se a la cèl·lula receptora i ser funcionals en aquest nou microambient, encara que no ho fossin en la cèl·lula d'origen [191].

Recentment s'ha descrit que durant la biogènesi dels exosomes i abans de la seva secreció, existeixen diversos mecanismes encarregats de seleccionar les molècules que s'inclouran en el

citosol dels exosomes (Figura 26), fent que el contingut de l'exosoma sigui heterogeni, específic i dinàmic, dependent de l'origen de la cèl·lula o del seu estat fisiològic i patològic [192]. D'una banda, pel que fa a la membrana de l'exosoma, s'ha descrit que aquest presenta una major expressió d'esfingomielina, colesterol, fosfatidilserina i generalment d'àcids grassos saturats, en comparació amb la resta de cèl·lules. D'altra banda, el contingut proteic de l'exosoma inclou proteïnes endosomals, plasmàtiques i nuclears [174], i estan enriquits de les proteïnes implicades en la seva biogènesi i secreció (per exemple, Tsg101, Alix, Rab GTPases, *heat shock proteins* (Hsp70, Hsp90), integrines, tetraspanines (CD9, CD63, CD81) i proteïnes del MHC II). A més, l'exosoma també pot contenir material genètic, com mRNA, ARN no codificant llarg (lncRNA), microRNA (miRNA) i ADN de doble cadena [164, 193, 194]. Generalment, els exosomes no contenen proteïnes de reticle endoplasmàtic, mitocondries o nucli cel·lular [195].

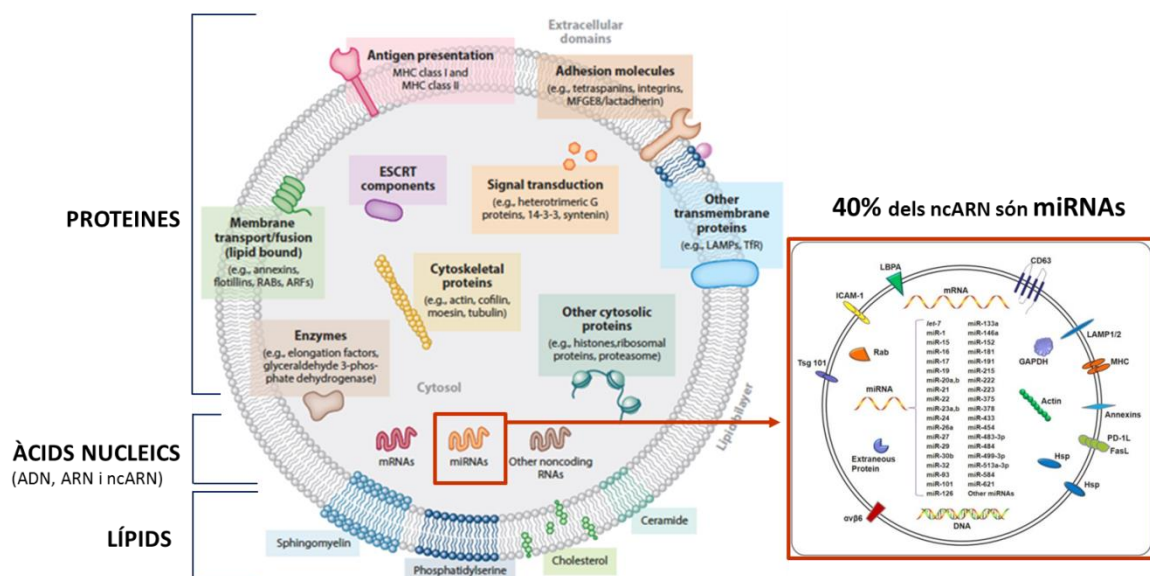


Figura 26. Contingut general dels exosomes. Adaptat de [155].

Cal destacar l'existència de diferents bases de dades, així com ExoCarta (<http://www.exocarta.org/>) i Vesiclepedia (<http://microvesicle.org/>) que recullen la informació més recent obtinguda dels estudis realitzats amb exosomes [196].

1.3.1.3 Funció dels exosomes en càncer

Recentment s'ha descrit que els exosomes derivats de cèl·lules tumorals podrien estar implicats amb la transferència d'informació cel·lular tot unint-se a la cèl·lula diana mitjançant proteïnes específiques de superfície, alliberar-ne el seu contingut i modificar-ne l'expressió gènica. En conseqüència, els exosomes s'han relacionat amb una gran diversitat de funcions

així com el creixement tumoral, la tumorogènesis, l'angiogènesis, l'evasió del sistema immunitari, la resistència a fàrmacs i la metàstasis. Els exosomes també estan involucrats amb la comunicació intercel·lular entre les cèl·lules tumorals i les de l'estroma, especialment amb els fibroblasts associats a càncer (CAFs) [196, 197] (Figura 27).

1.3.1.3.1 [Creixement tumoral](#)

L'efecte dels exosomes derivats del tumor sobre el creixement tumoral s'ha reportat en nombrosos estudis al llarg de la passada dècada. Un estudi *in vitro* que tingué un gran impacte demostrà que els exosomes aïllats de sèrum de glioblastoma estan enriquits amb el mARN de *EGFRvIII*, de manera que les cèl·lules receptores d'aquests exosomes manifestaven un gran creixement tumoral [198]. L'equip de Peinado demostrà que els exosomes de melanoma presentaven l'oncoproteïna *MET* que induïa el creixement tumoral [154]. En CCR, els exosomes alliberats del tumor primari estan enriquits en mARN relacionats amb el cicle cel·lular, fet que promou la proliferació i el creixement tumoral [199]. En el càncer d'ovari, els exosomes procedents de CAFs presenten alts nivells de miR-21, fet que inhibeix l'apoptosi tot unint-se a la seva diana *APAF1* [200]. En el càncer hepàtic, la pèrdua de miR-320a en els CAFs contribuïa a la proliferació tumoral [201]. Aquests i altres estudis indiquen que els exosomes procedents del tumor o de les cèl·lules estromals podrien jugar un paper important en la modulació del creixement tumoral.

1.3.1.3.2 [Tumorogènesis](#)

Existeixen evidències que suggereixen que els exosomes derivats de les cèl·lules tumorals poden induir la transformació cel·lular. Melo i col·laboradors demostraren que els miRNAs exosomals derivats de les cèl·lules tumorals de mama aïllats en plasma poden instigar a les cèl·lules epitelials normals a formar tumors [193]. Un altre estudi recent *in vivo* mostra que els exosomes derivats de cèl·lules malignes de càncer de mama són captats per cèl·lules tumorals amb menys potencial maligne ja sigui en el mateix tumor o en tumors a distància [202]. A més, els exosomes derivats de CAFs, component principals del microambient tumoral, poden transferir miRNAs i proteïnes potencialment malignes per afectar la progressió del càncer de mama [203].

1.3.1.3.3 [Angiogènesis](#)

La relació entre l'efecte pro-angiogènic dels exosomes derivats del tumor en les cèl·lules endotelials s'ha descrit en diferents tipus de càncers com ara glioblastoma, leucèmia, melanoma, càncer d'ovari o de mama [148, 204-206]. El grup de Gopal demostrà la comunicació entre cèl·lules oncogèniques sotmeses a la transició epiteli-mesènquima (EMT) i cèl·lules endotelials per mitjà d'exosomes carregats amb proteïnes promotores de

l'angiogènesis, *Rac1/PAK2* [207]. Alhora, alguns miRNAs exosomals com miR-9 [208], miR-210 [209] o miR-125a [210] podrien estar involucrats en potenciar l'angiogènesis tumoral.

1.3.1.3.3 [Evasió del sistema immunitari](#)

Estudis recents evidencien un paper dual en la interacció entre les cèl·lules immunitàries i les cèl·lules canceroses. Es postula que els exosomes derivats del tumor podrien contenir tant gens inductors del sistema immunitari, com la mesothelina i l'antigen carcinoembrionari (CEA); com àcids nucleics i proteïnes capaces d'afavorir l'evasió immunitària [211, 212].

Actualment el component inflamatori del microambient tumoral més estudiat són els macròfags associats al tumor (TAMs) i els exosomes que alliberen. En aquest sentit, Fabbri i col·laboradors identificaren un nou mecanisme de comunicació entre els TAMs i les cèl·lules tumorals via els miRNAs continguts en exosomes. De forma interessant, els exosomes carregats amb miR-21 i miR-29a eren reclutats pels TAMs activant la via de senyalització del NF- κ B i la secreció d'IL-6 [213].

1.3.1.3.4 [Resistència a fàrmacs](#)

Els exosomes alliberats per les cèl·lules tumorals resistents als fàrmacs poden estendre la seva resistència a les cèl·lules sensibles que responen al tractament, probablement per la transferència intercel·lular de proteïnes específiques, miRNAs o, fins i tot, lncRNA [214]. Recentment s'ha descrit que els exosomes derivats de CAFs contribueixen a la proliferació i a la quimioresistència en el càncer de pàncrees [215]. A més, els exosomes podrien alterar el tractament amb quimioteràpia modificant l'eflux de fàrmac. Un exemple d'aquest fet és l'estudi de Shedden i col·laboradors on mostra que la Doxorubicina pot ser encapsulada i exportada pels exosomes derivats del tumor [216]. D'altra banda, els exosomes podrien disminuir l'efecte terapèutic basat en anticossos tot modulant la unió d'aquests amb la cèl·lula tumoral. Aquest és el cas dels exosomes derivats de cèl·lules tumorals de mama amb alta expressió de *HER2* els quals s'ha descrit que interfereixen amb l'activitat de l'anticòs monoclonal Trastuzumab *in vitro* [217].

1.3.1.3.4 [Metàstasis](#)

Diverses evidències relacionen els exosomes tant amb la iniciació de la metàstasis com amb la preparació del nínxol pre-metastàtic, de manera que els exosomes poden afectar les cèl·lules pròximes al seu lloc d'origen però també als teixits distants. Un estudi recent en càncer de pàncrees postula que els exosomes derivats del tumor reclutaven macròfags per tal d'establir el nínxol pre-metastàtic en el fetge, fet que resultà en una gran metàstasis hepàtica [218]. Un altre evidència d'aquest fet es reporta en exosomes derivats de càncer de mama amb alts

nivells de miR-122, els quals estimulaven la metastàsis tant *in vitro* com *in vivo* [219]. Recentment, s'ha descrit que els exosomes procedents del tumor carregats amb miR-181c podrien traspasar la barrera hematoencefàlica i promoure la metastàsis cerebral [220]. En aquesta mateixa línia, Zhang i col·laboradors demostren que els exosomes derivats dels astròcits transporten miRNAs capaços d'inhibir *PTEN*, fet que augmenta els nivells de citoquina *CCL2* i promou la metastàsis cerebral [221]. De forma interessant i recolzant l'exclusivitat de molècules que forma cada exosoma, un estudi proteòmic de Hoshino i col·laboradors revela diferents patrons d'expressió en els exosomes, de manera que els exosomes que contenen integrines $\alpha 6\beta 4$ i $\alpha 6\beta 1$ es relacionen amb metastàsis pulmonar, mentre que la $\alpha v\beta 5$ s'associa a metastàsis hepàtica [61].

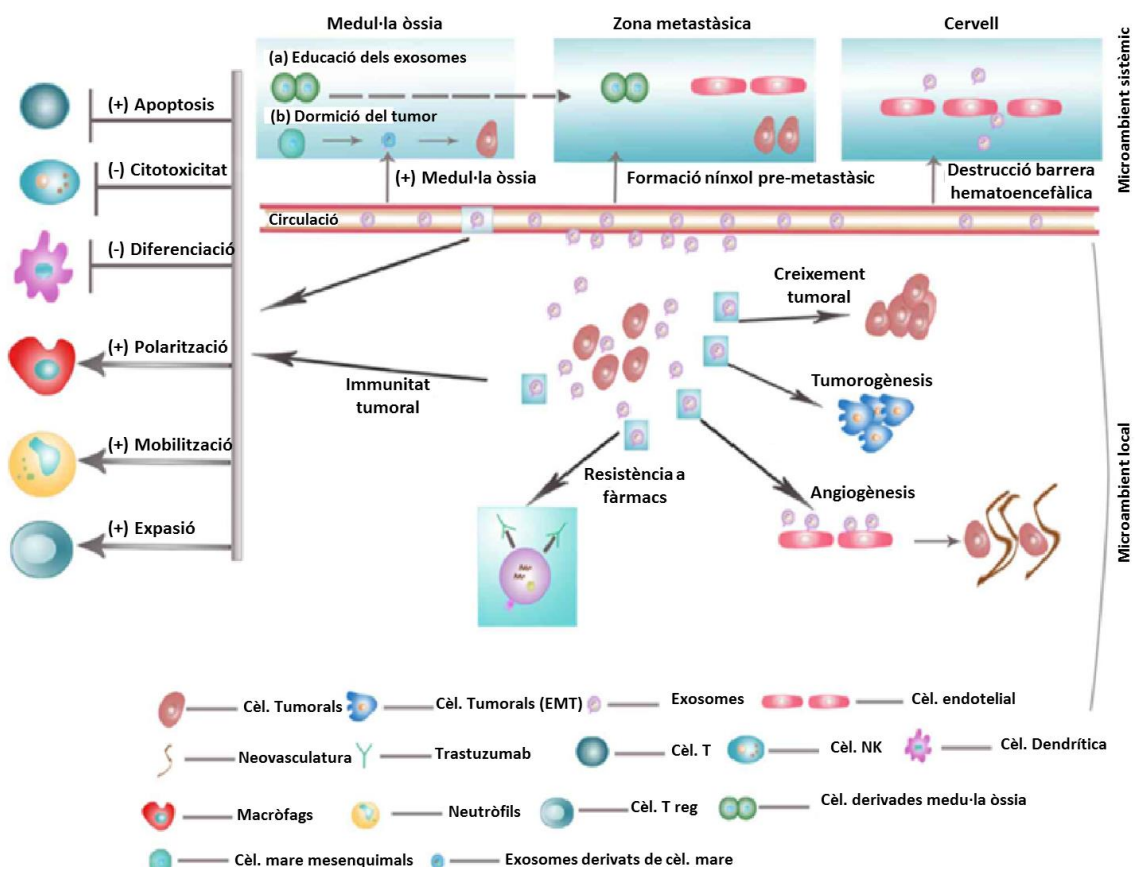


Figura 27. Funcions biològiques dels exosomes en càncer. Adaptat de [196].

Les evidències reportades, juntament amb moltes d'altres, suggereixen que els exosomes són una eina terapèutica molt prometedora per la seva gran eficiència en la comunicació intercel·lular. Tant és així que es podria pensar en bloquejar la secreció exosomal com a tractament adjuvant o bé utilitzar-los com a vehicles terapèutics per la distribució de fàrmacs, probablement disminuint els efectes adversos associats [197, 222]. Un exemple d'aquest fet és l'estudi de Tian i col·laboradors on s'exposa que els exosomes carregats amb Doxorubicina inhibeixen el creixement en tumors de colon i mama *in vivo* [222].

1.3.1.4 Exosomes en càncer de colon

Actualment, l'estudi dels exosomes en CCR és molt rellevant i avança a gran velocitat. Un estudi recent mostra que els exosomes procedents de les cèl·lules tumorals de colon poden induir canvis morfològics i funcionals en les cèl·lules mesenquimals de l'estroma adjacent, afavorint així el creixement i la progressió tumoral. Alguns d'aquests canvis són les alteracions morfològiques de les estructures colòniques, la formació de grans esferes, l'acidificació del microambient extracel·lular i la redistribució de la bomba H⁺/ATPasa de la membrana plasmàtica [223]. Una altra evidència recent d'aquest fenomen és l'estudi descrit per Lucchetti i col·laboradors on postula que l'estadi de diferenciació de les cèl·lules del CCR afecta l'alliberament d'exosomes a nivell quantitatiu i qualitatiu. En conseqüència, es suggereix que l'habilitat per modificar el microambient varia en funció del grau de diferenciació de la cèl·lula tumoral, de manera que el contingut dels exosomes alliberats per les cèl·lules tumorals indiferenciades és diferent de l'alliberat per cèl·lules diferenciades. Així doncs, es reporta que les cèl·lules diferenciades presenten nivells més baixos de miRNA i aquests nivells augmenten en els exosomes que alliberen, els quals podran transferir tals miRNAs a les cèl·lules receptores [224]. Tot i que són necessaris estudis més exhaustius sobre el contingut dels exosomes secretats pels diferents tipus cel·lulars, la figura 28 pretén resumir les principals molècules que poden estar presents en els exosomes en general i, particularment, en els exosomes derivats de cèl·lules tumorals de CCR.

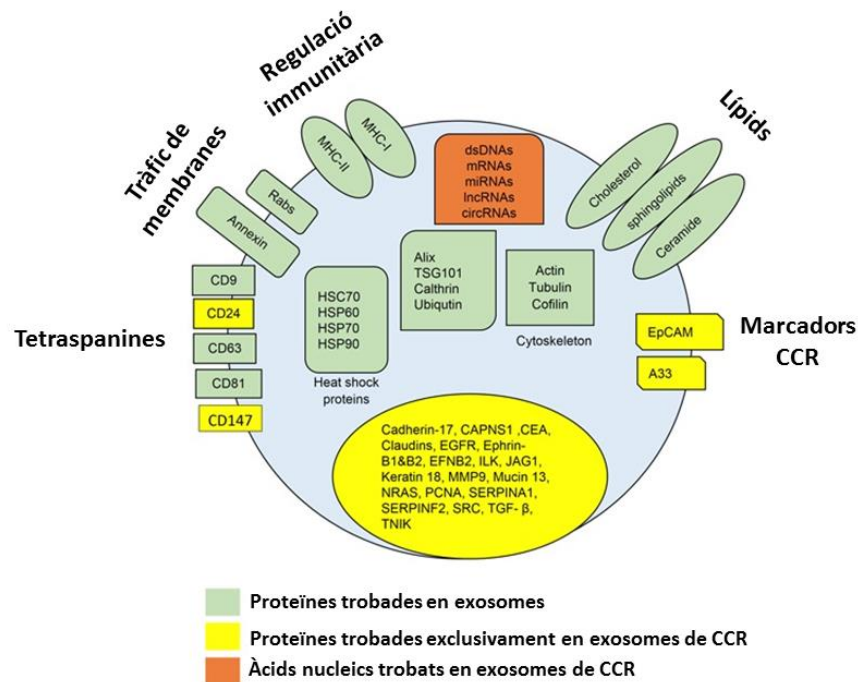


Figura 28. Composició dels exosomes derivats de cèl·lules tumorals de CCR. Adaptat de [225].

Diferents estudis s'han centrat en la detecció d'exosomes en fluids biològics de pacients com a potencials biomarcadors diagnòstic i pronòstic de malaltia, especialment càncer. Un estudi recent, revela que els exosomes procedents del tumor primari de colon presenten un contingut selecta de miRNAs supressors tumorals, com ara el miR-193a, en el seu interior, mentre que els miRNAs oncogènics queden retinguts en la cèl·lula tumoral per fomentar la progressió del CCR [226].

D'una banda, pel que fa al potencial diagnòstic dels miRNAs exosomals circulants, l'equip de Wang i col·laboradors exposa que els nivells de miR-125a-3p i miR-320c estan augmentats en pacients amb CC, i es suggereix que l'avaluació de miR-125a-3p, en combinació amb altres marcadors diagnòstic convencionals, podria contribuir a millorar la capacitat diagnòstica en el CC [227]. Seguint en aquesta mateixa línia, Zhao i col·laboradors reporten que miR-21, miR-133a i miR-181a estan sobreexpressats en exosomes circulants en sèrum i els nivells de miR-21 poden contribuir al diagnòstic d'estadis inicials de pacients de CC [228]. Un altre estudi que pretén evaluar la utilitat diagnòstica dels miRNAs exosomals mitjançant microarrays, descriu 7 miRNAs (let-7a, miR-1229, miR-1246, miR-150, miR-21, miR-223 i miR-23a) més expressats en pacients d'estadis inicials de CCR respecte a individus sans, i aquests nivells disminueixen després de l'extracció quirúrgica del tumor [229]. D'altra banda, pel que fa a l'ús dels exosomes com a biomarcador pronòstic, un estudi de microarrays fet amb mostres de sèrum de 227 pacients de CCR indica que aquells pacients amb exosomes carregats amb alts nivells de miR-19a mostraven un pitjor pronòstic que aquells amb nivells més baixos [230].

De forma interessant, a l'estudiar el contingut de miRNA exosomal procedent de la vena que drena directament el tumor primari de colon (VM) s'han descrit alts nivells de miR-328 en pacients de CC que recauen a nivell hepàtic respecte d'aquells que no desenvolupen metàstasis [139].

En referència al contingut de lncRNA exosomal, un estudi recent proposa que la presència de *CRNDE-h* en exosomes aïllats de sèrum podria ser un potencial biomarcador diagnòstic i pronòstic en pacients amb CCR [231].

Pel que fa al contingut de proteïna exosomal s'han detectat alts nivells de proteïna Hsp60 [232], CD24 [233], SERPINA1, SERPINF2 i MMP9 [234]. Malgrat la funció de Hsp60 no s'ha determinat, CD24 es proposa com a biomarcador diagnòstic en estadis inicials de CC, i les proteïnes intracel·lulars SERPINA1, SERPINF2 i MMP9 es relacionen amb la remodelació de la matriu extracel·lular, la comunicació intercel·lular, la transducció de senyals, la permeabilitat ascular i la inflamació.

Finalment, també s'ha descrit la presència de mRNA de $\Delta Np73$ en exosomes procedents del tumor primari en pacients amb CC. Es suggereix que l'empaquetament selectiu de $\Delta Np73$ en els exosomes tumorals està associat a l'augment de la proliferació tumoral, la quimioresistència de les cèl·lules receptores en estudis realitzats *in vitro* i *in vivo* i amb pitjor pronòstic en pacients de CC [235].

En la següent taula es recullen les principals característiques dels estudis més recents d'exosomes en pacients de CC.

Taula 10. Principals estudis d'exosomes circulants en pacients de CC.

Tipus de cargo	Nom del cargo	Expressió	Fluid biològic	Mostra	Funció	Referència
miRNAs	miR-193a	Alta	Plasma	25 pacients estadi inicial, 15 metastàsis hepàtica, n controls	Promou la progressió tumoral	[226] <i>Teng, 2017</i>
	miR-125a-3p	Alta	Plasma	50 pacients estadi inicial i 50 controls	Biomarcador diagnòstic	[227] <i>Wang, 2017</i>
	miR-21, miR-133a, miR-181b	Alta	Sèrum	20 pacients i 20 controls	Biomarcador diagnòstic	[228] <i>Zhao, 2017</i>
	let-7g, miR-15b, miR-155 i miR-328	Alta en miR-328	Plasma	50 pacients (50 de vena perifèrica i 50 de vena mesentèrica)	Promou la metastàsis hepàtica	[139] <i>Monzo, 2017</i>
	miR-19a	Alta	Sèrum	227 pacients i 28 controls	Tumorigènesis en estadis inicials	[230] <i>Matsumura, 2015</i>
	let-7a, miR-1229, miR-1246, miR-150, miR-21, miR-223, i miR-23a	Alta	Sèrum	88 pacients estadi inicial i 11 controls	No determinat	[229] <i>Ogata-Kawata, 2014</i>
lncRNA	CRNDE-h	Alta	Sèrum	388 pacients i 80 controls	Biomarcador diagnòstic i pronòstic	[231] <i>Liu, 2016</i>
Proteïna	Hsp60	Alts pre-cirurgia, disminueixen post-cirurgia	Sang	57 pacients i 40 controls	No determinat	[232] <i>Campanella, 2015</i>

	CD24	Alta	Plasma	8 pacients i 6 controls	Biomarcador diagnòstic	[233] <i>Yunusova, 2016</i>
	SERPINA1 SERPINF2 MMP9	Alta	Sèrum	36 pacients i 49 controls	Remodelació de ECM, comunicació cel·lular, transmissió de senyals, permeabilitat vascular i inflamació	[234] <i>Chen, 2017</i>
mARN	Δ Np73	Alta	Plasma	69 pacients i 12 controls	Afecta la proliferació i resistència a fàrmacs. Relacionada amb estadis avançats i mal pronòstic.	[235] <i>Soldevilla, 2013</i>

Una fracció important de miRNA viatja en sang de forma lliure, fet que inclouria el seu transport a l'interior d'exosomes [50].

1.4 ARNs no codificants

El descobriment dels àcids ribonucleics no codificants (ncARN) representà un canvi en la genètica del segle XX. Clàssicament, el dogma central de la biologia, proposat per Francis Crick al 1970, postulava que l'ADN es transcrivía a ARN i, posteriorment, es traduïa a proteïna; suggerint que les regions intergèniques eren poc rellevants i que la transcripció era exclusiva de les regions del genoma que contenien gens codificants per a proteïna. No obstant, la seqüenciació del genoma humà al 2001 va demostrar que aquest paradigma es compleix en menys del 2% dels casos. Una de les troballes més sorprenents fou que el genoma conté un nombre molt reduït de gens que codifiquen per a proteïna, aproximadament uns 20.000 gens (<2% del total del genoma), proposant que la resta del genoma correspon a regions no codificants que probablement tinguin funcions importants però desconegudes. Aquest fet es va corroborar gràcies al projecte ENCODE (de l'anglès, *Encyclopaedia of DNA Elements*) on es descriu que almenys el 80% dels elements del genoma són funcionals. Un d'aquests elements no codificants però de gran rellevància funcional en condicions fisiològiques i patològiques és la gran família ncARNs.

Els ncARNs es poden classificar segons la seva llargada en petits (<200nt) i llargs (>200nt). Entre els ncARNs petits trobem els miRNAs, el grup més estudiat fins a dia d'avui i la base sobre la qual s'ha elaborat aquesta tesi (Figura 29).

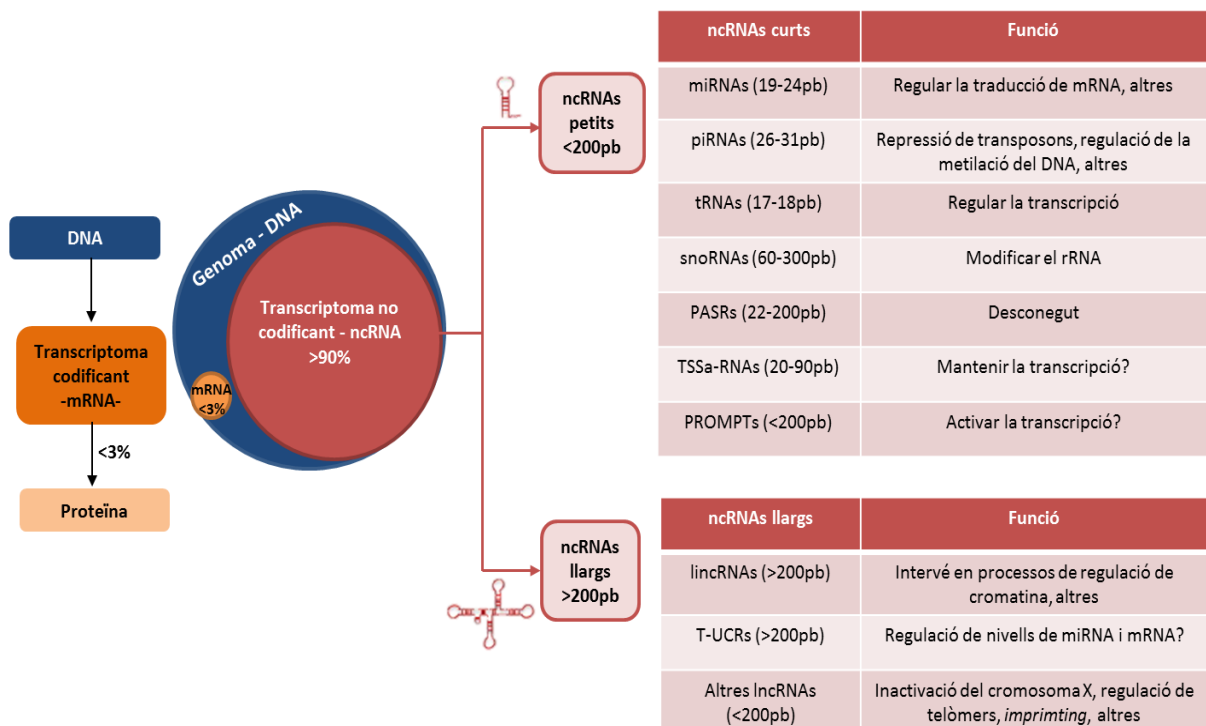


Figura 29. Esquema del dogma central de la biologia i els tipus de ARNs no codificants (ncARN).

1.4.1 microRNAs

1.4.1.1 Història i característiques

Els microRNAs (miRNAs) són una família de ARNs petits no codificants, de 18-25 nucleòtids, que juguen un paper molt important en el manteniment de la homeostasi cel·lular i estan altament conservats entre espècies. Aquests exerceixen la seva principal funció unint-se a la regió complementaria d'un ARN missatger diana, fet que resulta en la seva degradació i/o inhibició de la traducció a proteïna [236].

El primer miRNA es va identificar en *Caenorhabditis elegans* al 1993 per Ambros Rosalind i Rhonda Feinbaum, un ARN petit transcrit a partir del locus *lin-4* [237]. Aquests descobriren que el gen *lin-4* no codifica per una proteïna sinó per dos ncARNs curts: un d'aproximadament 22 nucleòtids, corresponent al miRNA madur, i l'altre de 61 nucleòtids i amb una estructura en forma de *stem-loop*, corresponent al precursor del miRNA madur [238]. Posteriorment es va descriure que *lin-4* presenta seqüències complementaries a la regió 3'UTR (regió sense traduir) del mRNA de *lin-14*. Aquesta troballa els va portar a suggerir que *lin-4* podria regular negativament l'expressió del gen *lin-14* en *C. elegans* [239] (Figura 30).

Set anys després d'aquesta important troballa, a l'any 2000, es descobrí el segon miRNA també en *C. elegans*: *let-7* [240, 241]. Aquest descobriment no només fou un altre exemple de regulació post-transcripcional dels ncARNs petits, sinó que suggerí la possibilitat de trobar homòlegs de *let-7* en altres espècies, fet que resultà en el descobriment del primer miRNA en mamífers [242-244] (Figura 30). Des d'aleshores, el nombre de miRNAs ha anat creixent exponencialment. Tant és així que segons el recompte recollit en l'última versió de miRBase (miRBase 21), base de dades encarregada del registre de miRNA -www.mirbase.org-, es descriuen en *Homo Sapiens* 28.645 entrades corresponents a precursors de miRNAs, les quals donen lloc a 35.828 miRNAs madurs en 223 espècies.

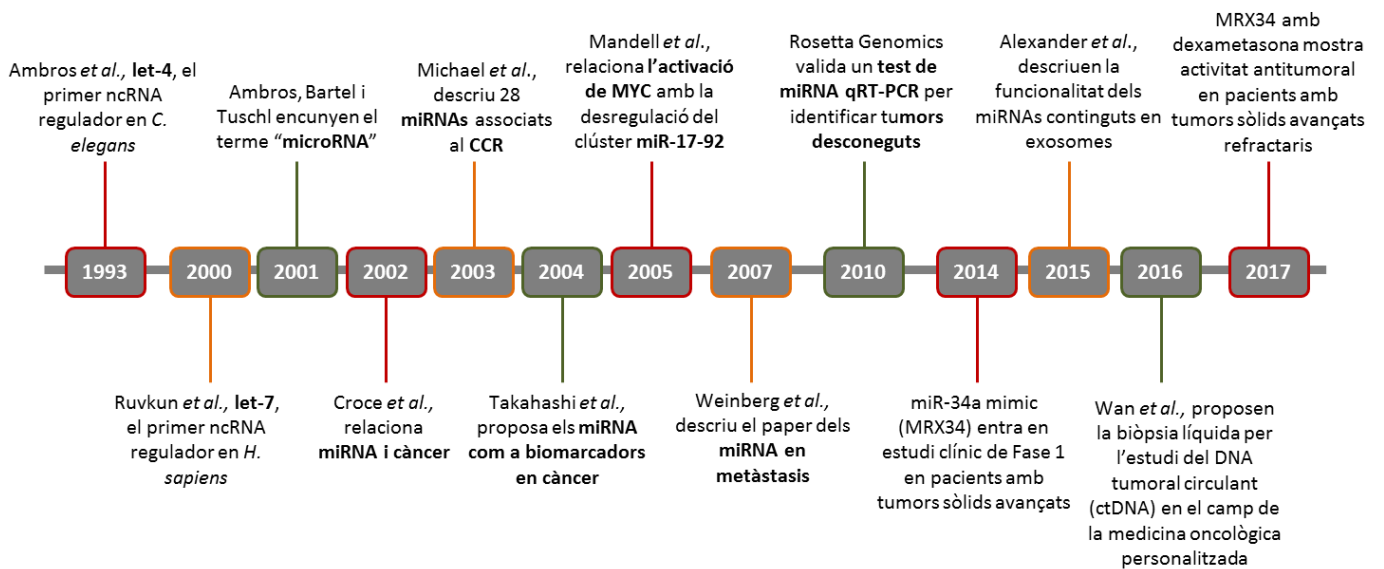


Figura 30. Principals esdeveniments històrics relacionats amb els ncARNs. Adaptat de [245].

L'estudi dels miRNAs cada vegada està més ben documentat i el nombre de treballs publicats segueix creixent periòdicament (Figura 31) [245]. Aquest fet ha permès canviar la nostra comprensió del procés de la regulació de l'expressió dels gens ja que actualment se sap que els miRNAs són capaços de regular centenars de gens i coordinar processos fisiològics incloent la proliferació, la diferenciació i l'apoptosis, mentre que la seva desregulació pot contribuir al procés de càncer [244, 246].

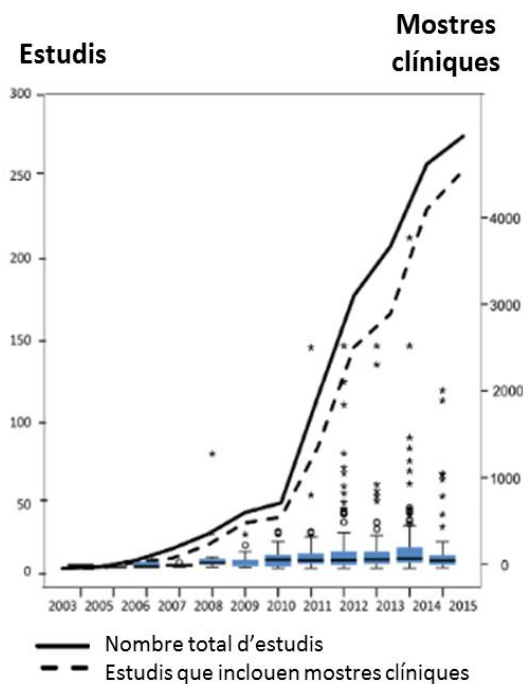


Figura 31. Estudis de miRNA en CCR. La imatge il·lustra un ràpid creixement dels estudis publicats (amb i sense mostres clíniques) per any. Adaptat de [245].

1.4.1.2 Identificació de dianes de microRNAs

Un miRNA pot tenir molts mARN diana i cada mARN pot estar regulat per més d'un miRNA. La predicció bioinformàtica és un mètode molt útil i necessari per identificar potencials seqüències d'unió situades en la regió 3'UTR de diferents mARN susceptibles a ser dianes putatives del miRNA estudiat. La predicció d'aquestes dianes es basa principalment en l'aparellament conservat descrit per Watson i Crick d'una regió anomenada “*seed sequence*” [244]. Aquesta és una seqüència complementària a la regió 5' del miRNA, de 6-8 nucleòtids, que ha permès reduir les prediccions falses-positives. No obstant, les eines actuals no només tenen en compte el grau de complementarietat de la *seed sequence* i l'energia d'unió predita entre aquesta i el mARN, sinó que també prediuen unions no canòniques, analitzen el grau de conservació evolutiva i compten amb models biofísics [247]. Aquestes consideracions seran de gran utilitat per realitzar posteriors estudis funcionals de miRNAs.

Algunes d'aquestes eines o softwares bioinformàtics són les que apareixen en la Taula 11 [248].

Taula 11. Principals algoritmes de predicció de dianes de miRNA.

Bases bioinformàtiques que consideren la regió 3'UTR com a diana putativa	
TargetScan	www.targetscan.org
PicTar	http://pictar.mdc-berlin.de/
EIMMo	http://m3rna.cnb.csic.es/
Diana-microT v3.0	http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php
PITA	https://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_prediction.html
microRNA	http://www.microrna.org/microrna/home.do
miRBase targets (microcosm)	http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5/
miRDB	http://www.mirdb.org/
Bases bioinformàtiques que consideren altres parts del mARN com a diana putativa	
RNA22	https://cm.jefferson.edu/rna22/
miRWalk	http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/

1.4.1.3 Biogènesis

En humans, la biogènesis dels miRNAs es duu a terme seguint vies altament conservades entre espècies i regulades per 4 enzims: Drosha, exportina 5, Dicer i argonaute 2 (AGO2). La majoria dels gens que codifiquen per miRNAs es localitzen en regions intròniques i contenen els seus propis promotors. No obstant, els miRNAs també poden trobar-se en regions intergèniques, exòniques o agrupats amb altres miRNAs en forma de clústers [249].

La biogènesis s'inicia amb la transcripció del miRNA per l'ARN polimerasa II (Pol II) en el nucli donant lloc al transcrit primari (pri-miRNA). A continuació el transcrit primari es sotmetrà a dues escissions enzimàtiques que donaran lloc al miRNA madur. En primer lloc, l'enzim Drosha, un tipus de RNasa III, juntament amb el cofactor DGCR8, s'unirà al pri-miRNA i el tallaran en direcció 3'-5' per generar un precursor d'aproximadament 70 nucleòtids anomenat pre-miRNA. Aleshores, el complex exportina5-RanGTP induirà la sortida del pre-miRNA del nucli cap al citosol, on la RNasa III Dicer i la proteïna d'unió a ARN en resposta a la transactivació (TRBP) tallaran el *loop* terminal del pre-miRNA. El dúplex de miRNA, d'uns 22 nucleòtids, resultant s'incorporarà al complex d'ARN induït per silenciament (RISC) per ser processat per la família de proteïnes argonauta, juntament amb l'ajuda d'alguns cofactors com PACT. El resultat d'aquest procés serà la selecció d'una de les dues cadenes del dúplex de miRNA, la qual es coneix com la seqüència del miRNA madur. Finalment, el miRNA madur ja és capaç de reconèixer l'ARN missatger diana, on s'unirà per complementarietat a la regió 3'UTR i l'inhibirà [250] (Figura 32).

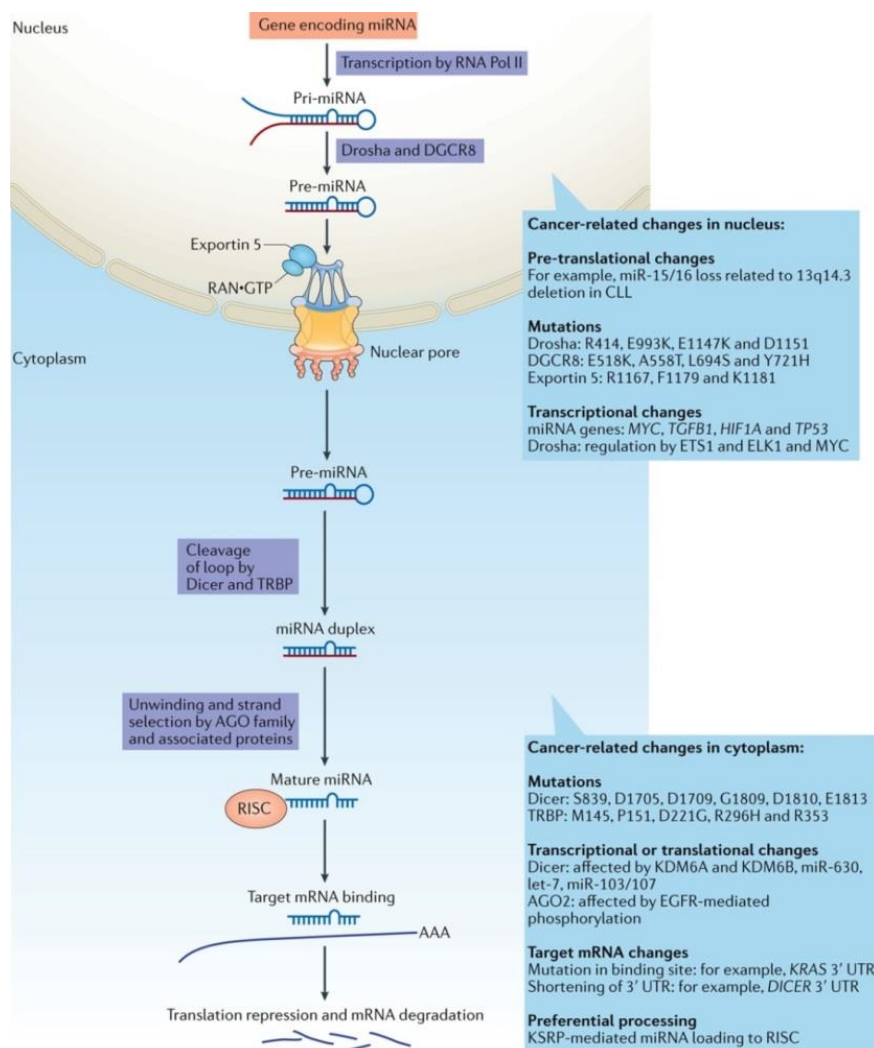


Figura 32. Generalitats de la biogènesis dels miRNAs [250].

1.4.1.4 Mecanisme d'acció

El mecanisme d'acció dels miRNAs principalment es relaciona amb el seu efecte en la regulació negativa de l'expressió proteica, ja sigui per la degradació del mRNA diana o per la inhibició temporal de la traducció del mRNA diana [251]. Aquests mecanismes depenen del grau de complementarietat del miRNA amb el seu mRNA diana, el qual es determina per una petita seqüència en l'extrem 5' del miRNA, de 2 a 8 nucleòtids, que rep el nom de “*seed sequence*” [251, 252]. Quan la complementarietat d'aquesta i la regió 3'UTR del mRNA diana és total s'esdevé la degradació del mRNA, mentre que quan la complementarietat és parcial s'esdevé una inhibició temporal de la traducció del mRNA a proteïna, sent aquest el mecanisme més freqüent en humans. En conseqüència, el resultat final d'ambdós mecanismes serà la reducció dels nivells totals de proteïna [244].

Doech i Sharp demostraren que per tal que s'esdevingui el silenciament gènic, el grau de complementarietat entre la *seed sequence* del miRNA i el mRNA no ha de ser total, sinó que únicament la unió dels primers 8 nucleòtids de l'extrem 5' del miRNA amb la regió 3'UTR del mRNA diana són suficients per bloquejar la traducció [252]. Així, malgrat existeixin casos de desaparellament de nucleòtids entre la *seed sequence* i el seu mRNA diana, es poden produir mecanismes compensatoris per afavorir tal unió. Aquest fet permet l'existència de diverses possibilitats d'unió del miRNA al seu mRNA diana [248] (Figura 33).

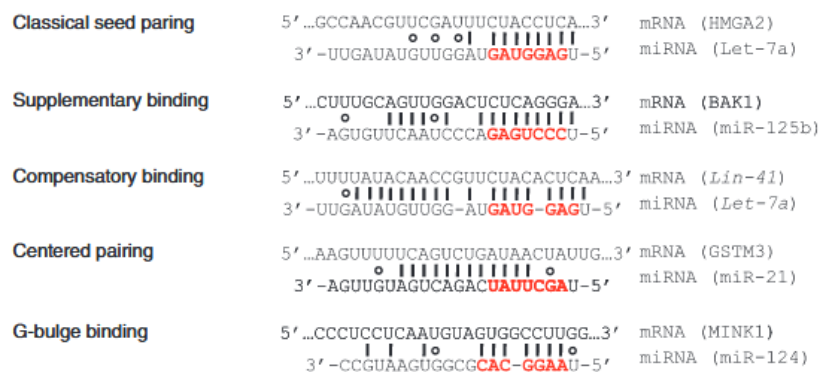


Figura 33. Principals tipus d'unió entre el miRNA-mARN. La *seed sequence* s'indica en vermell i les línies verticals indiquen complementarietat perfecta basada en l'aparellament descrit per Watson-Crick; els cercles indiquen regions inestables. (a) La *seed sequence* (2-7nt) del miRNA madur mostra complementarietat perfecta amb el mRNA diana (*classical seed pairing*). (b-c) Una unió imperfecte de la *seed sequence* es pot compensar amb un alt grau d'unions complementaries a l'extrem 3' del miRNA, afavorint l'energia d'enllaç global entre el miRNA-mARN (*supplementary/compensatory binding*). (d-e) A més podem trobar altres tipus d'unió com l'aparellament central que inclou part de l'extrem 3' de la *seed sequence* i part dels nt adjacents o l'aparellament *G-bulge* que es caracteritza per l'aparició d'una bombolla en el centre on es perd la complementarietat, però aquesta es manté tant en l'extrem 5' (*seed sequence*) com en nt individuals de l'extrem 3' del miRNA [248].

Aquesta baixa necessitat de complementarietat suposa un gran avantatge pels miRNA, ja que un miRNA pot inhibir simultàniament l'expressió de centenars de mARNs [248]. En conseqüència, l'efecte biològic d'un miRNA pot ser degut a la suma de totes les inhibicions que s'esdevenen en aquell precís instant.

S'han descrit altres mecanismes "no canònics" pels quals els miRNA exerceixen altres funcions de regulació (Figura 34). Per exemple, el fet que miR-29b estigui situat en el nucli qüestiona el mecanisme canònic dels miRNAs, el qual només podria explicar si la interacció d'aquest amb el seu mARN es produís en el citoplasma [253]. Alguns miRNAs poden unir-se a la regió 5'UTR o al cos del seu mARN diana per activar la seva expressió proteica. Exemples d'aquests fets són el miR-10a capaç d'induir la traducció del mARN de proteïnes ribosomals tot controlant la síntesi proteica a nivell global [254] o el miR-369-3p que promou la traducció del mARN de TNF α mitjançant el reclutament del complex de proteïnes format per Ago2 i FXR1 durant l'arrest del cicle cel·lular [255]. Altres miRNAs s'uneixen directament a l'ADN i regulen mecanismes epigenètics d'activació o silenciament de l'ADN, com el miR-373 que interactua amb el promotor de *CDH1* i activa la seva transcripció [256] o els miR-165/166 que participen en el silenciament gènic de *PHV* i *PHB* en l'espècie de planta *Arabidopsis thaliana* [249]. A més, també s'ha descrit que la unió de miR-21 i miR-29a als receptors tipus Toll (TLR) indueix la secreció de citoquines inflamatòries [213].

Recentment s'ha descrit un altre mecanisme d'acció dels miRNAs independent del complex RISC: l'anomenada "*Decoy activity*". Es postula que els miRNAs poden unir-se a proteïnes, concretament a proteïnes d'unió a l'ARN i evitar que aquestes s'uneixin als seus mARNs diana. Al 2010, Perrotti i col·laboradors descriueren un exemple d'aquest mecanisme exercit pel miR-328, el qual competeix amb el factor de transcripció *CEBPA* per unir-se al mARN de *hnRNP E2* i evitar la seva traducció [257, 258].

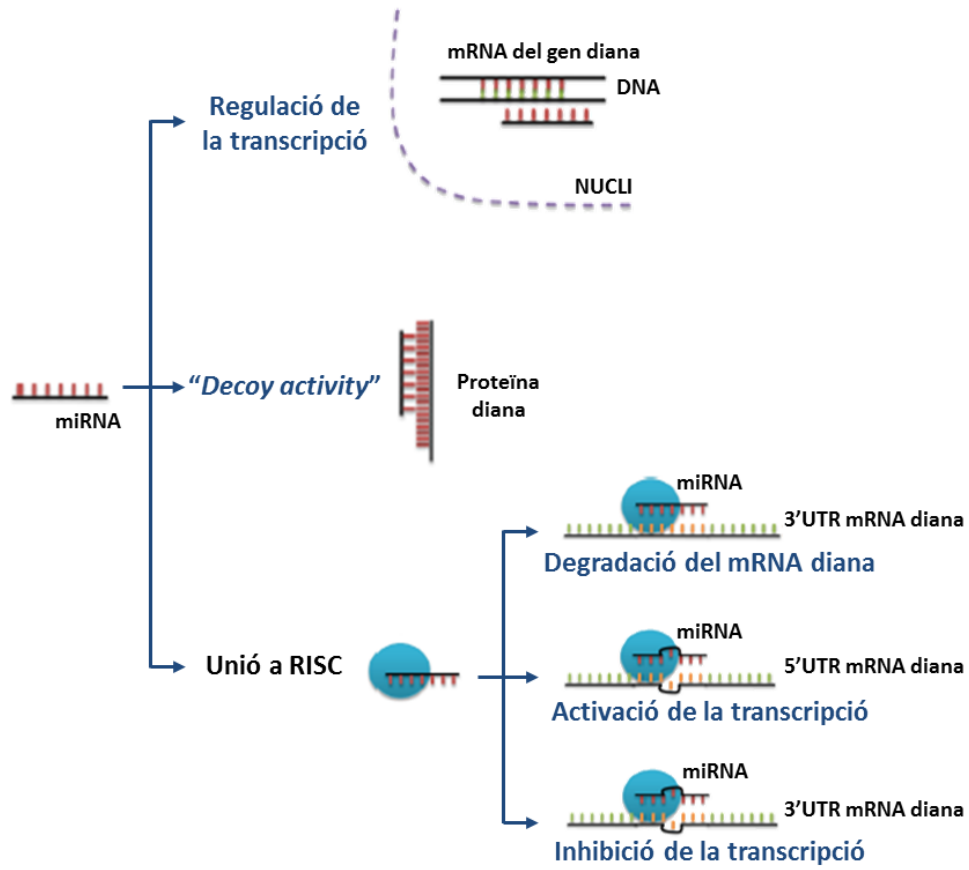


Figura 34. Principals funcions canòniques i no canòniques dels miRNAs.

1.4.5 microRNAs en càncer

La primera evidència que relacionà un miRNA amb la carcinogènesi va ser al 2002 per George Calin i Carlo Croce que descobriren que el clúster miR-15a/16-1 freqüentment es perd en la leucèmia limfocítica crònica (CLL) [259]. Aquesta troballa immediatament despertà l'interès de la societat científica i al 2006 es va publicar el primer treball que descrivia la funció biològica dels miRNAs, així com també el seu paper en el desenvolupament tumoral exercint rols d'oncogens o de supressors tumorals [260] (Figura 35).

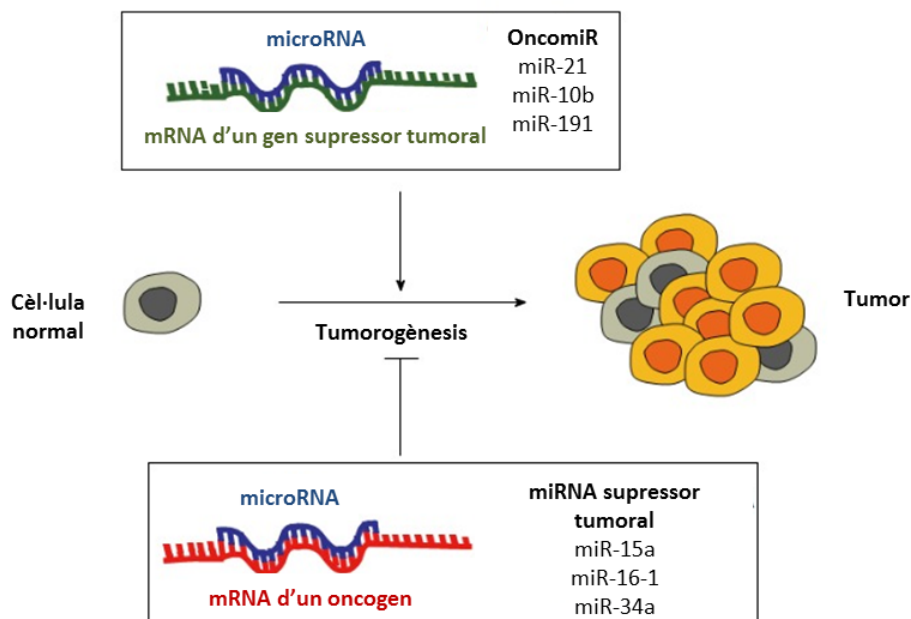


Figura 35. Funcions dels miRNAs en càncer. Els miRNAs inhibeixen l'expressió dels seus gens diana. Un miRNA oncogènic (oncomiR) reprimeix la traducció d'un gen supressor tumoral i estimula la tumorigènesi, en canvi un miRNA supressor tumoral inhibeix l'expressió d'oncogens i bloqueja la tumorigènesi. Adaptat de [261].

D'una banda, els miRNAs que estan altament expressats en tumors se'ls considera oncogens (oncomiRs) ja que promouen el desenvolupament del tumor degut a la inhibició dels gens supressors tumorals. MiR-21 és un exemple típic d'oncogen ja que està augmentat en molts tipus de càncer [260]. La sobreexpressió de miR-21 induïx el limfoma de cèl·lules pre-B en el model murí, estimula la carcinogènesi pulmonar mitjançant l'activació de la senyalització de MAPK i promou la metàstasi del CCR mitjançant la regulació del *PDCD4* [262]. D'altra banda, aquells miRNAs l'expressió dels quals es veu disminuïda en les cèl·lules tumorals, se'ls considera supressors tumorals i són els responsables de prevenir el desenvolupament del tumor tot inhibint oncogens i/o gens que controlen la diferenciació cel·lular o apoptosi. Alguns exemples són miR-15a/16-1 que té com a diana el *BCL2*, un oncogen associat amb l'apoptosi;

let-7 redueix els nivells dels oncogens *KRAS* i *MYC*; miR-34 controla l'expressió de *TP53* regulant diversos oncogens importants com *CDK4*, *MYC* i *MET* [236] (Figura 35).

Altres estudis més recents han demostrat el paper funcional dels microRNAs en el procés de metàstasi. Per exemple, s'ha demostrat que el panell format per miR-9, miR-10b, miR-103, miR-373 i miR-520c promou la metàstasi en models murins. Contràriament, altres miRNAs com ara miR-31, miR-34a, miR-126, miR-200, miR-206 i miR-335 són capaços de bloquejar la metàstasi [263].

No obstant, el concepte de miRNAs com a supressors tumorals o oncogens no s'ha d'estereotipar, ja que en funció del context cel·lular, un mateix miRNA pot exercir d'oncogen en un tipus tumoral i actuar de supressor tumoral en altres, fet que es coneix com "efecte pleiotròpic". Per exemple, la família miR-200 es considera un supressor tumoral degut al seu efecte inhibidor de la transició epiteli-mesenquima (EMT) [264, 265], però sembla que també promou que les CTCs colonitzin els òrgans metastàtics distants [266]. En conseqüència, miR-200 exerceix una funció de supressor tumoral o d'oncogen en diferents etapes del procés tumoral.

Malgrat encara queda molt per descobrir sobre els possibles mecanismes d'acció dels miRNAs, la punta de l'iceberg es va revelant a mesura que augmenten els estudis que relacionen els miRNAs amb la carcinogènesis. Actualment es considera que els miRNAs són un regulador indispensable per la biologia del càncer i la seva desregulació afecta a totes les etapes del procés tumoral [267]. Algunes de les principals funcions dels miRNA són les exposades a continuació (Figura 36):

1. Mantenir la senyalització proliferativa: miR-21 [268] i let-7 [269].
2. Reprogramar el metabolisme energètic: miR-23 i miR-103 [270].
3. Evitar la destrucció immunitària: miR-34a [271] i miR-124a [272].
4. Evadir els supressors de creixement: miR-221 i miR-222 [273].
5. Induir l'angiogènesi: miR-210 [274] i clúster miR-17-92 [275].
6. Activar la invasió i la metàstasi: miR-10b [276] i miR-224 [277].
7. Resistir a la mort cel·lular: miR-34a [278] i miR-15a / 16 [279].
8. Permetre la immortalitat replicativa: miR-29 [280] i miR-19b [281].

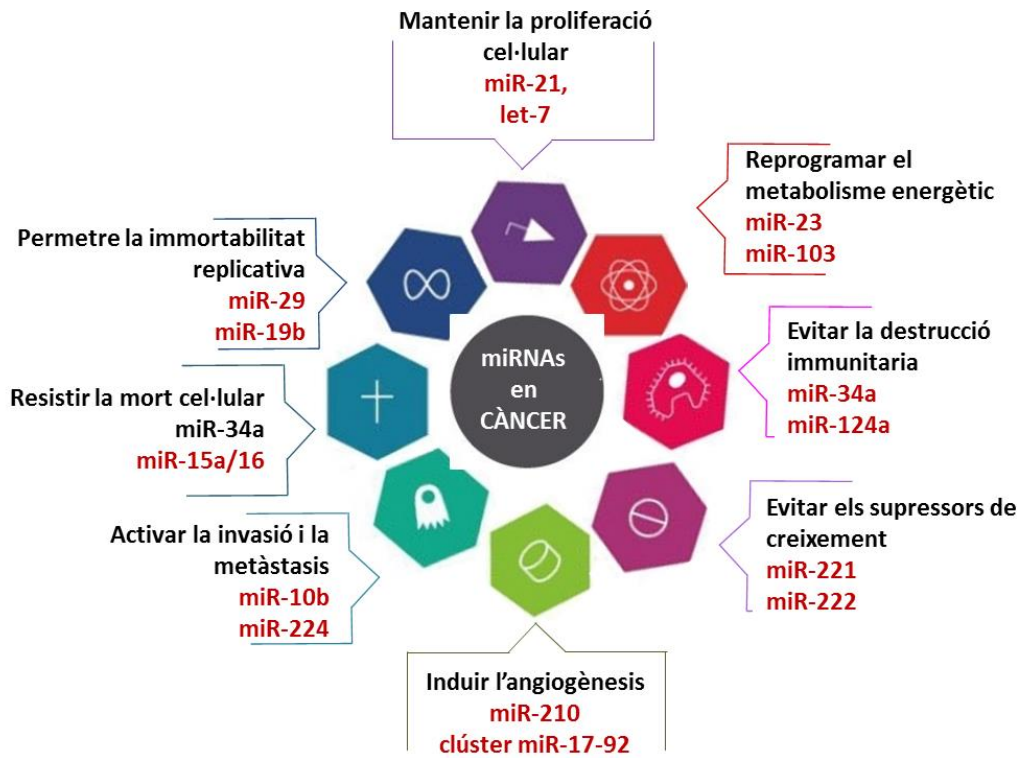


Figura 36. microRNAs i característiques del càncer. Exemples típics de miRNAs supressors de tumors o oncogens per a cada característica.

1.4.6 microRNAs en càncer colorectal

1.4.6.1 Perfils d'expressió de microRNAs alterats en CCR

Els estudis realitzats al llarg de la darrera dècada han reafirmat que canvis en l'expressió de miRNAs poden relacionar-se amb la iniciació i progressió del CCR. S'ha descrit que l'expressió de determinats miRNAs es veu alterada de manera reproducible en el CCR i els seus patrons d'expressió estan associats amb el diagnòstic, pronòstic i resultat terapèutic dels pacients. Tant és així que estudis recents han examinat la possibilitat d'utilitzar miRNAs circulants o fecals com a biomarcadors de detecció precoç no invasius i que podrien ser d'utilitat per a la classificació molecular i l'elecció del tractament més adequat. No obstant, malgrat la llarga llista de miRNA suggerits com a biomarcadors del CCR, encara cap d'ells s'empra amb finalitats clíniques [245].

Una revisió recent de 23 estudis de miRNAs en CCR descriu que dels 164 miRNAs significativament alterats en CCR, aproximadament 2/3 estan sobreexpressats i 1/3 infraexpressats en CCR [282].

Michael i col·laboradors van ser els primers en descriure que els patrons d'expressió de miRNA estaven alterats en CCR [283]. El seu estudi identificà la infraexpressió de miR-143 i miR-145 en tumors de CCR, suggerint la seva funció com a supressors tumorals. Des d'aleshores, augment exponencial d'evidències que relacionen els miRNAs amb la carcinogènesi i el seu impacte clínicopatològic, juntament amb els avenços tecnològics en el camp de la bioinformàtica i l'anàlisi de microarrays han permès identificar nous miRNA relacionats amb el CCR.

D'una banda, múltiples estudis descriuen l'activitat oncogènica de miR-21 en el CCR degut a l'important paper que juga en la iniciació, progressió i invasió tumoral. S'ha demostrat que miR-21 té com a diana el gen supressor tumoral *PTEN* fet que explicaria els seus baixos nivells d'expressió i d'activitat gènica en el CCR. També s'ha demostrat la relació entre miR-21 i el factor de transcripció *STAT3*, suggerint que baixos nivells d'expressió de *STAT3* es relacionen amb el procés carcinogènic degut a l'activació constitutiva de la IL6 [284]. A més, estudis *in vitro* mostren que el miR-21 està altament expressat en cèl·lules de CCR resistents a la quimioteràpia i, conseqüentment, la seva inhibició promou la diferenciació cel·lular tot sensibilitzant les cèl·lules als règims de quimioteràpia [285]. Un altre miRNA amb activitat oncogènica en el CCR és miR-135 capaç de disminuir l'apoptosis i incrementar el creixement cel·lular gràcies a la inhibició del gen *APC*, entre d'altres [286].

D'altra banda, els membres de la família miR-34 i miR-137 actuen com a supressors tumorals i sovint estan infraexpressats en CCR [287, 288]. En el cas dels membres de la família miR-34 (miR-34a, b i c) estan regulats per *TP53* i la transfecció de miR-34a en cèl·lules de CCR es relaciona amb la inhibició de la proliferació i la inducció d'apoptosi, almenys parcialment, gràcies a l'amplificació de la cascada de senyalització de *TP53*. També s'ha descrit que miR-34a és diana de la Sirtuina-1, fet que es relaciona amb la inducció de la transcripció de *TP53*. Aquests fets suggereixen l'existència d'una retroalimentació positiva entre *TP53* i miR-34a, i que miR-34a podria participar en la funció de *TP53* com a supressor tumoral [284, 286, 288]. A més, sembla que la família miR-34 podria formar part del mecanisme epigenètic relacionat amb la tumorigènesis del CCR, ja que s'ha descrit hipermetilació en els promotors de les illes CpG de miR-34b/c en la gran majoria de tumors primaris de CCR [288, 289].

Existeixen molts altres miRNAs alterats en CCR i descrits en diversos estudis, com el clúster miR-17-92, miR-106a, miR-31, miR-181b, miR-183, miR-135a/b, família miR-200, miR-203 i miR-224 [282]. Alguns dels principals miRNAs desregulats en el CCR apareixen a la taula 11.

L'estudi del perfil del genoma humà i les signatures de cromatina demostren que els mecanismes epigenètics també afecten als nivells d'expressió dels miRNAs en CCR. Així, alguns miRNAs amb funció de supressor tumoral com let-7, miR-1, miR-34, miR-342, miR-345, miR-9, miR-124, miR-129 i miR-137 freqüentment estan hipermetilats en tumors de colon, fet que permetria explicar la seva baixa expressió en càncer. A més, aquesta metilació irregular sovint s'esdevé en estadis inicials del desenvolupament del CCR [288, 290].

En aquest mateix context, la desregulació dels miRNA també podria induir alteracions en l'activitat d'alguns enzims de la maquinària epigenètica. Per exemple, miR-143 exerceix de supressor tumoral sobre la *DNMT3* i estudis *in vitro* que revelen que la inhibició de miR-143 en el CCR resulta en l'augment dels nivells d'expressió de *DNMT3A* en teixit de CCR [286, 288]. Seguint el mateix patró, miR-140 i miR-449 exerceixen el seu rol com a supressors tumorals tot inhibint *HDAC4* i *HDAC1*, respectivament. En conseqüència, la disminució dels nivells d'expressió de miR-140 i miR-449 característics del CCR podria relacionar-se amb alteracions en l'acetilació d'histones [289, 291]. A més, miR-342 s'ha relacionat amb la desregulació de la *DNMT1* contribuint a la hipermetilació d'alguns gens supressors tumorals [292]. De forma semblant, miR-627 s'ha vist implicat en la inhibició d'una histona desmetilasa, fet que permet que la vitamina D exerceixi la seva funció antitumoral [293].

La següent taula recull alguns exemples d'oncomiRs i miRNAs supressors de tumors en el CCR.

Taula 12. Alguns exemples de miRNAs que actuen com a oncogenes o gens supressors de tumors en CCR.

Adaptat de [294].

miRNA	Gen/s diana validats en CCR
OncomiRs elevats en CCR	
Clúster miR-17-92	<i>RBL2, CDC42, PTEN, HIF1A, CYP7B1, GABBR1, TGFBR2, VEGFA, PRRX1, DLC1, CDKN1A, BNIP2, SMAD4, SMAD7</i>
miR-21	<i>CDC25A, MSH2, MSH6, PDC4, RHOB, PTEN, CCL20, ITGB4</i>
miR-31	<i>SATB2, RHOBTB1, RASA1, HIF1AN</i>
miR-92a	<i>PTEN, KLF4, IQGAP2, BIM</i>
miR-95	<i>SNX1</i>
miR-135a/b	<i>APC</i>
miR-146a/b	<i>NUMB, CASR</i>
miR-155	<i>E2F2, MLH1, MSH2, MSH6, PTEN, SOCS1</i>
miR-196a/b	Desconegut
miR-221/222	<i>CDKN1C, PTEN, RECK, PDLIM2, ICAM1, ADAM17</i>
miR-499	<i>FOXO4, PDCD4</i>
miRNAs supressors tumorals disminuïts en CCR	
miR-34a/b/c	<i>AXL, CD24, SRC, PAR2, AXIN2, KIT, ZNF281, IL6R, FMNL2, E2F5, LMTK3, HMGB1, MYC, KITLG</i>
Let-7a/b/c/d/e/f/g/i	<i>CDC34, HMGA1, HMGA2, IGF2BP1</i>
miR-10a/b; -125a/b; -99a/b i -100	<i>HOXD10, KLF4, MCL1, BCLQ, IL6R, MTOR, RAP1B</i>
miR-25	<i>SMAD7</i>
miR-26a/b	<i>PDHX, LIN28B, ZCCHC11, HMGA1, MYCBP, SETD8, NAMPT</i>
miR-30a/b/c/d/e	<i>DTL, PIK3CD, IRS2, KRAS, BCL2, SIX1, ADAM19, HELZ, PIK3C2A</i>
miR-101	<i>COX2</i>
miR-137	<i>CDC42</i>
miR-143	<i>KRAS, DNMT3A, ERK5</i>
miR-145	<i>IRS-1,c-Myc, YES1, STAT1, OCT4, SOX2, KLF4, FLI1</i>
miR-192/215	<i>TYMS, BMI1, EFN2, MSH6, H3F3B</i>
miR-342	<i>DNMT1</i>
miR-365	<i>CCND1, BCL-2</i>
miR-451	<i>MIF</i>
miR-675	<i>RB</i>
miRNAs amb efecte pleiotròpic en CCR	
miR-15a/b, -16 i -195	<i>AP4, PTGS2, MYB, VEGFR2, BCL2, CARMA3, RAF1, UPC2, COPS2, MTSS1, KL</i>
miR-29	<i>KLF4, TIAM1, TCD7L2, SNAIL, BCL9L, LRP6, IGF1, GNAI13, PTP4A</i>
miR-200a/b/c, -141 i -429	<i>ZEB1, ZEB2, SIP1, DLC1, SOX2</i>
miR-483	<i>CKB, DLC1</i>

1.4.6.2 microRNAs en els estadis inicials del CCR

Existeixen diferències entre els patrons d'expressió de miRNAs corresponents a un epíteli normal, un adenoma o un adenocarcinoma de colon [295]. Aquests patrons d'expressió són consistents amb el model progressiu i acumulatiu de la carcinogènesi del colon i suggereixen un paper important dels microRNAs en la iniciació del CCR.

Recentment, l'estudi de Strubberg i Madison suggereix que les cèl·lules potencialment capaces d'iniciar el procés tumoral, conegudes com a "cèl·lules mare tumorals", podrien estar regulades per múltiples miRNAs [294], així com miR-34a [296, 297], miR-106b [298], miR-140 [299], miR-146a [300], miR-183 [301], miR-200 [301], miR-203 [301], miR-215 [302], miR-302b [303], miR-328 [304], miR-363 [305], miR-371 [306] and miR-451 [307]. Tals autors postulen que aquests miRNAs podrien interaccionar amb gens responsables del CCR, com *KRAS*, *BRAF*, *TP53* o certes vies de senyalització inflammatòries o de cèl·lules mare, com Wnt o Notch, per tal d'induir el desenvolupament del CCR tot guiant el destí de les cèl·lules mare o regulant la proliferació cel·lular [294].

A més, seguint en la mateixa línia s'han descrit un gran nombre d'evidències que relacionen els miRNAs amb la malignització de l'adenoma inicial. El miR-21 és un dels principals oncomiRs en el CCR i un clàssic exemple d'aquest fet ja que s'eleva tant en els adenomes com en els carcinomes de colon [308]. Els nivells d'expressió més elevats de miR-21 es correlacionen amb estadis més avançats de la malaltia [308, 309]. En consistència amb aquests resultats, per hibridació *in situ* es va demostrar que la freqüència i el nivell d'expressió de miR-21 s'incrementa durant la transició adenoma-carcinoma [310]. De la mateixa manera, miR-135b també pot participar en les primeres etapes del CCR ja que s'han descrit alts nivells de miR-135b en els adenomes i un dels seus mARN diana és el gen *APC* [311]. Una altre família d'oncomiRs important per la progressió del CCR és el clúster miR-17-92 (miR-17, miR-18a/b, miR-20a/b, miR-93 i miR-106a/b) [312]. Finalment, el silenciament de miR-137 [313] i miR-342 [314] en els adenomes de colon també suggereix un paper important d'aquestes molècules en l'inici del CCR.

S'ha descrit que els adenomes de colon tenen alts nivells de senescència que permeten controlar la malignització cel·lular, un procés en part regulat per algunes isoformes de *TP53* [315]. D'aquesta manera, un estudi mostra que l'expressió d'un miRNA diana de *TP53*, miR-34a, podria estar involucrat en desestabilitzar aquesta barrera de senescència i induir la progressió tumoral [316].

D'altra banda, existeixen famílies de miRNAs relacionades amb la prevenció del CCR gràcies a la seva funció antiproliferativa i diferenciadora: Let-7 (let-7a-1, let-7a-2, let-7a-3, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f-1, let-7f-2, let-7g, let-7i, miR-98 i miR-202), miR-10 (miR-10a/b, miR-99a/b, miR-100 i miR-125a/b) i miR-15 (miR-15, miR-16, miR-195; també pot incloure miR-424 i miR-497) [294].

1.4.6.3 microRNAs en els estadis avançats del CCR

Seguint en la mateixa línia, alguns patrons d'expressió de miRNAs s'han relacionat amb la progressió i invasió del CCR per mitjà de la seva interacció amb diferents components moleculars: miR-101 i ciclooxigenasa 2 (*COX-2*) [317], miR-499-5p i *FOXO4/PDCD4* [318], miR-675 i retinoblastoma (*RB*) [319], miR-29 i *MMP2* [320] i miR-95 i *SNX1* [321]. D'altra banda, també s'han descrit miRNAs que actuen com a supressors tumorals tot reprimint el creixement i la proliferació del tumor primari. Alguns d'aquests, juntament amb les seves dianes són els següents: miR-143 i miR-145 [322] relacionats amb la inhibició de múltiples oncogens, miR-30a-5p i *DTL* [323], miR-34a i *FRA1* [324], miR-192/miR-215 i *TP53* [325], miR-451 i el factor oncogènic de migració de macròfags (*MIF*) [326] i miR-365 i ciclina *D1/BCL-2* [327].

1.4.6.4 microRNAs en la metàstasi hepàtica derivada del CCR

El desenvolupament de la metàstasi es deu a la proliferació del tumor primari, la invasió de cèl·lules tumorals, la supervivència d'aquestes durant la migració a través de la sang perifèrica, l'adhesió a òrgans distants i, finalment la seva colonització mitjançant mecanismes proliferatius i angiogènics (Figura 37).

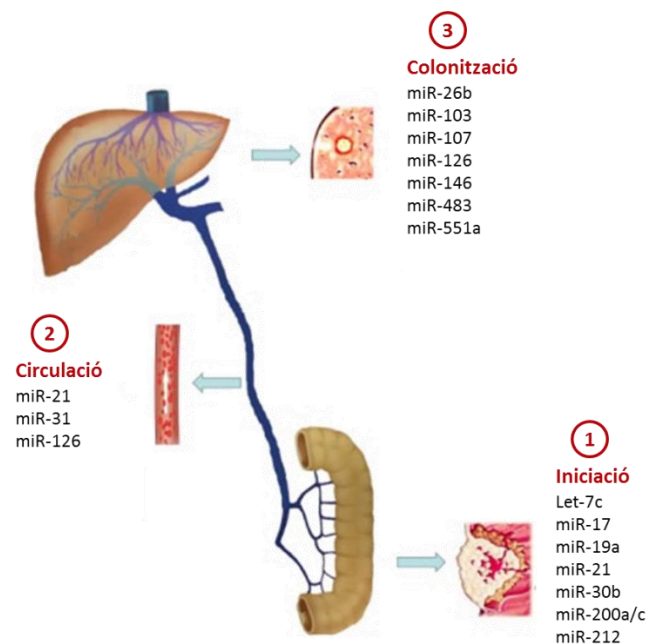


Figura 37. miRNAs associats a metàstasi hepàtica derivada de CC. Adaptat de [328].

Existeixen evidències que descriuen diferències entre el patró d'expressió d'alguns miRNAs entre el tumor primari i la metàstasi. Els miRNAs amb tals característiques podrien jugar un paper important alhora de conferir propietats invasives i migratòries a les cèl·lules malignes del tumor primari, activar enzims relacionats amb la metàstasi i induir la EMT .

En primer lloc, pel que fa a l'inici de la metàstasi, miR-19 s'ha relacionat amb la inhibició d'un enzim implicat en la regulació de la migració tumoral, la transglutaminasa 2 (*TG2*), i la conseqüent invasió cel·lular [329]. Una altre evidència d'aquest fet és la interacció entre miR-30b i *SIX1* que indueix la EMT [330]. A més, s'ha descrit que *PRL-3*, un protooncogen que promou la metàstasi, especialment en el CCR, activa a *STAT3* i aquest fomenta l'expressió de miR-21, miR-17 i miR-19a, els quals participarien en la proliferació i invasió tumoral [331].

En segon lloc, s'esdevé la intravassació i l'adhesió a l'òrgan diana, en el CCR generalment aquest és el fetge degut a la seva estreta relació anatòmica i vascular. S'ha postulat que miR-21 regula el factor programador de mort cel·lular *PDCD4* tot estimulant la invasió, intravassació i metàstasi [332]. També s'ha descrit la relació entre miR-126 i el factor de creixement epidèrmic *EGFL7* fet que inhibeix l'adhesió cel·lular i facilita la intravassació [333]. Recentment, també s'ha estudiat el paper de miR-31 i l'extravassació de la cèl·lula tumoral per mitjà de la desregulació de la E-selectina [334].

Finalment, l'últim pas de la cascada metastàsica s'atribueix a la colonització del fetge. Alguns miRNAs involucrats en el creixement tumoral i la metastatització en el CCR són el miR-26b [335] i miR-103/107 [336], mentre que d'altres com miR-551a [337], miR-483 [337] i miR-195 [338] es defineixen com a potencials supressors del creixement metastàtic.

[1.4.6.4 microRNAs pronòstic en el CCR](#)

L'expressió de determinats miRNAs s'associa amb el pronòstic del CCR.

Un dels miRNAs amb valor pronòstic més estudiats en el CCR és el miR-21, definit com un marcador pronòstic independent. Alts nivells d'expressió de miR-21 s'associen amb un pitjor pronòstic i aquest resultat s'ha validat en almenys 3 estudis independents basats en pacients de 3 ètnies diferents [339-341].

Altres miRNAs amb valor pronòstic identificats en el CCR són miR-10b-5p, miR-17-5p, miR-18a-5p, miR-19b-3p, miR-92a-3p, miR-125b-5p, miR-155-5p, miR-181a-5p, miR-185-5p, miR-194-5p, miR-200c-3p, miR-215 i miR-372, alts nivells dels quals en teixit es relacionen amb mal pronòstic. En canvi, baixos nivells tissulars de miR-16-5p, miR-22-3p, miR-93-5p, miR-106a-5p, miR-124-3p, miR-126-3p, miR-128, miR-133b, miR-135b-5p, miR-195-5p, miR-212-3p i miR-362-

3p s'associen a mal pronòstic en CCR. En referència a l'estudi en plasma, s'ha descrit que alts nivells de miR-140-5p, miR-141-3p, i miR-221-3p es relacionen amb pitjor pronòstic, mentre que baixos nivells de miR-143-3p i miR-1224-5p també prediuen mal pronòstic [342].

S'han descrit molts altres miRNAs amb valor pronòstic, alguns dels quals són els següents: let-7g [343], miR-15b [343], miR-29 [344], miR-106b [345], miR-145 [343, 346], miR-192 [343], miR-320 [347] i miR-498 [347]. A més, l'elevada expressió de l'enzim Dicer, involucrat en la biogènesis dels miRNAs, s'associa a mal pronòstic en CCR [348].

HIPÒTESI I OBJECTIUS

2. Hipòtesi i objectius

2.1 Fonaments de la hipòtesi

En el colon, el retorn venós s'esdevé a través de les dues venes mesentèriques, superior i inferior, que finalment drenen a la vena porta. Aquesta disposició anatòmica, permet explicar el fet que les metàstasis més freqüents dels tumors de colon s'esdevinguin al fetge. En conseqüència, l'obtenció de mostres de sang procedent del tumor primari abans de que aquesta assoleixi l'òrgan diana, pot proporcionar una valuosa informació per detectar biomolècules responsables de l'inici del desenvolupament metastàtic.

2.2 Hipòtesi

En els pacients no metastàtics de càncer de colon, l'obtenció de sang a través de les venes mesentèriques pot facilitar la identificació de biomarcadors, com miRNAS i exosomes, que participin en l'inici del procés metastàtic. D'altra banda, la identificació d'aquets biomarcadors en les mostres de sang obtingudes a partir de venes perifèriques (avantbraç) pot ser més problemàtica i difícil, ja que tals molècules poden haver quedat retingudes en l'òrgan diana on metastatitzen i, per tant, estan més diluïdes en l'extensa xarxa de la circulació perifèrica.

2.3 Objectius

Basant-nos en la present hipòtesi, es plantegen els següents objectius.

2.3.1 Objectiu general

Identificar la rellevància clínica i biològica dels miRNAs lliures en plasma i del contingut específic dels exosomes aïllats directament de la sang procedent del tumor primari en pacients de càncer de colon.

2.3.2 Objectius específics

1. Comprovar si els miRNAs lliures en sang, aïllats de VM i VP, es correlacionen per igual amb les característiques clíniques i patològiques dels pacients de càncer de colon.
2. Analitzar si existeix un perfil de miRNAs específic procedents de VM o de VP i que es relacioni amb les característiques clíniques i patològiques dels pacients de càncer de colon.
3. Identificar microRNAs associats a exosomes procedents de VM o de VP i la seva relació amb les característiques clíniques i patològiques dels pacients de càncer de colon.
4. Identificar *in vitro* les dianes gèniques dels microRNAs exosomals i la seva relació amb el desenvolupament del càncer de colon.
5. Comprovar si el contingut proteic dels exosomes permet detectar factors que es relacionin amb les metàstasis hepàtiques.

RESULTATS

3. Resultats

3.1 Article primer: “*Differential miR-21 expression in plasma from mesenteric versus peripheral veins*”

Resum

La principal causa de mort dels pacients amb tumors sòlids és la metàstasi. L’anàlisi de plasma i sèrum en pacients amb càncer pot ajudar a identificar biomarcadors òptims per predir la recaiguda i la metàstasi en aquest grup de pacients. Es suggereix que les venes més pròximes al tumor primari probablement continguin major concentració de les molècules alliberades per aquest, com per exemple miRNAs i proteïnes, abans de que arribin a l’òrgan diana on metastatitzen. El present treball pretén ser un estudi pilot retrospectiu sobre l’avantatge que confereix analitzar les molècules contingudes en el plasma de les venes que drenen directament del tumor primari en comparació amb la circulació perifèrica. Per això s’ha estudiat un miRNA oncogènic clàssicament associat al CCR, el miR-21, en mostres aparellades de teixit tumoral i normal i de vena mesentèrica (VM) i perifèrica (VP) en una sèrie de 57 pacients quirúrgics de CC.

Les principals característiques clínicopatològiques dels 57 pacients de la sèrie estudiada són les següents: homes (60%) i dones (40%), mitjana d’edat de 70 anys, la majoria d’estadi I-II (62%), estadi III (26%) i estadi IV (12%), i el 50% d’aquests varen rebre tractament adjuvant amb fluoropirimidines.

Els resultats mostren que l’expressió de miR-21 és significativament major en el plasma procedent de la VM que de la VP ($P=0.005$), fet que correlaciona amb els resultats del teixit normal i tumoral ($P<0.001$). Alhora, pel que fa a l’estadiatge, els nivells de miR-21 són majors en el plasma procedent de la VM que de la VP en els estadis I i II ($P=0.001$), però no es troben diferències estadísticament significatives en els estadis III i IV. Pel que fa a la localització anatòmica, es descriu una associació estadísticament significativa entre aquesta i els nivells de miR-21 procedents tant de la VP ($P=0.01$) com de la VM ($P=0.003$). Pel que fa als nivells de miR-21 en els 8 pacients que desenvoluparen metàstasi en zones drenades per la VM del colon, s’ha descrit una diferència estadísticament significativa entre els nivells de miR-21 en el plasma procedent de la VM respecte la VP ($P=0.02$).

Dels 57 pacients, 5 eren d’estadi IV al diagnòstic i no es varen incloure per estudiar la supervivència lliure de malaltia (DFS). Els 52 pacients restants mostren que nivells alts de miR-21 procedents de VM tenen pitjor pronòstic que els que presenten nivells més baixos ($P=0.05$).

El mateix passa amb els nivells de miR-21 identificats en VP, nivells alts de miR-21 en VP cursen pitjor que nivells baixos d'aquest ($P=0.07$). De forma interessant, quan els valors de miR-21 procedents tant de VP com de VM estan baixos, el pronòstic és millor en comparació d'aquells que tenen alts nivells en ambdós casos ($P=0.03$). Finalment, quan es compara aquest darrer subgrup de pacients amb alts nivells de miR-21 en VP i VM amb la resta de pacients analitzats, s'evidencia una recaiguda molt precoç de manera que manifesten un pitjor pronòstic ($P=0.01$).

Aquests resultats, suggereixen que el tumor primari de colon allibera altes concentracions de l'oncomiR miR-21 a través de la VM i aquests nivells queden relativament diluïts en la circulació perifèrica, fet que dificulta la seva utilitat com a biomarcador pronòstic en sang perifèrica però evidencia el gran potencial d'estudiar les venes que drenen directament del tumor primari.

Article “Differential miR-21 expression in plasma from mesenteric versus peripheral veins”

OPEN

Differential MIR-21 Expression in Plasma From Mesenteric Versus Peripheral Veins

An Observational Study of Disease-free Survival in Surgically Resected Colon Cancer Patients

Mariano Monzo, MD, PhD, Francisco Martínez-Rodenas, MD, PhD, Isabel Moreno, MD, PhD, Alfons Navarro, PhD, Sandra Santasusagna, MS, Ismael Macias, MD, Carmen Muñoz, MS, Rut Tejero, PhD, and Raquel Hernández, MD

Abstract: Findings on the role of plasma miR-21 expression in colorectal cancer are contradictory. Before reaching a peripheral vein (PV), microRNAs released by the tumor are dispersed throughout the body. We hypothesized that blood drawn from the mesenteric vein (MV) near the site of the primary tumor could provide more homogeneous information than blood drawn from the PV.

We have analyzed miR-21 expression in matched samples of tumor tissue, normal tissue, MV plasma, and PV plasma in 57 surgically resected patients with colon cancer and correlated our findings with clinical characteristics and disease-free survival (DFS).

miR-21 expression was higher in MV than PV plasma ($P=0.014$) and in tumor than in normal tissue ($P<0.001$). Patients with high levels of miR-21 in MV plasma had shorter DFS ($P=0.05$) than those with low levels, and those with high levels in both MV and PV plasma had shorter DFS than all other patients ($P=0.01$).

Our findings suggest that the primary tumor in colon cancer releases high concentrations of miR-21 in the MV but that these concentrations are later diluted in the circulatory system. MV expression of miR-21 may be a stronger prognostic marker than PV expression.

(*Medicine* 94(1):e145)

Abbreviations: CRC = colorectal cancer, CT = computed tomography, DFS = disease-free survival, miRNA = microRNA, MV = mesenteric vein, PV = peripheral vein.

Editor: Maria Kapritsou.

Received: June 18, 2014; revised and accepted: September 5, 2014.

From the Molecular Oncology and Embryology Laboratory, Human Anatomy Unit, School of Medicine, University of Barcelona, IDIBAPS, Barcelona (MM, AN, SS, IM, CM, RT); Department of Medical Oncology and Surgery, Hospital Municipal de Badalona, Badalona, Spain (FM-R, IM, RH).

Correspondence: Mariano Monzo, Department of Human Anatomy and Embryology, School of Medicine, University of Barcelona, Casanovas 143, 08036 Barcelona, Spain (e-mail: mmonzo@ub.edu).

This study was partially supported by a grant from SDCSC (*Servei de Donació del Cos a la Ciència*). RT is recipient of an APIF (*Ajuts de Personal Investigador Predoctoral en Formació*) grant from the Universitat de Barcelona. Neither of these funding bodies had a role in the design and conduct of the study; collection, management, analysis, and interpretation of the data; preparation, review, or approval of the manuscript; or decision to submit the manuscript for publication.

The authors have no conflicts of interest to disclose.

Copyright © 2015 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License 4.0, where it is permissible to download, share and reproduce the work in any medium, provided it is properly cited. The work cannot be changed in any way or used commercially.

ISSN: 0025-7974

DOI: 10.1097/MD.0000000000000145

INTRODUCTION

Colorectal cancer (CRC) is the third most common type of cancer and the second cause of cancer death worldwide.¹ The main prognostic factor for relapse and survival in CRC is disease stage, and patients with stage III disease have a higher risk of relapse than those with stage II. Surgery is the standard treatment for stage I to III, and adjuvant treatment has been shown to be effective in stage III but less so in stage II.² Prognostic and predictive biomarkers can provide a useful tool for selecting treatment and improving outcome in these patients. The analysis of biomarkers in the plasma or serum of CRC patients is a noninvasive yet effective way to determine prognosis, detect occult tumors, and monitor treatment.

MicroRNAs (miRNAs), noncoding RNAs that play a key role in the regulation of mRNA expression, are promising diagnostic and prognostic biomarkers in several cancers.³ Numerous studies have shown that miRNAs are aberrantly expressed during tumor development and can act either as oncogenes or tumor suppressors.^{4,5} The specific mechanism whereby tumor cells release miRNAs into the blood is not completely understood. Recent studies have shown that exosomes and microvesicles can act as miRNA transporters,⁶⁻⁸ whereas other studies have found that miRNAs circulate freely in blood by binding to the AGO-2 protein complex, which prevents the digestion of RNase in plasma.⁹

miR-21 was the first tumor-related miRNA to be identified, detected in the serum of a patient with B-cell lymphoma.¹⁰ Since then, miR-21 has been widely studied in tumor, plasma, and serum samples, both in CRC and in other tumors, where it controls carcinogenesis by targeting different genes, including TPM1,¹¹ PDCD4,^{12,13} PTEN,¹⁴ and BTG2.¹⁵ In hepatocellular carcinoma¹⁶ and non-small-cell lung cancer,¹⁷ plasma and serum levels of miR-21 have been identified as reliable biomarkers for both diagnosis and prognosis. In addition, post-operative levels of miR-21 were lower than baseline levels in both gastric cancer¹⁸ and squamous cell carcinoma of the esophagus.¹⁹

In CRC, some studies have identified miR-21 in serum^{20,21} or plasma^{22,23} as a useful diagnostic and prognostic biomarker. However, in other studies, miR-21 expression was not detected in the peripheral blood of CRC patients, although other miRNAs, including miR-17-3- miR-92,²⁴ miR-29a,²⁵ miR92a,²⁶ and miR-221,²⁷ were identified as circulating tumor biomarkers. These contradictory findings may be due to various causes, including differences in patient characteristics, internal controls, and cutoff values. Importantly, all previous studies of circulating miR-21 in CRC have consistently obtained circulating miRNAs from an area far from the primary tumor, generally from a peripheral vein (PV) located in the forearm. However,

before reaching the PV of the forearm, the miRNAs released by the tumor are diluted and dispersed in other parts of the body, which may explain the inconsistency between miRNA expression levels in the tumor itself and those detected in peripheral blood.

In CRC, venous return occurs through the superior mesenteric vein (MV) if the tumor is located in the right colon, through the inferior MV if the tumor is located in the left colon, and through the iliac veins if the tumor is located in the middle or lower third rectum. Therefore, we can hypothesize that in colon cancer, blood samples drawn from the MV near the site of the primary tumor can provide more homogeneous and effective information than blood drawn from the PV of the forearm. To test this hypothesis, we have analyzed miR-21 expression in paired samples of tumor tissue, normal tissue, plasma obtained by blood drawn from the MV, and plasma obtained by blood drawn from the PV in 57 surgically resected patients with colon cancer and correlated our findings with the clinical characteristics and disease-free survival (DFS) of these patients.

METHODS

Eligibility and Patient Evaluation

From August 2009 to August 2013, samples were obtained from 57 patients with stage I to IV colon cancer who underwent surgical resection at the Municipal Hospital of Badalona. Approval for the study was obtained from the institutional review board of the hospital, and signed informed consent was obtained from all patients and controls in accordance with the Declaration of Helsinki.

All 57 patients underwent a complete history and physical examination including routine hematological and biochemical analyses, chest radiographs, and computed tomography (CT) of the thorax and abdomen. Target lesions detected by abdominal ultrasound were also assessed by CT or magnetic resonance imaging.

Samples

For all 57 patients, we obtained tumor tissue, paired normal tissue, MV blood, and PV blood. Normal tissue was obtained from the area of the colon farthest from the tumor. Both tumor and normal tissue samples were analyzed and confirmed by a pathologist and frozen at -80°C for further use.

On the day of surgery, 5 mL of blood was drawn from the PV and stored in heparinized tubes. During surgery, with vascular ligation before tumor resection, an additional 5 mL of blood was drawn from either the superior or the inferior MV, according to the anatomic location of the tumor. Blood samples from 18 healthy individuals (young male athletes) were obtained from the blood bank of the Hospital Clinic for use as controls. All blood samples were centrifuged at 5000g during 5 min, and plasma was centrifuged at 10,000g during 10 minutes at 4°C to eliminate remaining cells. Plasma samples were frozen at -80°C for further use.

RNA Extraction and miRNA Quantification

Total RNA was extracted from fresh tumor and paired normal tissue and from PV plasma and paired MV plasma using miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. miRNA detection was performed using commercial assays (TaqMan MicroRNA assays, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) for miR-21, in the 7500 Sequence Detection System (Life

Technologies). The appropriate negative controls (non-template control) were also run in each reaction. All reactions were performed in duplicate. Relative quantification was calculated using the formula $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. Normalization was performed with miR-191.

Statistical Analyses

Differences between ≥ 2 groups were calculated using the Mann–Whitney *U* test or the Kruskal–Wallis test as appropriate. miR-21 expression levels were dichotomized according to the fixed threshold method using the maxstat package of R to determine the optimal cutoff that best discriminated between different groups of patients for DFS. Fifty-two patients were evaluable for DFS; the 5 stage IV patients in whom only the primary tumor—but not the metastasis—was removed were not included in the analysis of DFS. DFS was calculated from the date of surgery to the date of death, relapse, or last follow-up. The univariate analysis of DFS was performed with the Kaplan–Meier method and compared using the log-rank test. All statistical analyses were performed with SPSS 14.0 (SPSS Inc, Chicago, IL) and R 2.6.0 Software (Vienna, AU). Statistical significance was set at $P \leq 0.05$.

RESULTS

miR-21 Expression in Plasma and Tissue

Median miR-21 expression (fold change) was 0.2874 in MV plasma, 0.1805 in PV plasma, and 0.0201 in plasma from healthy controls. Median miR-21 expression in tumor and normal tissue was 0.3907 and 0.1733, respectively. miR-21 expression was significantly higher in MV plasma compared with PV plasma ($P = 0.005$) (Figure 1A). miR-21 expression was also significantly higher in tumor than in normal tissue ($P < 0.001$) (Figure 1A).

Patient Characteristics and miR-21 Expression

Table 1 shows the clinicopathologic characteristics of the 57 patients included in the study. Median age was 70 years. Thirty-four patients were males and 23 females. At diagnosis, 35 patients were having stage I to II of cancer, 15 stage III, and 7 stage IV. All patients underwent surgical resection; in 2 of the 7 stage IV patients, both the primary tumor and the metastasis were removed. Twenty-eight patients received adjuvant therapy with fluoropyrimidines.

MV miR-21 levels correlated positively with tumor size ($P = 0.04$) and showed a trend toward correlation with carcinoma embryonic antigen levels ($P = 0.08$). Among patients with stage I to II disease, miR-21 levels were higher in MV plasma than in PV plasma ($P = 0.001$), whereas no significant differences were observed among patients with stage III to IV disease (Figure 1B). A highly significant association was observed between MV miR-21 levels and the anatomic location of the tumor ($P = 0.003$), whereas the association with PV miR-21 levels was less significant ($P = 0.01$) (Table 1, Figure 1C).

miR-21 Expression and Metastases

Of the 13 patients who developed metastases during the course of the disease, 8 had metastases in areas drained by the MV of the colon: 4 peritoneal metastases, 2 liver metastases, and 2 anastomotic. Of these 8 patients, 7 had higher miR-21 expression levels in MV plasma than in PV plasma ($P = 0.02$) (Table 2, Figure 1D).

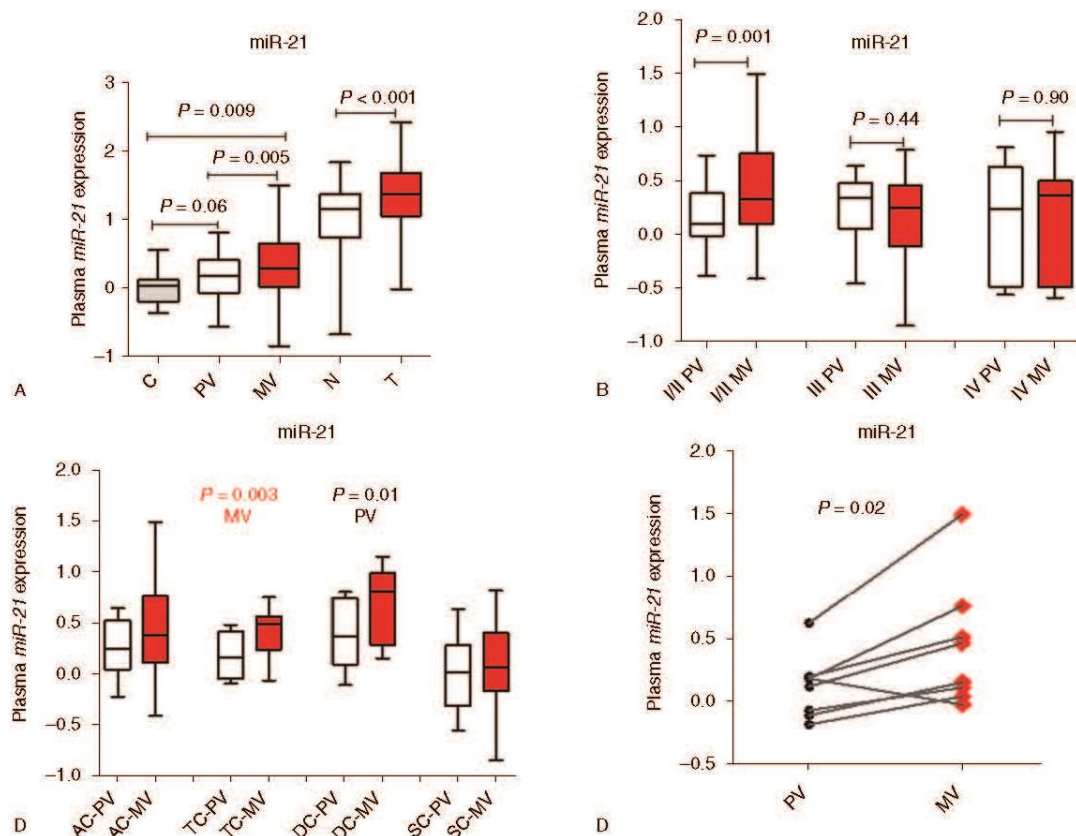


FIGURE 1. miR-21 expression levels (fold change) in plasma and tumor. (A) In plasma from healthy C and from the PV and MV of colon cancer patients and in matched T and N tissue samples from the same patients. (B) In plasma from the PV and MV of colon cancer patients classified by disease stage. (C) In plasma from the PV and MV of colon cancer patients classified by the anatomic location of the tumor. (D) In plasma from the PV and MV in 8 patients who developed locoregional metastases. AC = ascending colon, C = controls, DC = descend-descending colon, MV = mesenteric vein, N = normal, PV = peripheral vein, SC = sigmoid colon, T = tumor; TC = transverse colon.

miR-21 Expression and DFS

Fifty-two patients were evaluable for DFS. Median DFS was not reached among the 8 patients with low levels of miR-21 in MV plasma, compared with 32.2 months (95% confidence interval [CI] 27.9–37.5) for the 44 patients with high levels of miR-21 ($P=0.05$; Figure 2A). Median DFS was 38.1 months (95% CI 32.1–44.2) for the 24 patients with low levels of PV miR-21 and 30.1 months (95% CI 23.5–36.7) for the 28 patients with high levels ($P=0.07$; Figure 2B).

To further evaluate whether the levels of miR-21 in both MV and PV plasma could have a combinatory effect on DFS, we classified patients in 3 groups: those with high miR-21 levels in both MV and PV plasma, those with low levels in both MV and PV plasma, and those with other combinations of miR-21 levels. Median DFS for the 8 patients with low MV and PV miR-21 was not reached, compared with 29.1 months (95% CI 22.2–35.9) for the 26 patients with high MV and PV miR-21 and 31.2 months (95% CI 24.9–37.5) for the remaining 18 patients ($P=0.03$; Figure 2C). Based on these findings, we then compared DFS in the 26 patients with high miR-21 expression in both MV and PV plasma with all other patients. Median DFS was 29.1 months (95% CI 22.2–35.9) for these 26 patients

versus 40 months (95% CI 34.8–45.2) for the remaining patients ($P=0.01$; Figure 2D).

DISCUSSION

The main cause of death in patients with solid tumors is the development of metastases. The analysis of plasma and serum from cancer patients can help identify reliable biomarkers to predict relapse and metastasis in these patients. Recent findings suggest that the primary tumor can release proteins and miRNAs into the blood, which will organize a microenvironment known as a premetastatic niche in an area far from the primary tumor. This premetastatic niche will then provide support for the nesting and growth of metastatic tumor cells.^{28,29} Logically, the veins that are nearest the primary tumor would be most likely to contain the greatest concentration of these proteins and miRNAs.

The present study shows that miR-21 expression levels are significantly higher in MV plasma than in PV plasma. This finding suggests that the primary tumor in colon cancer releases high concentrations of miR-21 in the MV, but that these concentrations are later diluted in the circulatory system. This would explain why in other studies, only approximately 30% of

TABLE 1. Patient Characteristics

Characteristics	N (%), N = 57	P value for Association With miR-21 Expression	
		Plasma From Mesenteric Vein	Plasma From Peripheral Vein
Sex		0.5	0.05
Male	34 (60)		
Female	23 (40)		
Median age, y	70	0.5	0.2
CEA levels			
≤5	38 (67)	0.08	0.4
>5	19 (33)		
C 19.9 levels			
≤37	50 (88)	0.1	0.09
>37	7 (12)		
Tumor location			
Ascending colon	17 (30)		
Transverse colon	8 (14)	0.003	0.02
Descending colon	7 (12)		
Sigmoid colon	25 (44)		
Tumor size, cm			
>5	14 (24)	0.05	0.2
≤5	42 (74)		
unknown	1 (2)		
Histological type			
Well differentiated	50 (88)	0.5	0.3
Poorly differentiated	7 (12)		
Preexistent polyp			
Absent	44 (77)	0.5	0.2
Present	13 (23)		
Perilymphatic invasion			
Absent	52 (91)		
Present	4 (7)	0.1	0.1
unknown	1 (2)		
TNM stage			
I–II	35 (62)	0.8	0.6
III	15 (26)		
IV	7 (12)		
Adjuvant treatment			
Fluoropyrimidines	28 (50)	0.8	0.8
Palliative	5 (8)		
None	24 (42)		

CEA = carcinoma embryonic antigen, TNM = tumor, nodule, metastasis.

TABLE 2. Characteristics of 8 Patients Who Developed Locoregional Metastases

Patient	miR-21 Expression in PV Plasma	miR-21 Expression in MV Plasma	Disease Stage	Tumor location	Type of Metastasis
1	0.180685	-0.027026	IIIC	Sigmoid colon	Anastomotic leakage
2	-0.186873	0.036793	IIIB	Sigmoid colon	Liver
3	-0.073384	0.108137	IIIC	Sigmoid colon	Peritoneal
4	-0.112819	0.149980	IIA	Ascending colon	Anastomotic leakage
5	0.117168	0.462750	IIB	Transverse colon	Peritoneal
6	0.197543	0.511818	IIIC	Transverse colon	Liver
7	0.180384	0.759566	IIIC	Transverse colon	Peritoneal
8	0.625005	1.499196	IIB	Transverse colon	Peritoneal

MV = mesenteric vein, PV = peripheral vein.

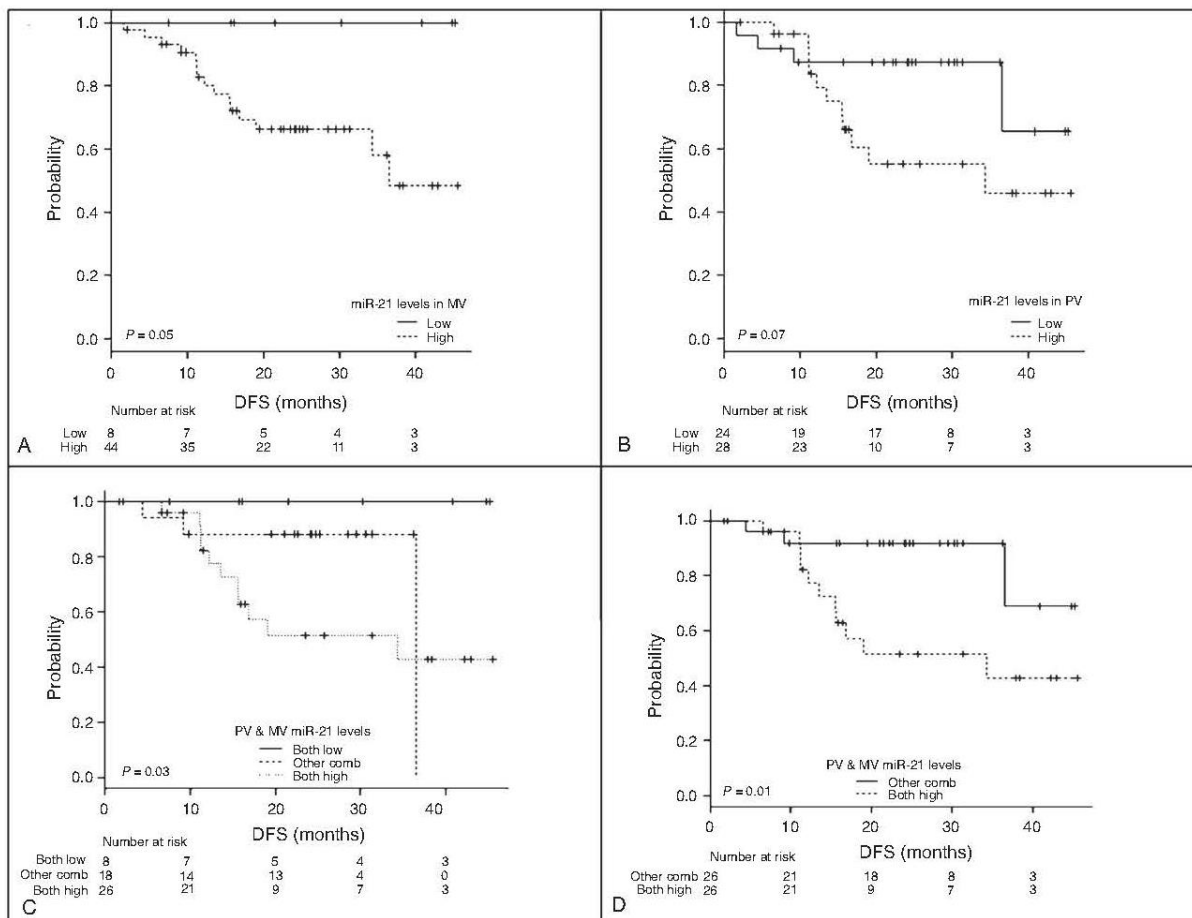


FIGURE 2. DFS according to miR-21 levels (fold change). (A) DFS according to miR-21 expression in plasma from the MV. (B) DFS according to miR-21 expression in plasma from the PV. (C) DFS in patients with high miR-21 expression in both MV and PV plasma compared with those with low expression in both the MV and the PV and those with high miR-21 expression in both MV and PV plasma compared with all other patients. (D) DFS in patients with high miR-21 expression in both MV and PV plasma compared with all other patients. DFS = disease-free survival, MV = mesenteric vein, PV = peripheral vein.

miRNAs detected in PV plasma or serum mirrored those found in the primary tumor.³⁰

Furthermore, miR-21 levels in MV plasma showed a trend toward correlation with CEA5 levels. In fact, previous studies have shown that in patients with CRC, CEA5 levels are higher in the MV than in the PV.^{31,32} A previous study with a large cohort of patients²⁰ found a correlation between tumor size and miR-21 expression in PV plasma; our findings are similar, but we observed this correlation only in MV plasma. We also found an association between the anatomic location of the tumor and miR-21 expression levels in both MV and PV plasma, although miR-21 expression was higher in MV than in PV plasma. In addition, recent studies in CRC patients have observed circulating tumor cells in blood obtained from MVs and from hepatic veins.³³ Taken together with these previous results, our findings indicate that veins near the tumor are the best source of biomarkers.

Similar to our findings, previous studies found no association between miR-21 expression and tumor stage, which may have been due to the use of different internal controls in these studies.²¹ However, among patients with stage I to II disease, we did observe a significant overexpression of miR-21 in MV

plasma compared with PV plasma, which would confirm previous reports^{20,21} that miR-21 is overexpressed in the early stages of tumor development.

At 4 years of follow-up, patients with high miR-21 levels in MV plasma had a significantly worse prognosis than those with low levels; in contrast, no differences were observed according to miR-21 levels in PV plasma, which suggests that miR-21 is more easily detected in MV than in PV plasma. Interestingly, however, patients with high miR-21 expression in both MV and PV plasma had a significantly shorter DFS than those with low levels in either MV or PV plasma. We can speculate that whether initial MV and PV levels are high; PV levels that remain high throughout follow-up may well be used to identify patients with a high risk of relapse.

Interestingly, the 8 patients who relapsed and developed metastases in areas drained by the MV of the colon—the liver and intestines—had higher levels of MV miR-21 than PV miR-21. In contrast, metastases in areas not drained by the MV of the colon—such as the lung—were not associated with miR-21 expression levels. In fact, miR-21 has been associated with hepatocellular tumors in several studies, which have shown that miR-21 targets several genes—such as MAP2K3,³⁴ PDCD4,³⁵

and PTEN³⁶—leading to the development of hepatocellular carcinomas. In a large cohort of patients with hepatocellular carcinomas, array analysis identified a panel of 7 miRNAs (miR-122, miR-192, miR-21, miR-223, miR-26a, miR-27a, and miR-801), wherein miR-21 expression levels were able to distinguish patients from healthy controls.³⁷

It has recently been reported that miRNAs released by the primary tumor can play a key role in preparing the premetastatic niche.^{38,39} miR-21 and miR-29a are released by tumor cells through exosomes, which bind to the Toll-like receptors of immune cells. The activation of the Toll-like receptors leads to the release of tumor necrosis factor- α and interleukin-6, which in turn prepare the extracellular environment for tumor growth and dissemination.⁴⁰ Our findings suggest that the miRNAs released in the MV may be retained in areas near the primary tumor (liver and intestines), where they could work to build the premetastatic niche. To validate these findings, however, further research on other miRNAs associated with colon cancer should compare expression levels in MV and PV plasma and examine the potential association between MV plasma expression and locoregional metastases. The findings of the present study will hopefully act as a springboard to strengthen collaboration among surgeons, medical oncologists, and molecular biologists with the aim of improving outcome in colon cancer patients.

REFERENCES

- Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin*. 2013;63:11–30.
- Gray R, Bamwell J, McConkey C, et al. Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study. *Lancet*. 2007;370:2020–2029.
- Yang X, Lee Y, Fan H, et al. Identification of common microRNA-mRNA regulatory biomarkers in human epithelial cancers. *Chin Sci Bull*. 2010;55:3576–3589.
- Schwarzenbach H, Nishida N, Calin GA, et al. Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014;11:145–156.
- Allegra A, Alonci A, Campo S, et al. Circulating microRNAs: new biomarkers in diagnosis, prognosis and treatment of cancer (review). *Int J Oncol*. 2012;41:1897–1912.
- Peinado H, Aleckovic M, Lavotshkin S, et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med*. 2012;18:883–891.
- Gibbins DJ, Ciaudo C, Erhardt M, et al. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat Cell Biol*. 2009;11:1143–1149.
- Roberts CT Jr, Kurre P. Vesicle trafficking and RNA transfer add complexity and connectivity to cell-cell communication. *Cancer Res*. 2013;73:3200–3205.
- Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:5003–5008.
- Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2008;141:672–675.
- Zhu S, Si ML, Wu H, et al. MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). *J Biol Chem*. 2007;282:14328–14336.
- Chang KH, Miller N, Kheirleisid EA, et al. MicroRNA-21 and PDCD4 expression in colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2011;37:597–603.
- Qi L, Bart J, Tan LP, et al. Expression of miR-21 and its targets (PTEN, PDCD4, TM1) in flat epithelial atypia of the breast in relation to ductal carcinoma in situ and invasive carcinoma. *BMC Cancer*. 2009;9:163. doi:10.1186/1471-2407-9-163.
- Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, et al. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology*. 2007;133:647–658.
- Coppola V, Musumeci M, Patrizii M, et al. BTG2 loss and miR-21 upregulation contribute to prostate cell transformation by inducing luminal markers expression and epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene*. 2013;32:1843–1853.
- Bührer V, Waidmann O, Friedrich-Rust M, et al. Serum microRNA-21 as marker for necroinflammation in hepatitis C patients with and without hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 2011;6:e26971.
- Wei J, Gao W, Zhu CJ, et al. Identification of plasma microRNA-21 as a biomarker for early detection and chemosensitivity of non-small cell lung cancer. *Chin J Cancer*. 2011;30:407–414.
- Ma GJ, Gu RM, Zhu M, et al. Plasma post-operative miR-21 expression in the prognosis of gastric cancers. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14:7551–7554.
- Komatsu S, Ichikawa D, Takeshita H, et al. Circulating microRNAs in plasma of patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2011;105:104–111.
- Toiyama Y, Takahashi M, Hur K, et al. Serum miR-21 as a diagnostic and prognostic biomarker in colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2013;105:849–859.
- Wang B, Zhang Q. The expression and clinical significance of circulating microRNA-21 in serum of five solid tumors. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2012;138:1659–1666.
- Kanaan Z, Rai SN, Eichenberger MR, et al. Plasma miR-21: a potential diagnostic marker of colorectal cancer. *Ann Surg*. 2012;256:544–551.
- Wang Y, Gao X, Wei F, et al. Diagnostic and prognostic value of circulating miR-21 for cancer: a systematic review and meta-analysis. *Gene*. 2014;533:389–397.
- Ng EK, Chong WW, Jin H, et al. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening. *Gut*. 2009;58:1375–1381.
- Huang Z, Huang D, Ni S, et al. Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2010;127:118–126.
- Wang LG, Gu J. Serum microRNA-29a is a promising novel marker for early detection of colorectal liver metastasis. *Cancer Epidemiol*. 2012;36:e61–e67.
- Pu XX, Huang GL, Guo HQ, et al. Circulating miR-221 directly amplified from plasma is a potential diagnostic and prognostic marker of colorectal cancer and is correlated with p53 expression. *J Gastroenterol Hepatol*. 2010;25:1674–1680.
- Sceneay J, Smyth MJ, Moller A. The pre-metastatic niche: finding common ground. *Cancer Metastasis Rev*. 2013;32:449–464.
- Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2009;9:239–252.
- Pigati L, Yaddanapudi SC, Iyengar R, et al. Selective release of microRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells. *PLoS One*. 2010;5:e13515.
- Ivankovics IG, Fernandes LC, Saad SS, et al. Peripheral and mesenteric serum levels of CEA and cytokeratins, staging and histopathological variables in colorectal adenocarcinoma. *World J Gastroenterol*. 2008;14:6699–6703.
- Rezende Junior HC, Palma RT, Toloí GC, et al. Carcinoembryonic antigen levels in the peripheral and mesenteric venous blood of patients with rectal carcinoma. *Arg Gastroenterol*. 2013;50:264–269.

33. Steinert G, Scholch S, Niemiets T, et al. Immune escape and survival mechanisms in circulating tumor cells of colorectal cancer. *Cancer Res.* 2014;74:1694-1704.
34. Xu G, Zhang Y, Wei J, et al. MicroRNA-21 promotes hepatocellular carcinoma HepG2 cell proliferation through repression of mitogen-activated protein kinase-kinase 3. *BMC Cancer.* 2013;13:469. doi: 10.1186/1471-2407-13-469.
35. Zhu Q, Wang Z, Hu Y, et al. miR-21 promotes migration and invasion by the miR-21-PDCD4-AP-1 feedback loop in human hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep.* 2012;27:1660-1668.
36. Damania P, Sen B, Dar SB, et al. Hepatitis B Virus Induces Cell Proliferation via HBx-Induced microRNA-21 in Hepatocellular Carcinoma by Targeting Programmed Cell Death Protein4 (PDCD4) and Phosphatase and Tensin Homologue (PTEN). *PLoS One.* 2014;9:e91745.
37. Zhou J, Yu L, Gao X, et al. Plasma microRNA panel to diagnose hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol.* 2011;29:4781-4788.
38. Ghasemi R, Grassadonia A, Tinari N, et al. Tumor-derived microvesicles: the metastasomes. *Med Hypotheses.* 2013;80:75-82.
39. Squadrito ML, Etzrodt M, De Palma M, et al. MicroRNA-mediated control of macrophages and its implications for cancer. *Trends Immunol.* 2013;34:350-359.
40. Fabbri M, Paone A, Calore F, et al. MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109:E2110-2116.

3.2 Article segon: “*Exosomal microRNAs isolated from plasma of mesenteric veins linked to liver metastases in resected patients with colon cancer*”

Resum

Durant el procés carcinogènic i el desenvolupament metastàtic és fonamental el paper dels exosomes com a comunicadors intercel·lulars. Els exosomes són capaços de modular el microambient tumoral i preparar el nínxol pre-metastàtic mitjançant la transferència de molècules procedents del tumor primari, com ara miRNAs i proteïnes, a les cèl·lules receptores de l'òrgan diana on es desencadenarà la metastasi. En el cas del CC i en base als resultats previs obtinguts, es suggereix que el tumor primari de colon allibera altes concentracions de molècules que afavoreixen que la cèl·lula adquireixi un fenotip més agressiu, a través de les VM. L'objectiu d'aquest treball és identificar un perfil de miRNAs en sang procedent de la vena que drena directament del tumor primari capaç de pronosticar la recaiguda de la malaltia. A més, s'ha estudiat la presència dels miRNAs continguts en exosomes.

Per tal propòsit, es van analitzar 754 microRNAs en VM de pacients quirúrgics de CC d'estadis I-III. D'aquests, alts nivells de 13 miRNAs en VM s'associen a major risc de recaiguda: let-7g (P=0.008), miR-15b (P=0.01), miR-18b (P=0.04), miR-26a (P=0.04), miR-106b (P=0.04), miR-126 (P=0.04), miR-142-3p (P=0.04), miR-155 (P=0.01), miR-328 (P=0.02), miR-410 (P=0.03), miR-449 (P=0.03), miR-548c-5p (P=0.04) i miR-744 (P=0.02). Només 4 d'aquests mostren una l'expressió significativament major en el plasma procedent de la VM que de la VP: let-7g (P=0.0174), miR-15b (P=0.0365), miR-155 (P=0.0466) i miR-328 (P=0.002). En concordància, l'alta expressió de let-7g (P=0.05), miR-15b (P=0.004), miR-155 (P=0.01) i miR-328 (P=0.02) aïllats en VM s'associa a pitjor pronòstic en termes de temps a la recaiguda (TTR), mentre que, de forma interessant, s'obtenen resultats inversos a l'analitzar tals miRNAs en VP: let-7g (P=0.004), miR-15b (P=0.02), miR-155 (P=0.03) i miR-328 (P=0.03).

Es van aïllar i caracteritzar exosomes de VM i VP dels pacients de la sèrie estudiada i es va confirmar la presència de let-7g, miR-15b, miR-155 i miR-328 en el seu interior. Al considerar la sèrie completa, no es detecten diferències d'expressió entre aquests miRNAs associats a exosomes procedents de VM i VP. No obstant, a l'analitzar el subgrup de pacients que desenvoluparen metàstasi hepàtica es detecten alts nivells de miR-328 a l'interior dels exosomes procedents de la VM en comparació amb els seus respectius nivells en VP (P=0.005). De forma interessant, també s'ha observat una relació directa entre miR-328 exosomal aïllat de VM i la metàstasi hepàtica, ja que a l'estudiar el contingut dels exosomes aïllats de la VM

entre el subgrup de pacients recaiguts i els no recaiguts, aquells pacients que recauen presenten exosomes altament enriquits amb miR-328 ($P=0.03$). Aquests resultats suggereixen la importància d'obtenir marcadors sanguinis abans de colonitzar l'òrgan diana.

Article “Exosomal microRNAs isolated from plasma of mesenteric veins linked to liver metastases in resected patients with colon cancer”

www.impactjournals.com/oncotarget/

Oncotarget, 2017, Vol. 8, (No. 19), pp: 30859-30869

Research Paper

Exosomal microRNAs isolated from plasma of mesenteric veins linked to liver metastases in resected patients with colon cancer

Mariano Monzo^{1,*}, Sandra Santasusagna^{1,*}, Isabel Moreno², Francisco Martinez², Raquel Hernández², Carmen Muñoz¹, Joan J. Castellano¹, Josep Moreno² and Alfons Navarro¹

¹ Molecular Oncology and Embryology Laboratory, Human Anatomy Unit, School of Medicine, University of Barcelona, IDIBAPS, Barcelona, Spain

² Department of Medical Oncology and Surgery, Hospital Municipal de Badalona, Badalona, Spain

* These authors have contributed equally to this article

Correspondence to: Mariano Monzo, email: mmonzo@ub.edu

Alfons Navarro, email: anavarroponz@ub.edu

Keywords: exosomes, colon cancer, miR-328, microRNAs, tumor-draining vein

Received: February 17, 2017

Accepted: March 03, 2017

Published: March 10, 2017

Copyright: Monzo et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC-BY), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

Before reaching a peripheral vein (PV), miRNAs released by the tumor are diluted and dispersed throughout the body or even retained in a specific organ. We hypothesized that blood drawn from the tumor-draining vein could provide more homogeneous information than blood drawn from the PV as that blood would contain all the biomarkers released by the tumor before they reach a potential metastatic site. We have profiled 754 miRNAs in 15 colon cancer plasma samples from the tumor-draining vein, the mesenteric vein (MV), identifying 13 microRNAs associated with relapse. The prognostic impact of these miRNAs were validated in 50 MV and 50 paired PV plasma samples of stage I-III colon cancer patients. Four miRNAs, let-7g, miR-15b, miR-155 and miR-328, were found overexpressed in MV compared to PV, and patients with high levels of those miRNAs in MV plasma had shorter time to relapse. Interestingly, in patients developing liver metastases, the exosomal cargo of miR-328 was much greater in MV than in PV plasma indicating a possible role of miR-328 in the development of liver metastases. Our results indicate that in colon cancer, the primary tumor releases high concentrations of miRNAs through the MV, and some of them are contained in tumor derived exosomes.

INTRODUCTION

Colon cancer (CC) is the third most common cancer and the second cause of death from cancer in developed countries [1]. Disease stage is the primary prognostic factor for CC and surgery is the first therapeutic option for stages I-III - alone for stage I or followed by adjuvant chemotherapy in stage III. However, in patients with stage II disease, the benefit of adjuvant treatment is unclear [2]. While several studies have shown that oxaliplatin plus either 5-fluorouracil or capecitabine can prolong disease-free survival and overall survival by 20% in stage III patients [3, 4], the evidence in stage II patients is not so clearcut [5]. In recent years, the effect of the monoclonal antibodies cetuximab [6] and bevacizumab [7]

has also been examined, but results have been less than satisfactory. There is thus a clear need for biomarkers that can predict relapse in patients with CC - particularly those with stage II disease - and thus help to identify patients likely to benefit from adjuvant therapy. Several circulating biomarkers have been examined in plasma or serum but findings are often inconsistent.

In recent years, microRNAs (miRNAs), non-coding RNAs that play a key role in the regulation of mRNA translation to protein, have emerged as promising biomarkers for screening, diagnosis and prognosis in several cancers, including CC. Several studies have found a link between miRNAs - either in tumor or in blood - and colorectal cancer. However, conflicting findings have been reported on the tumor expression levels of some miRNAs. For example, some studies have reported

overexpression of miR-10, miR-23a, miR-34b, miR-150, miR-199b, miR-212, miR-296, miR-324, miR-331, miR-340, and let-7g in tumor samples, while others have reported underexpression of these miRNAs [8]. Moreover, differences in the expression level of the same miRNA are often observed between tumor and paired blood samples. For example, miR-92 was overexpressed in plasma [9] but underexpressed in tumor [10]. Similar inconsistencies were found in the expression of the miR-200 family, where high plasma expression of miR-200c was related to poor prognosis while high tumor expression of miR-200c was related to better prognosis [11].

More recent studies have focused on miRNAs associated with exosomes, small vesicles (30-100nm) that mediate cell-to-cell communication in a variety of biological processes. An exosome contains a small cytosol with both coding and non-coding RNAs, 40% of which are miRNAs [12]. Exosomes are secreted by several cell types and captured by receptor cells in many body fluids, where they regulate normal and pathological physiological processes. Exosomes play an active role in the metastatic process by modifying the surrounding stroma in order to prepare the tissue microenvironment for the anchoring of metastatic cells [13-15].

Studies analyzing the expression levels of exosomal miRNAs in blood samples report varying results, and no homogeneous miRNA profile for CC has been identified. For example, a recent study in serum samples found that the exosomal cargo of miR-17-92 cluster was associated with poor prognosis in metastatic patients with colorectal cancer [16], while another study in circulating exosomal miRNAs in metastatic colorectal cancer patients identified a set of completely different miRNAs that did not include the miR-17-92 cluster [17].

These inconsistent findings on miRNAs in tumor, biofluids, and exosomes in CC have been attributed to various causes, including different patient populations, internal controls, and laboratory methods [8]. However, one potential factor that has not been fully examined is the anatomic route that exosomes and their biomarker cargos take in order to colonize a target organ.

All studies examining biomarkers in blood have used blood samples drawn from a peripheral vein (PV) in the forearm. However, we hypothesize that this method limits the correct interpretation of results, since before reaching the forearm, potential biomarkers released by the tumor are diluted and dispersed in other parts of the body or even retained in a specific organ. For example, exosomal biomarkers released by a colon tumor may be retained in the liver and not continue their circulatory route to the forearm. In contrast, blood drawn from a mesenteric vein (MV) close to the tumor site may well contain all the biomarkers released by the tumor before they reach the potential metastatic site [18].

In order to test this hypothesis, we have profiled the miRNA expression in plasma samples taken from MV of

surgically resected stage I-III CC patients and identified several MV-miRNAs associated with time to relapse (TTR). Furthermore, we confirm that these miRNAs were contained in MV-exosomes.

RESULTS

Patients

Fifty patients were included in the study. Mean age was 72 years, and 31 (62%) were males. Thirty-five patients had stage I-II disease. Of the 15 patients who developed metastases (5 stage II and 10 stage III), eight had liver metastases and seven had metastases in other organs. Mean follow-up was 45.2 months (range 26.4-63.8). K-ras mutations were assessed in 44 patients (Table 1).

Identification of miRNAs associated to relapse

The analysis of 754 miRNAs in 15 MV samples allowed us to identify 13 miRNAs differentially expressed between relapsed vs non-relapsed patients. High MV expression of these miRNAs were associated with higher risk of relapse: let-7g ($p = 0.008$), miR-15b ($p = 0.01$), miR-18b ($p = 0.04$), miR-26a ($p = 0.04$), miR-106b ($p = 0.04$), miR-126 ($p = 0.04$), miR-142-3p ($p = 0.04$), miR-155 ($p = 0.01$), miR-328 ($p = 0.02$), miR-410 ($p = 0.03$), miR-449 ($p = 0.03$), miR-548c-5p ($p = 0.04$) and miR-744 ($p = 0.02$).

Expression levels of relapse-associated miRNAs in MV and PV

Of the 13 relapse-associated miRNAs identified, four were expressed at higher levels in MV than in PV plasma: let-7g ($p = 0.02$); miR-15b ($p = 0.04$); miR-155 ($p = 0.05$); miR-328 ($p = 0.002$) (Figure 1A-1D). The Hierarchical cluster analysis of these four miRNAs confirmed that all four miRNAs obtained from MV had higher levels of expression than those obtained from PV (Fisher's exact $p = 0.01$) (Figure 1E). An association was observed between the MV expression levels of these four miRNAs and tumor site (let-7g: $p = 0.03$; miR-15b: $p = 0.001$; miR-155: $p = 0.03$; miR-328: $p = 0.002$) (Supplementary Figure 1). In addition, let-7g expression in MV was also associated with the presence of pre-existing polyps ($p = 0.03$), and miR-328 expression in MV was associated with disease stage ($p = 0.07$), and K-ras mutations ($p = 0.04$). There was no association between PV expression levels and clinical characteristics (Table 1).

Plasma miRNA expression and TTR

High MV expression of let-7g, miR-15b, miR-155 and miR-328 was associated with shorter TTR. Mean TTR was not reached for patients with low or high expression

of let-7g ($p = 0.05$). TTR was 58.9 months (95% CI 52.6-65.3 months) for those with low levels of miR-15b, compared to 38.7 months (95% CI 29.9-47.6 months) for those with high levels ($p = 0.004$). TTR was 59.4 months (95% CI 53.5-65.2 months) for those with low levels of

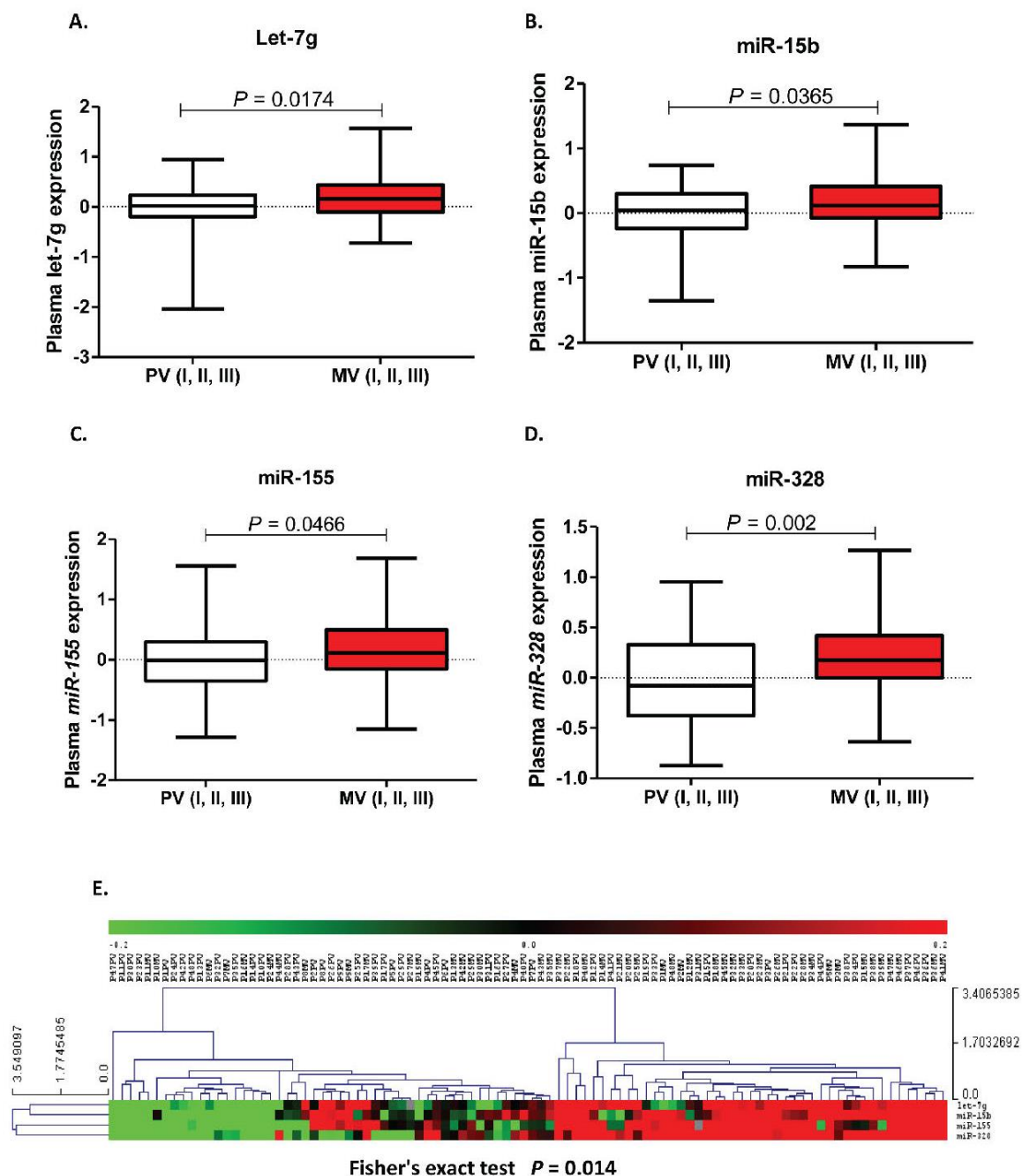


Figure 1: let-7g **A.**, miR-15b **B.**, miR-155 **C.** and miR-328 **D.** expression levels (fold change) in plasma from the peripheral vein (PV) and paired mesenteric vein (MV) of colon cancer patients. **E.** Heat map showing the miRNAs differentially expressed between PV and MV plasma samples clustered by Euclidean similarity metric (Fisher's exact $p = 0.014$). Each row represents one miRNA and each column represents a plasma sample. The legend on the right indicates the miRNA represented in the corresponding row. The relative miRNA expression is depicted according to the color scale. Red indicates upregulation; green indicates downregulation and gray indicates no detection. PV or MV indicates the region where the sample was obtained and the number indicates each patient.

Table 1: Patient characteristics and univariate *p*-values for time to relapse and for let-7g, miR-15b, miR-155 and miR-328 expression levels in 50 patients with early-stage colon cancer.

Characteristics	<i>N</i> (%), <i>N</i> =50	<i>P</i> value (TTR)	<i>P</i> value for association with microRNA expression								
			let-7g		miR-15b		miR-155		miR-328		
			MV Plasma	PV Plasma	MV Plasma	PV Plasma	MV Plasma	PV Plasma	MV Plasma	PV Plasma	
Sex											
Male	31 (62)	0.674	0.69	0.50	0.74	0.84	0.64	0.39	0.23	0.56	
Female	19 (38)										
Median age	72	0.921	0.81	0.36	0.43	0.46	0.67	0.35	0.77	0.52	
CEA levels											
<=5	34 (68)	0.401	0.37	0.81	0.97	0.80	0.93	0.77	0.81	0.72	
>5	16 (32)										
C 19.9 levels											
<=37	46 (92)	0.478	0.82	0.69	0.39	0.82	0.74	0.38	0.43	0.32	
>37	4 (8)										
Tumor location*											
Left colon	26 (52)	0.557	0.03	0.77	0.001	0.97	0.03	0.53	0.002	0.52	
Right colon	24 (48)										
Tumor size (cm)											
<=5	37 (74)	0.285	0.86	0.43	0.84	0.84	0.44	0.13	0.82	0.21	
>5	13 (26)										
Histological type											
Well differentiated	45 (90)	0.672	0.61	0.57	0.39	0.42	0.55	0.98	0.82	0.96	
Poorly differentiated	5 (10)										
Pre-existent polyp											
Absent	38 (76)	0.666	0.03	0.77	0.74	0.95	0.41	0.26	0.16	0.1	
Present	12 (24)										
Perilymphatic invasion											
Absent	47 (94)	0.710	0.62	0.50	0.29	0.01	0.82	0.51	0.31	0.3	
Present	2 (4)										
Unknown	1 (2)										
Adjuvant treatment											
Fluoropyrimidines	28 (56)	0.405									
None	22 (44)										
TNM stage											
I-II	35 (70)	0.001	0.16	0.72	0.26	0.31	0.62	0.97	0.07	0.33	
III	15 (30)										
Lymph nodes examined											
<12	11 (22)	0.266									
>12	39 (78)										
K-ras mutations											
Yes	14 (28)	0.79	0.11	0.45	0.65	0.43	0.32	0.78	0.04	0.39	
No	30 (60)										
Not assessed	6 (12)										
Relapsed											
Yes	15 (30)		0.86	0.09	0.57	0.38	0.54	0.31	0.48	0.11	
Hepatic metastasis											
Yes	8 (16)		0.83	0.25	0.45	0.78	0.61	0.58	0.71	0.12	

Abbreviations: CEA, Carcinoma Embryonic Antigen; MV, mesenteric vein; PV, peripheral vein; TNM, Tumor, Nodule, Metastasis; TTR, time to relapse.

*Tumor location according to anatomical site: 17 ascending colon, 7 transverse colon, 6 descending colon and 20 sigmoid colon.

miR-155 and 41.1 months (95% CI 32.3-49.7 months) for those with high levels ($p = 0.01$). TTR was 55.7 months (95% CI 49.3-62.1 months) for patients with low miR-328 expression, compared to 35.1 months (95% CI 26.1-44.1

months) for those with high expression ($p = 0.02$) (Figure 2).

In contrast, inverse results were found when PV was analyzed. High PV expression of these four miRNAs was

associated with longer TTR. Mean TTR for patients with low let-7g expression was 28.7 months (95% CI 16.4-41.1 months), while it was 53.6 months (95% CI 47.3-59.9 months) for those with high expression ($p = 0.004$). TTR was 21.7 months (95% CI 6.7-36.7 months) for those with low levels of miR-15b, compared to 50.7 months (95% CI 44.3-57.1 months) for those with high levels ($p = 0.02$). TTR was 35.5 months (95% CI 29.9-48.1 months) for those with low levels of miR-155 and 52.9 months (95% CI 46.1-59.6 months) for those with high levels ($p = 0.03$). TTR was 42.3 months (95% CI 33.1-51.4 months) for patients with low miR-328 expression, compared to 56.1 months (95% CI 48.5-63.7 months) for those with high expression ($p = 0.03$) (Figure 3).

The multivariate analysis identified stage (HR = 0.08, 95% CI 0.02-0.32; $P < 0.001$) and high miR-328 expression in MV plasma (HR = 6.034, 95% CI 1.456-25; $p = 0.01$) as independent prognostic markers of TTR.

miRNA cargo in exosomes isolated from MV and PV plasma

Sufficient plasma from both MV and PV to perform exosome isolation was only available from 33 patients

(25 metastasis-free and eight with liver metastases). We captured images of round microvesicles with 30-100nm diameters in the exosome-rich fraction. Cryo-TEM and Western blot analyses confirmed the presence of exosomes in plasma samples (Figure 4A-4B).

In the samples from all 33 patients, there were no differences in the exosome cargo of let-7g, miR-15b, miR-155 and miR-328 in MV *versus* PV plasma (Supplementary Figure 2). In order to examine whether the exosome cargo of these miRNAs was greater in patients with liver metastases, we then analyzed the subset of eight patients with metastases and found that the miR-328 cargo in exosomes was greater in MV than in PV ($p = 0.005$) (Figure 4C). Moreover, when we compared exosomes isolated from MV from patients with liver metastases and those without, the miR-328 cargo was higher in metastatic patients ($p = 0.03$) (Figure 4D), indicating that miR-328 is expressed at low levels in patients without liver metastases. In exosomes isolated from PV, there was no difference between the two groups of patients (Figure 4E).

DISCUSSION

Metastases are the primary cause of death in cancer patients. Recent studies have found that the primary

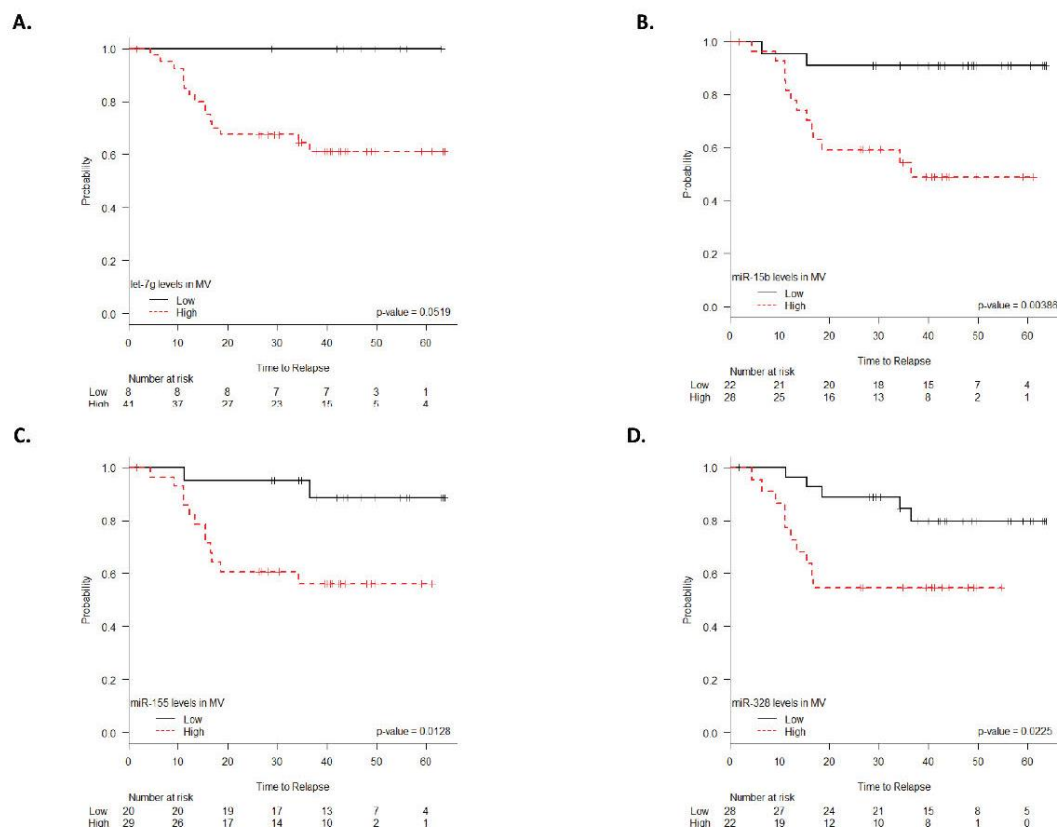


Figure 2: TTR according to let-7g **A.**, miR-15b **B.**, miR-155 **C.** and miR-328 **D.** expression levels (fold change) in plasma from the mesenteric vein (MV).

tumor can release tumor-associated molecules into blood circulation, leading to the development of metastases in target organs [19]. Many investigators have examined the presence of miRNAs or exosomal miRNAs in plasma or serum samples from cancer patients [8, 11, 16, 17]. Since all biomarkers released by the primary tumor are released *via* veins, it is logical to suppose that more biomarkers would be located in veins close to the primary tumor. The large intestine is an optimal model to study exosome circulation due to its distinctive distribution of arteries and veins. Venous return of the colon occurs through the superior and inferior MVs, both of which flow into the hepatic portal vein, which carries blood to the liver. This anatomic distribution may explain the higher frequency of liver metastases associated with primary tumors located in the colon. For this reason, we have focused our study on patients with liver metastases. Furthermore, we have not included patients with rectal cancer, since the venous return of the rectum occurs through the iliac veins and does not flow into the liver.

In the present study, we have found that four miRNAs (let-7g, miR-15b, miR-155, miR-328) are more

highly expressed in MV plasma than in PV plasma. Moreover, although all four miRNAs are associated with TTR, their overexpression in MV is related to poor prognosis, while their overexpression in PV is related to good prognosis. We can speculate that miRNAs with greater metastatic potential may be retained in the target organ, such as the liver, while those with less metastatic potential may continue to circulate towards the PV. Therefore, miRNAs isolated from PV blood would be more diluted than those from MV blood, have less metastatic potential, and thus indicate better prognosis (Figure 5). Moreover, the multivariate analysis identified overexpression of one of the miRNAs - miR-328 - in MV as an independent prognostic factor conferring a six-fold greater risk of relapse. Along these lines, a recent study in resected non-small-cell lung cancer patients found that tumor cells detected in the tumor-draining pulmonary vein were associated with relapse, while no association was found for tumor cells in the PV [20].

It is well known that exosomes and their cargo are one of the most important mediators of crosstalk between tumor cells and the microenvironment [21]. The presence

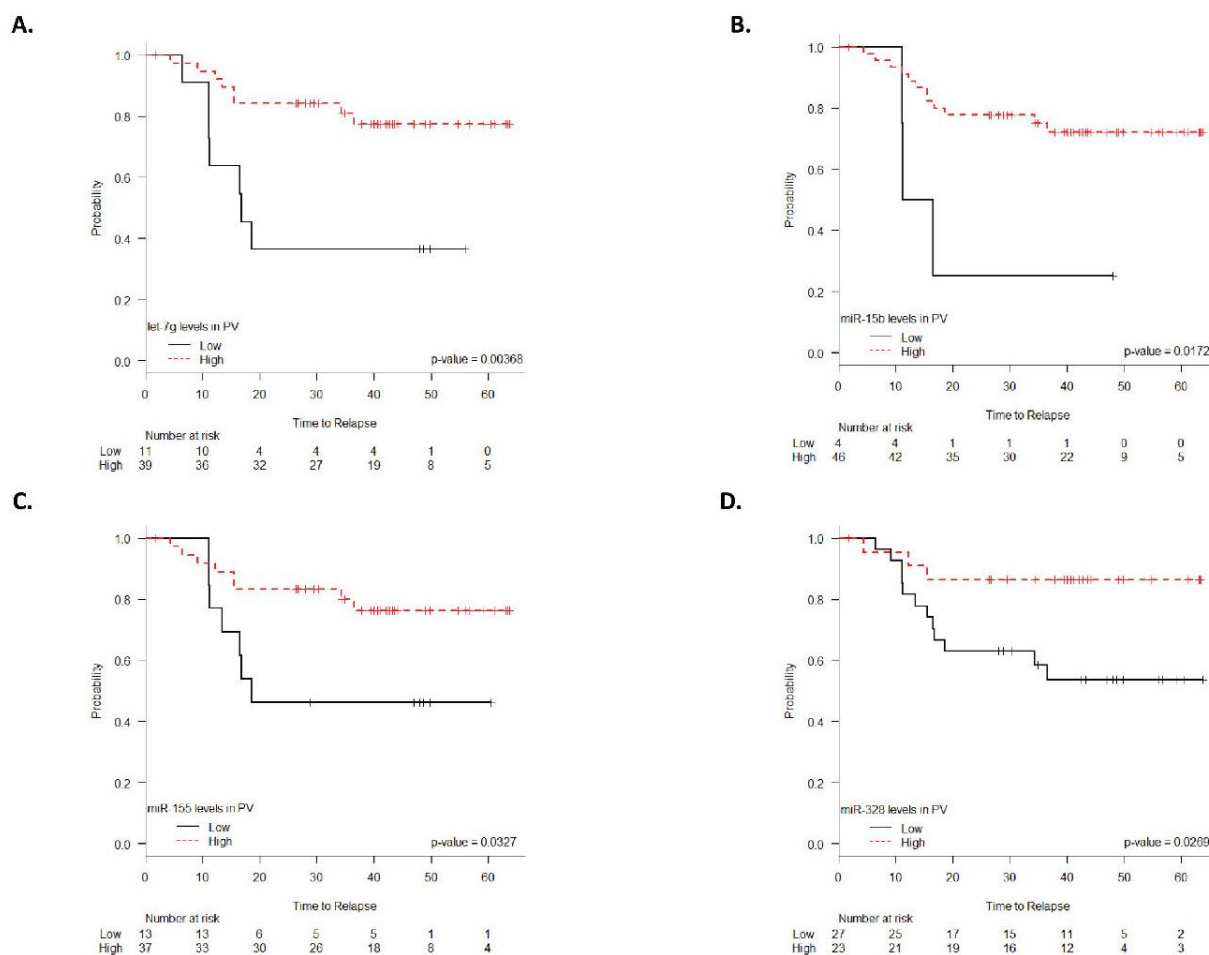


Figure 3: TTR according to let-7g **A.**, miR-15b **B.**, miR-155 **C.** and miR-328 **D.** expression levels (fold change) in plasma from the peripheral vein (PV).

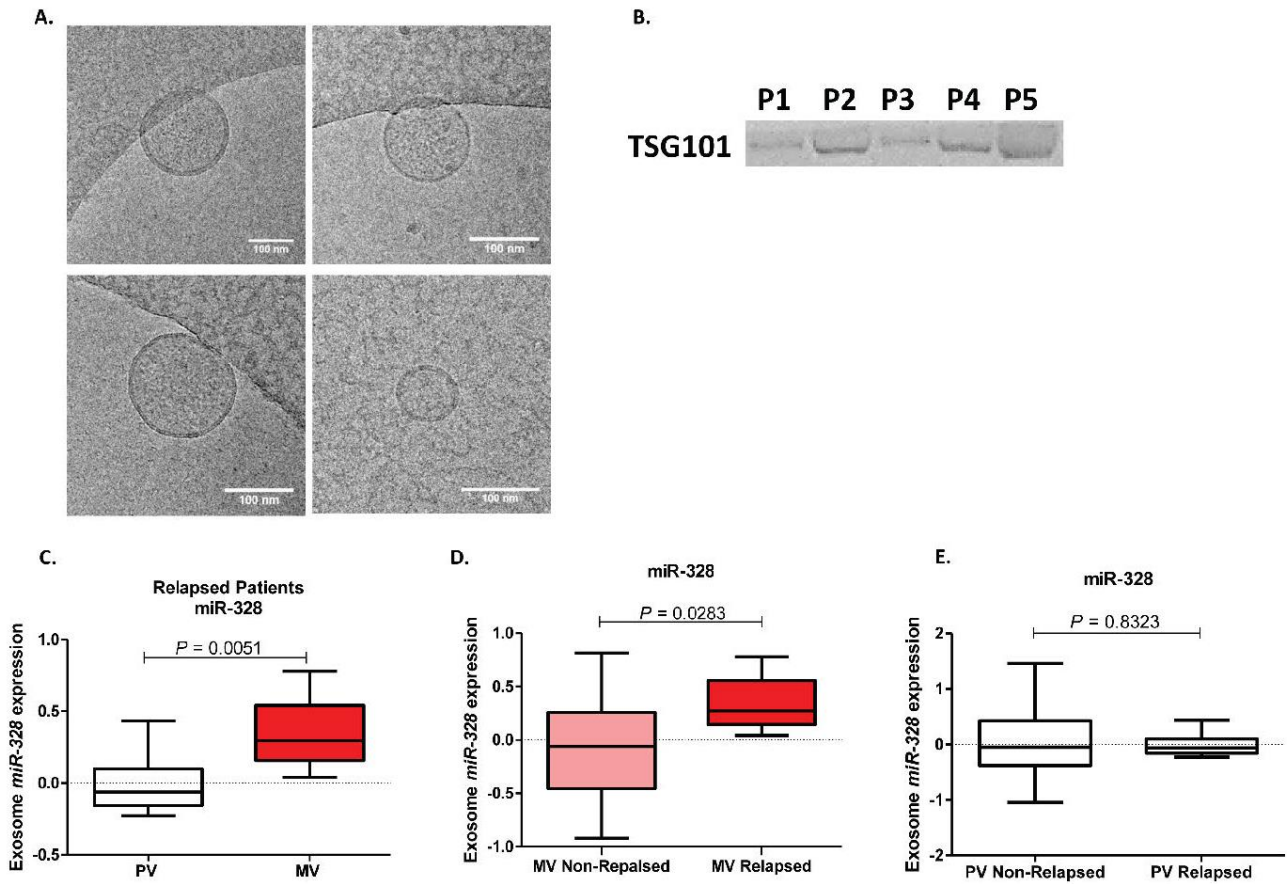
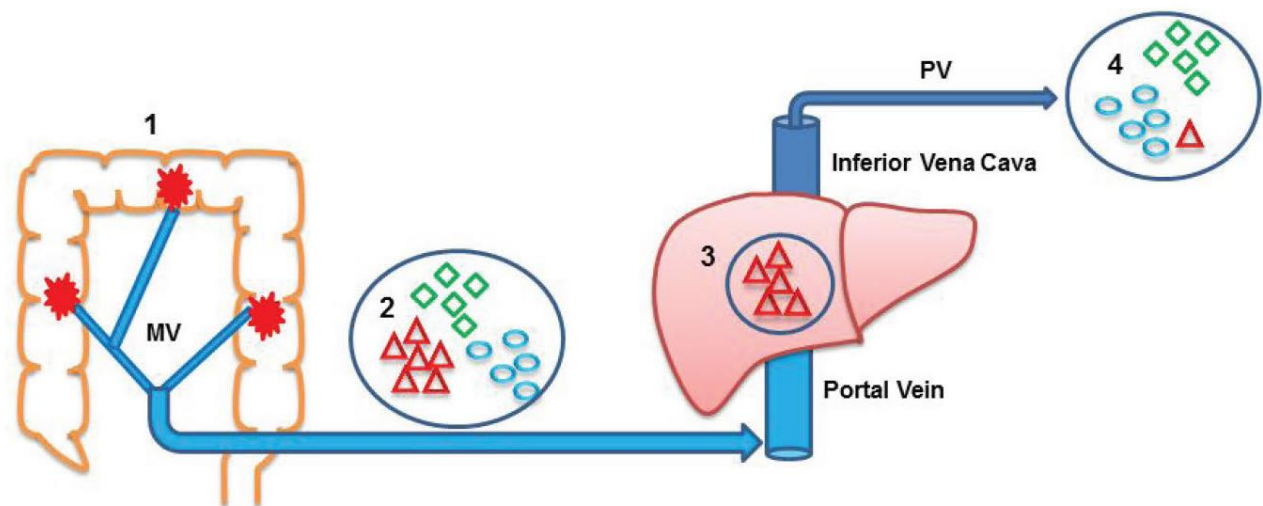


Figure 4: Exosome characterization in plasma samples of colon cancer patients by Cryo-TEM A. and Western blot using TSG101 marker B. C. miR-328 expression levels (fold change) in exosomes from the peripheral vein (PV) and matched mesenteric vein (MV) of eight patients who developed liver metastases. **D.** miR-328 expression levels (fold change) in exosomes from the MV of patients with liver metastases compared to those without metastases. **E.** miR-328 expression levels (fold change) in exosomes from the PV of patients with liver metastases compared to those without metastases.



of exosomes in blood has been analyzed in several tumors, including melanoma [22] and colorectal cancer [16, 17], where blood samples were taken from the PV of metastatic patients. Another study in metastatic ovarian cancer assessed exosomes in ascitic liquid [23]. All these studies found greater numbers of exosomes in plasma from patients than from healthy controls [16, 17].

Interestingly, our study included only I-III stage CC patients who had not developed metastases at the time of entering the study. It would thus be logical to expect that in these stages, the exosome cargo of our four miRNAs (let-7g, miR-15b, miR-155 and miR-328), would be greater in MV than in PV. However, when we analyzed both relapsed and non-relapsed patients, we found no overall significant differences in the miRNA cargo between exosomes isolated from MV and PV plasma. These findings are in line with those of previous studies [11, 24, 25], where higher expression levels of miRNAs in PV blood of metastatic patients was the manifestation of all miRNAs released by both the primary tumor and the metastasis.

In contrast, when we focused on the subset of patients who relapsed and developed liver metastases, while differences were still not found for let-7g, miR-15b or miR-155, the miR-328 exosomal cargo was much greater in MV than in PV. In addition, when the exosomal cargo in MV plasma in patients who developed liver metastases was compared to that in non-metastatic patients, the miR-328 cargo was higher in those with metastases. These findings lead us to suggest that the presence of exosomes with miR-328 cargo in MV plasma may well be an important predictor of metastases in CC patients. Along these lines, overexpression of miR-328 was related to brain metastases in patients with non-small-cell lung cancer [26].

There were more associations between miRNA expression in MV than in PV and clinical characteristics. In MV - but not PV - plasma, all four miRNAs were associated with tumor site, let-7g was associated with pre-existent polyp, and miR-328 was associated with disease stage. These findings indicate that biomarkers isolated from tumor-draining veins in patients with CC may provide much more clinical information than those from PVs.

Clearly, exosomes can help disseminate tumors and develop metastases intraperitoneally *via* other anatomic routes, including the lymphatic system. Tumors can also shed cells directly into the peritoneal cavity or the intestinal wall can be accidentally perforated during surgery [23, 27]. Our findings show that obtaining biomarkers from MV blood is a simple surgical method that can complement clinical findings.

In summary, our findings indicate that expression levels of let-7g, miR-15b, miR-155 and miR-328 isolated from MV blood can be a useful tool to identify patients at higher risk of relapse and that the miR-328 exosome cargo

in MV blood may play an important role in modulating the tissue microenvironment for the anchoring of metastatic cells. Our results provide the first step towards obtaining more homogeneous results in the analysis of blood biomarkers and can constitute an excellent surgical method for identifying patients with CC who are at risk of developing liver metastases.

MATERIALS AND METHODS

Patients

From August 2009 to August 2013, samples were obtained from 50 patients with stage I-III CC who underwent surgical resection at the Municipal Hospital of Badalona (Badalona, Spain). Fifteen patients later relapsed, eight of whom had liver metastases (Table 1). All 50 patients had undergone a complete history and physical examination prior to surgery. Approval for the study was obtained from the institutional review board of the hospital, and signed informed consent was obtained from all patients in accordance with the Declaration of Helsinki.

Blood samples

For all 50 patients, we obtained paired MV and PV blood as previously described [18]. On the day of surgery, 5mL of blood was drawn from the PV and stored in heparinized tubes. During surgery, with vascular ligation before tumor resection, an additional 5mL of blood was drawn from either the superior or the inferior MV, according to the anatomic location of the tumor.

Sample processing and total RNA extraction

Plasma from all blood samples was obtained by centrifugation of the whole blood at 5000G during 10 min and saved frozen at -80°C until further use.

Total RNA was isolated from 250µl of plasma using miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. The concentration of total RNA was quantified using NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

Supplementary Figure 3 shows the successive stages of the miRNA analyses performed.

miRNA profiling

miRNA profiling of 754 different human miRNAs was performed using TaqMan Array Human microRNA Set Cards v3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA,

USA) in a training set of 15 MV and 3 PV plasma samples as previously described [28]. Briefly, RT reactions of 4.50 μ l contained: 0.80 μ l of 10X RT buffer (Applied Biosystems), 0.2 μ l dNTPs (100mM each), 1.5 μ l multiscribe reverse transcriptase (50 U/ μ l), 0.10 μ l RNase inhibitor (20 U/ μ l), 0.80 μ l Megaplex RT primers (10X), 0.90 μ l of MgCl₂ (25 U/ μ l) and 70ng of total RNA. RT reactions were incubated in a 2720 thermocycler (Applied Biosystems) for 2 min at 16°C and 1 min at 42°C for 40 cycles, 1 s at 50°C and 5 min at 85°C, and then held at 4°C. 2.5 μ L of each RT product was preamplified in order to increase the quantity of desired cDNA. Preamplification reactions were incubated in a 2720 thermocycler (Applied Biosystems) for 10 min at 95°C, 2 min at 55°C and 2 min at 72°C; then 15 s at 95°C and 4 min at 60°C for 12 cycles, 10 min at 99.9°C and then held at 4°C. Preamplification product was diluted with 75 μ L of 0.1X TE buffer (pH 8.0). Quantitative real-time PCR reactions were performed on an ABI 7500 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) and contained 9 μ L of the diluted preamplified product, 450 μ L of TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG 2X (Applied Biosystems) and 441 μ L of nuclease-free water, mixed by vortexing, and pipetted into microfluidic TaqMan Human miRNA Array A and B.

Filtering and normalization of miRNA data

All miRNAs that were not expressed in all 15 MV plasma samples or were expressed with an unreliable quantification (Ct > 37) were excluded from further analysis, leaving a working set of 249 miRNAs. Relative miRNA expression was calculated using the 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} method. Normalization was performed with miR-484 as this miRNA was found to be the most stably expressed in all the samples.

Identification of miRNAs associated with relapse

The potential association between the 249 miRNAs and relapse was analyzed with the class comparison tool from BRB Array tools. A random-variance *t*-test [29] was used to detect miRNAs that were differentially expressed in relapsed vs non-relapsed patients.

Validation of miRNAs in the entire cohort

The miRNAs related to relapse were then used to evaluate TTR in the entire cohort of 50 patients using individual TaqMan microRNA assays (Applied Biosystems) in the ABIPrism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems) as previously described [28].

Exosome isolation, characterization and miRNA cargo

Exosome isolation was performed from 250 μ L of plasma samples by ultracentrifugation as previously described [30]. Briefly, sequential centrifugation at 4°C at 300G 5 min, followed by 2,500G 20 min and finally, 10,000G 30 min, followed by ultracentrifugation at 100,000G 2 hours. Then the pellet was washed with DPBS and ultracentrifuged again at 100,000G 1 hour in a Sorvall MX Plus Micro-Ultracentrifuge with S140AT Rotor and Polycarbonate Tubes (Thermo Scientific).

Exosome characterization was done by two methods: 1) Cryo transmission electron microscopy (cryo-TEM) in a Jeol JEM 2011 transmission electron microscope at the Microscope Facility of the Autonomous University of Barcelona; and 2) western blot analysis, using the exosome marker TSG101.

For the analysis of exosome miRNA cargo, RNA was purified using miRNeasy Mini Kit (Qiagen) after resuspension of the exosome pellet obtained by ultracentrifugation in 750 μ l Qiazol. MiRNA expression was analyzed using single TaqMan miRNA assays.

Statistical analyses

All 50 patients were evaluable for TTR, calculated from the date of surgery to the date of relapse or last follow-up. The univariate analysis of TTR according to miRNA expression was performed with the Kaplan-Meier method and compared using the log-rank test. Only covariates significantly associated with outcomes in the univariate analysis (two-sided *P* value < 0.05) were included in the Cox multivariate regression model. Results were reported as hazard ratios (HR) with their 95% confidence intervals (CI). To identify differences in expression according to two or more characteristics, including the comparison between miRNA levels in MV vs PV, the Students *T*-Test or ANOVA were used as appropriate.

All statistical analyses were performed with SPSS 22 (SPSS Inc, Chicago, IL), R 2.6.0 Software (Vienna, AU), BRB Array Tools version 3.5.0 software (Richard Simon & BRB-ArrayTools Development Team, <http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>, National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA) and TIGR Multiexperiment viewer version 4.0 software (Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA). Statistical significance was set at *P* < 0.05.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Servei de Donació del Cos a la Ciència (Body Donation Service) for providing funds for the purchase of laboratory materials. SS and JJC are APIF fellows from University of Barcelona. Thanks to the

“Ajuts de la Universitat de Barcelona per publicar en accés obert” for covering part of the the open access costs of this publication.

CONFLICTS OF INTEREST

There is no conflict of interest.

Editorial note

This paper has been accepted based in part on peer-review conducted by another journal and the authors' response and revisions as well as expedited peer-review in *Oncotarget*.

REFERENCES

- DeSantis CE, Lin CC, Mariotto AB, Siegel RL, Stein KD, Kramer JL, Alteri R, Robbins AS, Jemal A. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. *CA Cancer J Clin.* 2014; 64:252-271.
- Benson AB 3rd, Schrag D, Somerfield MR, Cohen AM, Figueredo AT, Flynn PJ, Krzyzanowska MK, Maroun J, McAllister P, Van Cutsem E. American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. *Journal of clinical oncology.* 2004; 22:3408-3419.
- André T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Taberero J, Hickish T, Topham C, Zaninelli M, Clingan P, Bridgewater J. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *New England Journal of Medicine.* 2004; 350:2343-2351.
- Haller DG, Taberero J, Maroun J, de Braud F, Price T, Van Cutsem E, Hill M, Gilberg F, Rittweger K, Schmoll HJ. Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer. *Journal of clinical oncology.* 2011; 29:1465-1471.
- Gill S, Loprinzi CL, Sargent DJ, Thomé SD, Alberts SR, Haller DG, Benedetti J, Francini G, Shepherd LE, Francois Seitz J. Pooled analysis of fluorouracil-based adjuvant therapy for stage II and III colon cancer: who benefits and by how much? *Journal of clinical oncology.* 2004; 22:1797-1806.
- Taieb J, Taberero J, Mini E, Subtil F, Folprecht G, Van Laethem JL, Thaler J, Bridgewater J, Petersen LN, Blons H. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin with or without cetuximab in patients with resected stage III colon cancer (PETACC-8): an open-label, randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology.* 2014; 15:862-873.
- de Gramont A, Van Cutsem E, Schmoll HJ, Taberero J, Clarke S, Moore MJ, Cunningham D, Cartwright TH, Hecht JR, Rivera F. Bevacizumab plus oxaliplatin-based chemotherapy as adjuvant treatment for colon cancer (AVANT): a phase 3 randomised controlled trial. *The Lancet Oncology.* 2012; 13:1225-1233.
- Ma Y, Zhang P, Yang J, Liu Z, Yang Z, Qin H. Candidate microRNA biomarkers in human colorectal cancer: systematic review profiling studies and experimental validation. *International journal of cancer.* 2012; 130:2077-2087.
- Ng EK, Chong WW, Lam EK, Shin VY, Yu J, Poon TC, Ng SS, Sung JJ. Differential expression of microRNAs in plasma of colorectal cancer patients: a potential marker for colorectal cancer screening. *Gut.* 2009.
- Schee K, Boye K, Abrahamsen TW, Fodstad Ø, Flatmark K. Clinical relevance of microRNA miR-21, miR-31, miR-92a, miR-101, miR-106a and miR-145 in colorectal cancer. *BMC cancer.* 2012; 12:505.
- Toiyama Y, Hur K, Tanaka K, Inoue Y, Kusunoki M, Boland CR, Goel A. Serum miR-200c is a novel prognostic and metastasis-predictive biomarker in patients with colorectal cancer. *Annals of surgery.* 2014; 259:735.
- Hamam R, Ali AM, Alsaleh KA, Kassem M, Alfayez M, Aldahmash A, Alajez NM. microRNA expression profiling on individual breast cancer patients identifies novel panel of circulating microRNA for early detection. *Scientific reports.* 2016; 6.
- Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, Rodrigues G, Hashimoto A, Mark MT, Molina H, Kohsaka S, Di Giannatale A, Ceder S. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature.* 2015; 527:329-335.
- Milane L, Singh A, Mattheolabakis G, Suresh M, Amiji MM. Exosome mediated communication within the tumor microenvironment. *Journal of Controlled Release.* 2015; 219:278-294.
- O'Driscoll L. Expanding on exosomes and ectosomes in cancer. *New England Journal of Medicine.* 2015; 372:2359-2362.
- Matsumura T, Sugimachi K, Iinuma H, Takahashi Y, Kurashige J, Sawada G, Ueda M, Uchi R, Ueo H, Takano Y. Exosomal microRNA in serum is a novel biomarker of recurrence in human colorectal cancer. *British journal of cancer.* 2015; 113:275-281.
- Ogata-Kawata H, Izumiya M, Kurioka D, Honma Y, Yamada Y, Furuta K, Gunji T, Ohta H, Okamoto H, Sonoda H. Circulating exosomal microRNAs as biomarkers of colon cancer. *PLoS one.* 2014; 9:e92921.
- Monzo M, Martínez-Rodenas F, Moreno I, Navarro A, Santasusagna S, Macias I, Muñoz C, Tejero R, Hernández R. Differential MIR-21 expression in plasma from mesenteric versus peripheral veins: an observational study of disease-free survival in surgically resected colon cancer patients. *Medicine.* 2015; 94:e145.
- Sevenich L, Bowman RL, Mason SD, Quail DF, Rapaport F, Elie BT, Brogi E, Brastianos PK, Hahn WC, Holsinger LJ. Analysis of tumour-and stroma-supplied proteolytic networks reveals a brain-metastasis-promoting role for

- cathepsin S. *Nature cell biology*. 2014; 16:876-888.
20. Crosbie PA, Shah R, Krysiak P, Zhou C, Morris K, Tugwood J, Booton R, Blackhall F, Dive C. Circulating tumor cells detected in the tumor-draining pulmonary vein are associated with disease recurrence after surgical resection of NSCLC. *Journal of Thoracic Oncology*. 2016; 11:1793-1797.
 21. Becker A, Thakur BK, Weiss JM, Kim HS, Peinado H, Lyden D. Extracellular Vesicles in Cancer: Cell-to-Cell Mediators of Metastasis. *Cancer Cell*. 2016; 30:836-848.
 22. Peinado H, Alekovi M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, Hergueta-Redondo M, Williams C, Garcia-Santos G, Ghajar CM. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nature medicine*. 2012; 18:883-891.
 23. de la Fuente A, Alonso-Alconada L, Costa C, Cueva J, Garcia-Caballero T, Lopez-Lopez R, Abal M. M-trap: exosome-based capture of tumor cells as a new technology in peritoneal metastasis. *Journal of the National Cancer Institute*. 2015; 107:djv184.
 24. Lodes MJ, Caraballo M, Suci D, Munro S, Kumar A, Anderson B. Detection of cancer with serum miRNAs on an oligonucleotide microarray. *PloS one*. 2009; 4:e6229.
 25. Valladares-Ayerbes M, Reboredo M, Medina-Villaamil V, Iglesias-Diaz P, Lorenzo-Patiño MJ, Haz M, Santamarina I, Blanco M, Fernández-Tajes J, Quindós M. Circulating miR-200c as a diagnostic and prognostic biomarker for gastric cancer. *Journal of translational medicine*. 2012; 10:186.
 26. Arora S, Ranade AR, Tran NL, Nasser S, Sridhar S, Korn RL, Ross JT, Dhruv H, Foss KM, Sibenaller Z. MicroRNA-328 is associated with (non-small) cell lung cancer (NSCLC) brain metastasis and mediates NSCLC migration. *International journal of cancer*. 2011; 129:2621-2631.
 27. Koppe MJ, Boerman OC, Oyen WJ, Bleichrodt RP. Peritoneal carcinomatosis of colorectal origin: incidence and current treatment strategies. *Annals of surgery*. 2006; 243:212-222.
 28. Navarro A, Diaz T, Tovar N, Pedrosa F, Tejero R, Cibeira MT, Magnano L, Rosiñol L, Monzó M, Bladé J. A serum microRNA signature associated with complete remission and progression after autologous stem-cell transplantation in patients with multiple myeloma. *Oncotarget*. 2015; 6:1874-83. doi: 10.18632/oncotarget.2761.
 29. Wright GW, Simon RM. A random variance model for detection of differential gene expression in small microarray experiments. *Bioinformatics*. 2003; 19:2448-2455.
 30. Ruiz-Martinez M, Navarro A, Marrades RM, Viñolas N, Santasusagna S, Muñoz C, Ramirez J, Molins L, Monzo M. YKT6 expression, exosome release, and survival in non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. 2016; 7:51515-51524. doi: 10.18632/oncotarget.9862.

3.3 Article tercer: “*miR-328 mediates a metabolic shift in colon cancer cells by targeting SLC2A1/GLUT1*”

Resum

Clàssicament, els miRNAs s’han descrit com a possibles reguladors del procés carcinogènic adquirint gran importància com a potencials dianes terapèutiques. En el cas del CC i en base als resultats previs obtinguts, l’objectiu d’aquest estudi és indagar l’efecte de miR-328 sobre els seus gens diana putatius per tal de poder aprofundir en el mecanisme molecular que exerceix miR-328 durant el procés carcinogènic del CC.

Per tal propòsit, es va dur a terme un anàlisi bioinformàtic *in silico* per estudiar les possibles dianes gèniques de miR-328, entre les quals apareix el gen *SLC2A1*. Per tal de validar aquesta interacció, es van dur a terme assajos luciferasa i western blots en les línies cel·lulars de CC, LOVO i SW480. En concordància, es va estudiar l’expressió de miR-328 en 47 mostres aparellades de teixit normal i tumoral corresponents a pacients de CC d’estadis I-III.

Els resultats de luciferasa mostren que miR-328 inhibeix de forma directa el gen *SLC2A1* tot unint-se a la seva regió 3’UTR en ambdues línies cel·lulars (LOVO, $P < 0.0001$; SW480, $P = 0.01$). Aquests resultats es confirmaren per western blot, obtenint en ambdós casos reducció dels nivells de proteïna GLUT1 en les cèl·lules transfectades amb alts nivells de miR-328 en comparació de les cèl·lules control sense transfectar (LOVO, $P = 0.03$; SW480, $P = 0.04$). De forma interessant, també s’evidencia una relació entre els nivells d’expressió de miR-328 i els de GLUT1 en pacients de CC, ja que el teixit tumoral es caracteritza per presentar baixos nivells de miR-328 ($P < 0.0001$) i, com ja s’ha reportat prèviament en múltiples estudis, alts nivells de GLUT1.

Aquests resultats indiquen que miR-328 té com a diana *SLC2A1/GLUT1*, suggerint que miR-328 podria participar en la desregulació metabòlica que s’esdevé durant el procés del CC exercint un paper clau pel desenvolupament de l’efecte Warburg.

Article “miR-328 mediates a metabolic shift in colon cancer cells by targeting SLC2A1/GLUT1”

Clinical and Translational Oncology
<https://doi.org/10.1007/s12094-018-1836-1>

RESEARCH ARTICLE



miR-328 mediates a metabolic shift in colon cancer cells by targeting SLC2A1/GLUT1

S. Santasusagna¹ · I. Moreno² · A. Navarro¹ · C. Muñoz¹ · F. Martínez² · R. Hernández² · J. J. Castellano¹ · M. Monzo^{1,3}

Received: 20 December 2017 / Accepted: 9 January 2018
 © The Author(s) 2018. This article is an open access publication

Abstract

Purpose Increasing evidence shows that altered metabolism is a critical hallmark in colon cancer. There is a strong need to explore the molecular mechanisms underlying cancer metabolism. Whether the aberrant expression of microRNAs contributes to cancer metabolism is not fully understood. miR-328 is a putative potential target of SLC2A1, but the regulating mechanism between them remains unknown. We have examined whether miR-328 directly regulates SLC2A1/GLUT1 expression in colon cancer cells.

Methods We performed in silico bioinformatic analyses to identify miR-328-mediated molecular pathways and targets. We also performed luciferase assays and western blot analyses in LOVO and SW480 colon cancer cell lines. In addition, we assessed miR-328 expression in 47 paired tumor and normal tissue specimens from resected colon cancer patients.

Results Luciferase reporter assays showed that miR-328 directly targeted SLC2A1 3'-untranslated region (UTR), with a significant decrease in luciferase activity in both LOVO and SW480 cell lines. These results were validated by western blot. miR-328 expression was significantly downregulated in tumor tissue compared with paired normal tissue.

Conclusions Our results show that miR-328 targets SLC2A1/GLUT1. We suggest that miR-328 may be involved in the orchestration of the Warburg effect in colon cancer cells. Furthermore, miR-328 expression is reduced in colon cancer patients and thus inversely correlates with the classically reported upregulated SLC2A1/GLUT1 expression in tumors.

Keywords SLC2A1 · GLUT1 · miR-328 · Colon cancer · Glycolysis

Introduction

Colorectal cancer is the third most common cancer worldwide in both males and females and represents the second and the third cause of cancer death in males and females, respectively [1], making it a significant health burden. The

vast majority of colorectal cancer cases are sporadic and usually progress from a benign polyp to a malignant adenocarcinoma while cells accumulate a series of genetic and epigenetic changes [2]. For example, mutations in KRAS predict a failure to respond to EGFR inhibitors [3].

✉ M. Monzo
 mmonzo@ub.edu
 S. Santasusagna
 sandra.santasusagna@ub.edu
 I. Moreno
 imoreno@bsa.cat
 A. Navarro
 anavarroponz@ub.edu
 C. Muñoz
 carmen.munoz@ub.edu
 F. Martínez
 fmartinez@bsa.cat

R. Hernández
 rahernandez@bsa.cat
 J. J. Castellano
 joan.castellano@ub.edu

- ¹ Molecular Oncology and Embryology Laboratory, Human Anatomy Unit, School of Medicine, University of Barcelona, IDIBAPS, Barcelona, Spain
- ² Department of Medical Oncology and Surgery, Hospital Municipal de Badalona, Badalona, Spain
- ³ Unit of Human Anatomy and Embryology, School of Medicine, Hospital Clinic, University of Barcelona, Casanova 143, 08036 Barcelona, Spain

Published online: 26 January 2018

Springer

It is well known that the metabolism of cancer cells is significantly different from that of normally differentiated cells [4]. Cancer cells preferentially use aerobic glycolysis to metabolize glucose, which is a less efficient pathway than mitochondrial oxidative phosphorylation, the main metabolic pathway used by normal cells. This different metabolism, termed the Warburg effect, is characterized by increased glycolysis and lactate production [5], which is one of the main hallmarks of cancer and could be the result of adaptations designed to maintain the continuous proliferation of cancer cells. In this malignant scenario, one of the earliest mechanisms that is upregulated during oncogenesis is the uniport protein glucose transporter 1 (GLUT1), which is a pivotal rate-limiting element in the transport of glucose in cancer cells and is responsible for increasing their glucose uptake [6]. GLUT1 deregulation results in an increased glucose uptake into the cytoplasm of tumor cells [7]. GLUT1 has found to be overexpressed in various cancers, such as esophageal squamous cell carcinoma [8], gastric carcinoma [9] and colon cancer (CC) [10, 11], and is significantly associated with worse prognosis [11]. In addition, a recent meta-analysis found that GLUT1 expression could be a promising prognostic and therapeutic target in solid tumors [6].

Recently, a number of microRNAs (miRNAs) were identified as important natural regulators of metabolism [12, 13]. For example, in renal cell carcinoma, miR-1291 induces cell proliferation, migration and invasion by targeting solute carrier family 2 member 1 (SLC2A1), which encodes for GLUT1 [14]. In addition, miR-124 inhibits proliferation, glycolysis, and energy metabolism, by targeting AKT-GLUT1/HKII in non-small cell lung cancer cells [15]. Several studies have reported that miR-328 is dysregulated in numerous human cancers, thus compromising metabolic and non-metabolic pathways [16–21]. In a previous study by our group, miR-328 was present in exosomes isolated from the tumor-draining vein of CC patients and its expression was associated with liver metastases [22], leading us to speculate that miR-328 could play a role in the disruption of the metabolic pathway regulated by GLUT1 by directly binding to its 3'-UTR. However, the direct function of miR-328 in CC cells has not been examined. In the present study, we have analyzed the expression levels of miR-328 in a cohort of surgical CC patients to evaluate the relationship between miR-328 expression and its potential target SLC2A1.

Methods

Cell culture

Two human CC cell lines, LOVO (ATCC[®] CCL-229[™]) and SW480 (ATCC[®] CCL-228[™]), were provided by American Type Culture Collection (Manassas, USA). Both cell

lines were cultured in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) with 10% fetal bovine serum (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and 1% penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at 37 °C with 5% CO₂.

miRNA target prediction

Bioinformatics prediction of target genes and miRNA binding sites was performed using a combination of TargetScan version 5.1 (<http://www.targetscan.com>), miRanda August 2010 release (<http://www.microna.org>), miRDB April 2009 (www.mirdb.org) and Tarbase (<http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=tarbase/index>). To obtain a reliable miRNA target prediction, we used the algorithm mirSVR for scoring and ranking the efficiency of miRNA target sites, including both target site information and contextual features [23]. In addition, phastCons score was used to study the target site conservation of nucleotide positions across multiple vertebrates [24].

miRNA transfection

One day before transfection, LOVO (8×10^5) and SW480 (5×10^5) cells were seeded in 6-well plates in RPMI media (Life Technologies) overnight. The following day, media were removed and cells were transfected with 50 ng of the pMirTarget vector (Origene), and 100 nM of the relevant pre-miRNA or pre-miR-Negative Control#1 (Life Technologies) using Lipofectamine 2000 in Opti-mem media (Life Technologies) according to the manufacturer's protocol. After 6 h transfection, the transfection reagent was replaced with complete RPMI media (Life Technologies). Cells were harvested for other experiments at 24 h after transfection. Transfection efficiency was monitored by qPCR.

Luciferase assay

To validate the potential target genes identified, a Luciferase assay was performed in LOVO and SW480 cells using a modified vector with the 3'UTR region of SLC2A1 gene (pMirTarget-SLC2A1-3'-UTR; accession number: 006516) obtained from Origene Technologies Inc. (Rockville, MD, USA). The Luciferase activity was measured 24 h after transfection with the Promega Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega, Madison, WI, USA) in a luminometer Versa Max Microplate Reader. Each experiment was performed at least three times. The effect of the miR-328 in the Luciferase assay was then confirmed by western blot.

Western blot

Western blot analysis was performed in LOVO and SW480 cells using the following primary antibodies: GLUT1 (21829-1-AP, Proteintech) and α -tubulin (T 6074, Sigma-Aldrich). Briefly, the cell pellet was mixed with LDS sample buffer (Life Technologies) and sample reducing agent (Life Technologies), according to the manufacturer's protocol. Proteins extracted were loaded onto a SDS-PAGE (Novex 4–12% Bis-Tris gel, Life Technologies), transferred to a nitrocellulose membrane by iBlot (Life Technologies), and blocked 1 h with 1× TBST buffer (Fisher Scientific) with 5% w/v nonfat dry milk. The membranes were incubated in blocking buffer at 4 °C overnight with primary antibody against GLUT1 (1:1000) or 1 h at room temperature for α -tubulin (1:3000). Subsequently, the membranes were washed three times with Tris-buffered saline with Tween-20 (TBST) and incubated 1 h with secondary antibodies (1:5000; anti-rabbit sc-2004, Santa Cruz Biotechnology; or 1:3000; anti-mouse A9044, Sigma-Aldrich). The signal was obtained using the Novex ECL Chemiluminescent Substrate Reagent kit (WP 20005, Invitrogen) and the images were developed and quantified using the Chemidoc System (Bio-Rad).

Patient samples

From August 2009 to August 2013, samples were obtained from 47 patients with stage I to III CC who underwent surgical resection at the Municipal Hospital of Badalona. All 47 patients underwent a complete history and physical examination.

Approval for the study was obtained from the institutional review board of the hospital, and signed informed consent was obtained from all patients and controls in accordance with the Declaration of Helsinki.

For all 47 patients, we obtained tumor tissue and paired normal tissue. Normal tissue was obtained from the area of the colon farthest from the tumor. Both tumor and normal tissue samples were analyzed and confirmed by a pathologist and frozen at – 80 °C for further use.

RNA extraction and miRNA quantification

Total RNA was extracted from fresh tumor and paired normal tissue using Trizol total RNA isolation reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. miRNA detection was performed using commercial assays (TaqMan MicroRNA assays, Life Technologies) for miR-328 (assay ID: 000543, Life Technologies), in the 7500 Sequence Detection System (Life Technologies). The appropriate

negative controls were also run in each reaction. Relative quantification was calculated using the formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Normalization was performed with miR-191.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed with SPSS 22 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). In vitro experiments were repeated on at least three biological replicates. Data are presented as the mean \pm SEM and analyzed using paired two-tailed Student's *t* test, using Prism software version 7.0 (GraphPad software). Differences were considered significant where $p \leq 0.05$.

Results

miR-328 targets SLC2A1

Bioinformatic analysis suggested that SLC2A1 could be a potential target of miR-328. Tarbase showed that the inhibition of SLC2A1 in *Homo sapiens* is partially mediated by miR-328 in two target sites that are dependent on additional non-sequence-specific context features. These SLC2A1 target sites for hsa-miR-328 are located in the 592 and 635 nucleotide positions of the 5' gene sequence. Their mirSVR scores are – 0.2195 and – 0.4210, respectively, indicating that miR-328 can potentially bind to its target gene SLC2A1, especially in the 635 position, which has a more negative mirSVR score. phastCons scores for the 592 and 635 nucleotide positions suggest that both show a high conservation rate across vertebrates (0.7569 and 0.7177, respectively) (Fig. 1).

miR-328 directly regulates SLC2A1 in CC cells

To demonstrate the direct interactions between miR-328 and SLC2A1-3'UTR, a construct of this region was cloned into the pMir-Target plasmid downstream of a luciferase reporter gene (Fig. 1). A significant decrease was observed in luciferase activity in cells transfected with pMirTarget-SLC2A1 construct when treated with 100 nM pre-miR-328 relative to the same concentration of a pre-miR-Negative Control: 48.6% in LOVO ($p < 0.0001$) and 20.2% in SW480 ($p = 0.01$) (Fig. 2). There was no significant difference between cells transfected with the target constructs alone. This provides strong evidence of a direct molecular binding interaction between miR-328 and the 3'UTRs of SLC2A1, indicating that this gene could be a novel direct target of miR-328.

Western blot was carried out to determine if changes in miR-328 levels correlated with changes in SLC2A1-encoded protein levels, GLUT1. The results showed that

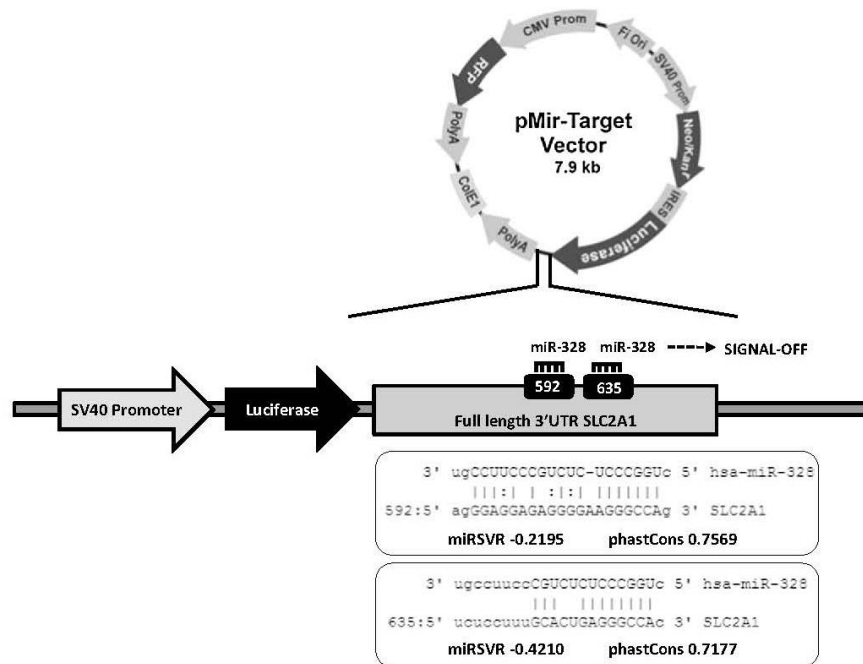


Fig. 1 Luciferase construct was used to test whether miR-328 binds to SLC2A1. The 3' UTRs of SLC2A1 were subcloned into the SV40-driven pMir-target luciferase vector (Origene)

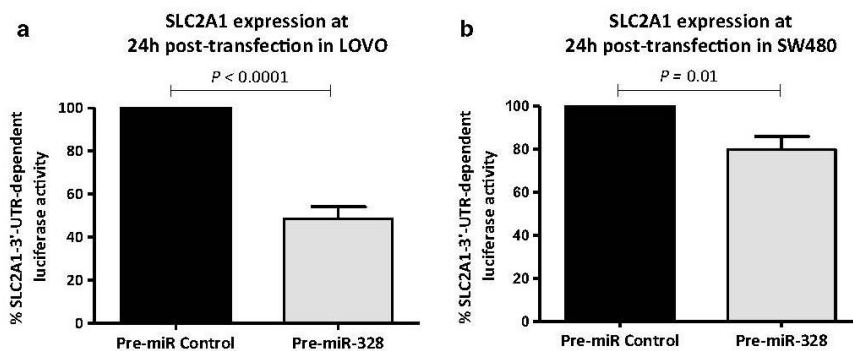


Fig. 2 Determination of luciferase activities in **a** LOVO and **b** SW480 colon cancer cells transfected with luciferase expression constructs containing the SLC2A1 downstream of the luciferase gene on a SV40-driven vector. SLC2A1 is a direct target of miR-328. Luciferase activity of plasmid containing firefly luciferase associated with 3' UTRs regions of SLC2A1 cotransfected with pre-miR-328

(100 nM) was reduced in **a** LOVO ($p < 0.0001$) and **b** SW480 ($p = 0.01$) cells. Cotransfection of SLC2A1 with a non-targeted pre-Negative Control did not cause a significant decrease in firefly luciferase activity. The values presented are the mean \pm SEM of three independent experiments (paired two tailed Student's t test)

protein levels of GLUT1 were reduced in cells transfected with pre-miR-328 compared to cells treated with the pre-miR-Negative Control: LOVO ($p = 0.03$); SW480 ($p = 0.04$) (Fig. 3). Taken together, these data indicate that miR-328 upregulation may contribute to the inhibition of GLUT1 in CC cells.

miR-328 expression in patient samples

Forty-seven patients were included in the study. Median age was 73 years, and 29 (62%) were males. Thirty-three patients had stage I–II disease and 14 had stage III. Mean follow-up was 45.2 months (range 26.4–63.8) (Table 1).

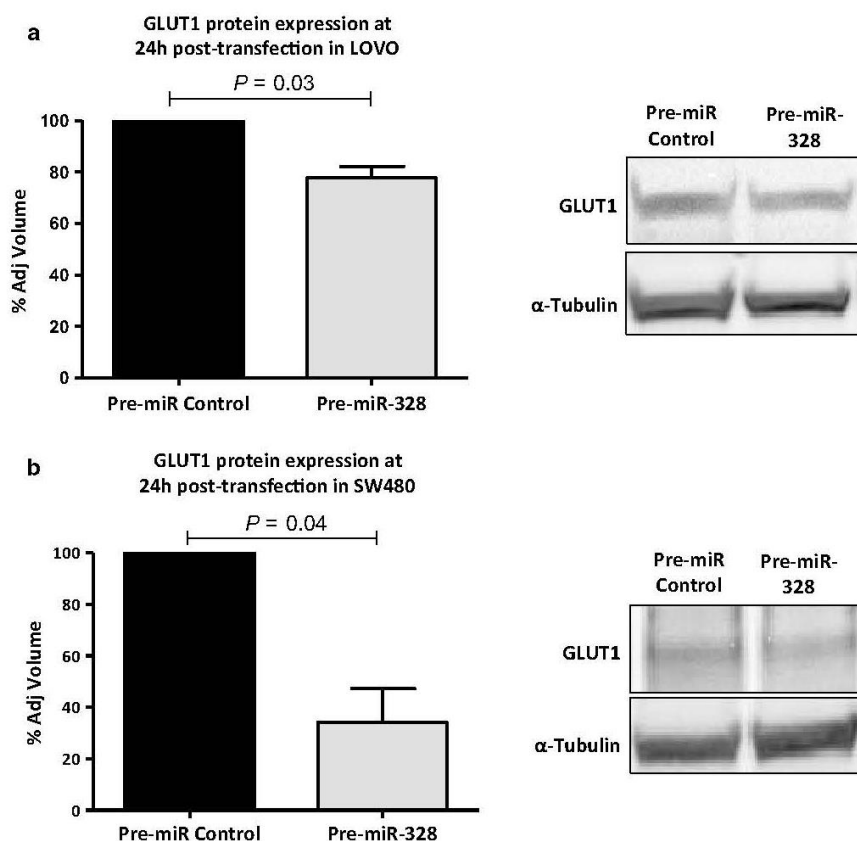


Fig. 3 Western blot of **a** LOVO ($p = 0.03$) and **b** SW480 ($p = 0.04$) cells transfected with pre-Negative Control or pre-miR-328 and quantification of SLC2A1 signal relative to loading control α -tubulin

Median miR-328 expression in tumor and normal tissue was -0.3838 and -0.0349 , respectively. miR-328 was expressed at lower levels in tumor than in paired normal tissue ($p < 0.0001$) (Fig. 4).

Discussion

In the recent years, accumulating evidence demonstrating the critical role of a large number of miRNAs as cancer regulators [25] indicate that it is crucial to understand the molecular mechanisms of miRNAs and their potential as therapeutic targets. To understand the potential effect of miR-328 on CC cells, we performed a target prediction analysis and luciferase reporter assays in CC cell lines treated with and without pre-miR-328. Our findings confirmed that miR-328 directly targets SLC2A1 in LOVO and SW480 cells, resulting in decreased levels of GLUT1 protein. Moreover, miR-328 expression was significantly lower in tumor than in normal tissue from CC patients.

Tumor tissue is characterized by a high glucose uptake, mainly via GLUT1 [26], which is why a miR-328-mediated reduction of GLUT1, an important glucose transport protein, could compromise tumor survival.

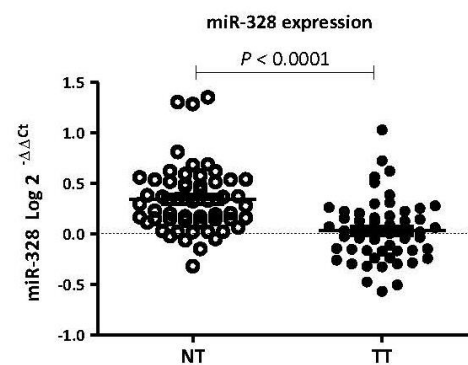
Our results are in line with previous studies showing that miR-328 modulates both metabolic and non-metabolic pathways. miR-328 suppresses the survival of cancer cells by targeting PLCE1 in esophageal cancer [16], inhibits epithelial to-mesenchymal transition in renal tubular cells by targeting CD44 [17, 27], and regulates cell invasion and proliferation in glioma cells by targeting SFRP1 [18] and in melanoma cells by targeting TGF β 2 [19]. In addition, miR-328 regulates the expression of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in human cancer cells, resulting in increased chemosensitivity [20, 21]. In line with these results, a study focused on miR-328 and cancer stem cell properties suggested that miR-328 downregulation correlated with more invasive and tumorigenic phenotypes in vitro [28].

Table 1 Patient characteristics

Characteristics	N (%)
Sex	
Male	29 (62)
Female	18 (38)
Median age	73
CEA levels	
≤ 5	31 (66)
> 5	16 (34)
C 19.9 levels	
≤ 37	43 (92)
> 37	4 (8)
Tumor location	
Left colon	23 (49)
Right colon	24 (51)
Tumor size (cm)	
≤ 5	34 (72)
> 5	12 (26)
Unknown	1 (2)
Histological type	
Well differentiated	42 (89)
Poorly differentiated	5 (11)
Preexistent polyp	
Absent	35 (75)
Present	12 (25)
Perilymphatic invasion	
Absent	44 (94)
Present	2 (4)
Unknown	1 (2)
TNM stage	
I-II	33 (70)
III	14 (30)
Adjuvant treatment	
Fluoropyrimidines	25 (53)
None	22 (47)
Relapsed	
Yes	14 (30)
No	33 (70)

CEA carcinoma embryonic antigen, *TNM* tumor, nodule, metastasis

Recent studies have shown that some miRNAs secreted in the microenvironment by the tumor and niche cells could play an active role in modulating the pre-metastatic niche and subsequent metastatic progression. For example, in breast cancer, tumor-secreted miR-122 reprograms glucose metabolism in the pre-metastatic niche by inhibiting the glycolytic enzyme pyruvate kinase M2 (PKM2) [29], while in brain cancer, astrocyte-derived miR-19a secreted by the niche cells induces the loss of PTEN in tumor cells [30]. In both cases, the authors suggest that glucose is increased in the surrounding stroma. We can thus speculate that together with other accumulated metabolic

**Fig. 4** miR-328 expression in paired tumor and normal tissue samples from CC patients

molecules, the increased glucose represents a feed of nutrients and energy for the anabolic pathways required for the growth of the cancer cells when they arrive at the pre-metastatic niche.

Our findings indicate that changes in miR-328 levels correlate with changes in the levels of GLUT1, an SLC2A1-encoded protein, which has been confirmed by western blot analysis. As a result of this direct interaction between SLC2A1 and miR-328, when miR-328 levels are increased in cells transfected with its pre-miRNA, glucose uptake becomes reduced due to an inhibition of the glucose carrier GLUT1, leading to decreased glucose transport. Taken together with our previous findings that miR-328 expression in exosomes isolated from the tumor-draining vein of CC patients was associated with liver metastases [22] as well as previous studies reporting increased stromal glucose [29, 30], the results of the present study lead us to suggest that aberrant expression of miR-328 can modulate the metabolic environment in order to induce a pre-metastatic niche. Low levels of miR-328 in the tumor could allow an increase in GLUT1-mediated glucose uptake to support tumor growth while the miR-328 secreted by the cancer cells could inhibit the glucose uptake of distant stromal niche cells, resulting in stromal glucose accumulation and hence metastatic colonization.

In conclusion, to the best of our knowledge, our study is the first to demonstrate that miR-328 is potentially able to inhibit SLC2A1 and consequently regulate GLUT1-mediated glycolytic activity in cancer cells. Further exploration of the biological mechanisms underlying this interaction is warranted to evaluate the potential of miR-328 as a therapeutic target in CC.

Acknowledgements The authors thank Renée Grupp for assistance in drafting the manuscript.

Funding This work was supported by a grant from Servei de Donació del Cos a la Ciència (Body Donation Service) of the University of Barcelona. SS and JJC are APIF fellows of the University of Barcelona. Neither of these funding bodies had a role in the design and conduct of

the study; collection, management, analysis, and interpretation of the data; preparation, review, or approval of the manuscript; or decision to submit the manuscript for publication.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare no conflicts of interest.

Ethical approval All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Informed consent Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

References

- Siegel RL, Miller KD, Fedewa SA, Ahnen DJ, Meester RG, Barzi A, et al. Colorectal cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(3):177–93.
- Schetter AJ, Okayama H, Harris CC. The role of microRNAs in colorectal cancer. *Cancer J*. 2012;18(3):244.
- De Rooock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilias G, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol*. 2010;11(8):753–62.
- Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell*. 2008;13(6):472–82.
- Warburg O. On the origin of cancer. *Science*. 1956;123(3191):309–14.
- Wang J, Ye C, Chen C, Xiong H, Xie B, Zhou J, et al. Glucose transporter GLUT1 expression and clinical outcome in solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8(10):16875.
- Szablewski L. Expression of glucose transporters in cancers. *BBA Rev Cancer*. 2013;1835(2):164–9.
- Tohma T, Okazumi S, Makino H, Cho A, Mochizuki R, Shuto K, et al. Overexpression of glucose transporter 1 in esophageal squamous cell carcinomas: a marker for poor prognosis. *Dis Esophagus*. 2005;18(3):185–9.
- Kawamura T, Kusakabe T, Sugino T, Watanabe K, Fukuda T, Nashimoto A, et al. Expression of glucose transporter-1 in human gastric carcinoma. *Cancer*. 2001;92(3):634–41.
- Haber RS, Rathana A, Weiser KR, Pritsker A, Itzkowitz SH, Bodian C, et al. Glut1 glucose transporter expression in colorectal carcinoma. *Cancer*. 1998;83(1):34–40.
- Feng W, Cui G, Tang C-W, Zhang X-L, Dai C, Xu Y-Q, et al. Role of glucose metabolism related gene GLUT1 in the occurrence and prognosis of colorectal cancer. *Oncotarget*. 2017;8(34):56850.
- Rotliers V, Näär AM. MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13(4):239–50.
- Wilfred BR, Wang W-X, Nelson PT. Energizing miRNA research: a review of the role of miRNAs in lipid metabolism, with a prediction that miR-103/107 regulates human metabolic pathways. *Mol Genet Metab*. 2007;91(3):209–17.
- Yamasaki T, Seki N, Yoshino H, Itesako T, Yamada Y, Tatarano S, et al. Tumor-suppressive microRNA-1291 directly regulates glucose transporter 1 in renal cell carcinoma. *Cancer Sci*. 2013;104(11):1411–9.
- Zhao X, Lu C, Chu W, Zhang B, Zhen Q, Wang R, et al. MicroRNA-124 suppresses proliferation and glycolysis in non-small cell lung cancer cells by targeting AKT-GLUT1/HKII. *Tumor Biol*. 2017;39(5):1010428317706215.
- Han N, Zhao W, Zhang Z, Zheng P. MiR-328 suppresses the survival of esophageal cancer cells by targeting PLCE1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;470(1):175–80.
- Chen C-H, Cheng C-Y, Chen Y-C, Sue Y-M, Liu C-T, Cheng T-H, et al. MicroRNA-328 inhibits renal tubular cell epithelial-to-mesenchymal transition by targeting the CD44 in pressure-induced renal fibrosis. *PLoS One*. 2014;9(6):e99802.
- Delic S, Lottmann N, Stelzl A, Liesenberg F, Wolter M, Götz S, et al. MiR-328 promotes glioma cell invasion via SFRP1-dependent Wnt-signaling activation. *Neuro-Oncology*. 2013;16(2):179–90.
- Li J-R, Wang J-Q, Gong Q, Fang R-H, Guo Y-L. MicroRNA-328 inhibits proliferation of human melanoma cells by targeting TGFβ2. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16:1575–9.
- Pan Y-Z, Morris ME, Yu A-M. MicroRNA-328 negatively regulates the expression of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in human cancer cells. *Mol Pharmacol*. 2009;75(6):1374–9.
- Li1ABCDEF W-Q, Li2ABCDEF G-Y-M, Tao2BCD B-B, Lu2ABCDEF Y-C, Hu2CDF G-H, Liu1DF H-M et al. Downregulation of ABCG2 expression in glioblastoma cancer stem cells with miRNA-328 may decrease their chemoresistance. *Med Sci Monit*. 2010;16(10):30.
- Monzo M, Santasusagna S, Moreno I, Martinez F, Hernández R, Muñoz C, et al. Exosomal microRNAs isolated from plasma of mesenteric veins linked to liver metastases in resected patients with colon cancer. *Oncotarget*. 2017;8(19):30859.
- Betel D, Koppal A, Agius P, Sander C, Leslie C. Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites. *Genome Biol*. 2010;11(8):R90.
- Siepel A, Bejerano G, Pedersen JS, Hinrichs AS, Hou M, Rosenbloom K, et al. Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes. *Genome Res*. 2005;15(8):1034–50.
- Hayes J, Peruzzi PP, Lawler S. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. *Trends Mol Med*. 2014;20(8):460–9.
- Hauptmann S, Grünwald V, Molls D, Schmitt W, Köbel M, Kriesche K, et al. Glucose transporter GLUT1 in colorectal adenocarcinoma cell lines is inversely correlated with tumour cell proliferation. *Anticancer Res*. 2005;25(5):3431.
- H-g Xue, A-h Yang, Sun X-g Lu, Y-y Tian Z-b. Expression of microRNA-328 functions as a biomarker for recurrence of early gastric cancer (EGC) after endoscopic submucosal dissection (ESD) by modulating CD44. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res*. 2016;22:4779.
- Xu XT, Xu Q, Tong JL, Zhu MM, Nie F, Chen X, et al. MicroRNA expression profiling identifies miR-328 regulates cancer stem cell-like SP cells in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2012;106(7):1320–30.
- Fong MY, Zhou W, Liu L, Alontaga AY, Chandra M, Ashby J, et al. Breast-cancer-secreted miR-122 reprograms glucose metabolism in premetastatic niche to promote metastasis. *Nat Cell Biol*. 2015;17(2):183–94.
- Zhang L, Zhang S, Yao J, Lowery FJ, Zhang Q, Huang W-C, et al. Microenvironment-induced PTEN loss by exosomal microRNA primes brain metastasis outgrowth. *Nature*. 2015;527(7576):100–4.

3.4 Article quart: “*Proteomic analysis of liquid biopsy from tumor-draining vein indicates that high expression of exosomal ECM1 is associated with relapse in stage I-III colon cancer*”

Resum

Els exosomes són potencials biomarcadors per ser estudiats mitjançant la biòpsia líquida en una gran diversitat de malalties, principalment en càncer, ja que són secretats per molts tipus cel·lulars, estan presents en diferents líquids corporals i generalment contenen informació de les seves cèl·lules d'origen. Els exosomes alliberats per les cèl·lules tumorals contenen molècules exclusivament seleccionades per educar i transformar les cèl·lules receptores amb informació genètica o alteracions moleculars característiques del tumor primari. L'objectiu d'aquest treball és identificar un patró característic de proteïnes susceptible a relacionar-se amb les metàstasis hepàtiques.

L'espectrometria de masses és un mètode òptim per analitzar el contingut proteic dels exosomes. Es van considerar únicament les proteïnes identificades en altes quantitats dins dels exosomes purificats de la vena que drena directament el tumor primari de colon en els pacients recaiguts: la VM. S'identificaren 49 proteïnes sobreexpressades en els exosomes dels pacients recaiguts respecte dels no recaiguts. Vint d'aquestes proteïnes apareixen anotades com a proteïnes exosomals i 14 d'elles s'han identificat exclusivament en cèl·lules de CCR.

En referència a les 49 proteïnes sobreexpressades s'ha descrit la seva relació en diferents processos biològics, incloent reconeixement cel·lular (7%), activació del complement (7%), fagocitosis (7%), respostes de defensa (17%), Immunitat mediada per cèl·lules B (7%), endocitosis mediada per receptors (7%), resposta a estrès (8%), processos metabòlics (13%), organització del component cel·lular (8%), regulació de processos biològics (9%), transducció de senyals (9%) i algunes tenien funció desconeguda (3%). D'aquestes, en destaca la proteïna ECM1 (*Extracellular Matrix protein 1*) la qual està 13.55 vegades més expressada en els exosomes aïllats de plasma de VM en pacients recaiguts respecte dels no recaiguts. La validació d'aquests resultats per western blot confirma aquest descobriment. De forma interessant, a l'estudiar els nivells d'expressió d'ECM1 també en VP observem que aquests no permeten discriminar els pacients recaiguts *versus* els no recaiguts. D'altra banda, a l'incloure individus sans per tal de comparar-los amb els pacients estudiats de CC, ECM1 està més expressada en exosomes de pacients tant en VM com en VP respecte a individus sans. Finalment, a l'estudiar el valor pronòstic de ECM1, alts nivells d'expressió d'ECM1 es relacionen amb menor temps a la recaiguda (TTR) (P=0.04).

Article “Proteomic analysis of liquid biopsy from tumor-draining vein indicates that high expression of exosomal ECM1 is associated with relapse in stage I-III colon cancer”



Volume 11 Number 3 June 2018 pp. 715–721 715

Proteomic Analysis of Liquid Biopsy from Tumor-Draining Vein Indicates that High Expression of Exosomal ECM1 Is Associated with Relapse in Stage I-III Colon Cancer¹

Sandra Santasusagna^{*}, Isabel Moreno[†],
Alfons Navarro^{*}, Joan J. Castellano^{*},
Francisco Martínez[†], Raquel Hernández[†],
Carmen Muñoz^{*} and Mariano Monzo^{*}

^{*}Molecular Oncology and Embryology Laboratory, Human Anatomy Unit, School of Medicine, University of Barcelona, IDIBAPS, Barcelona, [†]Department of Medical Oncology and Surgery, Hospital Municipal de Badalona, Badalona, Spain

Abstract

BACKGROUND: The analysis of exosomes in blood obtained from the tumor-draining mesenteric vein (MV) can identify tumor biomarkers before they reach target organs and form the premetastatic niche where circulating tumor cells can anchor. Our group has recently shown that microRNAs in plasma from the MV—but not the peripheral vein (PV)—have been related to liver metastases in colon cancer (CC) patients. Here we examine the exosomal protein cargo in plasma from the MV and paired PV in 31 CC patients. **PATIENTS AND METHODS:** The study included patients who were initially diagnosed with stage I-III CC and 10 healthy controls. Exosomes from the MV and PV of all patients and controls were isolated by ultracentrifugation and confirmed by cryogenic transmission electron microscopy. High-throughput proteomic analysis by mass spectrometry was used to identify expression levels of exosomal proteins. Findings were confirmed by Western blot. **RESULTS:** Exosomal ECM1 protein was more highly expressed in patients than in controls and was 13.55 times higher in MV from relapsed than relapse-free patients. High exosomal ECM1 expression was associated with liver metastases. Patients with high exosomal ECM1 expression in MV—but not PV—plasma had shorter time to relapse than those with low ECM1 expression ($P = .04$). **CONCLUSION:** High levels of exosomal ECM1 protein can identify CC patients with a higher risk of relapse. The analysis of exosomes isolated from the tumor-draining MV is a promising method for the identification of biomarkers before they reach the target organ.

Translational Oncology (2018) 11, 715–721

Introduction

Colon cancer (CC) is the third most frequent cancer and the second cause of death from cancer in the developed world [1]. Disease stage is the main prognostic factor for relapse and survival. Surgery is the standard treatment for stage I-III CC, followed by adjuvant therapy in stage III but not in stage I, while in stage II, the benefit of adjuvant therapy is still controversial [2]. However, approximately 30% of patients with stage I-III disease and up to 65% of stage IV patients will relapse after treatment [3], highlighting the need for prognostic biomarkers that can identify patients more likely to develop metastases.

In recent years, exosomes and their cargo have been shown to be promising markers of tumor growth and metastasis development. Exosomes are small vesicles (30-100 nm) involved in cell-to-cell communication. An exosome contains a small cytosol carrying coding and noncoding RNAs, DNA, and proteins [4]. Exosomes are secreted

Address all correspondence to: Mariano Monzo, MD, PhD, Professor and Chair, Unit of Human Anatomy and Embryology, School of Medicine, Hospital Clinic, University of Barcelona, Casanova 143, 08036 Barcelona, Spain.

E-mails: sandra.santasusagna@ub.edu, imoreno@bsa.cat, anavarroponz@ub.edu, joan.castellano@ub.edu, fmartinez@bsa.cat, fmrodenas@gmail.com, rahernandez@bsa.cat, carmen.munoz@ub.edu, mmonzo@ub.edu

¹ Funding: This work was supported by a grant from Servei de Donació del Cos a la Ciència (Body Donation Service) of the University of Barcelona. S. S. and J. J. C. are APIF fellows of the University of Barcelona. Neither of these funding bodies had a role in the design and conduct of the study; collection, management, analysis, and interpretation of the data; preparation, review, or approval of the manuscript; or decision to submit the manuscript for publication.

Received 20 February 2018; Revised 21 March 2018; Accepted 23 March 2018

© 2018 . Published by Elsevier Inc. on behalf of Neoplasia Press, Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>). 1936-5233/18

<https://doi.org/10.1016/j.tranon.2018.03.010>

by several cell types and captured by receptor cells in target organs, where they regulate several normal and pathological physiological processes. They play an active role in the metastatic process by modifying the surrounding stroma in order to prepare the tissue microenvironment for the anchoring of metastatic cells [5–7].

The majority of studies to identify circulating biomarkers of metastases are performed in blood obtained from the peripheral vein (PV) of the forearm. However, by the time the blood reaches the PV, the biomarkers associated with metastases may well have been retained in the target organ and will thus be present at lower levels in the PV blood sample, which may skew study results. Blood from the colon flows through the mesenteric veins (MVs) into the vena porta, carrying the tumor cells and exosomes associated with CC. For this reason, metastases associated with CC are primarily locoregional (in the liver or peritoneum) and less frequently distant (in the lung or bone) [8]. It is thus logical to suppose that obtaining blood from the MV will allow us to identify CC tumor biomarkers before they reach the target organs [9,10].

We have examined exosomes and their protein cargo by proteomic analysis in MV blood samples from relapsed and relapse-free CC patients who were initially diagnosed with stage I-III disease. The aim of the study was to identify exosomal proteins that can reliably predict the development of metastases in CC patients.

Material and Methods

Patients

From August 2009 to August 2013, samples were obtained from 31 patients initially diagnosed with stage I-III CC who underwent surgical resection at the Municipal Hospital of Badalona (Badalona, Spain). At the time of performing the present study, we selected 16 patients who had not relapsed and 15 who had. Four of the relapsed patients had liver metastases, seven had peritoneal metastases, and four had lung metastases (Table 1). All 31 patients had undergone a complete history and physical examination prior to surgery. In addition, we obtained blood samples from 10 healthy controls.

Approval for the study was obtained from the institutional review board of the hospital, and signed informed consent was obtained from all patients in accordance with the Declaration of Helsinki.

Blood Samples

Paired MV and PV blood was obtained from all 31 patients as previously described [9]. On the day of surgery, 5 ml of blood was drawn from the PV and stored in heparinized tubes. During surgery, with vascular ligation before tumor resection, an additional 5 ml of blood was drawn from either the superior or the inferior MV, according to the anatomic location of the tumor. Healthy control PV blood samples were obtained from the Hospital Clinic Blood Bank.

Sample Processing and Exosome Isolation

Plasma from all blood samples was obtained by centrifugation of the whole blood at 5000g during 10 minutes and saved frozen at –80°C until further use.

Exosomes were isolated from 50 µl of plasma samples by ultracentrifugation as previously described [11]. Briefly, samples were sequentially centrifuged at 4°C at 300g for 5 minutes, followed by 2500g for 20 minutes and finally 10,000g for 30 minutes, followed by ultracentrifugation at 100,000g for 2 hours. Then the pellet was washed with DPBS and ultracentrifuged again at 100,000g for 1 hour in a Sorvall MX Plus Micro-Ultracentrifuge with S140AT Rotor and Polycarbonate Tubes (Thermo Scientific).

Table 1. Patient Characteristics and Univariate *P* Values for TTR in 31 Surgical CC Patients

Characteristics	<i>N</i> (%)	<i>P</i>
Sex		.42
Male	18 (58)	
Female	13 (42)	
Median age, years	72	.92
CEA levels		.01
≤5	24 (77)	
>5	7 (23)	
C 19.9 levels		.80
≤37	27 (87)	
>37	4 (13)	
Tumor location		.99
Left colon	16 (52)	
Right colon	15 (48)	
Tumor size (cm)		.24
≤5	28 (90)	
>5	3 (10)	
Histological type		.03
Well differentiated	28 (90)	
Poorly differentiated	3 (10)	
Preexistent polyp		.65
Absent	24 (77)	
Present	7 (23)	
TNM stage		.003
I-II	18 (58)	
III	13 (42)	
Lymph nodes examined		.13
<12	8(26)	
>12	23(74)	
Relapsed		
Yes	15 (48)	
No	16 (52)	
Metastatic site		
Liver	4 (27)	
Peritoneum	7 (46)	
Lung	4 (27)	

CEA, carcinoma embryonic antigen; TNM, tumor, nodule, metastasis.

Exosomes were characterized by two methods: cryo–transmission electron microscopy (cryo-TEM) in a Jeol JEM 2011 transmission electron microscope at the Microscope Facility of the Autonomous University of Barcelona and Western blot analysis using the exosome marker TSG101.

Sample Preparation for Mass Spectrometry

For the analysis of exosome protein cargo by mass spectrometry, the exosome dry pellet was resuspended in 50 µl of DPBS. A training set of 11 different samples was analyzed.

Proteins from exosomes were solubilized in an SDS buffer (0.5% SDS, 50 mM Tris HCL, 5 mM DTT), incubated during 60 minutes at 65°C to denaturate proteins, and alkylated with 55 mM iodoacetamide and digested by trypsin. Following digestion, each sample was labeled with one specifically coded TMT reagent. The multiplex experiment was made by virtue of a specific reporter fragment ion of *m/z* 126, 127, 128, 129, 130, and 131. In a six-plex experiment, one channel was reserved for a reference sample that was created as a combination of aliquots from each primary sample in the study. The remaining five channels were utilized for samples. Labeled samples were combined into a tub, mixed, and fractionated by strong cation exchange into 10 fractions. Each of the fractions was further separated by HPLC and analyzed online in a LTQ VELOS Orbitrap mass spectrometer (Thermo).

Western Blot and Antibodies

Western blot analysis was performed as previously described [11]. Briefly, exosome dry pellets were mixed with LDS sample buffer (Life Technologies) and sample reducing agent (Life Technologies) according

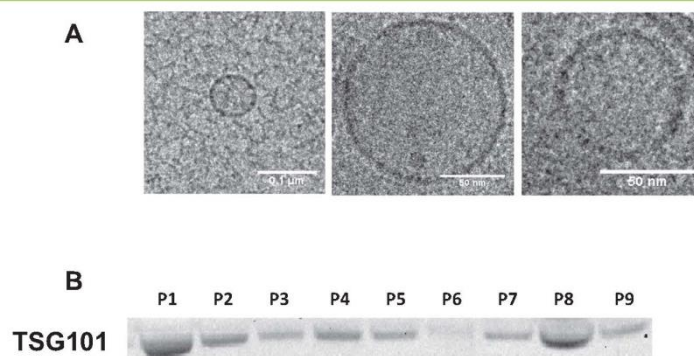


Figure 1. Exosome characterization in plasma samples from colon cancer patients by (A) cryo-TEM and (B) Western blot using TSG101 marker.

to the manufacturer's protocol. After incubation for 10 minutes at 97°C, exosome samples were loaded onto a SDS-PAGE (Novex 4%–12% Bis-Tris gel, Life Technologies), transferred to a nitrocellulose membrane by iBlot (Life Technologies), and blocked for 1 hour with 1× TBST buffer (Fisher Scientific) with 5% w/v nonfat dry milk, according to the manufacturer's instructions. The following primary antibodies were used and incubated in blocking buffer at 4°C overnight: TSG101 (ab83, Abcam) as a marker of exosomes and ECM1 (sc-365946, Santa Cruz Biotechnology) as a marker of the main protein isolated inside the exosomes. The signal was obtained using the Novex ECL Chemiluminescent Substrate Reagent kit (WP 20005, Invitrogen), and the images were developed using the Chemidoc System (Bio-Rad).

Statistical analyses

All 31 patients were evaluable for time to relapse (TTR), calculated from the date of surgery to the date of relapse or last follow-up. The univariate analysis of TTR according to protein expression was performed with the Kaplan-Meier method and compared using the log-rank test. The optimal cutoff point for protein expression was assessed by the Cutoff Finder software (<http://molpath.charite.de/cutoff/index.jsp>) [12]. Statistical analyses were performed with SPSS 22 (SPSS Inc., Chicago, IL), R 2.6.0 Software (Vienna, Austria), BRB Array Tools version 3.5.0 software (Richard Simon & BRB-ArrayTools Development Team, <http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>, National Cancer Institute, Bethesda, MD), and TIGR Multiexperiment viewer version 4.0 software (Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA). Statistical significance was set at $P < .05$.

Results

Patients

Thirty-one patients were included in the study, all of whom were initially diagnosed with stage I-III CC and followed using the standard protocol followed by Hospital Municipal de Badalona. Median age was 72 years, and 18 (58%) were males. Eighteen patients had stage I-II disease. Fifteen patients later relapsed (4 stage II and 11 stage III). Mean follow-up was 45.2 months (range, 26.4–63.8) (Table 1). Approval for the study was obtained from the institutional review board of the hospital, and signed informed consent was obtained from all patients and controls in accordance with the Declaration of Helsinki.

All 31 patients underwent a complete history and physical examination including routine hematological and biochemical analyses, chest radiographs, and computed tomography (CT) of the thorax and abdomen. Target lesions detected by abdominal ultrasound were also assessed by CT or magnetic resonance imaging.

Exosome Isolation and Proteomic Analysis

Both MV and PV plasma were obtained from all 31 patients, and exosomes were isolated from all plasma samples. The morphological analysis by cryo-TEM showed electron dense round 30- to 100-nm vesicles with a bilayer membrane [13]. In addition, Western blot analysis confirmed the presence of the exosomal marker TSG101 (Figure 1).

In a training set of 11 of the 31 patients, using mass spectrometry, we profiled the exosome content of the plasma samples. A change of more than one-fold is generally accepted as a significant cutoff value in tandem mass tag technology [14,15]. We identified a total of 202 proteins in the exosomes of the 11 patients. Of these 202 proteins, an exclusive panel of 49 proteins was detected as upregulated at least one-fold only in exosomes from relapsed patients in comparison with those from relapse-free patients. Twenty of these were considered exosomal proteins as they were annotated in curated databases of extracellular vesicles such as Vesiclepedia (<http://www.microvesicles.org>) or Exocarta (<http://www.exocarta.org>), and 14 were specifically identified in colorectal cancer cells (Table 2).

Gene ontology (GO) analysis was performed on these 14 upregulated proteins using Panther (version 9.0; <http://www.pantherdb.org>) according to the GO terms for molecular function, biological process and cellular component [16]. These 14 upregulated proteins are involved in various biological processes, including cell recognition, complement activation, phagocytosis, defense response, B cell-mediated immunity, receptor-mediated endocytosis, response to stress, protein metabolic process, cellular component organization, regulation of biological process, signal transduction, and extracellular matrix function (Figure 2A).

Higher expression of exosomal ECM1 protein in MV plasma from relapsed patients

Of the 14 exosomal proteins specifically related to colorectal cancer identified by mass spectrometry in the training set, only extracellular matrix protein 1 (ECM1) was differentially expressed in MV plasma

Table 2. Abundance of the Selected Exosomal Proteins Identified by Mass Spectrometry in a Training Set of 11 CC Patients

	Relapse-Free Patients	Relapsed Patients	Ratio of Relapsed to Relapse-Free Patients
ITIH4	0.67	0.71	1.06
IGHM	0.65	0.70	1.08
CD5L	0.74	0.81	1.09
APOA1	0.58	0.64	1.12
APOB	0.62	0.76	1.23
ITIH2	0.62	0.79	1.27
C4BPA	0.66	0.90	1.36
IGHA1	0.56	0.88	1.57
AMBP	0.69	1.14	1.65
C1QC	0.46	0.82	1.77
IGHG3	0.53	0.93	1.77
C1QB	0.48	0.92	1.92
IGKC	0.56	1.14	2.02
ECM1	0.06	0.88	13.55

The ratio between relapsed versus relapse-free patients is expressed as a quotient and indicates the relationship in quantity between the two groups of patients.

from relapsed versus relapse-free patients. ECM1 levels were 13.55 times higher in relapsed than in relapse-free patients (Figure 2B). We then validated this finding in the entire cohort of 31 patients by Western blot analysis, which confirmed a higher ECM1 expression in relapsed patients (Figure 3A).

In contrast, in PV plasma, the expression levels of ECM1 were similar in relapsed and relapse-free patients (Figure 3B).

Exosomal ECM1 levels were then analyzed in MV and PV plasma from the 15 relapsed patients, classified according to metastatic site. In patients with liver metastases, ECM1 levels were much higher in MV than in PV plasma, while levels in patients with peritoneal or lung metastases were similar in MV and PV (Figure 3C).

Exosomal ECM1 Protein in MV Plasma Associated with TTR

We then examined the potential prognostic impact of ECM1 expression in all 31 patients and found that high MV expression of exosomal ECM1 was associated with shorter TTR. Mean TTR was

40.2 months (95% CI 33.5-46.9 months) for the 17 patients with low ECM1 levels compared to 31.3 months (95% CI 21.4-41.2 months) for the 14 patients with high levels ($P = .04$) (Figure 4).

Discussion

Metastases are the primary cause of death in cancer patients. Although the exact mechanism whereby metastases occur is unknown, recent findings have shown that cells from the primary tumor release extracellular vesicles, such as exosomes, which play an important role in the metastatic process [17]. When exosomes reach their target organ, they release their cargo of miRNAs and proteins, thus modifying the function of the receptor cells, in order to prepare the premetastatic niche for the anchoring and growth of circulating tumor cells [18-20]. The exosomal cargo thus acts directly on the target organ to initiate the metastatic process.

Several studies have found that the detection of exosomal biomarkers in blood can help predict the formation of metastases [21-23]. The majority of these studies have focused on exosomal miRNAs [22,24-27], while few have examined the role of exosomal proteins [28-30]. Moreover, these studies of exosomal cargo have primarily analyzed blood drawn from the PV, although the exosomal molecules involved in metastasis will already have been retained in the target organ before reaching the PV. This phenomenon may explain the conflicting findings on the impact of exosomal cargo in colorectal cancer [31,32]. However, a recent study comparing exosomal miRNAs in blood from the MV versus the PV found that exosomal miR-328 from the MV was associated with metastases, while there was no correlation between miRNAs from the PV and metastases [10]. This finding highlights the importance in CC of obtaining tumor biomarkers from the MV before they reach the liver.

In the present study, we have examined whether the exosomal proteins in plasma obtained from the MV and paired PV are differentially expressed between relapsed and relapse-free CC patients. We have found that although exosomal proteins are present in both MV and PV plasma, which was to be expected since exosomes are

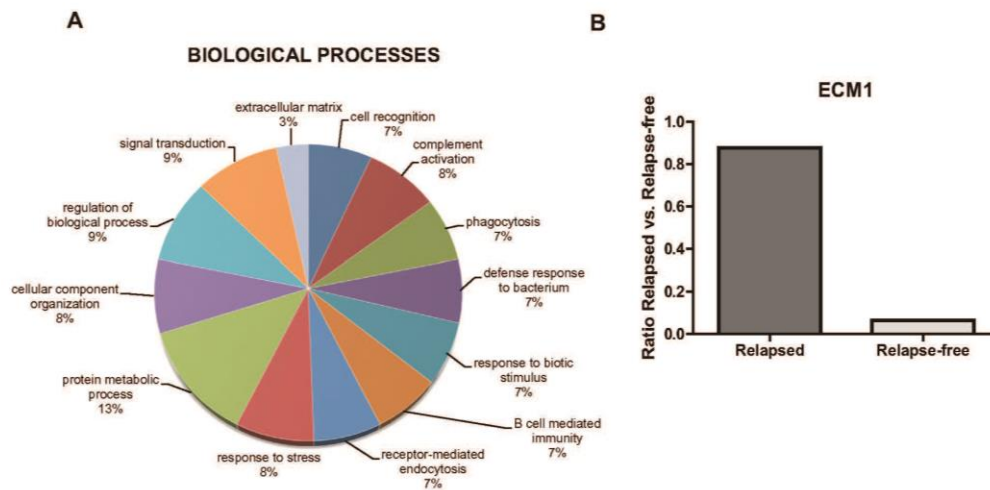


Figure 2. (A) The biological processes involving the proteins identified by mass spectrometry as being differentially expressed in relapsed and relapse-free patients. of the mainly differentially expressed proteins in relapsed patients identified by mass spectrometry. GO software was used for the classification analysis, and the information was retrieved from the "protein center" database. (B) ECM1 was identified as the protein most differentially expressed between relapsed and relapse-free patients.

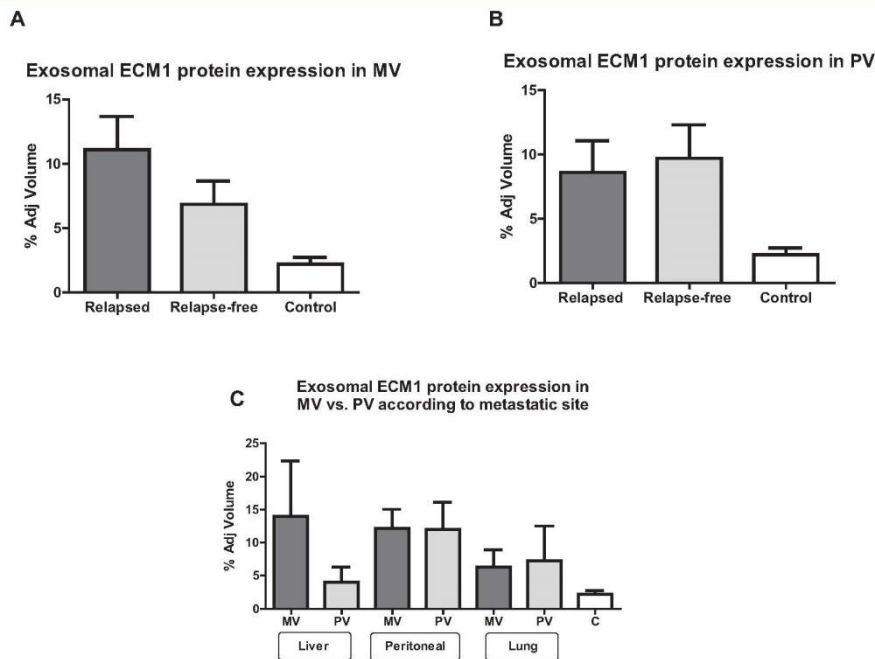


Figure 3. ECM1 protein expression levels (fold change) in exosomes isolated from plasma from the (A) MV and (B) paired PV of relapsed and relapse-free patients. (C) Exosomal ECM1 protein expression levels in MV and PV from relapsed patients classified according to the site of metastasis.

released by both normal and tumor cells [33], they are more highly expressed in MV than in PV plasma. Moreover, while the levels of most proteins were quite similar in relapsed and relapse-free patients, relapsed patients had much higher levels of ECM1 than those who were relapse-free, suggesting that exosomal ECM1 could play a role in the formation of metastases (Figure 5).

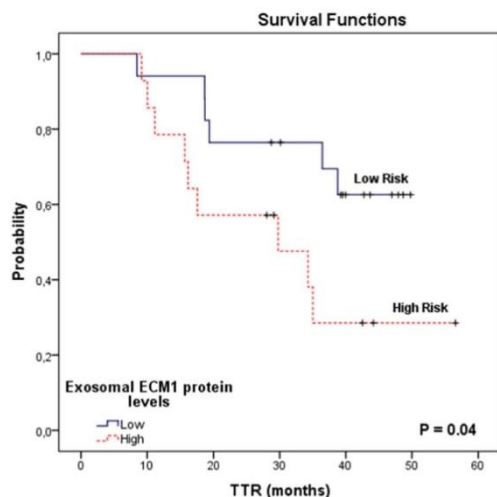


Figure 4. TTR in 31 colon cancer patients according to exosomal ECM1 protein expression levels in plasma from the MV.

ECM1 is a 85-kDa secreted glycoprotein that participates in several normal physiological functions, such as the maintenance of skin integrity and homeostasis [34]. However, it is overexpressed in many epithelial tumors, including breast cancer, squamous cell carcinoma of the esophagus, gastric cancer, and CC [35]. Interestingly, the exosomal ECM1 protein has recently been detected in 82% of breast cancer patients with nontuberculous mycobacterial disease [36].

In line with these findings, we have also observed high levels of exosomal ECM1 in MV plasma from CC patients. Furthermore, relapsed patients had even higher levels than those who were relapse-free. We can, therefore, speculate that high exosomal ECM1 levels in plasma obtained from the MV, before the exosomes arrive at the target organ, can help identify patients more likely to relapse. Moreover, an association between ECM1 and metastasis has been reported in several studies [37,38].

Furthermore, in the present study, we have observed a higher level of exosomal ECM1 in MV than PV plasma among patients with liver metastases, while levels in MV and PV plasma were similar among patients with peritoneal or lung metastases. This finding indicates that the exosomes released by the primary tumor may be organotropic and can be retained specifically by liver tissue. In fact, proteomic studies have shown that the exosomal $\alpha\beta5$ integrin was associated with liver metastases, while the $\alpha6\beta4$ and $\alpha6\beta1$ integrins were associated with lung metastases [5].

We have also found that patients with high levels of exosomal ECM1 have a shorter TTR than those with low levels. Although the exact role of ECM1 in metastasis formation is not clear, findings in breast cancer indicate that ECM1 helps to increase cancer stem cells by stabilizing β -catenin [38]. In addition, ECM1

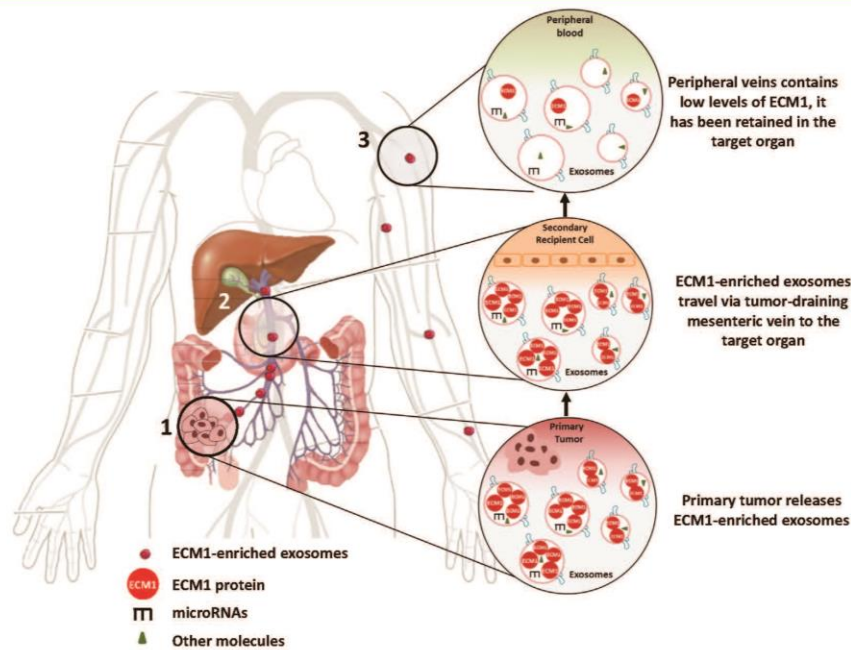


Figure 5. Anatomic route of exosomes released by the primary colon tumor. Venous return of the colon occurs through the MVs. Both MVs flow into the hepatic portal vein, which carries blood to the target organ, the liver, before reaching the peripheral veins. This anatomic distribution could explain the higher frequency of liver metastases associated with primary tumors located in the colon.

protein overexpression induces tumor progression in liver cancer through epithelial-mesenchymal transition [37].

In summary, our findings indicate that the analysis of exosomal ECM1 in blood drawn from the MV is a simple surgical method that can help identify patients with a higher risk of relapse by detecting tumor markers before they reach the target organ. Taken together with previous findings on exosomal miRNAs [10] and integrins [5], our findings lead us to suggest that ECM1, ideally in combination with other known metastasis-associated molecules, may well prove to be a sensitive marker for diagnosis and prognosis in CC patients. Moreover, we recommend the use of MV blood over PV whenever possible in future biomarker studies. In addition, future studies, ideally with a larger number of patients, should focus on the organotropism of exosomes to examine their association with specific metastatic sites, as well as on the functional mechanism of ECM1 whereby it impacts metastasis.

Conflict of Interest Statement

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors thank Renée Grupp for assistance in drafting the manuscript.

References

- [1] Miller KD, Siegel RL, Lin CC, Mariotto AB, Kramer JL, and Rowland JH, et al (2016). Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* 66 (4), 271–289.
- [2] Benson III AB, Schrag D, Somerfield MR, Cohen AM, Figueredo AT, and Flynn PJ, et al (2004). American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. *J Clin Oncol* 22(16), 3408–3419.
- [3] van der Stok EP, Spaander MCW, Grunhagen DJ, Verhoef C, and Kuipers EJ (2017). Surveillance after curative treatment for colorectal cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 14(5), 297–315.
- [4] Hamam R, Ali AM, Alsaleh KA, Kassem M, Alfayez M, and Aldahmash A, et al (2016). microRNA expression profiling on individual breast cancer patients identifies novel panel of circulating microRNA for early detection. *Sci Rep* 6, 25997.
- [5] Hoshino A, Costa-Silva B, Shen T-L, Rodrigues G, Hashimoto A, and Mark MT, et al (2015). Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* 527(7578), 329.
- [6] Milane L, Singh A, Mattheolabakis G, Suresh M, and Amiji MM (2015). Exosome mediated communication within the tumor microenvironment. *J Control Release* 219, 278–294.
- [7] O'Driscoll L (2015). Expanding on exosomes and ectosomes in cancer. *N Engl J Med* 372(24), 2359–2362.
- [8] Labianca R, Beretta GD, Kildani B, Milesi L, Merlin F, and Mosconi S, et al (2010). Colon cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 74(2), 106–133.
- [9] Monzo M, Martínez-Rodenas F, Moreno I, Navarro A, Santasusagna S, and Macias I, et al (2015). Differential MIR-21 expression in plasma from mesenteric versus peripheral veins: an observational study of disease-free survival in surgically resected colon cancer patients. *Medicine* 94(1).
- [10] Monzo M, Santasusagna S, Moreno I, Martínez F, Hernández R, and Muñoz C, et al (2017). Exosomal microRNAs isolated from plasma of mesenteric veins linked to liver metastases in resected patients with colon cancer. *Oncotarget* 8(19), 30859.
- [11] Ruiz-Martinez M, Navarro A, Marrades RM, Viñolas N, Santasusagna S, and Muñoz C, et al (2016). YKT6 expression, exosome release, and survival in non-small cell lung cancer. *Oncotarget* 7(32), 51515.
- [12] Budczies J, Klauschen F, Sinn BV, Györfy B, Schmitt WD, and Darb-Esfahani S, et al (2012). Cutoff Finder: a comprehensive and straightforward Web application enabling rapid biomarker cutoff optimization. *PLoS One* 7(12), e51862.

- [13] Ha D, Yang N, and Nadithe V (2016). Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges. *Acta Pharm Sin B* 6(4), 287–296.
- [14] Zeng X, Yang P, Chen B, Jin X, Liu Y, and Zhao X, et al (2013). Quantitative secretome analysis reveals the interactions between epithelia and tumor cells by in vitro modulating colon cancer microenvironment. *J Proteomics* 89, 51–70.
- [15] Fang Z, Yao W, Xiong Y, Zhang J, Liu L, and Li J, et al (2010). Functional elucidation and methylation-mediated downregulation of ITGA5 gene in breast cancer cell line MDA-MB-468. *J Cell Biochem* 110(5), 1130–1141.
- [16] Zhang H, Xu Y, Filipovic A, Lit L, Koo C, and Stebbing J, et al (2013). SILAC-based phosphoproteomics reveals an inhibitory role of KSR1 in p53 transcriptional activity via modulation of DBC1. *Br J Cancer* 109(10), 2675.
- [17] Tkach M and Théry C (2016). Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go. *Cell* 164(6), 1226–1232.
- [18] Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, and Moreno-Bueno G, et al (2012). Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med* 18(6), 883–891.
- [19] Costa-Silva B, Aiello NM, Ocean AJ, Singh S, Zhang H, and Thakur BK, et al (2015). Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nat Cell Biol* 17(6), 816–826.
- [20] de la Fuente A, Alonso-Alconada L, Costa C, Cueva J, Garcia-Caballero T, and Lopez-Lopez R, et al (2015). M-trap: exosome-based capture of tumor cells as a new technology in peritoneal metastasis. *J Natl Cancer Inst* 107(9).
- [21] Skog J, Würländer T, Van Rijn S, Meijer DH, Gainche I, and Curry WT, et al (2008). Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 10(12), 1470–1476.
- [22] Schwarzenbach H (2017). Clinical relevance of circulating, cell-free and exosomal microRNAs in plasma and serum of breast cancer patients. *Oncol Res Treat* 40(7-8), 423–429.
- [23] Erb U, Zhao K, Wang Z, Xiao L, and Zöller M (2017). Murine and human pancreatic tumor exosome recovery in mouse serum: diagnostic and prognostic potential and target cell delivery. *Cancer Lett* 403, 1–12.
- [24] Wu K, Feng J, Xing F, Liu Y, Sharma S, and Watabe K (2017). Exosomal miR-19a: a novel communicator between cancer cell and osteoclast in osteolytic bone metastasis of breast cancer. *AACR*; 2017.
- [25] Lan F, Qing Q, Pan Q, Hu M, Yu H, and Yue X (2017). Serum exosomal miR-301a as a potential diagnostic and prognostic biomarker for human glioma. *Cell Oncol*, 1–9.
- [26] Teng Y, Ren Y, Hu X, Mu J, Samykurty A, and Zhuang X, et al (2017). MVP-mediated exosomal sorting of miR-193a promotes colon cancer progression. *Nat Commun* 8, 14448.
- [27] Zhao L, Yu J, Wang J, Li H, Che J, and Cao B (2017). Isolation and identification of miRNAs in exosomes derived from serum of colon cancer patients. *J Cancer* 8(7), 1145.
- [28] Campanella C, Rappa F, Sciumè C, Marino Gammazza A, Barone R, and Bucchieri F, et al (2015). Heat shock protein 60 levels in tissue and circulating exosomes in human large bowel cancer before and after ablative surgery. *Cancer* 121(18), 3230–3239.
- [29] Yunusova N, Tamkovich S, Stakheeva M, Afanas'ev S, Frolova A, Kondakova I, editors. The characterization of exosome from blood plasma of patients with colorectal cancer. AIP Conference Proceedings. AIP Publishing; 2016.
- [30] Chen Y, Xie Y, Xu L, Zhan S, Xiao Y, and Gao Y, et al (2017). Protein content and functional characteristics of serum-purified exosomes from patients with colorectal cancer revealed by quantitative proteomics. *Int J Cancer* 140(4), 900–913.
- [31] Matsumura T, Sugimachi K, Iinuma H, Takahashi Y, Kurashige J, and Sawada G, et al (2015). Exosomal microRNA in serum is a novel biomarker of recurrence in human colorectal cancer. *Br J Cancer* 113(2), 275–281.
- [32] Ogata-Kawata H, Izumiya M, Kurioka D, Honma Y, Yamada Y, and Furuta K, et al (2014). Circulating exosomal microRNAs as biomarkers of colon cancer. *PLoS One* 9(4), e92921.
- [33] Piccin A, Murphy WG, and Smith OP (2007). Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev* 21(3), 157–171.
- [34] Sercu S, Lambeir A, Steenackers E, El Ghalbzouri A, Geentjens K, and Sasaki T, et al (2009). ECM1 interacts with fibulin-3 and the beta 3 chain of laminin 332 through its serum albumin subdomain-like 2 domain. *Matrix Biol* 28(3), 160–169.
- [35] Wang L, Yu J, Ni J, Xu X-M, Wang J, and Ning H, et al (2003). Extracellular matrix protein 1 (ECM1) is over-expressed in malignant epithelial tumors. *Cancer Lett* 200(1), 57–67.
- [36] Phillely JV, Kannan A, Griffith DE, Devine MS, Benwill JL, and Wallace Jr RJ, et al (2017). Exosome secretome and mediated signaling in breast cancer patients with nontuberculous mycobacterial disease. *Oncotarget* 8(11), 18070.
- [37] Chen H, Jia W, and Li J (2016). ECM1 promotes migration and invasion of hepatocellular carcinoma by inducing epithelial-mesenchymal transition. *World J Surg Oncol* 14(1), 195.
- [38] Lee K, Nam K, Oh S, Lim J, Kim R, and Shim D, et al (2015). ECM1 regulates tumor metastasis and CSC-like property through stabilization of β -catenin. *Oncogene* 34(50), 6055–6065.

DISCUSSION

4. Discussió

Estudis recents descriuen que el tumor primari allibera molècules amb propietats tumorogèniques a la circulació sanguínia, afavorint el desenvolupament de la metàstasi a l'òrgan diana [349]. En aquest sentit, diversos treballs han relacionat la presència de certs tipus cel·lulars alliberats pel tumor, com els miRNAs lliures o empaquetats en exosomes, a la circulació sanguínia de pacients oncològics amb el procés carcinogènic [229, 230, 350, 351]. Els estudis més recents posen de manifest que, en una primera fase, els exosomes alliberats pel tumor primari poden estar dotats d'una capacitat organotrópica que li permetria ancorar-se al teixit diana [61, 62]. Seguidament, els exosomes podrien fusionar-se amb les cèl·lules de l'estroma de l'òrgan diana, alterant les seves funcions i preparant així un "nínjol pre-metastàtic" que representaria terreny abonat per tal de que les cèl·lules tumorals, alliberades pel tumor primari, puguin anclar-se i desenvolupar-se [63]. Cal recordar que aquesta hipòtesi és una actualització de la teoria clàssica del "*seed and soil*" proposada per Stephen Paget a l'any 1889 [64].

Tenint en compte que en el CC el tumor primari allibera tant factors potencialment oncogènics com també cèl·lules tumorals a través del sistema venós, cal suposar que les venes mesentèriques, abans de drenar a l'òrgan diana, poden ser portadores d'altres concentracions de factors metastàtics. D'altra banda, en les venes perifèriques, tant els factors metastàtics com les cèl·lules tumorals circulants, estan més diluïts probablement degut a la seva retenció en l'òrgan diana. Aquest raonament explicaria la gran heterogeneïtat de resultats que s'obtenen quan s'analitzen mostres de biòpsia líquida procedent de venes perifèriques [66, 67].

Totes aquestes consideracions es justifiquen en els treballs que componen la present tesi doctoral.

Discussió de l'article primer: "*Differential miR-21 expression in plasma from mesenteric versus peripheral veins*"

El miR-21 és un dels miRNAs més estudiats en mostres de teixit i s'ha relacionat tradicionalment amb el CCR ja que es troba elevat tant en els adenomes com en els carcinomes de colon [308]. Aquest treball representa un estudi pilot de la importància d'estudiar biomarcadors en la VM per això s'evaluen els nivells d'expressió d'un miRNA clàssicament associat a CC, miR-21, en la VM i la seva correlació amb la metàstasi.

Els resultats indiquen que hi ha una sobreexpressió de miR-21 en teixit tumoral i plasma de VM respecte al teixit normal i plasma de VP. Aquest fet suggereix que el tumor primari allibera altes

concentracions de miR-21 en la VM i aquestes queden diluïdes en la circulació sistèmica. Això explicaria perquè en altres estudis, només aproximadament el 30% dels miRNAs detectats en VP reflexaven el perfil de miRNAs del tumor primari [352]. Quan analitzem altres característiques clíniques i patològiques, observem que l'expressió de miR-21 en VM es relaciona amb els nivells de CEA5, malgrat desconexim si hi ha alguna relació entre els nivells de CEA5 i miR-21, en concordança amb els nostres resultats, estudis prèvis mostren que els pacients amb CCR tenen nivells més alts de CEA5 en VM que en VP [353, 354]. A més, els nivells d'expressió de miR-21 en VM també correlacionen de forma estadísticament significativa amb la mida tumoral i la localització anatòmica del tumor. El conjunt de tots aquests resultats suggereixen que les venes pròximes al tumor podrien ser una font més acurada de biomarcadors.

A nivell de pronòstic, als 4 anys de seguiment, els pacients amb alts nivells de miR-21 en VM mostren un pitjor pronòstic, en termes de supervivència lliure de malaltia, respecte als pacients que presenten baixos nivells de miR-21 en VM, mentre que no s'observen diferències en els nivells de miR-21 en VP; fet que suggereix que el miR-21 es detecta més fàcilment en VM que en VP. De forma interessant, els pacients amb alts nivells de miR-21 en ambdues regions, VM i VP, presenten una supervivència lliure de malaltia més curta que aquells amb baixos nivells en ambdues localitzacions. En conseqüència, es postula que alts nivells de miR-21 de forma mantinguda al llarg del temps podria ser un factor de mal pronòstic.

D'altra banda, els 8 pacients que recauen i desenvolupen metàstasis en zones drenades per la VM del colon, generalment al fetge, tenen majors nivells de miR-21 en VM que en VP. En canvi, les metàstasis desenvolupades en zones no drenades per la VM, com ara el pulmó, no s'associen a canvis en l'expressió de miR-21. Aquests fets concorden amb estudis que reporten la capacitat de miR-21 per inhibir alguns dels seus gens diana importants pel desenvolupament de càncer hepàtic, com ara *MAP2K3* [355], *PDCD4* [356] i *PTEN* [357]. A més, un altre estudi basat en arrays, identificà un perfil de 7 miRNAs (miR-122, miR-192, miR-21, miR-223, miR-26a, miR-27a, i miR-801) associat a tumors hepatocel·lulars, on també es descriu el potencial del miR-21 per distingir entre pacients i individus sans [358].

Recentment s'ha descrit que els miRNAs alliberats pel tumor primari poden jugar un paper important en la preparació del nínxol pre-metastàtic [359, 360]. Els nostres resultats suggereixen que els miRNAs alliberats per la VM podrien quedar retinguts en les zones pròximes al tumor primari on podrien començar a desenvolupar el nínxol pre-metastàtic. No obstant, per validar aquests resultats calen més estudis d'altres miRNAs associats amb CC analitzats en plasma de VM i VP, així com també examinar l'associació entre l'expressió de miRNAs en VM i les metàstasis locoregionals o hepàtiques.

Amb aquesta finalitat, s'ha dissenyat l'article segon que inclou microarrays per tal d'estudiar un gran nombre de miRNAs i així poder obtenir un perfil de miRNAs en VM que pronostiquin la recaiguda de la malaltia.

Discussió de l'article segon: “*Exosomal microRNAs isolated from plasma of mesenteric veins linked to liver metastases in resected patients with colon cancer*”

Aquest treball pretén estudiar un perfil d'expressió de miRNAs lliures en plasma i associats a exosomes en VM de pacients de CC.

Després d'analitzar un panell de 754 miRNAs, s'ha identificat un perfil de 4 miRNAs (let-7g, miR-15b, miR-155 i miR-328) sobreexpressats de forma estadísticament significativa en plasma procedent de VM en comparació al de VP. S'observa que els 4 miRNAs descrits s'associen a valor pronòstic en termes de TTR tant en VM com en VP, però mentre que la seva sobreexpressió en VM es relaciona amb mal pronòstic, en VP es relaciona amb bon pronòstic; és a dir, s'esdevé una inversió en les corbes de supervivència. Aquests resultats coincideixen amb els obtinguts prèviament en el nostre estudi pilot amb miR-21, on alts nivells de miR-21 en VM s'associen a mal pronòstic però aquesta relació no es troba a l'estudiar la VP. En conseqüència, podem especular que els miRNAs amb major capacitat metastàsica podrien quedar retinguts a l'òrgan diana, en el cas del colon: el fetge, mentre que aquells amb menys potencial maligne podrien continuar la seva ruta a través del torrent sanguini i ser detectats amb alts nivells en VP, fet que explicaria la seva associació amb millor pronòstic. A més, l'anàlisi multivariat mostra la sobreexpressió de miR-328 en plasma de VM com un factor pronòstic independent que contribueix a elevar 6 vegades més el risc de recaiguda hepàtica. En la mateixa línia, un estudi recent en pacients quirúrgics de càncer de pulmó de cèl·lula no petita (CPCNP) mostra que les cèl·lules aïllades directament de la vena pulmonar on drena el tumor primari s'associaren a recaiguda, mentre que aquesta associació no es va trobar en les cèl·lules tumorals presents en una VP [361].

L'expressió del perfil de miRNAs lliures en VM també s'associa amb algunes característiques clíniques com la localització tumoral, let-7g s'associa amb pòlips pre-existents i miR-328 amb l'estadiatge. Aquests resultats indiquen que els biomarcadors aïllats en les venes que drenen el tumor primari en pacients de CC poden proporcionar molta més informació clínica que aquells obtinguts en VPs.

Els exosomes derivats de cèl·lules tumorals de pacients oncològics són prometedors biomarcadors diagnòstic i pronòstic. L'alliberació d'exosomes carregats amb molècules específiques per la cèl·lula tumoral d'origen és un dels principals mecanismes de comunicació intercel·lular entre el tumor primari i el microambient tumoral a distància [362]. La presència d'exosomes en sang s'ha analitzat

en diferents tipus tumorals metastàsics, incloent melanoma [154], CC [229, 230] i càncer d'ovari (líquid ascític) [363], entre d'altres. Tots aquests estudis descriuen un major nombre d'exosomes en plasma de pacients que d'individus sans [229, 230].

En comparació amb altres estudis prèvis que inclouen pacients metastàsics, en el nostre estudi hem purificat i estudiat el contingut d'exosomes procedents de pacients quirúrgics d'estadis I-III de CC que no havien desenvolupat metàstasis en el moment del diagnòstic. Observem que el perfil de miRNAs obtingut (let-7g, miR-15b, miR-155 i miR-328) es troba tant circulant lliure en plasma com també empaquetat en l'interior d'exosomes. Cal destacar que només el miR-328 exosomal s'associa a recaiguda. Al comparar el subgrup de pacients recaiguts *versus* els no recaiguts, és interessant comprovar que els nivells de miR-328 exosomal en VM són significativament més alts en el subgrup de recaiguts, mentre que aquesta capacitat discriminatòria no es manté a l'estudiar tal situació en VP. La capacitat de miR-328 en participar en la recaiguda també s'ha observat en el CPCNP, on s'ha descrit que miR-328 es relaciona amb les metàstasis cerebrals [364].

En resum, l'expressió de let-7g, miR-15b, miR-155 i miR-328 aïllats de plasma de VM pot ser una eina útil per identificar pacients amb alt risc de recaiguda i els exosomes enriquits amb miR-328 en VM poden jugar un paper important en modular el microambient tissular per permetre l'ancoratge de les cèl·lules metastàsiques.

Amb la finalitat de comprovar la capacitat de miR-328 en la formació de la metàstasis, hem dissenyat l'article tercer.

Discussió de l'article tercer: “miR-328 mediates a metabolic shift in colon cancer cells by targeting SLC2A1/GLUT1”

En concordança amb els resultats obtinguts, a l'estudiar el mecanisme molecular de miR-328 i les seves potencials dianes gèniques, es suggereix que miR-328 podria ser un element clau pel desenvolupament de l'efecte Warburg en el CC. De fet, mitjançant un estudi *in silico*, hem identificat que una de les dianes relacionades amb miR-328 i l'efecte Warburg és *SLC2A1/GLUT1*.

Aquest estudi demostra que miR-328 inhibeix de forma directa el gen *SLC2A1*, fet que resulta en una disminució de la traducció de la seva proteïna GLUT1, un dels principals transportadors de glucosa intracel·lular. A més, l'anàlisi dels nivells d'expressió de miR-328 en pacients de CC d'estadis I-III indica que el teixit tumoral presenta nivells de miR-328 més baixos que el teixit normal. Tenint en compte que el teixit tumoral es caracteritza per consumir alts nivells de glucosa, principalment via GLUT1 [365], una reducció de GLUT1 induïda per miR-328 podria suggerir que miR-328 podria actuar com un gen supressor tumoral comprometent la supervivència de les cèl·lules tumorals.

Aquests resultats correlacionen amb estudis prèvis que involucren el miR-328 amb alteracions en vies de senyalització de tipus metabòlic i no metabòlic [366-370]. A més, un estudi basat en les propietats de les cèl·lules mare tumorals i el miR-328 suggereix que nivells baixos de miR-328 correlacionen amb fenotips més invasius i tumorigènics *in vitro* [304].

Malgrat aquests treballs poden semblar contradictoris en relació als nostres resultats previs, on alts nivells de miR-328 eren factor del mal pronòstic, cal considerar que en aquest cas, miR-328 no era obtingut del tumor sinó que era miR-328 exosomal, circulant en sang i aïllat de VM, i abans de que assolís l'òrgan diana on metastatitzar, en aquest cas generalment el fetge. Aquesta circumstància ens permet especular que miR-328 exosomal podria actuar sobre les cèl·lules hepàtiques i alterar el seu comportament metabòlic. De fet existeixen estudis recents que mostren que alguns miRNAs secretats tant pel tumor com per les cèl·lules del nínxol al microambient adjacent al teixit tumoral podrien jugar un paper important en la modulació del nínxol pre-metastàtic i la consegüent progressió metastàsica. Per exemple, en càncer de mama, el miR-122 secretat pel tumor és capaç de reprogramar el metabolisme de la glucosa en el nínxol pre-metastàtic mitjançant la inhibició de l'enzim glicolític piruvat kinasa M2 (*PKM2*) [371], mentre que en càncer cerebral el miR-19a, secretat per les cèl·lules del nínxol, promou la pèrdua de l'expressió de *PTEN* en el tumor primari [221]. En ambdós casos, el resultat final és l'increment de glucosa estromal. En conseqüència, aquest increment de glucosa, juntament amb l'acumulació d'altres metabòlits, permet nodrir les cèl·lules tumorals amb nutrients i energia per poder dur a terme les vies anabòliques necessàries pel creixement del tumor secundari quan aquestes arribin al nínxol pre-metastàtic.

De forma interessant, al considerar els resultats obtinguts en el nostre estudi prèvi on es suggereix que l'expressió de miR-328 en els exosomes procedents de la vena que drena el tumor es relaciona amb la metàstasi hepàtica [139], juntament amb altres estudis que relacionen alguns miRNAs amb l'increment de la glucosa estromal [371, 372], els resultats del present treball suggereixen que l'expressió alterada de miR-328 pot modular les característiques metabòliques del microambient per tal d'accelerar la formació del nínxol pre-metastàtic. Així, nivells baixos de miR-328 en el tumor afavoreixen la captació de glucosa i el consegüent creixement tumoral, mentre que el miR-328 secretat pel tumor primari podria reprimir la captació de glucosa de les cèl·lules del nínxol pre-metastàtic que s'està formant a distància, fet que resultaria en l'acumulació de glucosa en l'estroma intercel·lular afavorint la colonització metastàsica.

En resum, l'expressió de miR-328 es relaciona amb la inhibició directa de *SLC2A1/GLUT1* i, consegüentment, amb la regulació de l'activitat metabòlica via GLUT1 en les cèl·lules tumorals de CC.

Futurs estudis dels mecanismes biològics encarregats d'aquesta interacció serien útils per evaluar el potencial terapèutic de miR-328 en el CC.

Discussió de l'article quart: *"Proteomic analysis of liquid biopsy from tumor-draining vein indicates that high expression of exosomal ECM1 is associated with relapse in stage I-III colon cancer"*

Aquest treball estudia el proteoma dels exosomes circlants en sang procedents de la vena que drena directament el tumor primari, la VM, i identifica la proteïna ECM1 exosomal com a rellevant per ser investigada al llarg de l'article quart.

L'estudi de proteïnes exosomals obtingudes de plasma procedent de la VM i de la corresponent VP mostra diferències d'expressió entre els pacients que desenvolupen metàstasis respecte dels que no recauen al llarg del temps. Aquest treball indica que les proteïnes exosomals estan presents tant en exosomes aïllats de VM com de VP, fet que coincideix amb que molts tipus cel·lulars són potencialment capaços d'alliberar exosomes tant en condicions fisiològiques com patològiques [373], essent la càrrega proteica exosomal major en els exosomes procedents de VM que de VP. Cal destacar que malgrat els nivells de la majoria de proteïnes exosomals eren semblants entre ambdós grups de pacients, la proteïna ECM1 presentava nivells molt més alts en els pacients que recauen al llarg del temps suggerint una possible relació entre ECM1 i la metàstasis.

La proteïna ECM1 és una glicoproteïna secretada de 85kDa involucrada en diverses funcions fisiològiques com el manteniment de la homeostasis tissular [374], però també s'ha descrit alterada en molts tumors epitelials com el càncer de mama, el carcinoma esquamós d'esòfag, el càncer gàstric i el CC [375]. De forma interessant i en consonància amb els resultats obtinguts, recentment s'ha descrit la presència d'ECM1 exosomal en el 82% dels pacients d'una cohort que presentava càncer de mama i micobacteria no tuberculosa [376]. Els resultats obtinguts en el nostre estudi mostren alts nivells d'ECM1 exosomal en plasma procedent de VM de pacients amb CC i aquests nivells són majors en el subgrup de pacients que desenvolupen metàstasis respecte d'aquells que no recauen al llarg del temps. En conseqüència, es podria suggerir que alts nivells d'ECM1 en plasma de VM, obtingut abans que els exosomes arribin a l'òrgan diana, podria ajudar a identificar pacients susceptibles a desenvolupar metàstasis. A més, diversos estudis postulen una possible relació entre ECM1 i el desenvolupament metastàtic [377, 378].

El present estudi també evidencia nivells més alts d'ECM1 en VM respecte VP en els pacients que desenvoluparen metàstasis en el fetge com a òrgan diana, mentre que aquells amb metàstasis peritoneal o pulmonar presenten nivells semblants d'ECM1 en VM i VP. Aquests resultats suggereixen que els exosomes alliberats pel tumor primari podrien presentar organotropisme i,

conseqüentment, quedar retinguts de forma específica pel teixit hepàtic. Tant és així que estudis proteòmics mostren que la integrina exosomal $\alpha\text{v}\beta\text{5}$ té afinitat per anclar-se a les cèl·lules del fetge i desenvolupar metàstasis hepàtica, mentre que les integrines exosomals $\alpha\text{6}\beta\text{4}$ i $\alpha\text{6}\beta\text{1}$ presenten organotropisme teixit-específic pel pulmó i, per tant, s'associen a metàstasis pulmonar [61].

Finalment, es postula que els nivells d'ECM1 podrien tenir un paper pronòstic en el CC ja que alts nivells d'ECM1 exosomal s'associen a menor TTR. Malgrat encara es desconeix la funció d'ECM1 en la formació metastàsica, els resultats obtinguts en diferents tipus tumorals recolzen aquesta hipòtesi.

CONCLUSIONS

5. Conclusions

Article primer

1. En el CC, la VM presenta nivells més elevats de miR-21 respecte la VP.
2. L'evaluació dels nivells de miR-21 en VM permet identificar un grup de pacients de CC amb menor supervivència lliure de malaltia.
3. L'estudi dels nivells de miR-21 procedent de VM, i no de VP, correlaciona amb el desenvolupament metastàtic.

Article segon

1. Alts nivells de let-7g, miR-15b, miR-155 i miR-328 aïllats de VM es relacionen amb pitjor pronòstic, mentre que alts nivells de let-7g, miR-15b, miR-155 i miR-328 aïllats de VP es relacionen amb millor pronòstic. Aquesta situació indica que existeixen diferències entre els biomarcadors procedents de VM i VP.
2. L'anàlisi exosomal mostra que let-7g, miR-15b, miR-155 i miR-328 estan presents a l'interior dels exosomes procedents tant de VM com de VP i, per tant, poden viatjar encapsulats en el seu citoplasma.
3. miR-328 exosomal està més elevat en plasma procedent de la VM respecte de la VP i actua com a biomarcador de recaiguda.

Article tercer

1. miR-328 té com a diana *SLC2A1/GLUT1*.
2. *SLC2A1/GLUT1* és regulat negativament pels nivells de miR-328 en les línies cel·lulars de CC, LOVO i SW480.

Article quart

1. L'anàlisi proteòmic d'exosomes aïllats de VM identifica 14 proteïnes relacionades amb el CC.
2. De les 14 proteïnes exomals associades a CC, destaquen els nivells de la proteïna ECM1 en pacients recaiguts, els quals són 13 vegades més alts que en pacients no recaiguts.
3. Els nivells exomals d'ECM1 obtinguts de VM actuen com a biomarcador pronòstic en pacients de CC.

Conclusions generals

1. En el CC, els marcadors tumorals circulants en plasma presenten diferents perfils segons s'aïllin de VM o de VP.
2. L'anàlisi de les molècules alliberades, miRNAs i/o exosomes, per la vena que drena directament el tumor primari de colon, la VM, és un mètode prometedor per a la identificació de biomarcadors abans que assoleixin l'òrgan diana on metastatitzar.

BIBLIOGRAFIA

Bibliografía

1. Siegel, R.L., et al., *Colorectal cancer statistics, 2017*. CA: a cancer journal for clinicians, 2017. 67(3): p. 177-193.
2. Arnold, M., et al., *Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality*. Gut, 2016: p. gutjnl-2015-310912.
3. Ferlay, J., et al., *GLOBOCAN 2012 v1. 0, cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase No. 11*. Lyon, France: International agency for research on cancer, 2013. 19.
4. Howlader, N., et al., *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2014*, National Cancer Institute. Bethesda, MD. 2017.
5. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012*. European journal of cancer, 2013. 49(6): p. 1374-1403.
6. *Las cifras del Cáncer en España 2017*. Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM).
7. Galcerán, J., et al., *Estimaciones de la incidencia y la supervivencia del cáncer en España y su situación en Europa*. Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN), 2014.
8. Hamam, R., et al., *microRNA expression profiling on individual breast cancer patients identifies novel panel of circulating microRNA for early detection*. Scientific reports, 2016. 6: p. 25997.
9. Murphy, N., et al., *A prospective evaluation of endogenous sex hormone levels and colorectal cancer risk in postmenopausal women*. JNCI: Journal of the National Cancer Institute, 2015. 107(10).
10. Lin, J.H., et al., *Association between sex hormones and colorectal cancer risk in men and women*. Clinical Gastroenterology and Hepatology, 2013. 11(4): p. 419-424. e1.
11. Platz, E.A., et al., *Plasma 1, 25-dihydroxy-and 25-hydroxyvitamin D and adenomatous polyps of the distal colorectum*. Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers, 2000. 9(10): p. 1059-1065.
12. Marmot, M., et al., *Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective*. 2007.
13. Fedirko, V., et al., *Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose–response meta-analysis of published studies*. Annals of oncology, 2011. 22(9): p. 1958-1972.
14. Bagnardi, V., et al., *Alcohol consumption and site-specific cancer risk: a comprehensive dose–response meta-analysis*. British journal of cancer, 2015. 112(3): p. 580.
15. Botteri, E., et al., *Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis*. Jama, 2008. 300(23): p. 2765-2778.

16. Liang, P.S., T.Y. Chen, and E. Giovannucci, *Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: Systematic review and meta-analysis*. International Journal of Cancer, 2009. 124(10): p. 2406-2415.
17. Limsui, D., et al., *Cigarette smoking and colorectal cancer risk by molecularly defined subtypes*. JNCI: Journal of the National Cancer Institute, 2010. 102(14): p. 1012-1022.
18. Hooker, C.M., et al., *A prospective cohort study of rectal cancer risk in relation to active cigarette smoking and passive smoke exposure*. Annals of epidemiology, 2008. 18(1): p. 28-35.
19. Walter, V., et al., *Smoking and survival of colorectal cancer patients: systematic review and meta-analysis*. Annals of Oncology, 2014. 25(8): p. 1517-1525.
20. Phipps, A.I., J. Baron, and P.A. Newcomb, *Prediagnostic smoking history, alcohol consumption, and colorectal cancer survival*. Cancer, 2011. 117(21): p. 4948-4957.
21. Rothwell, P.M., et al., *Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials*. The Lancet, 2010. 376(9754): p. 1741-1750.
22. Chan, A.T., et al., *Long-term use of aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of colorectal cancer*. Jama, 2005. 294(8): p. 914-923.
23. Cook, N.R., et al., *Alternate-day, low-dose aspirin and cancer risk: long-term observational follow-up of a randomized trial*. Annals of internal medicine, 2013. 159(2): p. 77-85.
24. Bosetti, C., et al., *Oral contraceptives and colorectal cancer risk: a systematic review and meta-analysis*. Human reproduction update, 2009. 15(5): p. 489-498.
25. Fernandez, E., et al., *Oral contraceptives and colorectal cancer risk: a meta-analysis*. British Journal of Cancer, 2001. 84(5): p. 722.
26. Thosani, N., et al., *Reduced risk of colorectal cancer with use of oral bisphosphonates: a systematic review and meta-analysis*. Journal of Clinical Oncology, 2012. 31(5): p. 623-630.
27. Fearon, E.R. and B. Vogelstein, *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell, 1990. 61(5): p. 759-767.
28. Smith, G., et al., *Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53—alternative genetic pathways to colorectal cancer*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002. 99(14): p. 9433-9438.
29. Pino, M.S. and D.C. Chung, *The chromosomal instability pathway in colon cancer*. Gastroenterology, 2010. 138(6): p. 2059-2072.
30. Grady, W.M. and J.M. Carethers, *Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis*. Gastroenterology, 2008. 135(4): p. 1079-1099.

31. Boland, C.R. and A. Goel, *Microsatellite instability in colorectal cancer*. *Gastroenterology*, 2010. 138(6): p. 2073-2087. e3.
32. Cunningham, J.M., et al., *Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability*. *Cancer research*, 1998. 58(15): p. 3455-3460.
33. Samowitz, W.S., et al., *Evaluation of a large, population-based sample supports a CpG island methylator phenotype in colon cancer*. *Gastroenterology*, 2005. 129(3): p. 837-845.
34. Nosho, K., et al., *Comprehensive biostatistical analysis of CpG island methylator phenotype in colorectal cancer using a large population-based sample*. *PloS one*, 2008. 3(11): p. e3698.
35. Wong, J.J., et al., *Methylation of the 3p22 region encompassing MLH1 is representative of the CpG island methylator phenotype in colorectal cancer*. *Modern Pathology*, 2011. 24(3): p. 396.
36. Dominguez-Valentin, M., et al., *Familial colorectal cancer type X: genetic profiles and phenotypic features*. *Modern Pathology*, 2015. 28(1): p. 30.
37. Guillén Ponce, C. and M.J. Molina Garrido, *Cáncer colorrectal hereditario no polipósico*. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 2011. 103(8): p. 434-434.
38. Green, S., et al., *Hereditary non-polyposis colorectal cancer*. *International journal of colorectal disease*, 1998. 13(1): p. 3-12.
39. Kowalski, L.D., et al., *Mutational analysis of MLH1 and MSH2 in 25 prospectively-acquired RER+ endometrial cancers*. *Genes, Chromosomes and cancer*, 1997. 18(3): p. 219-227.
40. Lin, K.M., et al., *Cumulative incidence of colorectal and extracolonic cancers in MLH1 and MSH2 mutation carriers of hereditary nonpolyposis colorectal cancer*. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 1998. 2(1): p. 67-71.
41. Mejuto, F.C., *Pólipos Intestinales*.
42. Parés, D., et al., *Poliposis adenomatosa familiar*. *Gastroenterología y hepatología*, 2006. 29(10): p. 625-635.
43. De la Chapelle, A., *Genetic predisposition to colorectal cancer*. *Nature reviews. Cancer*, 2004. 4(10): p. 769.
44. Burt, R. and D.W. Neklason, *Genetic testing for inherited colon cancer*. *Gastroenterology*, 2005. 128(6): p. 1696-1716.
45. de Abajoa, A.S. and T.C. Llopisb, *Poliposis asociada al gen MYH*. *GH Continuada.*, 2009. 8: p. 210-214.
46. Gammon, A., et al., *Hamartomatous polyposis syndromes*. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 2009. 23(2): p. 219-231.
47. Howe, J.R., et al., *A gene for familial juvenile polyposis maps to chromosome 18q21. 1*. *The American Journal of Human Genetics*, 1998. 62(5): p. 1129-1136.

48. Howe, J.R., et al., *Germline mutations of the gene encoding bone morphogenetic protein receptor 1A in juvenile polyposis*. Nature genetics, 2001. 28(2): p. 184.
49. Shuch, B., et al., *Germline PTEN mutation Cowden syndrome: an underappreciated form of hereditary kidney cancer*. The Journal of urology, 2013. 190(6): p. 1990-1998.
50. Hemminki, A., et al., *Localization of a susceptibility locus for Peutz-Jeghers syndrome to 19p using comparative genomic hybridization and targeted linkage analysis*. Nature genetics, 1997. 15(1): p. 87-90.
51. Carballal, S., et al., *Colorectal cancer risk factors in patients with serrated polyposis syndrome: a large multicentre study*. Gut, 2015: p. gutjnl-2015-309647.
52. Ritsma, L., et al., *Intestinal crypt homeostasis revealed at single-stem-cell level by in vivo live imaging*. Nature, 2014. 507(7492): p. 362-365.
53. Barker, N., et al., *Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer*. Nature, 2009. 457(7229): p. 608-611.
54. Roth, S., et al., *Paneth cells in intestinal homeostasis and tissue injury*. PloS one, 2012. 7(6): p. e38965.
55. Buczacki, S.J., et al., *Intestinal label-retaining cells are secretory precursors expressing Lgr5*. Nature, 2013. 495(7439): p. 65-69.
56. Van Es, J.H., et al., *Dll1+ secretory progenitor cells revert to stem cells upon crypt damage*. Nature cell biology, 2012. 14(10): p. 1099-1104.
57. Huels, D. and O. Sansom, *Stem vs non-stem cell origin of colorectal cancer*. British journal of cancer, 2015. 113(1): p. 1.
58. Ponder, B.A. and M.M. Wilkinson, *Direct Examination of the Clonality of Carcinogen-Induced Colonic Epithelial Dysplasia in Chimeric Mice 2*. Journal of the National Cancer Institute, 1986. 77(4): p. 967-976.
59. Théry, C., et al., *Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids*. Current protocols in cell biology, 2006: p. 3.22. 1-3.22. 29.
60. Bellingham, S.A., et al., *Exosomes: vehicles for the transfer of toxic proteins associated with neurodegenerative diseases?* Frontiers in physiology, 2012. 3.
61. Hoshino, A., et al., *Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis*. Nature, 2015. 527(7578): p. 329.
62. Liu, Y. and X. Cao, *Organotropic metastasis: role of tumor exosomes*. Cell research, 2016. 26(2): p. 149.
63. Langley, R.R. and I.J. Fidler, *The seed and soil hypothesis revisited—The role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs*. International journal of cancer, 2011. 128(11): p. 2527-2535.

64. Paget, S., *The distribution of secondary growths in cancer of the breast*. The Lancet, 1889. 133(3421): p. 571-573.
65. Ayaz, L., et al., *Differential expression of microRNAs in plasma of patients with laryngeal squamous cell carcinoma: potential early-detection markers for laryngeal squamous cell carcinoma*. Journal of cancer research and clinical oncology, 2013. 139(9): p. 1499-1506.
66. Ng, E.K., et al., *Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening*. Gut, 2009. 58(10): p. 1375-81.
67. Huang, Z., et al., *Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer*. International journal of cancer, 2010. 127(1): p. 118-126.
68. Goligher, J. and H. Duthie, *Anatomía quirúrgica y fisiología del colon, recto y ano*. Cirugía del ano, recto y colon. 2da ed. Barcelona: Salvat, 1987: p. 1-43.
69. Lopez-Garcia, C., et al., *Intestinal stem cell replacement follows a pattern of neutral drift*. Science, 2010. 330(6005): p. 822-825.
70. Snippert, H.J., et al., *Intestinal crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing Lgr5 stem cells*. Cell, 2010. 143(1): p. 134-144.
71. Vermeulen, L., et al., *Defining stem cell dynamics in models of intestinal tumor initiation*. Science, 2013. 342(6161): p. 995-998.
72. Dienstmann, R., R. Salazar, and J. Tabernero, *Personalizing colon cancer adjuvant therapy: selecting optimal treatments for individual patients*. Journal of Clinical Oncology, 2015. 33(16): p. 1787-1796.
73. Schwitalla, S., et al., *Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties*. Cell, 2013. 152(1): p. 25-38.
74. Saltz, L.B., et al., *Irinotecan fluorouracil plus leucovorin is not superior to fluorouracil plus leucovorin alone as adjuvant treatment for stage III colon cancer: results of CALGB 89803*. Journal of Clinical Oncology, 2007. 25(23): p. 3456-3461.
75. Van Cutsem, E., et al., *Randomized phase III trial comparing biweekly infusional fluorouracil/leucovorin alone or with irinotecan in the adjuvant treatment of stage III colon cancer: PETACC-3*. Journal of Clinical Oncology, 2009. 27(19): p. 3117-3125.
76. Alison, M.R., G. Murphy, and S. Leedham, *Stem cells and cancer: a deadly mix*. Cell and tissue research, 2008. 331(1): p. 109-124.
77. Kanamori, A., et al., *α -taxilin overexpression correlates with proliferation activity but not with prognosis of colorectal cancer*. Oncology letters, 2017. 14(2): p. 1471-1476.
78. Allegra, C.J., et al., *Extended RAS gene mutation testing in metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy:*

- American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion update 2015*. Journal of clinical Oncology, 2015. 34(2): p. 179-185.
79. Dalerba, P., et al., *CDX2 as a prognostic biomarker in stage II and stage III colon cancer*. New England Journal of Medicine, 2016. 374(3): p. 211-222.
80. Snaebjornsson, P., et al., *pT4 stage II and III colon cancers carry the worst prognosis in a nationwide survival analysis. Shepherd's local peritoneal involvement revisited*. International journal of cancer, 2014. 135(2): p. 467-478.
81. Alberts, S.R., et al., *Effect of oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin with or without cetuximab on survival among patients with resected stage III colon cancer: a randomized trial*. Jama, 2012. 307(13): p. 1383-1393.
82. Kinzler, K.W. and B. Vogelstein, *Lessons from hereditary colorectal cancer*. Cell, 1996. 87(2): p. 159-170.
83. Midgley, R., et al., *LBA12 final results from QUASAR2, a multicentre, international randomised phase III trial of Capecitabine (CAP)+/-Bevacizumab (BEV) in the adjuvant setting of stage ii/iii colorectal cancer (CRC)*. Annals of Oncology, 2014. 25(suppl_4).
84. He, T.-C., et al., *Identification of c-MYC as a target of the APC pathway*. Science, 1998. 281(5382): p. 1509-1512.
85. Shtutman, M., et al., *The cyclin D1 gene is a target of the β -catenin/LEF-1 pathway*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999. 96(10): p. 5522-5527.
86. Roose, J., et al., *Synergy between tumor suppressor APC and the β -catenin-Tcf4 target Tcf1*. Science, 1999. 285(5435): p. 1923-1926.
87. Takahashi-Yanaga, F. and M. Kahn, *Targeting Wnt signaling: can we safely eradicate cancer stem cells?* Clinical cancer research, 2010. 16(12): p. 3153-3162.
88. Karapetis, C.S., et al., *K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer*. New England Journal of Medicine, 2008. 359(17): p. 1757-1765.
89. Patel, G.S. and C.S. Karapetis, *Personalized treatment for advanced colorectal cancer: KRAS and beyond*. Cancer management and research, 2013. 5: p. 387.
90. Powell, S.M., et al., *APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis*. Nature, 1992. 359(6392): p. 235.
91. Tsao, J. and D. Shibata, *Further evidence that one of the earliest alterations in colorectal carcinogenesis involves APC*. The American journal of pathology, 1994. 145(3): p. 531.
92. Santos, C., et al., *Clinicopathological risk factors of stage II colon cancer: results of a prospective study*. Colorectal Disease, 2013. 15(4): p. 414-422.

93. Gray, R.G., et al., *Validation study of a quantitative multigene reverse transcriptase–polymerase chain reaction assay for assessment of recurrence risk in patients with stage II colon cancer*. *Journal of clinical oncology*, 2011. 29(35): p. 4611-4619.
94. Yothers, G., et al., *Validation of the 12-gene colon cancer recurrence score in NSABP C-07 as a predictor of recurrence in patients with stage II and III colon cancer treated with fluorouracil and leucovorin (FU/LV) and FU/LV plus oxaliplatin*. *Journal of Clinical Oncology*, 2013. 31(36): p. 4512-4519.
95. Benson III, A.B., et al., *American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer*. *Journal of Clinical Oncology*, 2004. 22(16): p. 3408-3419.
96. Rosty, C., et al., *Should the grading of colorectal adenocarcinoma include microsatellite instability status?* *Human pathology*, 2014. 45(10): p. 2077-2084.
97. Huh, J.W., et al., *Prognostic significance of lymphovascular or perineural invasion in patients with locally advanced colorectal cancer*. *The American Journal of Surgery*, 2013. 206(5): p. 758-763.
98. Liebig, C., et al., *Perineural invasion is an independent predictor of outcome in colorectal cancer*. *Journal of clinical oncology*, 2009. 27(31): p. 5131-5137.
99. Ogino, S., et al., *Lymphocytic reaction to colorectal cancer is associated with longer survival, independent of lymph node count, microsatellite instability, and CpG island methylator phenotype*. *Clinical Cancer Research*, 2009. 15(20): p. 6412-6420.
100. Hutchins, G., et al., *Value of mismatch repair, KRAS, and BRAF mutations in predicting recurrence and benefits from chemotherapy in colorectal cancer*. *Journal of Clinical Oncology*, 2011. 29(10): p. 1261-1270.
101. Gavin, P.G., et al., *Mutation profiling and microsatellite instability in stage II and III colon cancer: an assessment of their prognostic and oxaliplatin predictive value*. *Clinical cancer research*, 2012. 18(23): p. 6531-6541.
102. Sinicrope, F.A., et al., *Prognostic impact of deficient DNA mismatch repair in patients with stage III colon cancer from a randomized trial of FOLFOX-based adjuvant chemotherapy*. *Journal of Clinical Oncology*, 2013. 31(29): p. 3664-3672.
103. Sinicrope, F.A., et al., *DNA mismatch repair status and colon cancer recurrence and survival in clinical trials of 5-fluorouracil-based adjuvant therapy*. *Journal of the National Cancer Institute*, 2011. 103(11): p. 863-875.
104. Flejou, J.-F., et al., *Effect of adding oxaliplatin to adjuvant 5-fluorouracil/leucovorin (5FU/LV) in patients with defective mismatch repair (dMMR) colon cancer stage II and III included in the MOSIAC study*. 2013, American Society of Clinical Oncology.

105. Vilar, E. and J. Taberero, *Molecular dissection of microsatellite instable colorectal cancer*. *Cancer discovery*, 2013. 3(5): p. 502-511.
106. Shiovitz, S., et al., *CpG island methylator phenotype is associated with response to adjuvant irinotecan-based therapy for stage III colon cancer*. *Gastroenterology*, 2014. 147(3): p. 637-645.
107. Klingbiel, D., et al., *Prognosis of stage II and III colon cancer treated with adjuvant 5-fluorouracil or FOLFIRI in relation to microsatellite status: results of the PETACC-3 trial*. *Annals of oncology*, 2014. 26(1): p. 126-132.
108. Pogue-Geile, K., et al., *Defective mismatch repair and benefit from bevacizumab for colon cancer: findings from NSABP C-08*. *Journal of the National Cancer Institute*, 2013. 105(13): p. 989-992.
109. Lochhead, P., et al., *Microsatellite instability and BRAF mutation testing in colorectal cancer prognostication*. *Journal of the National Cancer Institute*, 2013. 105(15): p. 1151-1156.
110. Ogino, S., et al., *Predictive and prognostic roles of BRAF mutation in stage III colon cancer: results from intergroup trial CALGB 89803*. *Clinical Cancer Research*, 2011: p. clincanres. 2246.2011.
111. Sinicrope, F.A., et al., *Overall survival result and outcomes by KRAS, BRAF, and DNA mismatch repair in relation to primary tumor site in colon cancers from a randomized trial of adjuvant chemotherapy: NCCTG (Alliance) N0147*. 2014, American Society of Clinical Oncology.
112. Douillard, J.-Y., et al., *Panitumumab–FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer*. *New England Journal of Medicine*, 2013. 369(11): p. 1023-1034.
113. Van Cutsem, E., et al., *Fluorouracil, leucovorin, and irinotecan plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer*. *Journal of clinical oncology*, 2015. 33(7): p. 692-700.
114. Sanoff, H.K., et al., *Effect of adjuvant chemotherapy on survival of patients with stage III colon cancer diagnosed after age 75 years*. *Journal of Clinical Oncology*, 2012. 30(21): p. 2624-2634.
115. Liao, X., et al., *Aspirin use, tumor PIK3CA mutation, and colorectal-cancer survival*. *New England Journal of Medicine*, 2012. 367(17): p. 1596-1606.
116. McCleary, N.J., et al., *Impact of age on the efficacy of newer adjuvant therapies in patients with stage II/III colon cancer: findings from the ACCENT database*. *Journal of clinical oncology*, 2013. 31(20): p. 2600-2606.
117. Yothers, G., et al., *Oxaliplatin as adjuvant therapy for colon cancer: updated results of NSABP C-07 trial, including survival and subset analyses*. *Journal of clinical oncology*, 2011. 29(28): p. 3768-3774.

118. André, T., et al., *Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial*. *Journal of Clinical Oncology*, 2009. 27(19): p. 3109-3116.
119. Berglund, Å., B. Cedermark, and B. Glimelius, *Is it deleterious to delay the start of adjuvant chemotherapy in colon cancer stage III?* *Annals of oncology*, 2008. 19(2): p. 400-402.
120. Huang, K. and W. Jennifer, *CDX2-A Predictive Biomarker in Stage II Colon Cancer for Adjuvant Chemotherapy?* *Colorectal Cancer: Open Access*, 2017. 3(1).
121. Lee, J.J. and E. Chu, *Adjuvant Chemotherapy for Stage II Colon Cancer: The Debate Goes On*. *Journal of oncology practice*, 2017. 13(4): p. 245-246.
122. Thanki, K., et al., *Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer and their Clinical Implications*. *International biological and biomedical journal*, 2017. 3(3): p. 105.
123. Pages, F., et al., *In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer*. *Journal of Clinical Oncology*, 2009. 27(35): p. 5944-5951.
124. Galon, J., et al., *Validation of the Immunoscore (IM) as a prognostic marker in stage I/II/III colon cancer: Results of a worldwide consortium-based analysis of 1,336 patients*. 2016, American Society of Clinical Oncology.
125. *American Cancer Society. Atlanta. 2017.*
126. *Bailey N. The role of EPA in the chemoprevention of colorectal cancer. 2014.*
127. O'Connell, J.B., M.A. Maggard, and C.Y. Ko, *Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging*. *Journal of the National Cancer Institute*, 2004. 96(19): p. 1420-1425.
128. Gill, S., et al., *Pooled analysis of fluorouracil-based adjuvant therapy for stage II and III colon cancer: who benefits and by how much?* *Journal of clinical oncology*, 2004. 22(10): p. 1797-1806.
129. André, T., et al., *Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer*. *New England Journal of Medicine*, 2004. 350(23): p. 2343-2351.
130. Taieb, J., et al., *Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin with or without cetuximab in patients with resected stage III colon cancer (PETACC-8): an open-label, randomised phase 3 trial*. *The Lancet Oncology*, 2014. 15(8): p. 862-873.
131. Tie, J., et al., *Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer*. *Science translational medicine*, 2016. 8(346): p. 346ra92-346ra92.
132. Sargent, D.J., et al., *Prognostic impact of deficient mismatch repair (dMMR) in 7,803 stage II/III colon cancer (CC) patients (pts): A pooled individual pt data analysis of 17 adjuvant trials in the ACCENT database*. 2014, American Society of Clinical Oncology.

133. Bertagnolli, M.M., et al., *Microsatellite instability predicts improved response to adjuvant therapy with irinotecan, fluorouracil, and leucovorin in stage III colon cancer: Cancer and Leukemia Group B Protocol 89803*. Journal of clinical Oncology, 2009. 27(11): p. 1814-1821.
134. Popovici, V., et al., *Context-dependent interpretation of the prognostic value of BRAF and KRAS mutations in colorectal cancer*. BMC cancer, 2013. 13(1): p. 439.
135. Roth, A.D., et al., *Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial*. Journal of clinical oncology, 2009. 28(3): p. 466-474.
136. Domingo, E., et al., *Evaluation of PIK3CA mutation as a predictor of benefit from nonsteroidal anti-inflammatory drug therapy in colorectal cancer*. Journal of clinical oncology, 2013. 31(34): p. 4297-4305.
137. Hershman, D., et al., *Timing of adjuvant chemotherapy initiation after surgery for stage III colon cancer*. Cancer, 2006. 107(11): p. 2581-2588.
138. Siravegna, G., et al., *Integrating liquid biopsies into the management of cancer*. Nature reviews Clinical oncology, 2017. 14(9): p. 531-548.
139. Monzo, M., et al., *Exosomal microRNAs isolated from plasma of mesenteric veins linked to liver metastases in resected patients with colon cancer*. Oncotarget, 2017. 8(19): p. 30859.
140. Monzo, M., et al., *Differential MIR-21 expression in plasma from mesenteric versus peripheral veins: an observational study of disease-free survival in surgically resected colon cancer patients*. Medicine, 2015. 94(1).
141. Rahbari, N.N., et al., *Compartmental differences of circulating tumor cells in colorectal cancer*. Annals of surgical oncology, 2012. 19(7): p. 2195-2202.
142. Millholland, J.M., et al., *Detection of low frequency FGFR3 mutations in the urine of bladder cancer patients using next-generation deep sequencing*. Research and reports in urology, 2012. 4: p. 33.
143. Li, Y., et al., *RNA profiling of cell-free saliva using microarray technology*. Journal of dental research, 2004. 83(3): p. 199-203.
144. Pan, W., et al., *Brain tumor mutations detected in cerebral spinal fluid*. Clinical chemistry, 2015. 61(3): p. 514-522.
145. Taylor, D.D. and C. Gerceel-Taylor, *MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer*. Gynecologic oncology, 2008. 110(1): p. 13-21.
146. Vickers, K.C., et al., *MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins*. Nature cell biology, 2011. 13(4): p. 423.
147. Joosse, S.A. and K. Pantel, *Tumor-educated platelets as liquid biopsy in cancer patients*. Cancer cell, 2015. 28(5): p. 552-554.

148. Skog, J., et al., *Glioblastoma microvesicles transport RNA and protein that promote tumor growth and provide diagnostic biomarkers*. *Nature cell biology*, 2008. 10(12): p. 1470.
149. Mathivanan, S., H. Ji, and R.J. Simpson, *Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication*. *Journal of proteomics*, 2010. 73(10): p. 1907-1920.
150. Simons, M. and G. Raposo, *Exosomes—vesicular carriers for intercellular communication*. *Current opinion in cell biology*, 2009. 21(4): p. 575-581.
151. Zhang, J., et al., *Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function*. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 2015. 13(1): p. 17-24.
152. Lee, T.H., et al. *Microvesicles as mediators of intercellular communication in cancer—the emerging science of cellular ‘debris’*. in *Seminars in immunopathology*. 2011. Springer.
153. Zitvogel, L., et al., *Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell derived exosomes*. *Nature medicine*, 1998. 4(5): p. 594-600.
154. Peinado, H., et al., *Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET*. *Nature medicine*, 2012. 18(6): p. 883-891.
155. Colombo, M., G. Raposo, and C. Théry, *Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles*. *Annual review of cell and developmental biology*, 2014. 30: p. 255-289.
156. Lawson, C., et al., *Microvesicles and exosomes: new players in metabolic and cardiovascular disease*. *Journal of Endocrinology*, 2016. 228(2): p. R57-R71.
157. Tkach, M. and C. Théry, *Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go*. *Cell*, 2016. 164(6): p. 1226-1232.
158. Schorey, J.S. and C.V. Harding, *Extracellular vesicles and infectious diseases: new complexity to an old story*. *The Journal of clinical investigation*, 2016. 126(4): p. 1181-1189.
159. Zhang, X., et al., *Exosomes in cancer: small particle, big player*. *Journal of hematology & oncology*, 2015. 8(1): p. 83.
160. Kalluri, R., *The biology and function of exosomes in cancer*. *The Journal of clinical investigation*, 2016. 126(4): p. 1208-1215.
161. Trams, E.G., et al., *Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1981. 645(1): p. 63-70.
162. Pan, B.-T. and R.M. Johnstone, *Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor*. *Cell*, 1983. 33(3): p. 967-978.
163. Raposo, G., et al., *B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles*. *Journal of Experimental Medicine*, 1996. 183(3): p. 1161-1172.
164. Valadi, H., et al., *Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells*. *Nature cell biology*, 2007. 9(6): p. 654.

165. Vlassov, A.V., et al., *Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2012. 1820(7): p. 940-948.
166. Madison, M.N., R.J. Roller, and C.M. Okeoma, *Human semen contains exosomes with potent anti-HIV-1 activity*. Retrovirology, 2014. 11(1): p. 102.
167. Zonneveld, M.I., et al., *Recovery of extracellular vesicles from human breast milk is influenced by sample collection and vesicle isolation procedures*. Journal of extracellular vesicles, 2014. 3(1): p. 24215.
168. Zhou, Q., et al., *Immune-related microRNAs are abundant in breast milk exosomes*. International journal of biological sciences, 2012. 8(1): p. 118.
169. Levänen, B., et al., *Altered microRNA profiles in bronchoalveolar lavage fluid exosomes in asthmatic patients*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2013. 131(3): p. 894-903. e8.
170. Rodríguez, M., et al., *Different exosome cargo from plasma/bronchoalveolar lavage in non-small-cell lung cancer*. Genes, Chromosomes and Cancer, 2014. 53(9): p. 713-724.
171. Sugimachi, K., et al., *Identification of a bona fide microRNA biomarker in serum exosomes that predicts hepatocellular carcinoma recurrence after liver transplantation*. British journal of cancer, 2015. 112(3): p. 532.
172. Principe, S., et al., *In-depth proteomic analyses of exosomes isolated from expressed prostatic secretions in urine*. Proteomics, 2013. 13(10-11): p. 1667-1671.
173. Melo, S.A., et al., *Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer*. Nature, 2015. 523(7559): p. 177-182.
174. Kowal, J., M. Tkach, and C. Théry, *Biogenesis and secretion of exosomes*. Current opinion in cell biology, 2014. 29: p. 116-125.
175. Williams, R.L. and S. Urbé, *The emerging shape of the ESCRT machinery*. Nature reviews. Molecular cell biology, 2007. 8(5): p. 355.
176. Gingras, M.-C., J.M. Kazan, and A. Pause, *Role of ESCRT component HD-PTP/PTPN23 in cancer*. Biochemical Society Transactions, 2017. 45(3): p. 845-854.
177. Trajkovic, K., et al., *Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes*. Science, 2008. 319(5867): p. 1244-1247.
178. Baietti, M.F., et al., *Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes*. Nature cell biology, 2012. 14(7): p. 677.
179. Robbins, P.D. and A.E. Morelli, *Regulation of immune responses by extracellular vesicles*. Nature reviews. Immunology, 2014. 14(3): p. 195.
180. Ostrowski, M., et al., *Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway*. Nature cell biology, 2010. 12(1): p. 19.

181. Denzer, K., et al., *Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device*. Journal of cell science, 2000. 113(19): p. 3365-3374.
182. Fader, C.M., et al., *TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 2009. 1793(12): p. 1901-1916.
183. Yu, X., S.L. Harris, and A.J. Levine, *The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein*. Cancer research, 2006. 66(9): p. 4795-4801.
184. Wei, Y., et al., *Pyruvate kinase type M2 promotes tumour cell exosome release via phosphorylating synaptosome-associated protein 23*. Nature communications, 2017. 8.
185. Savina, A., et al., *Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells*. Journal of Biological Chemistry, 2003. 278(22): p. 20083-20090.
186. Parolini, I., et al., *Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells*. Journal of Biological Chemistry, 2009. 284(49): p. 34211-34222.
187. Alvarez-Erviti, L., et al., *Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes*. Nature biotechnology, 2011. 29(4): p. 341-345.
188. Mulcahy, L.A., R.C. Pink, and D.R.F. Carter, *Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake*. Journal of extracellular vesicles, 2014. 3(1): p. 24641.
189. Glebov, O.O., N.A. Bright, and B.J. Nichols, *Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells*. Nature cell biology, 2006. 8(1): p. 46.
190. Escrevente, C., et al., *Interaction and uptake of exosomes by ovarian cancer cells*. BMC cancer, 2011. 11(1): p. 108.
191. Witwer, K.W., et al., *Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research*. Journal of extracellular vesicles, 2013. 2(1): p. 20360.
192. Sun, H.-L., et al., *ERK activation globally downregulates miRNAs through phosphorylating exportin-5*. Cancer cell, 2016. 30(5): p. 723-736.
193. Melo, S.A., et al., *Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis*. Cancer cell, 2014. 26(5): p. 707-721.
194. Crescentelli, R., et al., *Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes*. Journal of extracellular vesicles, 2013. 2(1): p. 20677.
195. Frydrychowicz, M., et al., *Exosomes—Structure, Biogenesis and Biological Role in Non-Small-Cell Lung Cancer*. Scandinavian journal of immunology, 2015. 81(1): p. 2-10.
196. Guo, W., et al., *Exosomes: New players in cancer*. Oncology Reports, 2017. 38(2): p. 665-675.
197. Mollaei, H., R. Safaralizadeh, and N. Pouladi, *A brief review of exosomes and their roles in cancer*. Meta Gene, 2017. 11: p. 70-74.

198. Al-Nedawi, K., et al., *Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells*. *Nature cell biology*, 2008. 10(5): p. 619.
199. Hong, B.S., et al., *Colorectal cancer cell-derived microvesicles are enriched in cell cycle-related mRNAs that promote proliferation of endothelial cells*. *BMC genomics*, 2009. 10(1): p. 556.
200. Yeung, C.L.A., et al., *Exosomal transfer of stroma-derived miR21 confers paclitaxel resistance in ovarian cancer cells through targeting APAF1*. *Nature communications*, 2016. 7: p. 11150.
201. Zhang, Z., et al., *Loss of exosomal miR-320a from cancer-associated fibroblasts contributes to HCC proliferation and metastasis*. *Cancer Letters*, 2017. 397: p. 33-42.
202. Zomer, A., et al., *In vivo imaging reveals extracellular vesicle-mediated phenocopying of metastatic behavior*. *Cell*, 2015. 161(5): p. 1046-1057.
203. Donnarumma, E., et al., *Cancer-associated fibroblasts release exosomal microRNAs that dictate an aggressive phenotype in breast cancer*. *Oncotarget*, 2017. 8(12): p. 19592.
204. Taverna, S., et al., *Role of exosomes released by chronic myelogenous leukemia cells in angiogenesis*. *International journal of cancer*, 2012. 130(9): p. 2033-2043.
205. Hood, J.L., et al., *Paracrine induction of endothelium by tumor exosomes*. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 2009. 89(11): p. 1317.
206. Millimaggi, D., et al., *Tumor vesicle—associated CD147 modulates the angiogenic capability of endothelial cells*. *Neoplasia*, 2007. 9(4): p. 349-357.
207. Gopal, S.K., et al., *Oncogenic epithelial cell-derived exosomes containing Rac1 and PAK2 induce angiogenesis in recipient endothelial cells*. *Oncotarget*, 2016. 7(15): p. 19709.
208. Kosaka, N., et al., *Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent exosomal transfer of angiogenic microRNAs regulate cancer cell metastasis*. *Journal of Biological Chemistry*, 2013. 288(15): p. 10849-10859.
209. Fan, G.-C., *Hypoxic exosomes promote angiogenesis*. *Blood*, 2014. 124(25): p. 3669-3670.
210. Liang, X., et al., *Exosomes secreted by mesenchymal stem cells promote endothelial cell angiogenesis by transferring miR-125a*. *J Cell Sci*, 2016. 129(11): p. 2182-2189.
211. Andre, F., et al., *Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes*. *The Lancet*, 2002. 360(9329): p. 295-305.
212. Dai, S., et al., *More efficient induction of HLA-A* 0201-restricted and carcinoembryonic antigen (CEA)-specific CTL response by immunization with exosomes prepared from heat-stressed CEA-positive tumor cells*. *Clinical cancer research*, 2005. 11(20): p. 7554-7563.
213. Fabbri, M., et al., *MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012. 109(31): p. E2110-E2116.
214. Qu, L., et al., *Exosome-transmitted lncARSR promotes sunitinib resistance in renal cancer by acting as a competing endogenous RNA*. *Cancer Cell*, 2016. 29(5): p. 653-668.

215. Richards, K.E., et al., *Cancer-associated fibroblast exosomes regulate survival and proliferation of pancreatic cancer cells*. *Oncogene*, 2017. 36(13): p. 1770.
216. Shedden, K., et al., *Expulsion of Small Molecules in Vesicles Shed by Cancer Cells*. *Cancer research*, 2003. 63(15): p. 4331-4337.
217. Ciravolo, V., et al., *Potential role of HER2-overexpressing exosomes in countering trastuzumab-based therapy*. *Journal of cellular physiology*, 2012. 227(2): p. 658-667.
218. Costa-Silva, B., et al., *Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver*. *Nature cell biology*, 2015. 17(6): p. 816.
219. Fong, M.Y., et al., *Breast cancer-secreted miR-122 reprograms glucose metabolism in pre-metastatic niche to promote metastasis*. *Nature cell biology*, 2015. 17(2): p. 183.
220. Tominaga, N., et al., *Brain metastatic cancer cells release microRNA-181c-containing extracellular vesicles capable of destructing blood–brain barrier*. *Nature communications*, 2015. 6.
221. Zhang, L., et al., *Microenvironment-induced PTEN loss by exosomal microRNA primes brain metastasis outgrowth*. *Nature*, 2015. 527(7576): p. 100-104.
222. Tian, Y., et al., *A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy*. *Biomaterials*, 2014. 35(7): p. 2383-2390.
223. Lugini, L., et al., *Exosomes from human colorectal cancer induce a tumor-like behavior in colonic mesenchymal stromal cells*. *Oncotarget*, 2016. 7(31): p. 50086.
224. Lucchetti, D., et al., *Differentiation Affects the Release of Exosomes from Colon Cancer Cells and Their Ability to Modulate the Behavior of Recipient Cells*. *The American Journal of Pathology*, 2017.
225. Hon, K.W., et al., *Exosomes As Potential Biomarkers and Targeted Therapy in Colorectal Cancer: A Mini-Review*. *Frontiers in Pharmacology*, 2017. 8.
226. Teng, Y., et al., *MVP-mediated exosomal sorting of miR-193a promotes colon cancer progression*. *Nature communications*, 2017. 8: p. 14448.
227. Wang, J., et al., *Circulating exosomal miR-125a-3p as a novel biomarker for early-stage colon cancer*. *Scientific Reports*, 2017. 7.
228. Zhao, L., et al., *Isolation and Identification of miRNAs in exosomes derived from serum of colon cancer patients*. *Journal of Cancer*, 2017. 8(7): p. 1145.
229. Ogata-Kawata, H., et al., *Circulating exosomal microRNAs as biomarkers of colon cancer*. *PloS one*, 2014. 9(4): p. e92921.
230. Matsumura, T., et al., *Exosomal microRNA in serum is a novel biomarker of recurrence in human colorectal cancer*. *British journal of cancer*, 2015. 113(2): p. 275-281.

231. Liu, T., et al., *Exosomal long noncoding RNA CRNDE-h as a novel serum-based biomarker for diagnosis and prognosis of colorectal cancer*. *Oncotarget*, 2016. 7(51): p. 85551.
232. Campanella, C., et al., *Heat shock protein 60 levels in tissue and circulating exosomes in human large bowel cancer before and after ablative surgery*. *Cancer*, 2015. 121(18): p. 3230-3239.
233. Yunusova, N., et al. *The characterization of exosome from blood plasma of patients with colorectal cancer*. in *AIP Conference Proceedings*. 2016. AIP Publishing.
234. Chen, Y., et al., *Protein content and functional characteristics of serum-purified exosomes from patients with colorectal cancer revealed by quantitative proteomics*. *International journal of cancer*, 2017.
235. Soldevilla, B., et al., *Tumor-derived exosomes are enriched in $\Delta Np73$, which promotes oncogenic potential in acceptor cells and correlates with patient survival*. *Human molecular genetics*, 2013. 23(2): p. 467-478.
236. Ling, H., W. Zhang, and G.A. Calin, *Principles of microRNA involvement in human cancers*. *Chinese journal of cancer*, 2011. 30(11): p. 739.
237. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. *Cell*, 1993. 75(5): p. 843-854.
238. He, L. and G.J. Hannon, *MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation*. *Nature reviews. Genetics*, 2004. 5(8): p. 631.
239. Wightman, B., I. Ha, and G. Ruvkun, *Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans*. *Cell*, 1993. 75(5): p. 855-862.
240. Lin, S.-Y., et al., *The C. elegans hunchback homolog, hbl-1, controls temporal patterning and is a probable microRNA target*. *Developmental cell*, 2003. 4(5): p. 639-650.
241. Reinhart, B.J., et al., *The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans*. *nature*, 2000. 403(6772): p. 901.
242. Pasquinelli, A.E., et al., *Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA*. *Nature*, 2000. 408(6808): p. 86.
243. Lee, R.C. and V. Ambros, *An extensive class of small RNAs in Caenorhabditis elegans*. *Science*, 2001. 294(5543): p. 862-864.
244. Bartel, D.P., *MicroRNAs: target recognition and regulatory functions*. *cell*, 2009. 136(2): p. 215-233.
245. Cekaite, L., et al., *MicroRNAs as growth regulators, their function and biomarker status in colorectal cancer*. *Oncotarget*, 2016. 7(6): p. 6476.

246. Salmena, L., et al., *A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language?* Cell, 2011. 146(3): p. 353-358.
247. Sethupathy, P., M. Megraw, and A.G. Hatzigeorgiou, *A guide through present computational approaches for the identification of mammalian microRNA targets*. Nature methods, 2006. 3(11): p. 881.
248. Moqadam, F.A., R. Pieters, and M. Den Boer, *The hunting of targets: challenge in miRNA research*. Leukemia, 2013. 27(1): p. 16.
249. Khraiweh, B., et al., *Transcriptional control of gene expression by microRNAs*. Cell, 2010. 140(1): p. 111-122.
250. Rupaimoole, R. and F.J. Slack, *MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases*. Nature Reviews Drug Discovery, 2017. 16(3): p. 203-222.
251. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. cell, 2004. 116(2): p. 281-297.
252. Doench, J.G., C.P. Petersen, and P.A. Sharp, *siRNAs can function as miRNAs*. Genes & development, 2003. 17(4): p. 438-442.
253. Hwang, H.-W., E.A. Wentzel, and J.T. Mendell, *A hexanucleotide element directs microRNA nuclear import*. Science, 2007. 315(5808): p. 97-100.
254. Ørom, U.A., F.C. Nielsen, and A.H. Lund, *MicroRNA-10a binds the 5' UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation*. Molecular cell, 2008. 30(4): p. 460-471.
255. Vasudevan, S., Y. Tong, and J.A. Steitz, *Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation*. Science, 2007. 318(5858): p. 1931-1934.
256. Place, R.F., et al., *MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. 105(5): p. 1608-1613.
257. Almeida, M.I., R.M. Reis, and G.A. Calin, *Decoy activity through microRNAs: the therapeutic implications*. Expert opinion on biological therapy, 2012. 12(9): p. 1153-1159.
258. Eiring, A.M., et al., *miR-328 functions as an RNA decoy to modulate hnRNP E2 regulation of mRNA translation in leukemic blasts*. Cell, 2010. 140(5): p. 652-665.
259. Calin, G.A., et al., *Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002. 99(24): p. 15524-15529.
260. Calin, G.A. and C.M. Croce, *MicroRNA signatures in human cancers*. Nature reviews. Cancer, 2006. 6(11): p. 857.
261. Oliveto, S., et al., *Role of microRNAs in translation regulation and cancer*. World journal of biological chemistry, 2017. 8(1): p. 45.

262. Melnik, B.C., *MiR-21: an environmental driver of malignant melanoma?* Journal of translational medicine, 2015. 13(1): p. 202.
263. Pencheva, N. and S.F. Tavazoie, *Control of metastatic progression by microRNA regulatory networks.* Nature cell biology, 2013. 15(6): p. 546.
264. Park, S.-M., et al., *The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2.* Genes & development, 2008. 22(7): p. 894-907.
265. Pichler, M., et al., *MiR-200a regulates epithelial to mesenchymal transition-related gene expression and determines prognosis in colorectal cancer patients.* British journal of cancer, 2014. 110(6): p. 1614.
266. Korpai, M., et al., *Direct targeting of Sec23a by miR-200s influences cancer cell secretome and promotes metastatic colonization.* Nature medicine, 2011. 17(9): p. 1101-1108.
267. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation.* cell, 2011. 144(5): p. 646-674.
268. Meng, F., et al., *MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer.* Gastroenterology, 2007. 133(2): p. 647-658.
269. Johnson, C.D., et al., *The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells.* Cancer research, 2007. 67(16): p. 7713-7722.
270. Rottiers, V. and A.M. Näär, *MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders.* Nature reviews. Molecular cell biology, 2012. 13(4): p. 239.
271. Cortez, M.A., et al., *PDL1 Regulation by p53 via miR-34.* JNCI: Journal of the National Cancer Institute, 2016. 108(1).
272. Wei, J., et al., *MiR-124 inhibits STAT3 signaling to enhance T cell-mediated immune clearance of glioma.* Cancer research, 2013. 73(13): p. 3913-3926.
273. le Sage, C., et al., *Regulation of the p27 Kip1 tumor suppressor by miR-221 and miR-222 promotes cancer cell proliferation.* The EMBO journal, 2007. 26(15): p. 3699-3708.
274. Lou, Y.-L., et al., *miR-210 activates notch signaling pathway in angiogenesis induced by cerebral ischemia.* Molecular and cellular biochemistry, 2012. 370(1-2): p. 45-51.
275. Kuhnert, F. and C.J. Kuo, *MiR-17-92 angiogenesis micromanagement.* Blood, 2010. 115(23): p. 4631-4632.
276. Ma, L., J. Teruya-Feldstein, and R.A. Weinberg, *Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer.* Nature, 2007. 449(7163): p. 682.
277. Ling, H., et al., *The clinical and biological significance of MIR-224 expression in colorectal cancer metastasis.* Gut, 2015: p. gutjnl-2015-309372.

278. Yamakuchi, M., M. Ferlito, and C.J. Lowenstein, *miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. 105(36): p. 13421-13426.
279. Cimmino, A., et al., *miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. 102(39): p. 13944-13949.
280. Martinez, I., et al., *miR-29 and miR-30 regulate B-Myb expression during cellular senescence*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011. 108(2): p. 522-527.
281. Ohira, T., et al., *miR-19b regulates hTERT mRNA expression through targeting PITX1 mRNA in melanoma cells*. Scientific reports, 2015. 5.
282. Luo, X., et al., *MicroRNA signatures: novel biomarker for colorectal cancer?* Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers, 2011. 20(7): p. 1272-1286.
283. Michael, M.Z., et al., *Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia*. Molecular cancer research, 2003. 1(12): p. 882-891.
284. Roy, S. and A.P. Majumdar, *Cancer stem cells in colorectal cancer: genetic and epigenetic changes*. Journal of stem cell research & therapy, 2012(6).
285. Oue, N., et al., *High miR-21 expression from FFPE tissues is associated with poor survival and response to adjuvant chemotherapy in colon cancer*. International journal of cancer, 2014. 134(8): p. 1926-1934.
286. Schetter, A.J., H. Okayama, and C.C. Harris, *The role of microRNAs in colorectal cancer*. Cancer journal (Sudbury, Mass.), 2012. 18(3): p. 244.
287. Liang, L., et al., *MicroRNA-137, an HMGA1 target, suppresses colorectal cancer cell invasion and metastasis in mice by directly targeting FMNL2*. Gastroenterology, 2013. 144(3): p. 624-635. e4.
288. Suzuki, H., et al., *DNA methylation and microRNA dysregulation in cancer*. Molecular oncology, 2012. 6(6): p. 567-578.
289. Iorio, M.V., C. Piovan, and C.M. Croce, *Interplay between microRNAs and the epigenetic machinery: an intricate network*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms, 2010. 1799(10): p. 694-701.
290. Suzuki, H., et al., *Genome-wide profiling of chromatin signatures reveals epigenetic regulation of MicroRNA genes in colorectal cancer*. Cancer research, 2011.
291. Pucci, S. and P. Mazzei, *MicroRNA dysregulation in colon cancer microenvironment interactions: the importance of small things in metastases*. Cancer Microenvironment, 2011. 4(2): p. 155-162.
292. Wang, H., et al., *MicroRNA-342 inhibits colorectal cancer cell proliferation and invasion by directly targeting DNA methyltransferase 1*. Carcinogenesis, 2011. 32(7): p. 1033-1042.

293. Padi, S.K., et al., *MicroRNA-627 mediates the epigenetic mechanisms of vitamin D to suppress proliferation of human colorectal cancer cells and growth of xenograft tumors in mice*. *Gastroenterology*, 2013. 145(2): p. 437-446.
294. Strubberg, A.M. and B.B. Madison, *MicroRNAs in the etiology of colorectal cancer: Pathways and clinical implications*. *Disease models & mechanisms*, 2017. 10(3): p. 197-214.
295. Oberg, A.L., et al., *miRNA expression in colon polyps provides evidence for a multihit model of colon cancer*. *PloS one*, 2011. 6(6): p. e20465.
296. Bu, P., et al., *A microRNA miR-34a-regulated bimodal switch targets Notch in colon cancer stem cells*. *Cell stem cell*, 2013. 12(5): p. 602-615.
297. Bu, P., et al., *A miR-34a-Numb feedforward loop triggered by inflammation regulates asymmetric stem cell division in intestine and colon cancer*. *Cell stem cell*, 2016. 18(2): p. 189-202.
298. Zheng, L., et al., *Down-regulation of miR-106b induces epithelial-mesenchymal transition but suppresses metastatic colonization by targeting Prrx1 in colorectal cancer*. *International journal of clinical and experimental pathology*, 2015. 8(9): p. 10534.
299. Zhai, H., et al., *Inhibition of colorectal cancer stem cell survival and invasive potential by hsa-miR-140-5p mediated suppression of Smad2 and autophagy*. *Oncotarget*, 2015. 6(23): p. 19735.
300. Hwang, W.-L., et al., *MicroRNA-146a directs the symmetric division of Snail-dominant colorectal cancer stem cells*. *Nature cell biology*, 2014. 16(3): p. 268.
301. Wellner, U., et al., *The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs*. *Nature cell biology*, 2009. 11(12): p. 1487-1495.
302. Jones, M.F., et al., *The CDX1-microRNA-215 axis regulates colorectal cancer stem cell differentiation*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2015. 112(13): p. E1550-E1558.
303. Zhu, R., et al., *Ascl2 knockdown results in tumor growth arrest by miRNA-302b-related inhibition of colon cancer progenitor cells*. *PloS one*, 2012. 7(2): p. e32170.
304. Xu, X.T., et al., *MicroRNA expression profiling identifies miR-328 regulates cancer stem cell-like SP cells in colorectal cancer*. *British journal of cancer*, 2012. 106(7): p. 1320-1330.
305. Tsuji, S., et al., *The miR-363-GATA6-Lgr5 pathway is critical for colorectal tumorigenesis*. *Nature communications*, 2014. 5: p. 3150.
306. Li, Y., et al., *The SOX17/miR-371-5p/SOX2 axis inhibits EMT, stem cell properties and metastasis in colorectal cancer*. *Oncotarget*, 2015. 6(11): p. 9099.
307. Bitarte, N., et al., *MicroRNA-451 is involved in the self-renewal, tumorigenicity, and chemoresistance of colorectal cancer stem cells*. *Stem cells*, 2011. 29(11): p. 1661-1671.

308. Schetter, A.J., et al., *MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma*. *Jama*, 2008. 299(4): p. 425-436.
309. Slaby, O., et al., *Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer*. *Oncology*, 2007. 72(5-6): p. 397-402.
310. Yamamichi, N., et al., *Locked nucleic acid in situ hybridization analysis of miR-21 expression during colorectal cancer development*. *Clinical cancer research*, 2009. 15(12): p. 4009-4016.
311. Nagel, R., et al., *Regulation of the adenomatous polyposis coli gene by the miR-135 family in colorectal cancer*. *Cancer research*, 2008. 68(14): p. 5795-5802.
312. Diosdado, B., et al., *MiR-17-92 cluster is associated with 13q gain and c-myc expression during colorectal adenoma to adenocarcinoma progression*. *British journal of cancer*, 2009. 101(4): p. 707.
313. Balaguer, F., et al., *Epigenetic silencing of miR-137 is an early event in colorectal carcinogenesis*. *Cancer research*, 2010. 70(16): p. 6609-6618.
314. Grady, W., et al., *Epigenetic silencing of the intronic microRNA hsa-miR-342 and its host gene EVL in colorectal cancer*. *Oncogene*, 2008. 27(27): p. 3880.
315. Fujita, K., et al., *p53 isoforms $\Delta 133p53$ and p53 β are endogenous regulators of replicative cellular senescence*. 2010, AACR.
316. Bartkova, J., et al., *Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints*. *Nature*, 2006. 444(7119): p. 633.
317. Strillacci, A., et al., *MiR-101 downregulation is involved in cyclooxygenase-2 overexpression in human colon cancer cells*. *Experimental cell research*, 2009. 315(8): p. 1439-1447.
318. Liu, X., et al., *MicroRNA-499-5p promotes cellular invasion and tumor metastasis in colorectal cancer by targeting FOXO4 and PDCD4*. *Carcinogenesis*, 2011. 32(12): p. 1798-1805.
319. Tsang, W.P., et al., *Oncofetal H19-derived miR-675 regulates tumor suppressor RB in human colorectal cancer*. *Carcinogenesis*, 2009. 31(3): p. 350-358.
320. Ding, Q., et al., *APOBEC3G promotes liver metastasis in an orthotopic mouse model of colorectal cancer and predicts human hepatic metastasis*. *The Journal of clinical investigation*, 2011. 121(11): p. 4526.
321. Huang, Z., et al., *MicroRNA-95 promotes cell proliferation and targets sorting Nexin 1 in human colorectal carcinoma*. *Cancer research*, 2011. 71(7): p. 2582-2589.
322. Akao, Y., Y. Nakagawa, and T. Naoe, *MicroRNA-143 and-145 in colon cancer*. *DNA and cell biology*, 2007. 26(5): p. 311-320.
323. Baraniskin, A., et al., *MiR-30a-5p suppresses tumor growth in colon carcinoma by targeting DTL*. *Carcinogenesis*, 2012. 33(4): p. 732-739.

324. Wu, J., et al., *MicroRNA-34a inhibits migration and invasion of colon cancer cells via targeting to Fra-1*. Carcinogenesis, 2011. 33(3): p. 519-528.
325. Braun, C.J., et al., *p53-Responsive micrornas 192 and 215 are capable of inducing cell cycle arrest*. Cancer research, 2008. 68(24): p. 10094-10104.
326. Bandres, E., et al., *microRNA-451 regulates macrophage migration inhibitory factor production and proliferation of gastrointestinal cancer cells*. Clinical Cancer Research, 2009. 15(7): p. 2281-2290.
327. Nie, J., et al., *microRNA-365, down-regulated in colon cancer, inhibits cell cycle progression and promotes apoptosis of colon cancer cells by probably targeting Cyclin D1 and Bcl-2*. Carcinogenesis, 2011. 33(1): p. 220-225.
328. Wang, D., et al., *The role of microRNAs in colorectal liver metastasis: Important participants and potential clinical significances*. Tumor Biology, 2017. 39(6): p. 1010428317709640.
329. Cellura, D., et al., *miR-19-Mediated Inhibition of Transglutaminase-2 Leads to Enhanced Invasion and Metastasis in Colorectal Cancer*. Molecular Cancer Research, 2015. 13(7): p. 1095-1105.
330. Zhao, H., et al., *miR-30b regulates migration and invasion of human colorectal cancer via SIX1*. Biochemical Journal, 2014. 460(1): p. 117-129.
331. Zhang, J., et al., *miR-21, miR-17 and miR-19a induced by phosphatase of regenerating liver-3 promote the proliferation and metastasis of colon cancer*. British journal of cancer, 2012. 107(2): p. 352.
332. Asangani, I., et al., *MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer*. Oncogene, 2008. 27(15): p. 2128.
333. Hansen, T.F., et al., *Intra-tumoural vessel area estimated by expression of epidermal growth factor-like domain 7 and microRNA-126 in primary tumours and metastases of patients with colorectal cancer: a descriptive study*. Journal of translational medicine, 2015. 13(1): p. 10.
334. Zhong, L., et al., *p38 and JNK pathways control E-selectin-dependent extravasation of colon cancer cells by modulating miR-31 transcription*. Oncotarget, 2017. 8(1): p. 1678.
335. Ma, Y.L., et al., *Human embryonic stem cells and metastatic colorectal cancer cells shared the common endogenous human microRNA-26b*. Journal of cellular and molecular medicine, 2011. 15(9): p. 1941-1954.
336. Chen, H.-Y., et al., *miR-103/107 promote metastasis of colorectal cancer by targeting the metastasis suppressors DAPK and KLF4*. Cancer research, 2012. 72(14): p. 3631-3641.
337. Larsen, C.-J., *Metastatic colonization of the liver by colorectal tumor cells is abolished by two micro-RNAs (miR-483-5p et miR-551a)*. Bulletin du cancer, 2015. 102(9): p. 713.

338. Wang, R., et al., *MicroRNA-195 suppresses angiogenesis and metastasis of hepatocellular carcinoma by inhibiting the expression of VEGF, VAV2, and CDC42*. *Hepatology*, 2013. 58(2): p. 642-653.
339. Shibuya, H., et al., *Clinicopathological and prognostic value of microRNA-21 and microRNA-155 in colorectal cancer*. *Oncology*, 2010. 79(3-4): p. 313-320.
340. Kulda, V., et al., *Relevance of miR-21 and miR-143 expression in tissue samples of colorectal carcinoma and its liver metastases*. *Cancer genetics and cytogenetics*, 2010. 200(2): p. 154-160.
341. Nielsen, B.S., et al., *High levels of microRNA-21 in the stroma of colorectal cancers predict short disease-free survival in stage II colon cancer patients*. *Clinical & experimental metastasis*, 2011. 28(1): p. 27-38.
342. Dong, Y., J. Yu, and S.S. Ng, *MicroRNA dysregulation as a prognostic biomarker in colorectal cancer*. *Cancer management and research*, 2014. 6: p. 405.
343. Yang, J., et al., *Expression analysis of microRNA as prognostic biomarkers in colorectal cancer*. *Oncotarget*, 2017. 8(32): p. 52403.
344. Naeem, B. and A. Ayub, *Utilization of Micrnas in Colorectal Cancer: A Review*. *Journal of Advanced Surgical Research*, 2017. 1(1).
345. Díaz, R., et al., *Deregulated expression of miR-106a predicts survival in human colon cancer patients*. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 2008. 47(9): p. 794-802.
346. Drebber, U., et al., *Altered levels of the onco-microRNA 21 and the tumor-suppressor microRNAs 143 and 145 in advanced rectal cancer indicate successful neoadjuvant chemoradiotherapy*. *International journal of oncology*, 2011. 39(2): p. 409-415.
347. Schepeler, T., et al., *Diagnostic and prognostic microRNAs in stage II colon cancer*. *Cancer research*, 2008. 68(15): p. 6416-6424.
348. Faber, C., et al., *Overexpression of Dicer predicts poor survival in colorectal cancer*. *European journal of cancer*, 2011. 47(9): p. 1414-1419.
349. Massagué, J. and A.C. Obenauf, *Metastatic colonization by circulating tumour cells*. *Nature*, 2016. 529(7586): p. 298-306.
350. Ma, Y., et al., *Candidate microRNA biomarkers in human colorectal cancer: systematic review profiling studies and experimental validation*. *International journal of cancer*, 2012. 130(9): p. 2077-2087.
351. Toiyama, Y., et al., *Serum miR-200c is a novel prognostic and metastasis-predictive biomarker in patients with colorectal cancer*. *Annals of surgery*, 2014. 259(4): p. 735.
352. Pigati, L., et al., *Selective release of microRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells*. *PloS one*, 2010. 5(10): p. e13515.

353. Ivankovics, I.G., et al., *Peripheral and mesenteric serum levels of CEA and cytokeratins, staging and histopathological variables in colorectal adenocarcinoma*. World Journal of Gastroenterology: WJG, 2008. 14(43): p. 6699.
354. Rezende junior, H.C.d., et al., *Carcinoembryonic antigen levels in the peripheral and mesenteric venous blood of patients with rectal carcinoma*. Arquivos de gastroenterologia, 2013. 50(4): p. 264-269.
355. Xu, G., et al., *MicroRNA-21 promotes hepatocellular carcinoma HepG2 cell proliferation through repression of mitogen-activated protein kinase-kinase 3*. BMC cancer, 2013. 13(1): p. 469.
356. Zhu, Q., et al., *miR-21 promotes migration and invasion by the miR-21-PDCD4-AP-1 feedback loop in human hepatocellular carcinoma*. Oncology reports, 2012. 27(5): p. 1660-1668.
357. Damania, P., et al., *Hepatitis B virus induces cell proliferation via HBx-induced microRNA-21 in hepatocellular carcinoma by targeting programmed cell death protein4 (PDCD4) and phosphatase and tensin homologue (PTEN)*. PLoS One, 2014. 9(3): p. e91745.
358. Zhou, J., et al., *Plasma microRNA panel to diagnose hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma*. Journal of Clinical Oncology, 2011. 29(36): p. 4781-4788.
359. Ghasemi, R., et al., *Tumor-derived microvesicles: the metastasomes*. Medical hypotheses, 2013. 80(1): p. 75-82.
360. Squadrito, M.L., et al., *MicroRNA-mediated control of macrophages and its implications for cancer*. Trends in immunology, 2013. 34(7): p. 350-359.
361. Crosbie, P.A., et al., *Circulating tumor cells detected in the tumor-draining pulmonary vein are associated with disease recurrence after surgical resection of NSCLC*. Journal of Thoracic Oncology, 2016. 11(10): p. 1793-1797.
362. Becker, A., et al., *Extracellular vesicles in cancer: cell-to-cell mediators of metastasis*. Cancer cell, 2016. 30(6): p. 836-848.
363. de la Fuente, A., et al., *M-trap: exosome-based capture of tumor cells as a new technology in peritoneal metastasis*. JNCI: Journal of the National Cancer Institute, 2015. 107(9).
364. Arora, S., et al., *MicroRNA-328 is associated with (non-small) cell lung cancer (NSCLC) brain metastasis and mediates NSCLC migration*. International journal of cancer, 2011. 129(11): p. 2621-2631.
365. Hauptmann, S., et al., *Glucose transporter GLUT1 in colorectal adenocarcinoma cell lines is inversely correlated with tumour cell proliferation*. Anticancer research, 2005. 25(5): p. 3431.
366. Han, N., et al., *MiR-328 suppresses the survival of esophageal cancer cells by targeting PLCE1*. Biochemical and biophysical research communications, 2016. 470(1): p. 175-180.

367. Chen, C.-H., et al., *MicroRNA-328 inhibits renal tubular cell epithelial-to-mesenchymal transition by targeting the CD44 in pressure-induced renal fibrosis*. PloS one, 2014. 9(6): p. e99802.
368. Xue, H.-g., et al., *Expression of microRNA-328 Functions as a Biomarker for Recurrence of Early Gastric Cancer (EGC) After Endoscopic Submucosal Dissection (ESD) by Modulating CD44*. Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research, 2016. 22: p. 4779.
369. Delic, S., et al., *MiR-328 promotes glioma cell invasion via SFRP1-dependent Wnt-signaling activation*. Neuro-oncology, 2013. 16(2): p. 179-190.
370. Li, J.-R., et al., *MicroRNA-328 inhibits proliferation of human melanoma cells by targeting TGF β 2*. Asian Pac. J. Cancer Prev, 2015. 16: p. 1575-1579.
371. Fong, M.Y., et al., *Breast-cancer-secreted miR-122 reprograms glucose metabolism in premetastatic niche to promote metastasis*. Nature cell biology, 2015. 17(2): p. 183-194.
372. Wu, K., et al., *Exosomal miR-19a: a novel communicator between cancer cell and osteoclast in osteolytic bone metastasis of breast cancer*. 2017, AACR.
373. Piccin, A., W.G. Murphy, and O.P. Smith, *Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications*. Blood reviews, 2007. 21(3): p. 157-171.
374. Sercu, S., et al., *ECM1 interacts with fibulin-3 and the beta 3 chain of laminin 332 through its serum albumin subdomain-like 2 domain*. Matrix Biology, 2009. 28(3): p. 160-169.
375. Wang, L., et al., *Extracellular matrix protein 1 (ECM1) is over-expressed in malignant epithelial tumors*. Cancer Letters, 2003. 200(1): p. 57-67.
376. Philley, J.V., et al., *Exosome secretome and mediated signaling in breast cancer patients with nontuberculous mycobacterial disease*. Oncotarget, 2017. 8(11): p. 18070.
377. Chen, H., W. Jia, and J. Li, *ECM1 promotes migration and invasion of hepatocellular carcinoma by inducing epithelial-mesenchymal transition*. World journal of surgical oncology, 2016. 14(1): p. 195.
378. Lee, K., et al., *ECM1 regulates tumor metastasis and CSC-like property through stabilization of β -catenin*. Oncogene, 2015. 34(50): p. 6055-6065.

ANNEXES

Annexes

Annex 1. Revisions dels articles publicats

Article primer

OA_Response to Reviewers

MD-D-14-00236: DIFFERENTIAL MIR-21 EXPRESSION IN PLASMA FROM MESENTERIC VERSUS PERIPHERAL VEINS: AN OBSERVATIONAL STUDY OF DISEASE-FREE SURVIVAL IN SURGICALLY RESECTED COLON CANCER PATIENTS

RESPONSE TO REVIEWER

Editor's Note

1. *The manuscript should be edited for English by a native speaker, or a language-editing service prior to re-submission.*

Our reply: The manuscript has been checked by a native English medical writer.

Reviewer's Comments

1. *Is the manuscript technically sound, and do the data support the conclusions? The manuscript must describe a technically sound piece of scientific research with data that supports the conclusions. Experiments must have been conducted rigorously, with appropriate controls, replication, and sample sizes. The conclusions must be drawn appropriately based on the data presented.*

Reviewer #1: Partly

Please explain (optional).

Reviewer #1: (No Response)

Our reply: Based on the criteria mentioned above, we believe that our manuscript is technically sound and our data support our conclusions. For example, both tumor and normal tissue samples were analyzed and confirmed by a pathologist. miRNA detection was performed using commercial assays with appropriate negative controls and all reactions were performed in duplicate. Our data indicate that miR-21 expression levels were higher in MV plasma than in PV plasma, suggesting that the primary tumor releases high concentrations of miR-21 in the MV, but that these concentrations are later diluted in the circulatory system. Perhaps the reviewer feels that the sample size (57 patients) was relatively small; however, we did not have access to samples from additional patients, since blood is not routinely drawn from the mesenteric vein during surgery on patients with colon cancer. The originality of our research lies precisely in this novel approach.

2. *Has the statistical analysis been performed appropriately and rigorously?*

Reviewer #1: Yes

Please explain (optional).

Reviewer #1: (No Response)

Our reply: We thank the reviewer for this positive comment.

3. *Does the manuscript adhere to standards in this field for data availability?*

Authors must follow field-specific standards for data deposition in publicly available resources and should include accession numbers in the manuscript when relevant. The manuscript should explain what steps have been taken to make data available, particularly in cases where data cannot be publicly deposited.

Reviewer #1: No

Please explain (optional).

Reviewer #1: (No Response)

Our reply: The data we used for our study are part of a larger data base of the Hospital Clinic, Barcelona, which contains confidential patient information that we cannot make publicly available. However, we will be happy to make a limited data base available upon request. Anyone who desires to access our data should write to the corresponding author, Dr Mariano Monzo, at mmonzo@ub.edu and he will send the data requested.

- 4. Is the manuscript presented in an intelligible fashion and written in standard English? Medicine does not copyedit accepted manuscripts, so the language in submitted articles must be clear, correct, and unambiguous. Any typographical or grammatical errors should be corrected at revision, so please note any specific errors below.*

Reviewer #1: Yes

Please explain (optional).

Reviewer #1: (No Response)

Our reply: We thank the reviewer for this positive comment.

Editorial Formatting Comments

- 1. Title page: Be sure the title page lists all author names, degrees, and affiliations.*

Our reply: The title page lists all authors, degrees and affiliations.

- 2. Title: Be sure the title includes any specific terms as directed in the reporting guidelines for your type of article (for example, "case report" should be in the title of a CARE-compliant article). The following guidelines specify terms that should be in the title: CARE, CHEERS, CONSORT, PRISMA.*

Our reply: We have included the necessary specific terms.

- 3. Abstract: Be sure to use a structured abstract, with headings. Use the specific headings listed in the guidelines checklist if your report is based on the CARE, CHEERS, CONSORT, or PRISMA guidelines.*

Our reply: As an observational study, ours is STROBE-compliant. We are unable to identify the specific headings – if any – required by the STROBE guidelines. However, we have used generally acceptable headings.

- 4. List of abbreviations: If not already included, please include a list of abbreviations used in the text as part of the manuscript text file following the title page. Use abbreviations*

sparingly in the text, and spell them out the first time you use them. Abbreviations used in tables should be spelled out at the bottom of the table.

Our reply: We have added a list of abbreviations as requested.

5. *Ethical review, Methods section: If not already included, please state in the Methods section that an ethics committee or institutional review board approved the study, and list the board's name. If ethical approval was waived or not necessary, please state the reason. If the study involves patient consent, state explicitly that informed consent was or was not given, and state the reason if not given.*

Our reply: The Methods section includes the following statements:

From August 2009 to August 2013, samples were obtained from 57 patients with stage I-IV colon cancer who underwent surgical resection at the Municipal Hospital of Badalona. Approval for the study was obtained from the institutional review board of the hospital, and signed informed consent was obtained from all patients and controls in accordance with the Declaration of Helsinki.

6. *Funding/Conflict of Interest information: List any source of funding or anything that could be perceived as a conflict of interest in the Acknowledgments section.*

Our reply: We had originally provided this information on the title page. We have now moved it to the Acknowledgements section, as follows:

This study was partially supported by a grant from SDCSC (*Servei de Donació del Cos a la Ciència*). RT is recipient of an APIF (*Ajuts de Personal Investigador Predoctoral en Formació*) grant from the Universitat de Barcelona. Neither of these funding bodies had a role in the design and conduct of the study; collection, management, analysis, and interpretation of the data; preparation, review, or approval of the manuscript; or decision to submit the manuscript for publication. The authors declare no conflicts of interest.

7. *Acknowledgments: If you list anyone by name in the Acknowledgments section, please confirm that the person gives permission to be named.*

Our reply: We do not acknowledge anyone by name.

8. *License to Publish: If not already submitted, complete and submit a copy of the Open Access-License to Publish (LTP). The LTP is available to download from the home page of our website, under Forms. Be sure to select the kind of license you would like to use if the paper is accepted. (The different kinds of licenses determine how others can use your work after publication, varying from not restrictive at all to very restrictive.) Fill out all schedules (parts of the form). The corresponding author can sign the form on behalf of all authors; we need only one copy of the form. The form can be filled out and signed electronically, then uploaded as a submission item.*

Our reply: We submitted a signed copy of the LTP with our original submission.

Article segon

De: em.annsurg.0.51309f.528c2a71@editorialmanager.com [em.annsurg.0.51309f.528c2a71@editorialmanager.com]
en nom de Annals of Surgery [em@editorialmanager.com]

Enviat el: diumenge, 12 / febrer / 2017 16:32

Per a: MARIANO MONZO PLANELLA

Tema: Annals of Surgery - [EMID:12bb868a718e09a7]

Ref.: Ms. No. ANNSURG-D-17-00022

Exosomal microRNAs isolated from plasma of mesenteric veins linked to liver metastases in resected patients with colon cancer
Annals of Surgery

Dear Dr. Monzo,

Thank you for submitting your manuscript to Annals of Surgery. It has been reviewed by members of the Editorial Board, and we are sorry to inform you that it was not accepted for publication. Reviewer comments are attached for your information.

Due to limited publication space, we regret that we are unable to accept many fine manuscripts. However, please be assured that we greatly appreciate your considering Annals for your work.

Yours sincerely,

Keith D. Lillemoe, MD
Editor in Chief

James W. Fleshman, Jr., MD
Associate Editor

***PUBLISHER TRANSFER OPTION

Important Note: This option is provided to authors at the sole discretion of Wolters Kluwer Health, and does not modify the editorial decision of this journal, nor does it imply any endorsement for publication by this journal's editorial board.

Wolters Kluwer Health now provides the option to have your manuscript transferred to Medicine, an open access journal published online by Wolters Kluwer Health.

Transfer is not a guarantee of publication, and submissions to Medicine will undergo a separate review by the Medicine editorial board. Article Processing Charges (APCs) will apply to accepted articles.

For more information about Medicine, please visit the Medicine open access information page, located [here](#), or contact the Medicine Editorial Office at medicine@wolterskluwer.com.

To initiate the transfer, please click on the Accept link below. To decline the transfer, please click Decline. Please note that this transfer offer will expire on Feb 17 2017 11:59PM.

Accept Transfer - [Agree to Transfer](#)

Decline Transfer - [Decline to Transfer](#)

16 February 2017

Drs Andrei V. Gudkov and Mikhail V. Blagosklonny
Editors-In-Chief, *Oncotarget*

Dear Drs Gudkov and Blagosklonny,

We are submitting our manuscript entitled “**Exosomal microRNAs isolated from plasma of mesenteric veins linked to liver metastases in resected patients with colon cancer**” so that you may consider it for publication as a Research Paper in *Oncotarget*.

In our manuscript, we report our findings in 50 surgically resected patients with stage I-III colon cancer, from whom we obtained blood samples from the vein draining from the tumor (mesenteric vein) and the peripheral vein. We identified four miRNAs that were expressed at higher levels in mesenteric plasma than in peripheral plasma. Overexpression of these miRNAs in mesenteric plasma was associated with shorter time to relapse, while high expression of the miRNAs in peripheral plasma was associated with longer time to relapse. Moreover, we found that the exosomal cargo in mesenteric plasma of one of these miRNAs (miR-328) was higher in patients who developed metastases, while there was no difference in the exosomal cargo in peripheral plasma between metastatic and non-metastatic patients. Our findings indicate that in surgical colon cancer patients, the analysis of biomarkers in blood obtained from the mesenteric vein during surgery may provide a more reliable indication of risk of relapse than can the analysis of biomarkers in peripheral blood.

This paper was previously submitted to *Annals of Surgery* (IF 8.569), but we believe that it was mistakenly rejected, and we are submitting to *Oncotarget* as suggested on your web page. We are submitting a revised version of our original manuscript formatted according to *Oncotarget* guidelines, together with the reviewers' comments and our rebuttal letter.

Thank you for considering this manuscript for publication. I hope that you enjoy it and find it of interest for the readers of *Oncotarget*.

With our best regards,

Mariano Monzo, MD, PhD

Professor and Chairman
Unit of Anatomy and Human Embryology
School of Medicine-Hospital Clinic
University of Barcelona
Casanova 143
08036 Barcelona
Phone: 93 402 19 03
mmonzo@ub.edu

Ref.: Ms. No. ANNSURG-D-17-00022

Exosomal microRNAs isolated from plasma of mesenteric veins linked to liver metastases in resected patients with colon cancer *Annals of Surgery*

Reviewers' comments:

Reviewer #1: Several things need clarification.

In the last sentence of the introduction, the authors state that they have analyzed 754 micro RNA in 50 paired samples taken from the mesenteric vein and peripheral vein of surgically resected colon cancer patients and correlated these results the patient characteristics and time to relapse. In reading the methods section, it sounds as if the 754 Micro RNA where used only in a training set of 15 mesenteric vein and 3 plasma veins samples, not the entire 50 paired plasma sample set.

Our reply: We performed the analysis of the 754 miRNAs only in the training set composed of 15 mesenteric vein and 3 plasma veins samples. After that the miRNAs identified associated to relapse were studied in the whole cohort of 50 patients (plasma from paired mesenteric and peripheral blood). To avoid confusion we have modified introduction as follows:

“In order to test this hypothesis, we have profiled the miRNA expression in plasma samples taken from MV of surgically resected stage I-III CC patients and identified several MV-miRNAs associated with time to relapse (TTR). Furthermore, we confirm that these miRNAs were contained in MV-exosomes.”

For their methods with this the authors site a paper on multiple myeloma that they have published. So that the reader does not have to refer to this paper they should briefly state how the screening was performed and how all but 249 of the miRNA were excluded? All of these not expressed or unreliably quantified in the 15 mesenteric vein plasma samples?

Our reply: Previous reports of microRNA profiling in serum sample from our group (Navarro A. et al. *Oncotarget* 2015) or other groups (Pescador N. et al. *PLOS One* 2013; Jiang X. et al. 2015 *Int. J. Cancer*; Zampetaki A. et al. 2010 *Circulation Research*) show that the number of microRNAs detected in plasma samples by real time PCR is around 30% as we observed in our cohort. Moreover, as suggested by this reviewer, we have added in methods section all the information about the microRNA screening and filtering as follows:

“Briefly, RT reactions of 4.50µl contained: 0.80µl of 10X RT buffer (Applied Biosystems), 0.2µl dNTPs (100mM each), 1.5µl multiscribe reverse transcriptase (50 U/µl), 0.10µl RNase inhibitor (20 U/µl), 0.80µl Megaplex RT primers (10X), 0.90µl of MgCl₂ (25 U/µl) and 70ng of total RNA. RT reactions were incubated in a 2720 thermocycler (Applied Biosystems) for 2 min at 16°C and 1 min at 42°C for 40 cycles, 1 s at 50°C and 5 min at 85°C, and then held at 4°C. 2.5 µL of each RT product was preamplified in order to increase the quantity of desired cDNA. Preamplification reactions were incubated in a 2720 thermocycler (Applied Biosystems) for 10 min at 95°C, 2 min at 55°C and 2 min at 72°C; then 15 s at 95°C and 4 min at 60°C for 12 cycles, 10 min at 99.9°C and then held at 4°C. Preamplification product was diluted with 75µL of 0.1X TE buffer (pH 8.0). Quantitative real-time PCR reactions were performed on an ABI 7500 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) and contained 9µL of the diluted preamplified product, 450µL of TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG 2X (Applied Biosystems) and 441µL of nuclease-free water, mixed by vortexing, and pipetted into microfluidic TaqMan Human miRNA Array A and B. ”

“All miRNAs that were not expressed in all 15 MV plasma samples or were expressed with an unreliable quantification (Ct>37) were excluded from further analysis, leaving a working set of 249 miRNAs.”

They state that samples were normalized using miR-484. Can they justify use of this as a reference?

Our reply: Using the miRNA data from the training set we identified miR-484 as the miRNA whose expression had the least variance and that was not differentially expressed between mesenteric and peripheral vein samples. Moreover, this miRNA have been previously described in the literature as a good endogenous control to study miRNA expression in serum samples (Hu Z et al. Carcinogenesis 2012). We have included this information in the text as follows:

“Normalization was performed with miR-484 as this miRNA was found to be the most stably expressed in all the samples.”

In the methods they state that that mean miRNA value of the peripheral vein plasma samples included in the profiling was used "as calibrator sample". Can the authors clarify what was done? Was exosomal miRNA normalized both to a reference miRNA as well as to peripheral vein plasma miRNA?

Our reply: As stated in method section relative miRNA expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. This method is a convenient method to analyze the relative changes in gene expression. It requires the assignment of one or more housekeeping genes (miR-484), which are assumed to be uniformly and constantly expressed in all samples, as well as one or more reference samples (peripheral vein plasma samples). The expression of other samples is then compared to that in the reference sample (Kenneth J. *et al.* Methods 2001).

Many comparisons were performed to correlate the miRNA's both with clinical characteristics as well as with time to relapse. What statistical correction was used for this? Are the p-values that are presented FDR-corrected P values?

Our reply: Raw p-value data is shown in the text and figures of the manuscript. However, the significance is retained for time to relapse when FDR correction is applied. We have included this information in the table below for reviewer’s information:

microRNA	Peripheral vein		Mesenteric vein	
	Raw p-value	FDR-corrected p-value	Raw p-value	FDR-corrected p-value
Let-7g	0.00368	0.01544	0.0519	0.05190
miR-15b	0.0172	0.03440	0.00386	0.01544
miR-155	0.0327	0.03737	0.0128	0.03413
miR-328	0.0269	0.03586	0.0225	0.03586

We are provided with a mean follow-up of 45 months, the range should also be provided.

Our reply: We have included this information in the text as follows:

“Mean follow-up was 45.2 months (range 26.4-63.8).”

On page 11, second paragraph I do not understand what the authors mean by "pre-existing polyps" can they elaborate?

Our reply: By pre-existing polyps we refer to precursor lesions (adenomatous polyps) that were found in the patient years before the diagnosis of the colon cancer. This is a common clinical variable that oncologists take in account at diagnosis.

Since annals of surgery is a surgical journal, the authors should describe how mesenteric venous blood was collected at the time of surgery and not just provide a reference to their prior paper about miR-21 in mesenteric venous blood.

Our reply: We have included this information in methods section as follows:

"On the day of surgery, 5 mL of blood was drawn from the PV and stored in heparinized tubes. During surgery, with vascular ligation before tumor resection, an additional 5 mL of blood was drawn from either the superior or the inferior MV, according to the anatomic location of the tumor."

Reviewer #2: The authors analyzed miRNA profiles from mesenteric veins and peripheral veins in patients with colon cancer and associated findings with liver metastases and time to recurrence. The main finding is that high expression of four miRNAs in mesenteric, but not in peripheral plasma was associated with shorter time to relapse. In patients who developed liver metastases, the miR-328 exosomal cargo was greater in mesenteric plasma. This is an exploratory study with findings derived and validated in a small population of stage I-III colon cancer patients. It is an interesting and exciting concept to identify biomarkers to predict liver metastases. There is potential clinical application if the findings are validated in a larger population. Some points need to be clarified.

1. There are many patient and clinical variables that influence outcome. Adjuvant treatment use is described in table 1, but it should be given in detail with respect to outcome, not just miRNA levels. Did the use of chemotherapy influence outcome and where is that in the multivariate analysis? Were the surgeries done open or laparoscopic? Can you report on the number of lymph nodes harvested and evaluated as this will demonstrate a surgical quality measure; i.e. that technique did not influence outcome.

Our reply: The use of adjuvant treatment not influence time to relapse as it was already shown in Table 1 (p=0.405). For that reason we have not included that variable in the multivariate analysis. The surgery was performed by both methods, open surgery or laparoscopic, depending on patient and tumor characteristics. Moreover, as requested by this reviewer we have now included the number of lymph nodes examined in Table 1. Most of the patients (78%) had more than 12 lymph nodes examined.

2. How were the patients followed post-treatment for surveillance? Was there a standard protocol followed? Was this done prospectively?

Our reply: The patients were followed using the standard protocol followed by Hospital Municipal de Badalona. Despite the samples were collected prospectively, the study can be considered retrospective and no intervention or changes in the standard protocol of follow up were done as consequence of the results obtained in the microRNA analysis.

3. Please report more clearly the location of the tumors: right, left, transverse.

Our reply: More detailed information about the location of the tumor was included as footnote in Table 1.

“*Tumor location according to anatomical site: 17 ascending colon, 7 transverse colon, 6 descending colon and 20 sigmoid colon.”

4. The most useful part of this would be if the findings could be used to predict recurrence specifically in the stage I or II patients. Can the data be presented specifically for this group?

Our reply: We agree with this reviewer that the subanalysis of stage I-II patients could be of great interest, especially in stage II patients where the addition of adjuvant treatment is still controversial. Despite thirty five patients had stage I-II in our cohort only 5 of them relapsed after surgery. We observed that most of the microRNAs retained its significance as time to relapse markers when analyzed in mesenteric vein in stage I-II, but it is difficult to draw consistent conclusion with so few events. For that reason, we consider that is better not to include this information in the text.

5. Smaller points: Would not call stage III early cancer; Figures are of poor quality and could not be read.

Our reply: We have corrected this in the text and we have improved the quality of the figures as suggested by this reviewer.

We have submitted a clean copy (Revised Version) of the revised manuscript, as well as a copy with the edits tracked (Highlighted Version). Please let us know if you require any further information at this time.

Sincerely,

Mariano Monzo, MD, PhD

Professor and Chairman
Unit of Anatomy and Human Embryology
School of Medicine-Hospital Clinic
University of Barcelona
Casanova 143
08036 Barcelona
Phone: 93 402 19 03
mmonzo@ub.edu

Article tercer

Date: 04 Jan 2018
To: "Mariano Monzo" mmonzo@ub.edu
From: "Clinical and Translational Oncology (CLAT)" Ramya.Thulasingham@springer.com
Subject: Your Submission CLAT-D-17-00812

Dear prof. Monzo,

We have received the reports from our advisors on your manuscript, "miR-328 mediates a metabolic shift in colon cancer cells by targeting SLC2A1/GLUT1", submitted to Clinical and Translational Oncology.

Based on the advice received, I have decided that your manuscript can be accepted for publication after you have carried out the corrections as suggested by the reviewer(s).

Attached, please find the reviewers' comments for your perusal. YOU ARE KINDLY REQUESTED TO ALSO CHECK THE WEBSITE FOR POSSIBLE REVIEWER ATTACHMENTS!

Please make sure to submit your editable source files (i. e. Word, TeX).

Please submit your revised manuscript using the Editorial Manager system.

Your username is: *****

If you forgot your password, you can click the 'Send Login Details' link on the EM Login page at <http://clat.edmgr.com/>.

I am looking forward to receiving your revised manuscript before 10 May 2018.

Thank you very much.

With kind regards,
Pedro Gascón Vilaplana
Editor in Chief
Clinical and Translational Oncology

Comments for the Author:

Reviewer #1: In the present study the authors have investigated the role of miR-328 in colon cancer. First, they performed in silico analyses to identify SLC2A1 as a molecular target of miR-328. Then, authors performed luciferase assays and western blot analyses in 2 different colon cancer cell lines in order to validate these findings. Finally, they assessed miR-328 expression in tumor and normal tissue from 47 specimens. Results showed that miR-328 directly targeted SLC2A1 3'UTR and that miR-328 expression was significantly downregulated in tumor tissue compared with paired normal tissue.

Authors performed a proper study to explain the role of miR-328 in colon cancer from the methodological point of view. The introduction is appropriate and the discussion is such interesting increasing the knowledge of miR-328 in a significant manner. Moreover, the manuscript deals with an issue of interest because metabolic-related biomarkers in cancer is an interesting field with poor evidences. Consequently, this study suggests that miR-328 may be a potential metabolic target in colon cancer.

I will suggest accepting the manuscript for publication in "Clinical and Translational Oncology". However, there are some minor comments that could improve the work:

Minor Comments:

1. I recommend to the authors to include the exact p-values in Figures 2 and 3 instead of only in the figure legends.

2. The antibody "Tubulin" should include the symbol " α -Tubulin" in Figure 3 in order to avoid confusions.
3. In the bibliography, reference 26, authors are written in capital letters disrupting the harmony of all the others references. I would recommend following the same criteria for all the references.

Author's Response To Reviewer Comments

Close

Minor Comments:

1. I recommend to the authors to include the exact p-values in Figures 2 and 3 instead of only in the figure legends.

We have already modified figures 2 and 3 and their corresponding figure legends in order to include the exact p-values both in the image and in the figure caption.

2. The antibody "Tubulin" should include the symbol " α -Tubulin" in Figure 3 in order to avoid confusions.

We have revised and included the symbol α -Tubulin in figure 3.

3. In the bibliography, reference 26, authors are written in capital letters disrupting the harmony of all the others references. I would recommend following the same criteria for all the references.

We have carefully revised bibliography and corrected reference 26 in order to maintain the same criteria for all the references.

Close

Date: 08 Jan 2018
To: "Mariano Monzo" mmonzo@ub.edu
From: "Clinical and Translational Oncology (CLAT)" Ramya.Thulasingham@springer.com
Subject: Your Submission CLAT-D-17-00812R1

Dear prof. Monzo,

We are pleased to inform you that your manuscript, "miR-328 mediates a metabolic shift in colon cancer cells by targeting SLC2A1/GLUT1", has been accepted for publication in Clinical and Translational Oncology.

You will receive an e-mail from Springer in due course with regards to the following items:

1. Offprints
2. Colour figures
3. Open Choice
4. Transfer of Copyright

Please remember to quote the manuscript number, CLAT-D-17-00812R1, whenever inquiring about your manuscript.

With best regards,

Pedro Gascón Vilaplana
 Editor in Chief

Article quart

Invitation to revise manuscript TRANON_2018_69

20/Mar/2018 09:24

To: Mariano Monzo

Ref: TRANON_2018_69

Title: Proteomic analysis of liquid biopsy from tumor-draining vein indicates that high expression of exosomal ECM1 is associated with relapse in stage H-III colon cancer

Journal: Translational Oncology

Dear Professor Monzo,

Thank you for submitting your manuscript to Translational Oncology. We have completed the review of your manuscript. A summary is appended below. The consensus of external reviewers and the board was that the findings are generally acceptable for publication, however specific clarification should be included in a revised manuscript. While revising the paper please consider the reviewers' comments carefully. We look forward to receiving your detailed response and your revised manuscript.

To submit your revised manuscript:

- Log into EVISE® at: http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=TRANON
- Locate your manuscript under the header 'My Submissions that need Revisions' on your 'My Author Tasks' view
- Click on 'Agree to Revise'
- Make the required edits
- Click on 'Complete Submission' to approve

What happens next?

After approving your submission you will receive a notification that the submission is complete. To track the status of your paper throughout the editorial process, log into EVISE® at:

http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=TRANON

Enrich your article to present your research with maximum impact. This journal supports the following [Content Innovations](#):

- Explain your research in your own words and attract interest in your work using [AudioSlides](#): 5-minute webcast-style presentations that are displayed next to your published article and can be posted on other websites. You will receive an invitation email to create an AudioSlides presentation within three weeks after your paper has been accepted.
- [Virtual Microscope](#): Interactive viewer for high-resolution microscopy images. To make use of this feature for your paper and for questions, contact virtualmicroscope@elsevier.com (please include your manuscript number).

I look forward to receiving your revised manuscript as soon as possible.

Kind regards,

Alnawaz Rehemtulla
Editor-in-Chief
Translational Oncology

Comments from the editors and reviewers:

- In this study, proteomics was used to analyze the different expression of exosomal proteins in blood samples obtained from the tumor-draining mesenteric vein (MV) and the peripheral vein (PV). Results showed that patients with high exosomal ECM1 expression in MV – but not PV – plasma had shorter time to relapse than those with low ECM1 expression ($P=0.04$), suggesting that exosomal ECM1 expression was associated with metastases and that high levels of exosomal ECM1 protein can identify CC patients with a higher risk of relapse.

The authors can further discuss the possibility of using ECM1 as the promising prognostic biomarker in colon cancer. Especially, is it possible to combine other known metastasis-associated molecules together with ECM1 to form a panel to increase the sensitivity of diagnosis?

Have questions or need assistance?

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

Copyright © 2018 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.

Proteomic analysis of liquid biopsy from tumor-draining vein indicates that high expression of exosomal ECM1 is associated with relapse in stage I-III colon cancer

Sandra Santasusagna et al

RESPONSE TO EDITOR AND REVIEWER

Comment:

In this study, proteomics was used to analyze the different expression of exosomal proteins in blood samples obtained from the tumor-draining mesenteric vein (MV) and the peripheral vein (PV). Results showed that patients with high exosomal ECM1 expression in MV – but not PV – plasma had shorter time to relapse than those with low ECM1 expression ($P=0.04$), suggesting that exosomal ECM1 expression was associated with metastases and that high levels of exosomal ECM1 protein can identify CC patients with a higher risk of relapse. The authors can further discuss the possibility of using ECM1 as the promising prognostic biomarker in colon cancer. Especially, is it possible to combine other known metastasis-associated molecules together with ECM1 to form a panel to increase the sensitivity of diagnosis?

Our reply: We have added the following comment to the final paragraph of the Discussion:

Taken together with previous findings on exosomal miRNAs and integrins, our findings lead us to suggest that ECM1, ideally in combination with other known metastasis-associated molecules, may well prove to be a sensitive marker for diagnosis and prognosis in CC patients.

Ref: TRANON_2018_69_R1

Title: Proteomic analysis of liquid biopsy from tumor-draining vein indicates that high expression of exosomal ECM1 is associated with relapse in stage I-III colon cancer

Journal: Translational Oncology

Dear Professor Monzo,

I am pleased to inform you that your paper has been accepted for publication. Now that your manuscript has been accepted for publication it will proceed to copy-editing and production.

Thank you for submitting your work to Translational Oncology. We hope you consider us again for future submissions.

Kind regards,

Editor-in-Chief
Translational Oncology

Annex 2. Participació en congrés internacional al que ha donat lloc la tesi

Exosomal ECM1 protein expression in plasma from the tumor-draining vein (mesenteric vein) and time to relapse in colon cancer patients

Santassusagna S, Navarro A, Moreno I, Martinez F, Castellano JJ, Muñoz C, Canals J, Morales S, Hernandez R, Moreno J, Monzó M.

ESMO Congress 2017 (Madrid, Espanya, 8-12/06/2017)



577P Exosomal ECM1 protein expression in plasma from the tumor-draining vein (mesenteric vein) and time to relapse in colon cancer patients

S. Santassusagna¹, A. Navarro¹, I. Moreno², R. Ibeas², F. Martinez², J.J. Castellano¹, C. Muñoz¹, J. Canals¹, S. Morales¹, R. Hernandez², J. Moreno², M. Monzó¹

¹Molecular Oncology and Embryology Laboratory, Human Anatomy Unit, University of Barcelona, Barcelona, Spain, ²Medical Oncology and Surgery, Hospital Municipal de Badalona, Badalona, Spain

Background: Exosomes are microvesicles that contain and transport coding and non-coding RNA, DNA, and proteins. They are secreted by several cell types, including tumor cells, and captured by receptor cells in a target organ, where they modify the tissue microenvironment, forming a pre-metastatic niche where circulating tumor cells can anchor. It has recently been found that blood from a tumor-draining vein can provide more reliable information about biomarkers than that obtained from a peripheral vein (PV). Venous return from the colon occurs through the mesenteric veins (MV), making the MV an excellent source to analyze potential biomarkers contained in exosomes released by the tumor cells in colon cancer before they reach the target organ. We have assessed the presence of exosomal proteins in the MV and PV of surgically resected colon cancer patients and correlated our findings with time to relapse (TTR).

Methods: On the day of surgery, blood samples were obtained from the MV and PV of 31 stage I-III colon cancer patients. Exosomes were isolated by ultracentrifugation and confirmed by cryogenic transmission electron microscopy. High-throughput proteomic analysis by mass spectrometry was used to identify expression levels of exosomal proteins. Findings were confirmed by western blot in MV and PV samples, as well as in samples from healthy controls, using TSG101 as a recognized marker of exosomes.

Results: TSG101 was more highly expressed in relapsed patients than in non-relapsed patients or controls. The ECM1 protein was more highly expressed in both MV and PV exosomes from patients than in those from controls. However, ECM1 expression was 13 times higher in relapsed than in non-relapsed patients in MV – but not PV – exosomes. Among 17 patients with low exosomal ECM1 levels in MV, TTR was 40.2 months, compared to 31.3 months for 14 patients with high levels ($P = 0.04$).

Conclusions: ECM1 and TSG101 are higher expressed in relapsed patients and high expression of exosomal ECM1 released by the tumor is associated with shorter TTR. The analysis of exosomes isolated from the tumor-draining vein, the MV, is a promising method for the identification of biomarkers before reaching the target organ.

Legal entity responsible for the study: University of Barcelona

Funding: University of Barcelona

Disclosure: All authors have declared no conflicts of interest.

Pòster "Exosomal ECM1 protein expression in plasma from the tumor-draining vein (mesenteric vein) and time to relapse in colon cancer patients"



UNIVERSITAT DE
BARCELONA
Facultat de Medicina
i Ciències de la Salut

Exosomal ECM1 protein expression in plasma from the tumor-draining vein (mesenteric vein) and time to relapse in colon cancer patients

Santasusagna S¹, Navarro A¹, Moreno I², Ibeas R², Martínez F², Castellano JJ¹, Muñoz C¹, Canals J¹, Morales S¹, Hernández R², Moreno J², Monzo M¹

Abstract ID:1956
#577P

¹Molecular Oncology and Embryology Laboratory Human Anatomy Unit, University of Barcelona, Barcelona, ES
²Medical Oncology and Surgery, Hospital Municipal de Badalona, Badalona, ES



Background

Exosomes are microvesicles that contain and transport coding and non-coding RNA, DNA, and proteins. They are secreted by several cell types, including tumor cells, and captured by receptor cells in a target organ, where they modify the tissue microenvironment, forming a pre-metastatic niche where circulating tumor cells can anchor [1]. It has recently been found that blood from a tumor-draining vein can provide more reliable information about biomarkers than that obtained from a peripheral vein (PV). Venous return from the colon occurs through the mesenteric veins (MV), making the MV an excellent source to analyze potential biomarkers contained in exosomes released by the tumor cells in colon cancer before they reach the target organ [2].

We have assessed the presence of exosomal proteins in the MV and PV of surgically resected colon cancer patients and correlated our findings with time to relapse (TTR).

Methods

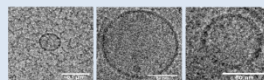
- On the day of surgery, blood samples were obtained from the MV and PV of 31 stage I-III colon cancer patients.
- Exosomes were isolated by ultracentrifugation and confirmed by cryogenic transmission electron microscopy.
- High-throughput proteomic analysis by mass spectrometry was used to identify expression levels of exosomal proteins.
- Findings were confirmed by western blot in MV and PV samples, as well as in samples from healthy controls, using TSG101 as a recognized marker of exosomes.
- Survival was estimated with Kaplan-Meier method and log-rank test was used for comparison. Time to relapse (TTR) was calculated from the date of surgery until patient's relapse/last follow-up.

Results

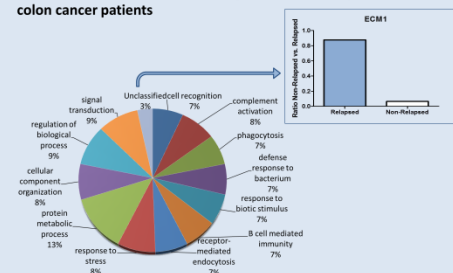
1. Patient main characteristics

Characteristics	N (%), n=31	P-value for association with TTR
Sex		0.42
Male	18 (58)	
Female	13 (42)	
Median age	72	0.92
CEA levels		0.01
<=5	24 (77)	
>5	7 (23)	
C39.9 levels		0.80
<=37	27 (87)	
>37	4 (13)	
Tumor location		0.99
Left colon	16 (52)	
Right colon	15 (48)	
Tumor size (cm)		0.24
<=5	28 (90)	
>5	3 (10)	
Histological type		0.03
Well differentiated	28 (90)	
Poorly differentiated	3 (10)	
Preexistent polyp		0.65
Absent	24 (77)	
Present	7 (23)	
TNM stage		0.003
I-II	18 (58)	
III	13 (42)	
Lymph nodes examined		0.13
<12	8(26)	
>12	23(74)	
Relapsed		
Yes	15 (48)	
No	16 (52)	
TTR, Time to Relapse; CEA, Carcinoembryonic Antigen; TNM, Tumor, Nodule, Metastasis		

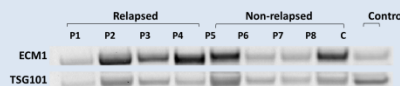
2. Electronic microscopic image of exosomes identified by Cyo-TEM in plasma samples of colon cancer patients



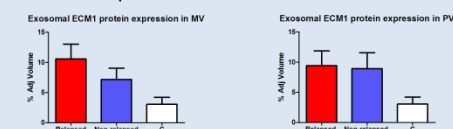
3. ECM1 protein was identified by proteomics as 13 times higher in exosomes isolated from the tumor-draining vein from relapsed vs. non-relapsed colon cancer patients



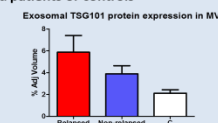
4. Validation of ECM1 protein levels show that ECM1 protein is more highly expressed in relapsed colon cancer patients



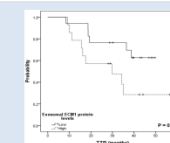
5. The ECM1 protein was more highly expressed in both MV and PV exosomes from patients than in those from controls



6. TSG101 was more highly expressed in relapsed patients than in non-relapsed patients or controls



7. Among 17 patients with low exosomal ECM1 levels in MV, TTR was 40.2 months, compared to 31.3 months for 14 patients with high levels (P=0.04).



Conclusion

- ECM1 and TSG101 are higher expressed in relapsed patients.
- High exosomal ECM1 expression released by the tumor is associated with shorter TTR.
- The analysis of tumor-draining vein (MV) exosomes is a promising method for the identification of biomarkers before reaching the target organ.

References

- [1] Webber J, Yeung V, Clayton A. Extracellular vesicles as modulators of the cancer microenvironment. *Seminars in cell & developmental biology*. 2015; 40:27-34.
[2] Monzo M, Santasusagna S, Moreno I, et al. Exosomal microRNAs isolated from plasma of mesenteric veins linked to liver metastases in resected patients with colon cancer. *Oncotarget*. 2017;8(19):30859-30869.

sandra.santasusagna@ub.edu
mmonzo@ub.edu

Annex 3. Altres publicacions en les que he participat durant el període de tesi

AUTORS: Tejero R, Navarro A, Campayo M, Viñolas N, Marrades RM, Cordeiro A, Ruiz-Martinez M, **Santassusagna S**, Molins L, Ramirez J, Monzó M.

TÍTOL: miR-141 and miR-200c as Markers of Overall Survival in Early Stage Non-Small Cell Lung Cancer Adenocarcinoma.

REVISTA: PlosOne DATA: 2013 VOLUM: 9 PÀG.INICIAL/FINAL: e101899 IF: 3.54

AUTORS: Ruiz-Martinez M, Navarro A, Marrades RM, Viñolas N, **Santassusagna S**, Muñoz C, Ramírez J, Molins L, Monzo M.

TÍTOL: YKT6 expression, exosome release, and survival in non-small cell lung cancer.

REVISTA: Oncotarget DATA: 2016 VOLUM: 7 PÀG.INICIAL/FINAL: 51515-51524 IF: 5.17

AUTORS: Caritg O, Navarro A, Moreno I, Martínez-Rodenas F, Cordeiro A, Muñoz C, Ruiz-Martinez M, **Santassusagna S**, Castellano JJ, Monzó M.

TÍTOL: Identifying High-Risk Stage II Colon Cancer Patients: A Three-MicroRNA-Based Score as a Prognostic Biomarker.

REVISTA: Clin Colorectal Cancer DATA: 2016 VOLUM: 15 PÀG.INICIAL/FINAL: e175-e18 IF: 4.5

AUTORS: Moisés J, Navarro A, **Santassusagna S**, Viñolas N, Molins L, Ramirez J, Osorio J, Saco A, Castellano JJ, Muñoz C, Morales S, Monzó M, Marrades RM.

TÍTOL: NKX2-1 expression as a prognostic marker in early stage non-small-cell lung cancer

REVISTA: BMC Pulmonary Medicine DATA: 2017 VOLUM: 17 PÀG.INICIAL/FINAL: 197-206 IF: 2.43

Annex 4. Altres congressos en els que he participat durant el període de tesi

1. High miR-141 and miR-200c expression levels as prognostic factors in NSCL adenocarcinoma through angiogenesis and mesenchymal-epithelial transition regulation
Tejero R, Navarro A, Campayo M, Viñolas N, Marrades RM, Cordeiro A, Ruíz-Martínez M, **Santatusagna S**, Molins L, Ramirez J, Monzó M.
15th World Conference on Lung Cancer (Sydney, Australia, 27-30/10/2013)
2. Los piwiRNAs, ARNs no codificantes germinales, estan activos en el linfoma de Hodgkin y actuan como marcadores pronósticos
Navarro A, Cordeiro A, Gaya A, Gonzalez B, Díaz-Beyá M, Fuster D, Tejero R, Ruiz M, **Santatusagna S**, Muñoz C, Caritg O, Martinez C, Martinez A, Monzó M.
LVI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (Madrid, Espanya, 6-8/11/2014)
3. Germline small non coding RNAs, piwiRNAs, are expressed in Hodgkin Lymphoma: the role of piwiRNAs-651 as prognostic factor in Hodgkin Lymphoma
Navarro A, Cordeiro A, Gaya A, Gonzalez-Farre B, Díaz-Beyá M, Fuster D, Tejero R, Ruiz M, **Santatusagna S**, Muñoz C, Caritg O, Martínez A, Monzó M.
19th Congress of the European Hematology Association (Milano, Itàlia, 12-15/06/2014)
4. YKT6 regulation of exosome release is mediated by microRNAs and impacts prognosis in non-small-cell lung cancer
Ruiz-Martinez M, **Santatusagna S**, Navarro A, Castellano JJ, Moises J, Viñolas N, Muñoz C, Segui J, Marrades R, Ramirez J, Del Portillo H, Caritg O, Cordeiro A, Molins L, Monzó M.
The Fifth International Meeting of Journal of Extracellular Vesicles 2016 (Rotterdam, Països Baixos, 4-7/05/2016)
5. La via PIWI/piRNA: paper pronòstic del piR-651 en el Limfoma de Hodgkin clàssic
Cordeiro A, Gaya A, Díaz-Beyá M, Gonzalez-Farré B, Castellano JJ, Caritg O, Ruiz-Martínez M, **Santatusagna S**, Muñoz C, Fuster D, Martínez C, Martínez A, Monzó M, Navarro A.
40ª Diada Internacional de la Societat Catalana d'Hematologia i Hemoteràpia (Barcelona, Espanya, 03/06/2016)

6. LincRNA-p21 Impacts Prognosis in Non-Small Cell Lung Cancer Adenocarcinoma Patients

Moises J, Castellano JJ, Ramirez J, Cordeiro A, Vinolas N, Saco A, Ruiz M, **Santatusagna S**, Aya F, Molins L, Navarro A, Monzó M, Marrades R.

Annual congress 2016 of the American Thoracic Society (San Francisco, EUA, 13-18/05/2016)

7. Variaciones genéticas en la vía PIWI/piRNA tienen impacto pronóstico en la supervivencia libre de enfermedad en el Linfoma de Hodgkin clásico

Cordeiro A, Navarro A, Gaya A, Martínez C, Gonzalez-Farré B, Díaz-Beyá M, Castellano JJ, Ruiz-Martínez M, **Santatusagna S**, Muñoz C, Martínez A, Monzó M.

LVIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (Santiago de Compostela, Galicia, 20-22/10/2016)

8. NKX2-1 impacts prognosis in early stage NSCLC not harboring TP53 mutations

Moisés J, **Santatusagna S**, Navarro A, Viñolas N, Ramirez J, Molins J, Agustí C, Osorio J, Saco A, Ruiz-Martinez M, Castellano JJ, Cordeiro A, Muñoz C, Monzó M, Marrades RM.

ERS International Congress 2016 (Londres, Regne Unit, 3-7/11/2016)

9. HOXA-related long non-coding RNAs impact prognosis in early stage NSCLC patients

Navarro A, **Santatusagna S**, Viñolas N, Castellano JJ, Moises J, Marrades R, Morales S, Canals J, Muñoz C, Ramírez J, Molins L, Monzó M.

ESMO Congress 2017 (Madrid, Espanya, 8-12/06/2017)

Annex 5. Protocols

1. Processament de mostres

El dia de la cirurgia s'extreuen dues mostres de 5mL de sang del pacient: una procedent d'una vena perifèrica de l'avantbraç i l'altre de la vena mesentèrica superior o inferior -en funció de la localització anatòmica del tumor-. Aquestes mostres s'emmagatzemen en tubs heparinitzats fins a ser processades per centrifugació a 5000g durant 10 minuts. Es congelen a -80°C fins a recollir suficients pacients per realitzar un estudi retrospectiu.

2. Extracció d'ARNs totals en teixit

L'ARN total en mostres de teixit s'extreu amb el reactiu Trizol Reagent (Ref. 15596-018, Life technologies), seguint el protocol proporcionat pel fabricant.

1. Afegir 1mL de Trizol per cada 50-100mg de mostra tissular i homogeneïtzar amb un bisturí en una placa de Petri.
2. Recollir l'homogeneïtzat i transferir-lo en un nou tub *ependorf* de 1.5mL, fer vòrtex i deixar incubar durant 5 minuts a temperatura ambient.
3. Afegir 0.2mL de cloroform i fer vòrtex.
4. Incubar durant 15 minuts a temperatura ambient.
5. Centrifugar a 12.000g durant 15 minuts a 4°C. S'esdevé una separació de fases, la fase incolora superior conté l'ARN, la interfase blanquinosa conté el DNA i la fase orgànica inferior conté les proteïnes i lípids.
6. Aïllar la fase aquosa superior amb molt de compte per tal de no interrompre les fases separades i transferir a un nou tub *ependorf* de 2mL.
7. Afegir 0.5mL d'isopropanol i invertir el tub 2-3 vegades. Incubar la mostra a -20°C durant la nit per tal de precipitar l'ARN.
8. Al dia següent, centrifugar a 12.000g durant 10 minuts.
9. Descartar el sobrenedant i afegir 1mL d'etanol 75%. Fer vòrtex per desenganxar el *pellet* del fons del tub i rentar-lo amb etanol 75%.
10. Centrifugar a 7.500g durant 5 minuts. Eliminar tot el sobrenedant i deixar assecar el *pellet* a temperatura ambient.
11. Resuspendre l'ARN en H₂O MQ i incubar durant 10 minuts a 60°C.
12. Quantificar la concentració d'ARN amb Nanodrop model ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

3. Extracció de microRNAs totals en plasma i continguts en exosomes

El miRNA total lliure en mostres de plasma i contingut dins d'exosomes en pacients amb CC i controls s'ha extret amb el kit "miRNeasy Mini Kit" (Ref. 217004, Qiagen), generalment seguint el protocol del fabricant, tot i que s'inclouen algunes modificacions:

1. Partir de 250µL de plasma o del *pellet* total d'exosomes.
2. Centrifugar a 3000g durant 5 minuts a 4°C.
3. Descartar el sobrenedant i recollir el *pellet* en un nou tub *ependorf* de 1.5mL.
4. Afegir 750µL de la màster de QIAzol en cada mostra. La màster està calculada en excés, però per mostra cal barrejar 800µL de QIAzol i 1.25µl de MS2 RNA, vòrtex contundent.
5. Incubar 5 minuts a temperatura ambient.
6. Afegir 200µL de cloroform i fer vòrtex.
7. Incubar 2 minuts a temperatura ambient.
8. Centrifugar a 12000g durant 15 minuts a 4°C.
9. Recollir la fase aquosa, en la part superior, transferir en un nou tub *ependorf* de 2 mL.
10. Afegir 1.5 volums d'etanol 100%.
11. Passar 750µL de la mostra per la columna proporcionada pel fabricant.
12. Centrifugar a 13000g durant 30 segons a temperatura ambient. Descartar el filtrat.
13. Repetir 11-12 fins a esgotar la mostra.
14. Rentat amb 700µL del buffer RWT.
15. Centrifugar a 13000g durant 1 minut a temperatura ambient. Descartar el filtrat.
16. Rentar amb 500µL del buffer RPE.
17. Centrifugar a 13000g durant 1 minut a temperatura ambient. Descartar el filtrat.
18. 2x (Repetir 16-17 fins a esgotar la mostra).
19. Centrifugar la columna buida amb un tub col·lector nou a 13000g durant 2 minuts a temperatura ambient.
20. Deixar les columnes obertes 1 minut per evaporar les restes d'alcohol.
21. Passar les columnes a un nou tub *ependorf* de 1.5mL *RNase-free*.
22. Afegir 50µL d'H₂O *DNase/RNase free*.
23. Incubar 1 minut a temperatura ambient.
24. Centrifugar a 13000g durant 1 minut a temperatura ambient.

Finalment, la concentració d'ARN resultant es quantifica amb l'espectrofotòmetre NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) i l'ARN es guarda a -80°C fins a ser analitzat.

4. Estudi de microRNAs diferencialment expressats en plasma i associats a la recaiguda

4.1 Elaboració d'un perfil de miRNAs mitjançant microfluidiques

L'estudi de 754 miRNA humans diferents es va realitzar utilitzant *TaqMan Array Human microRNA Set Cards v3.0* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) en una sèrie pilot de 15 mostres de plasma procedent de la vena mesentèrica (VM) i 3 mostres de plasma procedent d'una vena perifèrica (PV).

Les reaccions de retrotranscripció (RT) amb volum final de 4.5µL, contenen: 0.80µL de buffer RT 10X (Applied Biosystems), 0.2µL de dNTPs (100µM), 1.5µL transcriptasa inversa *multiscribe* (50U/µL), 0.10 µL d'inhibidor de RNasa (20U/µL), 0.80µL de primers Megaplex RT (10X), 0.90µL de MgCl₂ (25U/µL) i 70µg d'ARN total. Les reaccions de RT s'incubaren en un termociclador 2720 (Applied Biosystems) durant 2 minuts a 16°C i 1 minut a 42°C durant 40 cicles, 1 segon a 50°C i 5 minuts a 85°C, i després es mantingueren a 4°C.

A continuació, es preamplificaren 2.5µL de cada producte de RT per augmentar la quantitat de cADN desitjat. Les reaccions de preamplificació s'incubaren en un termociclador 2720 (Applied Biosystems) durant 10 minuts a 95°C, 2 minuts a 55°C i 2 minuts a 72°C; a continuació, 15 segons a 95°C i 4 minuts a 60°C durant 12 cicles, 10 minuts a 99.9°C i, finalment, es mantingueren a 4°C. El producte de preamplificació es va diluir amb 75µL de buffer de 0,1X TE (pH 8.0).

Finalment, es varen dur a terme les reaccions quantitatives a temps real de PCR en una ABI7500 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). Les reaccions contenen 9µL del producte preamplificat diluït, 450µL de TaqMan Universal Master Mix de PCR, No AmpErase UNG 2X (Applied Biosystems) i 441µL d'H₂O MQ. La barreja es va pipetejar en cartes de microfluidiques *TaqMan Human miRNA Array A i B*.

4.2 Filtratge i normalització de les dades

Els miRNAs no expressats en totes les mostres de MV o expressats amb un valor poc creïble (Ct>37) s'exlogueren de l'anàlisi, donant lloc a un grup de treball de 249 miRNAs. L'expressió relativa d'aquests miRNAs es va calcular utilitzant el mètode de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. El control endogen utilitzat per a la normalització de les dades és el miR-484 (Ref. 001821, Applied Biosystems), ja que és el que presenta una expressió més estable en totes les mostres analitzades.

4.3 Identificació de microRNAs associats a recaiguda

L'associació entre els nivells d'expressió dels 249 miRNAs candidats i el temps a la recaiguda es va dur a terme amb l'eina de comparació de classes de *BRB Array tools*. Per detectar els miRNAs diferencialment expressats en els pacients recaiguts en comparació als no recaiguts es va utilitzar el test T-Student.

4.4 Validació dels microRNAs identificats en plasma

Els miRNAs associats a la recaiguda s'evaluaren tenint en compte el temps a la reiguda en la sèrie completa de 50 pacients mitjançant els assajos individuals TaqMan microRNA (Applied Biosystems) en una ABI7500 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). Tots els assajos utilitzats són de la casa comercial Applied Biosystems i són els següents: let-7g (Ref. 002282), miR-15b (Ref. 000390), miR-18b (Ref. 002217), miR-26a (Ref. 000405), miR-106b (Ref. 000442), miR-126 (Ref. 002228), miR-142-3p (Ref. 000464), miR-155 (Ref. 002623), miR-328 (Ref. 000543), miR-410 (Ref. 001274), miR-449 (Ref. 001030), miR-548c-5p (Ref. 002429) i miR-744 (Ref. 002324).

5. Aïllament i caracterització d'exosomes circulants en plasma

L'aïllament dels exosomes de mostres de plasma de pacients amb CC s'inicia amb 250mL de plasma, seguint el procediment de centrifugacions seqüencials i ultracentrifugació (Sorvall MX Plus Micro-Ultracentrifuge amb el rotor S140AT, Thermo Scientific; i tubs de policarbonat, Ref. 355630, Beckman Coulter), procediment esquematitzat en la figura 1. Breument, es realitzen 3 centrifugacions a 4°C a 300g durant 5 minuts, 2.500g durant 20 minuts, 10.000g durant 30 minuts, seguit de dues ultracentrifugacions, una a 100.000g durant 2 hores i l'altre a 100.000g durant 1 hora. En cada pas, es descarta el sobrenadant i s'afegeix 1mL de DPBS. Finalment, es resuspen el *pellet* d'exosomes en 750µL de la màster de QIAzol, en 40µL de tampó de càrrega de Western blot o en 100µL de DPBS per a la seva caracterització per Cryo-TEM.

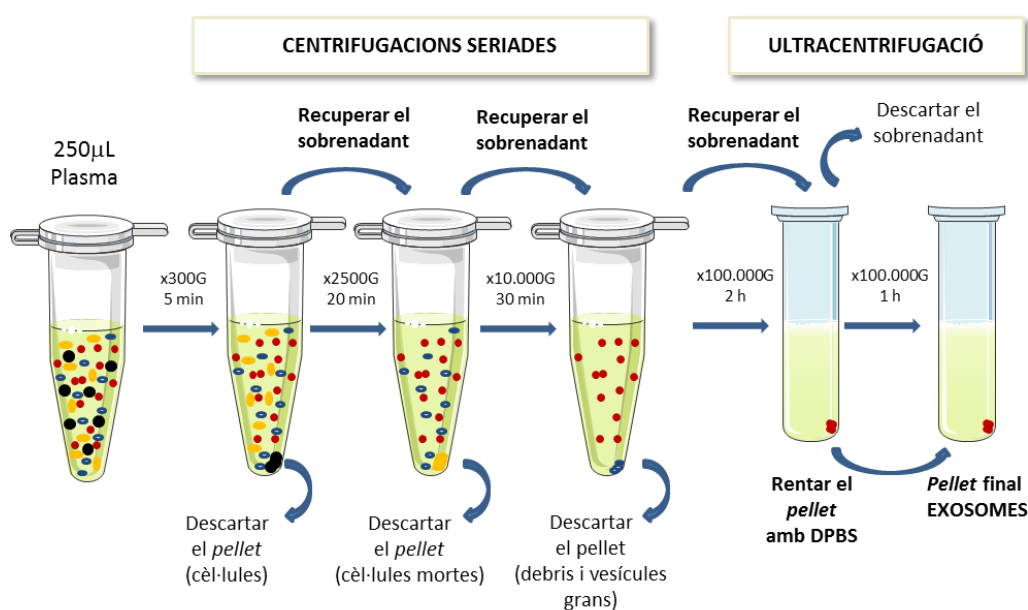


Figura 1. Esquema del protocol d'aïllament d'exosomes.

La caracterització dels exosomes aïllats es realitzà mitjançant dues tècniques: Crio microscòpia electrònica de transmissió i quantificació del marcador exosomal Tsg101 per western blot.

5.1 Crio Microscopia electrònica de transmissió (Cryo-TEM)

Els exosomes resuspesos en 100mL de DPBS s'analitzaren morfològicament en un microscopi de transmissió electrònica Jeol JEM 2011 amb una potència de voltatge d'acceleració de 200kv al servei de microscòpia de la Universitat Autònoma de Barcelona. En primer lloc, es vitrificaren 3µL de mostra en una reixeta TEM Quantifoil 1.2/1.3. Cada mostra es va preparar en forma d'una làmina fina i va ser sumergida ràpidament en età líquid a la crioestació Leica EM CPC. Les reixetes es varen transferir a un crioport 626 Gatan i es mantingueren a -179°C durant la captació d'imatges. Les micrografies s'obtingueren amb una càmera Gatan Ultrascan cooled CCD sotmesa a una baixa dosis d'electrons per a minimitzar la radiació emesa pels electrons.

5.2 Quantificació de Tsg101 exosomal per western blot

Per realitzar el Western blot d'exosomes, es carrega tot el *pellet* d'exosomes resuspès en 40µL de tampó de càrrega, prèviament desnaturalitzat a 97°C durant 10 minuts. Es realitza el protocol d'electroforèsis, transferència, bloqueig, incubació i revel·lat explicat a continuació en l'apartat 3.11. L'anticòs primari utilitzat és anti-Tsg101 (ab83) a una dilució 1:500.

6. Quantificació de microRNAs lliures en plasma i continguts en exosomes

Per la quantificació de miRNAs, es parteixen de 10ng d'ARN total per a la reacció de retrotranscripció (RT-PCR) amb els *primers* específics per cada miRNA mitjançant el *TaqMan miRNA Reverse Transcription Kit* (Life technologies). Les reaccions de RT contenen 10ng d'ARN, 0.075µL de dNTPs, 0.075µL de buffer, 1.5µL d'assaig comercial RT miRNA Taqman i 0.5µL de transcriptasa inversa *MultiScribe*; en un volum final de 7.5µL. Cada reacció s'incuba en un termociclador amb les condicions següents: 16°C durant 30 minuts, 42°C durant 30 minuts i 85°C durant 5 minuts.

El cADN obtingut per cada miRNA, s'utilitza per realitzar una PCR quantitativa a temps real en una *ABI7500 HT Sequence Detection System* (Applied Biosystems). Cada reacció té un volum final de 10µL, dels quals 0.7µL correspon al producte de RT-PCR obtingut, 5µL a la Taqman Universal PCR Master Mix (2X) i 1µL a l'assaig comercial TM miRNA Taqman. Les reaccions s'incuben en plaques de 96 pouets òptics a 50°C durant 2 minuts, 40 cicles de [95°C durant 10 minuts i 95°C durant 15 segons] i, finalment, 60°C durant 1 minut. Els valors de Ct del miRNA lliure miR-21 (Ref. 000397) es normalitzà amb miR-191 (Ref. 002299); i els miRNAs continguts en exosomes, let-7g (Ref. 002282), miR-15b (Ref. 000390), miR-155 (Ref. 002623) i miR-328 (Ref. 000543), es normalitzaren amb el control endògen miR-484 (Ref. 001821) i la quantificació relativa es realitzà amb el mètode de $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

7. Estudi *in vitro* amb les línies cel·lulars SW480 i LOVO

Els experiments *in vitro* s'han realitzat amb les línies cel·lulars de CCR: SW480 (ATCC® CCL-228™) i LOVO (ATCC® CCL-229™).

La línia cel·lular SW480 correspon a un CCR del tipus adenocarcinoma i s'inicià a partir d'un pacient masculí de raça caucàsica de 50 anys amb un diagnòstic histològicament validat d'adenocarcinoma de colon. Com a característiques principals, aquesta línia cel·lular és positiva per l'expressió de *C-MYC*, *RAS*, *FOS*, *TP53* i *SIS* i negativa per l'expressió de *ABL*, *ROS* i *SRC*.

La línia cel·lular LOVO, correspon a un CCR del tipus adenocarcinoma i s'inicià a partir d'un pacient masculí de raça caucàsica de 56 anys amb un diagnòstic histològicament validat d'adenocarcinoma de colon. Com a característiques principals, aquesta línia cel·lular és positiva per l'expressió de *C-MYC*, *RAS*, *FOS* i *TP53* i negativa per l'expressió de *SIS*, *ABL*, *ROS* i *SRC*.

Ambdues línies cel·lulars s'han cultivat en RPMI 1640 amb sèrum boví fetal al 10% i antibiòtic (penicilina i estreptomicina) (Life technologies) i mantingudes en l'incubador en condicions de 37°C, 5% CO₂ i 95% d'humitat.

8. Estudi de la regulació de miR-328 sobre *SLC2A1/GLUT1*

8.1 Estudi *in silico*

Per estudiar els gens diana del miR-328, es seleccionaren diferents gens en funció del seu potencial *in silico*, és a dir, la probabilitat generada mitjançant algorismes basats en diferents *scores* capaços de predir la complementarietat del miRNA amb el seu mARN diana i les referències bibliogràfiques que recolzen aquesta interacció. Per tal finalitat s'utilitzen bases de dades DIANA-TarBase v7.0 (<http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=tarbase/index>) i microRNA.org (<http://www.microrna.org/microrna/getMirnaForm.do>). En ambdues bases de dades es tingueren en compte que el mARN diana tingués *score* d'unió alt, la conservació entre espècies i les evidències bibliogràfiques.

8.2 Assaig RFP - Luciferasa

Per validar el gen seleccionat, *SLC2A1*, s'utilitza l'assaig del plàsmid reporter RFP-Luciferasa.

Per tal d'estudiar si el miR-328 podria estar regulant la 3'UTR de *SLC2A1* es transfecten les cèl·lules SW480 i LOVO amb el plàsmid pMirTarget (Ref. NM_006516, Origene) que conté la regió 3'UTR del mARN de *SLC2A1* just després del codó STOP de la seqüència que codifica per la proteïna *Firefly Luciferasa*, la qual està controlada per un promotor constitutivament actiu, *SV40Prom*. D'altra banda,

en una altre regió, es localitza una altre proteïna bioluminiscent, la *Red Fluorescent Protein* (RFP), sota l'expressió d'un altre promotor constitutivament actiu, *CMV Prom*. Al cotransfectar el Pre-miR-328 amb el plàsmid a les cèl·lules de CCR si hi ha diferència en el ratio d'activitat de la *Firefly luciferasa*/RFP, es podrà inferir que *SLC2A1* és diana de miR-328 (Figura 2).

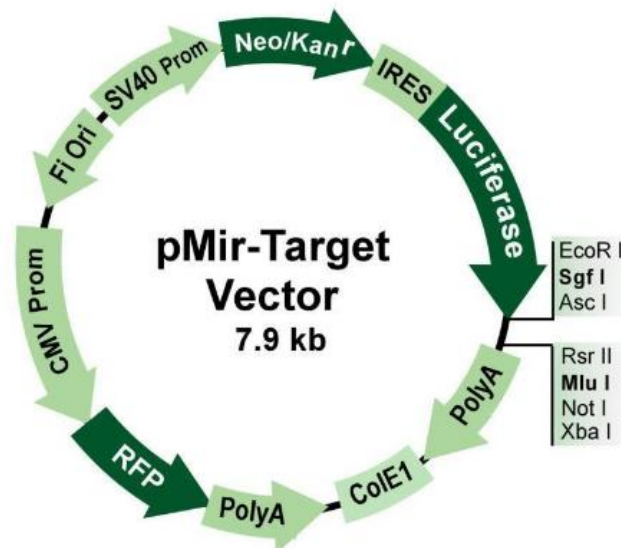


Figura 2. Plàsmid pMirTarget utilitzat.

L'activitat de la RFP i la *Firefly luciferasa* es mira 48 hores després de la transfecció amb les cèl·lules SW480 i LOVO amb 50ng del plàsmid pMirTarget modificat amb la 3'UTR de *SLC2A1* i 100nM del pre-miRNA seleccionat. Les referències dels pre-miRNAs són els següents: pre-miR-328 (Ref. PM10034 - AM17100, Life technologies) i pre-miR-negative control#1 (Ref. AM17110, Life technologies).

Per la lectura del luminòmetre s'utilitza el kit Promega Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega) seguint les instruccions del fabricant:

1. Obtenir un *pellet* de cèl·lules transfectades a les 48h, prèvia tripsinització i centrifugació a 2500g durant 5 minuts.
2. Rentat del *pellet* amb DPBS i centrifugar a 2500g durant 5 minuts.
3. Afegir 100µL de buffer PLB a cada *pellet*, incubar 30 minuts realitzant vòrtex periòdics cada 5 minuts.
4. Preparar els reactius *Luciferase Assay Reagent II* (LARII) i *StopGlo*:
 - a. LARII és una pastilla que s'ha de dissoldre en el líquid que proporciona el kit.
 - b. Per 10mL de buffer StopGlo, es necessiten 0.2mL de *StopGlo substrate*.
 - c. El volum necessari per emplenar la màquina és de 900µL + 100µL per pouet + 100µL per blanc.

5. Carregar els reactius a la màquina. De cada mostra de *pellet* de cèl·lules resuspès en 100µL de buffer PLB, se n'agafen [30µL i es col·loquen en un pouet d'una placa de 96 pouets de fons blanc (Ref. 3917, Costar)] x 3 rèpliques.
6. Llegir amb el programa "Simplicity" i la opció "Promega DLR_Dual measurement" en el luminòmetre Orion II (Berthold).

En el cas d'obtenir un resultat significatiu, l'assaig es valida per WB.

9. Extracció i quantificació de proteïna

Per l'**extracció de la proteïna** total de les cèl·lules, s'utilitza el Buffer de lisis de cèl·lules (CLB) (Ref. 9803, Cell Signaling) suplementat amb 10% PMSF 0.1M. El protocol a seguir el següent:

1. Rentar la placa amb les cèl·lules d'estudi amb 2mL de PBS.
2. Afegir 2mL de Tripsina per desenganxar les cèl·lules i incubar durant 4 minuts a 37°C.
3. Afegir 4mL de medi amb FBS per neutralitzar l'efecte de la Tripsina i resuspendre les cèl·lules arrancades de la base de la placa de cultiu.
4. Transferir les cèl·lules a un tub *falcon* de 15mL i centrifugar a 2.500g durant 5 minuts.
5. Retirar el sobrenedant i resuspendre el *pellet* de cèl·lules en 1mL de PBS. Transferir a un *ependorf* i tornar a centrifugar a 2.500g durant 5 minuts.
6. Retirar completament el sobrenedant i dipositar l'*ependorf* que conté el *pellet* de cèl·lules en gel.
7. Preparar la solució mare de CLB (per 10mL): 200 µl Tris-HCl pH 7.5, 300 µl NaCl 5M (al final ha d'estar a 150 mM), 100 µl de Tritó i afegir H₂O MiliQ fins a 10 mL. Fer una alíquota al moment, tenint en compte que per cada 100 µl de CLB cal afegir 2 µl de cocktail inhibidor de proteases 50x i 1 µl d'ortovanadat de sodi 100x (inhibidor fosfatases).
8. Afegir 50-100µl (depenent número cèl·lules) de la barreja CLB+inhibidors a les cèl·lules i resuspendre vigorosament.
9. Deixar la mostra en gel de 30-60 minuts, fer vòrtex cada 5 minuts.
10. Centrifugar a 14.000 rpm durant 15 minuts a 4°C.
11. Recollir el sobrenedant que conté les proteïnes.

Per la **quantificació de proteïna** es realitza un assaig de quantificació colorimètrica de proteïna Bradford. Per això, cal realitzar una recta estàndard amb diferents concentracions conegudes de BSA (Ref. 23209, Pierce) a partir de la dilució de 1mg/mL.

1. Realitzar les dilucions de la proteïna per quantificar en una placa de 96 pouets. Afegir 199.5µl d'H₂O MQ i 0.5µl de mostra, realitzant duplicats per mostra. Alhora, es realitza una recta partó amb BSA 1M:

Concentració BSA	BSA 1M (µL)	H ₂ O (µL)
0	0	200
1	0.25	199.75
2.5	0.625	199.375
5	1.25	198.75
7.5	1.875	198.125
10	2.5	197.5
15	3.75	196.25
20	5	195
Mostra *2	0.5 mostra	199.5
Blanc	0.5 BL	199.5

2. Afegir 50 µl del reactiu Bradford (Ref. Bradford 1X Dye Reagent #5000205, BioRad) a cada pou, resuspenent amb la pipeta per evitar la sedimentació del reactiu. Aquest pas cal realitzar-lo ràpidament per evitar la variabilitat de resultats degut a l'usuari.
3. Incubar 30 minuts en fosc i a temperatura ambient.
4. Llegir amb l'absorbància a 595nm amb l'espectrofotòmetre (VERSAmax microplate Reader, Molecular Devices).
5. Extrapolar la concentració de proteïna de les mostres a partir de la recta patró.

10. Western blot d'exosomes circulants en plasma i de línies cel·lulars

Per detectar les proteïnes mitjançant anticossos es realitzarà la tècnica de western blot. El procediment és el següent:

1. Carregar 50µg de proteïna total o el *pellet* aïllat d'exosomes, prèviament desnaturalitzats a 70°C o a 97°C, respectivament, durant 10 minuts en gels NuPAGE del 4-12% (Ref. NW 04120BOX, Invitrogen).
 - a. Per les proteïnes extretes de cèl·lules, es calcula la concentració necessària per 50µg de proteïna total per a obtenir un volum final de 40µL de tampó de càrrega format per 10µL de NuPAGE LDS Sample Buffer (4X) (Ref. B0007 Life Technologies), 4µL de 10X Bolt Sample Reducing Agent (Ref. B0009 Life Technologies) i H₂O fins a 40µL.
 - b. Pels exosomes, resuspendre tot el *pellet* en 40µL de tampó de càrrega format per 10µL de NuPAGE LDS Sample Buffer (4X) (Ref. B0007 Life Technologies), 4µL de 10X Bolt Sample Reducing Agent (Ref. B0009 Life Technologies) i 26µL d'H₂O.

- c. Pel marcador de pes molecular (KDa), es carreguen 7 μ L (Ref. LC5925, Life Technologies)
2. Realitzar l'electroforesis durant 45-90 minuts, a 80V i uns 100mA amb el Novex Bolt Mini gel Tank amb el buffer d'electroforesis MES SDS Running Buffer 20X (Ref. B0002, Life Technologies).
3. La transferència dels gels es realitza amb membrana de PVDF (Ref. IB24002, Life Technologies) pels exosomes, o de nitrocel·lulosa (Ref. IB23002, Life Technologies) per les proteïnes cel·lulars. S'utilitza la màquina iBlot2 (Life Technologies) i el programa 0 que correspon a 20V durant 1 minut, 23V durant 4 minuts i 25V durant 2 minuts.
4. Abans del bloqueig, la membrana es tenyeix amb Ponceau (Ref. P7170, Sigma-Aldrich) durant 5 minuts i el gel amb Bio-SafeTM Coomassie Stain (Ref. 1610786, BIO-RAD) per comprovar l'eficiència de la transferència. Fer 3 rentats de 5 minuts amb H₂O MiliQ en la membrana i descartar el gel.
5. El bloqueig de la membrana es realitza durant 1h en agitació i a temperatura ambient. La solució de bloqueig conté 15mL TBS-T al 0.05% i 0.75g de llet desnatada en pols.
 - a. La solució de TBS-T al 0.05% s'obté a partir de TBS (Ref. Tris Buffered Saline 10X, BP2471-1, Fisher Scientific) diluït 1:10 per a obtenir 1L de TBS 1X, i a continuació s'afegeixen 500 μ L de Tween20 (Ref. P7949, Sigma-Aldrich).
6. Fer 3 rentats de 10 minuts amb TBS-T al 0.05%.
7. Incubar la membrana en rotació a 4°C fins al dia següent amb els anticossos primaris corresponents. Aquesta solució d'anticòs conté 5mL de la solució de bloqueig i 10 μ L d'anticòs primari TSG101 (dilució 1:500) (Ref. ab83, Abcam), ECM1 (dilució 1:500) (Ref. sc-365335, Santa Cruz Biotechnology) o GLUT-1 (dilució 1:1000) (Ref. 21829-1 AP, Proteintech). L'anticòs anti-tubulina s'incuba 1 hora a temperatura ambient, en 15mL de TBS-T 0.05% i 7.5 μ L d'anticòs.
8. Al dia següent, fer 3 rentats de 10 minuts amb TBS-T al 0.05%, per eliminar les restes d'anticòs primari que no s'haguin adherit a la proteïna.
9. Incubar la membrana amb els anticossos secundaris anti-ratolí (Ref. A9044, Sigma-Aldrich) o anti-conill (Ref. sc-2004, Santa Cruz Biotechnology) en 15mL de TBS-T al 0.05%.
10. Fer 3 rentats, els 2 primers amb TBS-T al 0.05% i l'últim amb TBS.
11. Revelar la senyal amb el Novex *ECL Chemiluminescent Substrate Reagent Kit* (Ref. WP20005, Invitrogen) a una proporció 1:1 i obtenir la imatge amb el sistema Chemidoc (BioRad).
12. La intensitat de les bandes es quantifica amb el programa Quantity One versió 4.2.6.

11. Estudi proteòmic dels exosomes

Les proteïnes aïllades d'exosomes es sol·lubilitzaren en buffer SDS (0.5% SDS, 50 mM Tris HCL, 5 mM DTT), es desnaturalitzaren a 65°C durant 60 minuts, s'alcalinitzaren amb 55 mM de iodoacetamida i, finalment, es digeriren en tripsina. A continuació, cada mostra es va marcar amb un reactiu TMT codificat de forma específica. La mostra de referència es va crear mitjançant la combinació d'aliquotes de cadascuna de les sis mostres que es sotmeteren a l'anàlisi proteòmic.

Les mostres marcades es combinaren en un únic tub, es barrejaren i es fraccionaren en 10 trossos mitjançant un fort intercanvi catiònic. Cadascuna de les fraccions es separà per HPLC i s'analitzà en un espectròmetre de masses LTQ VELOS Orbitrap (Thermo Fisher).

12. Anàlisi dels nivells d'ARNm

Per la quantificació del mARN, es parteix de 500ng de ARN total en 10µL per a realitzar la reacció de retrotranscripció (RT-PCR) amb el *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Life Technologies). Les reaccions de RT contenen 500ng d'ARN, 0.8µL de 25X dNTPs, 2µL de RT buffer 10X, 2µL de 10X *Random Primers*, 1µL d'inhibidor de RNasa, 1µL de transcriptasa inversa *MultiScribe* i 3.2µL d'H₂O; en un volum final de 20µL. Cada reacció s'incuba en un termociclador amb les condicions següents: 25°C durant 10 minuts, 37°C durant 2 hores i 85°C durant 5 minuts.

El cADN obtingut per cada mARN, s'utilitza per realitzar una PCR quantitativa a temps real en una *ABI7500 HT Sequence Detection System* (Applied Biosystems). Cada reacció té un volum final de 10µL, dels quals 1µL correspon al producte de RT-PCR obtingut, 5µL a la Taqman Universal PCR Master Mix (2X) i 0.5µL a la sonda comercial *TaqMan® Gene Expression Assays* i 3.5µL d'H₂O. Les reaccions s'incuben en plaques de 96 pouets òptics a 50°C durant 2 minuts, 40 cicles de [95°C durant 10 minuts i 95°C durant 15 segons] i, finalment, 60°C durant 1 minut. Els valors de Ct dels mARN, ECM1 (Ref. Hs00189435_m1), es normalitzaren amb el control endògen CDKN1β (Ref. Hs00153277_m1) i la quantificació relativa es realitzà amb el mètode de $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

13. Anàlisi estadístic

Les comparacions entre dos o més grups es realitzaren mitjançant la prova t-Student o ANOVA i el programa GraphPad. Es va utilitzar el programa R 2.6.0 Software (Vienna, AU) amb el paquet MaxStat per trobar el punt òptim de tall que permet separar els pacients en funció dels nivells d'expressió dels miRNAs estudiats i així poder determinar el pronòstic. El temps a la recaiguda (TTR) es va

calcular des de la data de cirurgia a la data de recaiguda o última visita. La Supervivència lliure de malaltia (DFS) es va calcular des de la data de cirurgia a la data de recaiguda, mort o última visita. L'anàlisi univariat de TTR o DFS d'acord amb els nivells d'expressió de miRNAs es va fer amb el mètode Kaplan-Meier i s'establiren comparacions mitjançant el test log-rang. Només les covariables associades de forma significativa amb la supervivència en l'anàlisi univariat (P valor amb dues cues < 0.05) es varen incloure a l'anàlisi multivariat de regressió de Cox. Els resultats es reporten com a Hazard ratios (HR) amb uns intervals de confiança (CI) del 95%.

Tots els anàlisis estadístics es varen dur a terme amb SPSS 22 (SPSS Inc, Chicago, IL), R, BRB Array Tools versió 3.5.0 software (Richard Simon & BRB-ArrayTools Development Team, <http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>, National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA) i TIGR Multiexperiment viewer versió 4.0 software (Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA). La significancia estadística es va considerar a $P < 0.05$.

14. Anàlisis de l'estat mutacional de *KRAS*

Per estudiar l'estat mutacional de *KRAS* es realitza una PCR i seqüenciació del producte de l'exó 2 per estudiar l'estat mutacional dels codons 12 i 13. La seqüència dels encebadors per a cada PCR es mostra a continuació:

Sonda	Seqüència
<i>KRAS Forward</i>	TTA ACC TTA TGT GTG ACA TGT T
<i>KRAS Reverse</i>	AGA ATG GTC CTG CAC CAG TAA

Per la realització de la PCR s'utilitza l'ADN polimerasa TaKaRa LA 125U (Ref. RR002A, Conda Pronadisa) amb les següents condicions: per cada reacció s'empren 4µL de dNTPs, 2.5µL de Buffer, 2.5µL de MgCl₂, 0.25µL de Taq polimerasa, 0.5µL de *primer Forward* (10nM) i 0.5µL de *primer Reverse* (10nM) en un volum final de 25µL. Es parteix de 50ng d'ADN totals per mostra.

Les condicions del termociclador (Flezy cycler, Analytikjena) són les següents: 94°C – 1 minut, [94°C – 30 segons, 60°C – 1 minut, 72°C – 1 minut] x 35 cicles, 72°C – 10 minuts i es manté a 4°C.

Finalment, el producte de PCR s'envia a seqüenciar a l'empresa StabVida.