Mejora de la eficiencia metastásica en un modelo de cáncer colorrectal humano y efecto del oncogén K-RAS en la transición de micro a macrometástasis

Patricia Álamo Vargas

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**) 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. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (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**) 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. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (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 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 neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This 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.

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

Facultad de Farmacia

Departamento de Biomedicina

MEJORA DE LA EFICIENCIA METASTÁSICA EN UN MODELO DE CÁNCER COLORRECTAL HUMANO Y EFECTO DEL ONCOGÉN K-RAS EN LA TRANSICIÓN DE MICRO A MACROMETÁSTASIS

PATRICIA ÁLAMO VARGAS

2012

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

Facultad de Farmacia

Departamento de Biomedicina

MEJORA DE LA EFICIENCIA METASTÁSICA EN UN MODELO DE CÁNCER COLORRECTAL HUMANO Y EFECTO DEL ONCOGÉN K-RAS EN LA TRANSICIÓN DE MICRO A MACROMETÁSTASIS

Tesis Doctoral realizada bajo la dirección del Dr. Ramón Mangues y la Dra. María Virtudes Céspedes, en el Grupo de Oncogénesis y Antitumorales del Institut d'Investigacions Biomèdiques del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

Tutor: Prof. Carlos Ciudad

Programa de Doctorado de Biomedicina

Dr. Ramón Mangues

Dra. María Virtudes Céspedes

Dr. Carlos Ciudad

Patricia Álamo

A mi familia,

Seis honrados servidores me
ensañaron cuanto sé;
sus nombres son cómo, cuándo,
dónde, qué y porqué.
Rudyard Kipling (1865-1936)
Novelista británico

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Bueno y finalmente llegó el momento de agradecer a toda la gente que me han ayudado de una manera u otra durante todo este tiempo y han participado en esta tesis leyendo, opinando, corrigiendo, teniéndome paciencia, dándome ánimo, mucho ánimo… acompañándome en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad.

En primer lugar me gustaría agradecer a Ramón y a Virtu que desde el primer momento confiaron en mí y me dieron la oportunidad de aprender y desarrollarme en el área que deseaba y por su gran apoyo y paciencia sobretodo en esta etapa final con las numerosas correcciones de la tesis. Gracias Virtu por todos los conocimientos que me brindastes cuando apenas tenía poca experiencia con los animales y por la confianza que depositastes en mi.

Agradezco a la gente del laboratorio en general porque desde el primer momento me sentí cómoda sin que me costase adaptarme, tanto cuando estábamos en Esteve y sobretodo cuando nos trasladamos a Sant Pau. Un agradecimiento especial a la gente de Esteve que nos ayudó durante todo el tiempo que estuvimos allá y nos brindó de buenos momentos, como la Pili y la Noemí.

A Mary Carmen Cabrera, quien más que un apoyo a nivel profesional lo ha sido a nivel personal, solo te puedo decir… un millón de gracias…Gracias por siempre escucharme, por tus consejos, tus ánimos, por arrancarme la closcla cuando mas incrustada la tenía jeje.. por abrirme prácticamente las puertas de tu casa .. gracias a ti y a toda tu familia.

A los chicos de Cap i Coll, A Miguel Ángel y Carlos por su buen humor y los buenos momentos pasados sobretodo cuando los visitaba en Villa abajo, momentos que me permitían desconectar un poco del día a día, a Carlos también por su entre A y B no hay C…jummm y a Miguel Angel porque siempre estuvo dispuesto a ayudarme con cualquier duda que tenía durante la tesis.

A Marta quien siempre estuvo mano a mano conmigo, prácticamente empezamos y acabamos juntas. Muchas gracias por demostrar ese empeño, fuerza y dedicación aun en los momentos maá difíciles.Gracias por enseñarme aunque sea indirectamente que se tiene que ver el lado positivo de las cosas y seguir para adelante.

Gracias a los demás también, a las chicas de linfoma y leucemia, Isolda, Rebeca, Sandra, MJ y su popola jajajaja, a Mónica, Olga y Rosa. Gracias también a Montse, por los buenos momentos pasados en el comedor.

Un MUCHAS GRACIAS muy en mayúsculas a Alberto Gallardo, por las horasssss que estuvo conmigo mirando cristales, cuantificando células muertas, focis, focis y mas focis….creo que nos quedo claro que todo se puede cuantificar jejejeje.. y a las chicas de inmuno, Montse e Iris y a los chicos que estaban antes, Mariona y Cristo.

Y por supuesto agradecer hoy y siempre a mi familia porque a pesar de no estar presentes físicamente, nunca he sentido su ausencia durante los 11 años que llevo fuera, y esta claro que si no fuese por el esfuerzo realizado por ellos, nada de esto hubiese sido posible. A mis padres Valentín y Nohemí, que siempre confiaron en mí aún dejándome ir cuando apenas era una niña, por la paciencia que me han tenido en los momentos difíciles y

por su apoyo incondicional en todo momento. A la pequeña de la familia, a quien prácticamente ya es una señorita y que siempre me recibe con los brazos abiertos a pesar de no haber estado prácticamente nunca cerca de ella, a Tino por todos los momentos que hemos pasado, por siempre venir a verme, pasar los veranos conmigo, por contarme sus cosas, confiar en mí y seguir mis pasos y evitar mis errores jejejeje; a Elisa, quien también ha sido un gran apoyo todo este tiempo, gracias por tus consejos… a mis tíos y primos, a todo el familión por parte de Elisa porque nos han tratado como de la familia.. a todos ellos muchas gracias porque a pesar de la distancia, el ánimo, apoyo y alegría que me brindan me dieron y me dan la fortaleza necesaria para seguir adelante.

A mis amigos que son mi familia en Barcelona y de este lado del charco, Arturo, Úrsula, Rosa, al oso, Mary, Noemí, Manu, Rodrigo y a Mary carmen una vez más.. personas que desde el primer momento me brindaron y me brindan todo el apoyo, colaboración y cariño, son las personas por las cuales hoy por hoy puedo afirmar que, a pesar de haber venido sola a continuar mis estudios, jamás me he sentido así, porque ellos han estado a mi lado cada día durante estos años por haber compartido tantos momentos juntos, porque con su compañía las cosas malas se convierten en buenas, la tristeza se transforma en alegría y la soledad no existe. Un gracias muy especial a Arturo quien desde que lo conocí me ha tratado de subir el ánimo día a día y se ha convertido en uno más de la familia con sus numerosas idas y venidas para visitarme y ayudarme en cada momento, abrirme los ojos y sacarme una sonrisa cuando más me hacía falta.

En general quisiera agradecer a todas y cada una de las personas que han vivido conmigo la realización de esta tesis doctoral, con sus altos y bajos y que no necesito nombrar porque tanto ellas como yo sabemos que desde

los más profundo de mi corazón les agradezco el haberme brindado todo el apoyo, colaboración, ánimo y sobre todo cariño y amistad.

CONTENIDO

CONTENIDO

TABLAS 1

FIGURAS 4

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS 12

I. INTRODUCCIÓN.....15

1.CÁNCER COLORRECTAL HUMANO 17

1.1 Etiopatología 17

1.2 Metástasis.....20

1.2.1 Mecanismos moleculares asociados con la vascularización tumoral y el desarrollo de metástasis en cáncer colorrectal humano 20

1.2.2 Estroma tumoral, diseminación metastásica y tropismo 22

1.2.2 .2 Papel de GCSF en metástasis. 25

1.2.2 .3 Papel de las integrinas en cáncer. 27

1.2.3. Activación oncogénica y transición de micro- a macrometástasis. ..29

1.3 Inestabilidad genómica.....30

2. PROTOONCOGENES RAS 31

2.1. K-RAS y metástasis 36

3. MODELOS ANIMALES DE CÁNCER COLORRECTAL Y METÁSTASIS CON EXPRESIÓN DEL ONCOGÉN K-RAS 39

II. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS 45

III. METODOLOGÍA 53

1. MEJORA DEL MODELO DE MICROINYECCIÓN ORTOTÓPICA DE CCR.....55

1.1 Líneas celulares.....55

1.2 Animales 55

1.3 Aumento de la diseminación metastásica mediante administración G-CSF.....56

1.3.2 Seguimiento de los animales 59

1.3.3 Necropsia y procesado de muestras. 60

1.3.4 Análisis histopatológico e inmunohistoquímico 60

1.3.5. Variables evaluadas y análisis estadístico. 61

1.4 Generación del modelo ortotópico de CCR metastásico después de condicionamiento subcutáneo. 62

1.4.1 Inyección subcutánea en ratón atímico 62

1.4.2 Obtención de las células disgregadas procedentes de tumores subcutáneos.....63

1.4.3 Inyección ortotópica en ratón atímico 65

1.4.4 Necropsia y procesado de muestras. 65

1.4.5. Análisis molecular del tumor primario y de los focos metastásicos. 65

1.4.5.1 Extracción de proteínas a partir de tejido tumoral para su estudio por ELISA 66

1.4.5.1.1. Cuantificación de proteínas.....66

1.4.5.2 Cuantificación de Interleuquina 8 y VEGFA mediante ELISA.....67

1.4.5.3 Construcción del bloque celular 69

1.4.5.4 Análisis inmunohistoquímico 69

1.4.5.5 Análisis histopatológico e inmunohistoquímico 71

1.4.6. Variables evaluadas y análisis estadístico 71

2.2 Digestión de pTRE2 pur 77

2.3 Inserción de K-RAS en pTRE2 pur 79

2.4 Mutagénesis Dirigida 81

3. OBTENCIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER COLORRECTAL CON DISTINTAS MUTACIONES EN K-RAS 83

3.1 Líneas celulares de CCR 83

3.2 Determinación de la concentración óptima de antibiótico para la selección de los clones transfectados 83

3.3 Transfecciones 84

3.4 Generación del modelo animal de CCR con expresión de K-RAS mutado 87

3.4.1 Líneas celulares de CCR humano que expresan K-RAS mutado 87

3.4.2 Animales 87

3.4.3 Tipos de implantación utilizados y seguimiento 87

3.4.3.1 Implantación ortotópica inmediata a la transfección en ratón atímico 88

3.4.4 Necropsia y análisis histopatológico. 88

4. GENERACIÓN DE LÍNEAS DE CCR PORTADORAS DE DISTINTAS MUTACIONES EN K-RAS POR RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA.....89

4.1 Técnica de recombinación homóloga.....90

4.2. Verificación del vector viral adeno-asociado construído con las diferentes mutaciones de interés 92

4.3 Obtención de los vectores por recombinación homóloga.....93

4.4 Generación de los clones recombinantes.....94

5. CARACTERIZACIÓN DE LOS CLONES DE CCR CON EXPRESIÓN DE LOS ALELOS ONCOGÉNICOS 96

5.1 Análisis de Viabilidad celular.....96

5.2 Western Blot 96

***5.2.1 Extracción de proteínas* 96**

***5.2.2 Electroforesis* 97**

***5.2.3. Transferencia por Electroblotting* 98**

***5.2.4 Hibridación de membranas*.....99**

6. ESTUDIOS IN VIVO DE TUMOROGÉNESIS Y METASTAGÉNESIS PARA LOS DISTINTOS MUTANTES DE K-RAS 101

6.1 Líneas celulares.....101

6.2 Animales 101

6.3 Generación del modelo ortotópico de CCR metastásico después de condicionamiento subcutáneo. 101

***6.3.1 Inyección subcutánea en ratón atímico* 102**

6.3.2 Obtención de las células disgregadas procedentes de tumor subcutáneo 102

6.3.3 Inyección ortotópica en ratón atímico 102

6.3.4 Necropsia y procesado de muestras. 103

6.3.5. Análisis molecular del tumor primario y de los focos metastásicos. 103

6.3.6 Análisis de los niveles de IL8 y VEGFA 104

6.3.7 Análisis histopatológico e inmunohistoquímico 104

6.3.8. Variables evaluadas y Análisis estadístico. 105

IV. RESULTADOS 107

1. NUEVAS ESTRATEGIAS PARA MEJORAR LA EFICIENCIA METASTÁSICA EN EL MODELO DE CCR 109

1.1 Efecto de la movilización de células de la medula ósea por administración de G-CSF sobre la eficiencia metastásica de la línea celular HCT116 110

1.2 Efecto del pase previo subcutáneo sobre la capacidad metastásica de la línea celular HCT116 inyectada ortotópicamente. 118

1.2.1 Diseminación metastásica linfática 122

1.2.2 Diseminación hepática 125

1.2.3 Diseminación pulmonar 128

1.3. Análisis **molecular de tumor primario y focos metastáticos en los grupos ORT y SC+ORT** 131

1.3.2 Activación de las vías de MAP quinasa y AKT 134

1.3.3 Análisis de la expresión de VEGFA en tumor primario 138

1.3.4 Análisis de la expresión de Ki67 en tumor primario 140

1.3.5 Análisis de la expresión de IL-8 en tumor primario y focos metastáticos 141

2. GENERACIÓN DE LÍNEAS CELULARES DE CCR HUMANO QUE EXPRESAN DIFERENTES MUTACIONES DE K-RAS 145

2.1. Obtención de vectores de expresión portadores de diferentes mutaciones en el oncogén KRAS 145

2.2 Obtención de líneas celulares de CCR con expresión de las distintas mutaciones en el oncogén K-RAS y análisis fenotípico 152

2.3 Obtención de tumores por inyección ortotópica y selección in vivo de células de CCR portadoras de las distintas mutaciones 158

2.4 Introducción de mutaciones en K-RAS, B-Raf y PI3K (H1047R) en células SW48 utilizando recombinación homóloga 159

3. PAPEL DE *PI3K, BRAF y KRAS D13* EN TUMOROGÉNESIS Y METÁSTASIS EN CCR 163

3.1. Formación de tumor primario y patrón de diseminación metastásica de los recombinantes de SW48 con mutación en PI3K, B-raf o KRAS D13 tras inyección ortotópica. 163

4. PAPEL DE LAS MUTACIONES K12V y K13D EN TUMOROGÉNESIS Y EN METASTAGÉNESIS EN CCR 166

4.1 Formación de tumor primario, patrón de diseminación metastásica y supervivencia de los animales a partir de la inyección ortotópica, tras pase dubcutáneo, de los recombinantes SW48 WT, K13D o K12V 167

4.2 Número de focos y área de las metástasis hematógenas y linfáticas 173

4.2.1 Número de focos y área de las metástasis linfáticas 173

4.2.2 Análisis del número de focos metastásicos y área en las metástasis pulmonares.....176

4.3. Alteraciones moleculares observadas en tumor primario y focos metastáticos en los grupos K12V y K13D 178

4.3.1. Expresión y activación de las vías dístales a K-RAS en los grupos K12V y K13D.....179

4.3.2. Análisis de la expresión de la integrina beta 5 y beta 1 182

4.3.3 Análisis de la expresión de la angiopoyetina 2 186

4.3.4 Análisis de la expresión de Serpina-1 en muestras de tumor primario 190

4.3.5 Análisis de la expresión de Vimentina en las muestras de tumor primario 192

4.3.6 Análisis de la expresión de Ki67 en las muestras de tumor primario 195

4.3.7 Análisis de la expresión de VEGFA en tumor primario.....196

4.3.8 Análisis de la expresión de CXCR4 en los émbolos tumorales 198

4.3.9 Análisis de la expresión de PTHLH en las muestras de tumor primario 200

V. DISCUSIÓN.....203

1. EFECTO ANTITUMORAL Y ANTIMETASTÁSICO DE GCSF EN EL MODELO ORTOTÓPICO DERIVADO DE LA LÍNEA CELULAR HCT-116 206

2. AUMENTO DE LA DISEMINACIÓN METASTÁSICA MEDIANTE CONDICIONAMIENTO SUBCUTÁNEO PREVIO A LA INYECCIÓN ORTOTÓPICA DE LA LÍNEA HCT-116 212

2.1 Cambios histológicos y moleculares asociados al incremento de la metastagénesis en HCT-116 tras condicionamiento subcutáneo previo a la inyección ortotópica. 217

3. ESTUDIO DE LAS DIFERENCIAS EN CAPACIDAD METASTÁSICA ENTRE LOS ONCOGENES K12V Y K13D.....226

3.1 Generación de transfectantes y recombinantes del oncogén K-ras 226

3.2. Estimación de la tasa de metástasis en el modelo ortotópico derivado de los recombinantes del oncogén Kras de línea celular SW48 tras su pase subcutáneo previo 231

3.3 Diferencias en la capacidad tumorigénica y metastásica de los mutantes del oncogén K-RAS K12V y K13D en la línea celular SW48233

***3.3.1 Cambios moleculares asociados con las diferencias en metastagénesis por expresión de K12V o de K13D*.....235**

VI. CONCLUSIONES 249

VII. BIBLIOGRAFÍA.....253

ANEXO 1.....279

TABLAS

Tabla 1. Ventajas e inconvenientes del uso de OCMI frente a otros procedimientos para la generación de modelos animales de CCR. 43

Tabla 2. Optimización del protocolo de disgregación del tumor para la obtención de la suspensión celular a partir de tumores subcutáneos 64

Tabla 3. Anticuerpos utilizados para el análisis inmunohistoquímico de tumores..... 70

Tabla 4. Reactivos utilizados para la amplificación por PCR del c-DNA de K-RAS..... 75

Tabla 5. Programa de PCR utilizado para la amplificación de K-RAS 76

Tabla 6. Reactivos y programa de PCR utilizados en la reacción de secuenciación del fragmento de K-RAS 77

Tabla 7. Reactivos y condiciones utilizadas en la reacción de defosforilación del vector linearizado pTRE2 pur 79

Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados para realizar la mutagénesis dirigida en el c-DNA del gen K-RAS 82

Tabla 9. Origen, morfología, medio de cultivo utilizado y presencia de mutaciones en K-ras o B-Raf en las líneas colorrectales COLO320DM, SW48 y CACO2. 83

Tabla 10. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de las regiones homólogas de los vectores 92

Tabla 11. Oligonucleótidos utilizados para la secuenciación de los clones recombinantes de SW48 92

Tabla 12. Reactivos utilizados para la amplificación por PCR de los clones recombinantes en la línea SW48..... 93

Tabla 13. Programa de PCR utilizado para la amplificación de las regiones a secuenciar de los clones recombinantes de SW48 93

Tabla 14. Anticuerpos utilizados para el análisis por Western Blot de los clones que expresan los distintos oncogenes K-RAS 100

Tabla 15. Anticuerpos utilizados para en análisis inmunohistoquímico de tumores derivados de los transfectantes de K-RAS estudiados 105
Tabla 16. Tasa de injerto, volumen del tumor primario y tiempo de supervivencia obtenidos en los grupos control y en el tratado con G-CSF 113
Tabla 17. Número de ratones afectados con macrometástasis en el grupo control y en el grupo tratado con G-CSF 115
Tabla 18. Número y área de focos metastásicos hepáticos en el grupo control y tratado con G-CSF 116
Tabla 19. Área y número de focos metastásicos pulmonares en el grupo administrado con el vehículo y en el grupo administrado con G-CSF116
Tabla 20. Número y área de los focos metastásicos linfáticos en el grupo administrado con el vehículo y en el grupo tratado con G-CSF 117
Tabla 21. Tasa de injerto, volumen del tumor primario y tiempo de supervivencia obtenido en los grupos ORT y SC+ORT 119
Tabla 22. Número de ratones afectados por micro y/o macrometástasis en el grupo inyectado ortotópicamente (ORT) y en el grupo con pase subcutáneo previo a la inyección ortotópica (SC+ORT). 121
Tabla 23. Cuantificación del número de focos metastásicos linfáticos en los grupos ORT y SC+ORT. 122
Tabla 24. Cuantificación del área de los focos tumorales en ganglios linfáticos mesentéricos en los grupos ORT y SC+ORT. 123
Tabla 25. Área y número de focos metastásicos hepáticos en los grupos ORT y SC+ORT. 126
Tabla 26. Área y número de focos metastásicos pulmonares en los grupos ORT y SC+ORT. 129
Tabla 27. Análisis de la expresión de Vimentina, Serpina-1, MAPK-P38, Ki67, γ-H2AX, Snail1, IL-8, PTHLH, β-catenina, CD44v6, Integrinas α1-v y β2-4 y ANGPT2 en muestras de tumor primario de los grupos ORT y SC+ORT. 144

Tabla 28. Resumen de los resultados de las transfecciones con los distintos vectores de expresión del oncogén K-RAS en las distintas línias celulares de CCR humano 158

Tabla 29. Número de ratones inyectados, tasa de injerto y número de ratones afectados con micrometástasis linfáticas, hematógenas (hígado y pulmon) y carcinomatosis, tras inyección ortotópica directa de los recombinantes de SW48 con mutación en PI3K, BRAF y KRAS D13164

Tabla 30. Tasa de injerto, volumen del tumor primario y tiempo de supervivencia para los grupos SW48 WT, K12V y K13D, inyectados ortotópicamente tras pase subcutáneo. 169

Tabla 31. Porcentaje de animales afectados por micro y macrometástasis linfáticas, hepáticas, pulmonares y peritoneales en los grupos WT, K12V y K13D, obtenidos por inyección ortotópica tras pase subcutáneo. 172

Tabla 32. Número y área de ganglios afectados y focos tumorales linfáticos en los animales inyectados con los recombinantes WT, K12V y K13D. 173

Tabla 33. Número y área de los focos tumorales pulmonares en los animales inyectados con los recombinantes WT, K12V y K13D. 176

Tabla 34. Análisis de la expresión de MAPK-P38, Ki67, γ-H2AX, Snail1, IL8 y Integrinas α1-v y β2-4 en muestras de tumor primario de los grupos K12V y K13D. 202

FIGURAS

Figura 1. Incidencia de cáncer en España, en el período 2009-2011, clasificado por tipos tumorales 19
Figura 2. Secuencia temporal de la transformación adenoma-carcinoma en cáncer colorrectal 19
Figura 3. Vías para el desarrollo de metástasis en cáncer colorrectal. 21
Figura 4. Componentes celulares del microentorno del tumor primario 22
Figura 5. Ciclo de activación de las proteínas RAS. 33
Figura 6. Vías de señalización de K-RAS 34
Figura 7. Tipo de respuesta tumoral a la terapia anti-EGFR en función de la presencia de mutaciones en K-RAS, B-RAF o PI3K en CCR 35
Figura 8. Efecto antitumoral y antiangiogénico del anticuerpo monoclonal Bevacizumab 36
Figura 9. Tipos de implantación quirúrgica utilizadas en la generación de los modelos animales ortotópicos de CCR. 41
Figura 10. Contribución de los diferentes modelos animales al estudio de las diferentes etapas de la diseminación metastásica. 42
Figura 11. Pauta de administración de G-CSF e implantación de células HCT-116 en el ciego de ratones *Swiss nude.* 57
Figura 12. Vascularización de la mejilla del ratón. 58
Figura 13. Extracción de sangre de la vena mandibular del ratón. 58
Figura 14. Plásmido pDNR-Dual con el inserto de cDNA de K-RAS. 74
Figura 15. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación del fragmento de c-DNA de K-RAS, con las dianas de restricción para PuvII, NotI y la secuencia de HA 75
Figura 16. Vector de expresión pTRE2 pur con resistencia a puromicina ... 78
Figura 17. Vector que contiene como inserto el minigen de K-RAS. 86
Figura 18. Estructura de los Virus adeno-asociados (AVV) construídos para introducir las mutaciones puntuales en los genes K-RAS Val12 (G12V),

K-RAS Asp13 (G13D), B-Raf o PI3K mediante recombinación homóloga, en la línea celular SW48. 90
Figura 19. Aumento de leucocitos circulantes en el grupo tratado con G-CSF respecto al grupo control..... 111
Figura 20. Evolución del peso de los animales por administración de G-CSF. 112
Figura 21. Análisis de supervivencia aplicando el método de Kaplan-Meier entre el grupo control y G-CSF..... 112
Figura 22. Fotografía de los tumores primarios del grupo control y del grupo G-CSF. 114
Figura 23. Diseminación linfática, hepática y pulmonar asociada a la administración de G-CSF..... 118
Figura 24. Fotografía de los tumores primarios de los grupos ORT y SC+ORT 120
Figura 25. Comparación del número y el área de focos metastásicos linfáticos a nivel microscópico, macroscópico y visible entre el grupo ORT y SC+ORT. 124
Figura 26. Metástasis linfáticas desarrolladas en los grupos ORT y SC+ORT 125
Figura 27 . Número y área de los focos hepáticos metastásicos a nivel microscópico, macroscópico y visible en los grupos ORT y SC+ORT. 127
Figura 28. Metástasis hepáticas desarrolladas en los grupos ORT y SC+ORT. 128
Figura 29. Comparación del número y área de los focos micro y macro pulmonares y el número de animales afectados entre los grupos ORT y SC+ORT. 130
Figura 30. Metástasis pulmonares desarrolladas en los grupos ORT y SC+ORT. 130

Figura 31. Tinción inmunohistoquímica de Integrina β1 en muestras de tumor primario de ratones inyectados con la línea tumoral HCT116 para los grupos ORT y SC+ORT..... 132
Figura 32. Cuantificación de la expresión de integrina β1 en tumor primario de los grupos ORT y SC+ORT. 133
Figura 33. Cuantificación de la expresión de integrina β1 en los focos metastáticos pulmonares (a) y hepáticos (b) de los grupos ORT y SC+ORT 133
Figura 34. Tinción por inmunohistoquímica de Integrina β1 en muestras de hígado y pulmón afectados por metástasis en los ratones inyectados con la línea tumoral HCT116 en los grupos ORT (a y c) y SC+ORT (b y d). 134
Figura 35. Análisis de la activación de MAPK en los grupos ORT y SC+ORT por IHQ, utilizando anticuerpo contra formas fosforiladas. 135
Figura 36. Niveles de activación de MAPK en los grupos ORT y SC+ORT. 135
Figura 37. Cuantificación de la activación de AKT (AKT-p) en los grupos ORT y SC+ORT 136
Figura 38. Análisis de la activación de AKT por IHQ en tumor primario de los grupos ORT y SC+ORT. 137
Figura 39. Análisis de la activación de AKT (AKT-p) por IHQ en metástasis (a) pulmonar y (b) hepática en el grupo SC+ORT. 138
Figura 40. Análisis de la expresión de VEGFA en tumor primario en los grupos ORT y SC+ORT mediante ensayo ELISA..... 138
Figura 41. Análisis de la expresión de VEGFA en las metástasis pulmonares observadas en los grupos ORT y SC+ORT. 139
Figura 42. Expresión de VEGFA en las metástasis pulmonares observadas en los grupos ORT y SC+ORT. 140
Figura 43. Cuantificación de la expresión de Ki67 en tumor primario de los grupos ORT y SC+ORT mediante IHQ. 141

Figura 44. Análisis de la expresión de IL-8 en tumor primario en los grupos ORT y SC+ORT mediante ensayo ELISA. 142
Figura 45. Comparación del nivel de expresión de IL-8 en tumor primario y en metástasis linfáticas para el grupo ORT y para el grupo SC+ORT, mediante ensayo ELISA. 143
Figura 46. Productos de la amplificación de K-RAS a partir de pcDNR Dual. 146
Figura 47. Digestión de pTRE2 pur..... 147
Figura 48. PCR de la ligación para verificar el inserto de K-RAS 148
Figura 49. Verificación por secuenciación de la construcción del vector de expresión. 149
Figura 50. Verificación de la mutagénesis del codón 61 por secuenciación, para revertir la mutación a la secuencia silvestre. 150
Figura 51. Verificación de la mutagénesis dirigida en el codón 12 y codón 13 por secuenciación. 151
Figura 52. Verificación de la construcción del vector por digestión enzimática con las enzimas HindIII y XmnI. 152
Figura 53. Microfotografías de la línea de cáncer colorrectal Colo320DM en cultivo 154
Figura 54. Microfotografías de la línea de cáncer colorrectal Caco2 en cultivo. 154
Figura 55. Cromatograma representativo de uno de los clones transfectados con el vector pTRE K12V en la línea colo320DM. 155
Figura 56. Cromatograma representativo de los clones transfectados con el vector pTRE K12V en la línea Caco2. 155
Figura 57. Microfotografías de la línea SW48 en cultivo..... 156
Figura 58. Cromatogramas representativos obtenidos a partir de los clones transfectados con el vector que contiene el mini gen K12V. 157
Figura 59. Análisis de la expresión de K-RAS, B-RAF y PI3K en los clones de la línea celular SW48. 161

Figura 60. Cromatograma representativo de la secuenciación de los recombinantes de SW48 con mutación en PI3K (E545K) y B-RAF(V600E). 161

Figura 61. Cromatogramas representativos de la secuenciación de los recombinantes de SW48 con mutación en K13D ó K12V. 162

Figura 62. Mejora de la capacidad metastásica mediante el pase SC previo a la inyección ortotópica, evaluado en la línea de CCR humano SW48165

Figura 63. Tasa de crecimiento tumoral tras inyección subcutánea de los clones recombinantes SW48 WT, K13D y K12V. 167

Figura 64. Verificación de la viabilidad de las células SW48 WT, K12V y K13D aisladas y recultivadas tras la disgregación del tumor SC. 168

Figura 65. Microfotografías de los clones de SW-48 K-RAS (WT, KV12, KD13) en cultivo, antes y después del crecimiento SC en ratón y posterior re-cultivo. 168

Figura 66. Macrofotografía de tumores primarios representativos de los grupos SW48 WT, K12V y K13D, obtenidos mediante inyección ortotópica tras pase subcutáneo previo. 170

Figura 67. Análisis de supervivencia utilizando el método de Kaplan_Meier entre los animales de los grupos K12V, K13D y WT. 171

Figura 68. Metástasis linfáticas desarrolladas en los grupos K12V y K13D. 174

Figura 69. Análisis comparativo del tamaño del tumor primario, número de animales afectados, número y área de los focos micro, macro y visibles de las metástasis linfáticas en función de la expresión del oncogén K12V o K13D. 175

Figura 70. Tinción con H&E de las metástasis pulmonares en los ratones inyectados ortotópicamente con células SW48 aisladas de tumores subcutáneos. 177

Figura 71. Comparación entre el número de animales afectados y el número y área de los focos micro y macrometastásicos pulmonares en los grupos K12V y K13D. 178
Figura 72. Cuantificación de la activación de MAPK en los grupos K12V y K13D..... 179
Figura 73. Análisis de la activación de MAPK por IHQ en los grupos K12V y K13D..... 180
Figura 74. Análisis por IHQ de la activación de AKT en los grupos K12V y K13D..... 181
Figura 75. Cuantificación de la activación de AKT en los grupos K12V y K13D..... 182
Figura 76. Análisis de la expresión de integrina beta 5 por IHQ en los grupos K12V y K13D. 183
Figura 77. Cuantificación de la expresión de integrina β5 en los grupos K12V y K13D..... 184
Figura 78. Cuantificación de la expresión de integrina β1 en los grupos K12V y K13D en tumor primario..... 185
Figura 79. Análisis de la expresión de integrina beta 1 por IHQ en los grupos K12V y K13D. 185
Figura 80. Cuantificación de la expresión de ANGTP2 por IHQ en los grupos K12V y K13D. 186
Figura 81. Análisis de la expresión de ANGTP2 por IHQ en los grupos K12V y K13D..... 187
Figura 82.Análisis de la expresión de ANGTP2 por IHQ en las metástasis linfáticas y pulmonares de los grupos K12V y K13D. 188
Figura 83. Cuantificación de la expresión de ANGTP2 en los focos metastáticos pulmonares de los grupos K12V y K13D. 189
Figura 84. Análisis de la expresión de ANGTP2 en los focos metastáticos linfáticos en los grupos K12V y K13D..... 189

Figura 85. Análisis de la expresión de serpina-1 en muestras de tumor primario en los grupos K12V y K13D. 190
Figura 86. Análisis de la expresión de serpina 1 por IHQ en los grupos K12V y K13D. 191
Figura 87. Análisis de la expresión de Serpina1 por IHQ en las metástasus pulmonares de los grupos K12V y K13D. 192
Figura 88. Análisis de la expresión de vimentina por IHQ en los grupos K12V y K13D. 193
Figura 89. Análisis de la expresión de vimentina en muestras de tumor primario entre los grupos K12V y K13D. 194
Figura 90. Análisis de la expresión de vimentina en metástasis linfáticas y pulmonares entre los grupos K12V y K13D. 194
Figura 91. Análisis de la expresión de vimentina en metástasis pulmonares y linfáticas en los grupos K12V y K13D. 195
Figura 92. Cuantificación de la expresión de Ki67 en muestras de tumor primario en los grupos K12V y K13D. 196
Figura 93. Cuantificación de la expresión de VEGFA mediante ensayo ELISA, en el tumor primario de los grupos K12V y K13D. 197
Figura 94. Análisis de la expresión de VEGFA por IHQ en las metástasis pulmonares en los grupos K12V y K13D. 197
Figura 95. Análisis de la expresión de VEGFA en metástasis pulmonares en los grupos K12V y K13D mediante ensayo de ELISA. 198
Figura 96. Cuantificación de la expresión de CXCR4 en los émbolos tumorales intravasados en tumores primarios de los grupos K12V y K13D. 199
Figura 97. Análisis de la expresión de CXCR4 por IHQ en los embolos tumorales intravasales de los grupos K12V y K13D. 199
Figura 98. Análisis de la expresión de CXCR4 por IHQ en las metástasis linfáticas de los grupos K12V y K13D. 200

Figura 99. Cuantificación de la expresión de PTHLH en tumor primario de los grupos K12V y K13D 201
Figura 100. Análisis de la expresión de PTHLH por IHQ en los tumores primarios de los grupos K12V y K13D. 201
Figura 101. Esquema global de los cambios histopatológicos y moleculares observados tras la utilización del pase subcutáneo previo a la inyección ortotópica de la línea celular HCT116 225
Figura 102. Esquema global de las diferencias en cuanto a diseminación metastásica y cambios moleculares entre los grupos K12V y K13D.. 246

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

AA: aminoácido

ADN: ácido desoxirribonucléico

Amp: ampicilina

AmpR: resistencia a ampicilina

Asp, D : aspártico

BSA : albúmina sérica bovina

BME: bromuro de etidio

CCR: cáncer colorrectal

Cys: cisteína

DMSO: dimetil sulfóxido

D12: gen K-ras con una mutación en el codón 12 que codifica para Aspártico

D13: gen K-ras con una mutación en el codón 13 que codifica para Aspártico

EE: error estándar

EMA: ensayo experimental de metástasis

GAP: proteína activadora de GTPasa

Gly: glicina

G12: proto-oncogén K-ras que porta la secuencia silvestre de nucleótidos en el codón 12 que codifican para Glicina

G418: geneticina

HET: heterotópico

H61: gen K-ras con una mutación en el codón 61 que codifica para Histidina

HSC: células madre hematopoyéticas

IP: inyección intraperitoneal

IV: inyección intravenosa

kb: kilobase

LB: medio de cultivo para bacterias Luria-Broth

MSS: estabilidad de microsatélites

MSI: inestabilidad de microsatélites

nt: nucleótidos

OCMI: modelo de microinyección de células humanas en la submucosa de la pared del colon

O/N: cultivo durante toda la noche (del inglés "over/night")

ORT: ortotópico

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa para la amplificación de un fragmento de ADN

P-S: Penicilina-estreptomicina

SC: subcutáneo

SF: suero fisiológico

SMA: ensayo de metástasis espontáneas

SOI: implantación quirúrgica ortotópica

UV: ultravioleta

Val, V : valina

V12: gen K-ras con una mutación en el codón 12 que codifica para Valina

Wt: wild type (gen silvestre)

Zona SPF: zona libre de patógenos ("Specific patogen free")

I. INTRODUCCIÓN

1. CÁNCER COLORRECTAL HUMANO

1.1 Etiopatología

La mayoría de los tumores (alrededor del 85%) derivan de células epiteliales, pudiéndose originar en diversos órganos. Estos tipos de tumores epiteliales se denominan carcinomas y se generan por la acumulación sucesiva de alteraciones de diferentes genes que llevan a una transformación progresiva de las células humanas sanas, en células altamente malignas[1] .

El carcinoma colorrectal (CCR) es una de las neoplasias más comunes en países occidentales, seguida del cáncer de mama y de pulmón (U.S. Cancer Statistics Working Group 2011) (**figura 1**)

Los factores de riesgo asociados al CCR incluyen la edad, el estilo de vida, antecedentes de haber padecido otras enfermedades colorrectales y factores hereditarios. En cuanto al estilo de vida, la alimentación, el consumo de alcohol, el tabaquismo y la inactividad física favorecen la aparición de CCR[2].

En relación a los factores hederitarios, sólo un 25% de lo casos de CCR son de origen familiar. Los síndromes de origen hereditario que predisponen al CCR se dividen en polipósicos, siendo el más frecuente la Poliposis cólica familiar ("familial adenomatous polyposis", FAP) asociada con mutaciones en el gen APC; y los no polipósicos, como el síndrome de Lynch. Este último está asociado con mutaciones en línea germinal de genes del sistema de reparación de bases desapareadas (MMR)

del ADN, principalmente MLH1 y MSH2, que se heredan de forma autosómica dominante. Por otro lado, los antecedentes de enfermedades colorrectales, como son los pólipos adenomatosos (adenomas), o la enfermedad inflamatoria intestinal ("inflammatory bowel disease", IBD), que incluye la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn, son factores adicionales que aumentan el riesgo de padecer CCR[3].

El 75% de los casos de CCR son esporádicos, es decir no cuentan con factores hereditarios que influyan en su evolución. El CCR hereditario se desarrolla por la acumulación de alteraciones epigenéticas o genéticas a lo largo de toda la vida.

La transformación del epitelio colónico y su progresión hasta un fenotipo maligno sucede secuencialmente, pasando de focos de criptas aberrantes, a adenoma y posteriormente, a carcinoma. Las mutaciones en *K-RAS, B-RAF* y *APC* son eventos tempranos, mientras que las deleciones en *DCC* y *Smad4* o mutaciones en *p53* son eventos tardíos en el proceso de transformación del epitelio colónico[4] (**figura 2**).

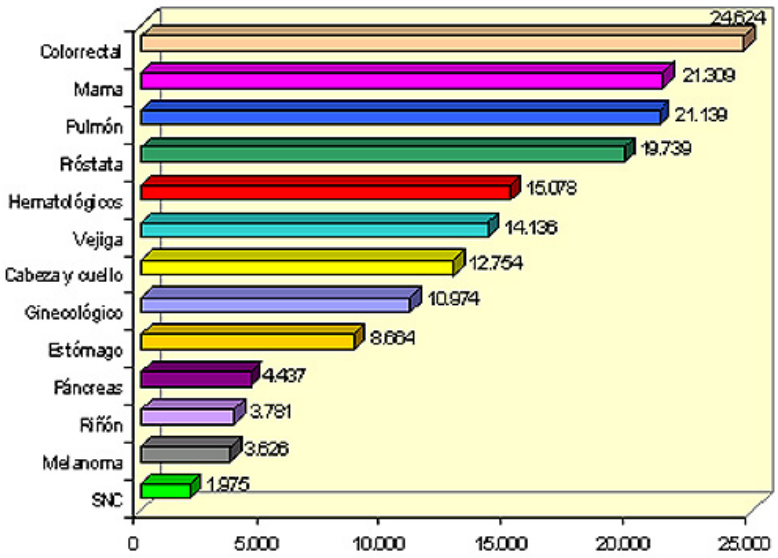


Figura 1. Incidencia de cáncer en España, en el período 2009-2011, clasificado por tipos tumorales [5]

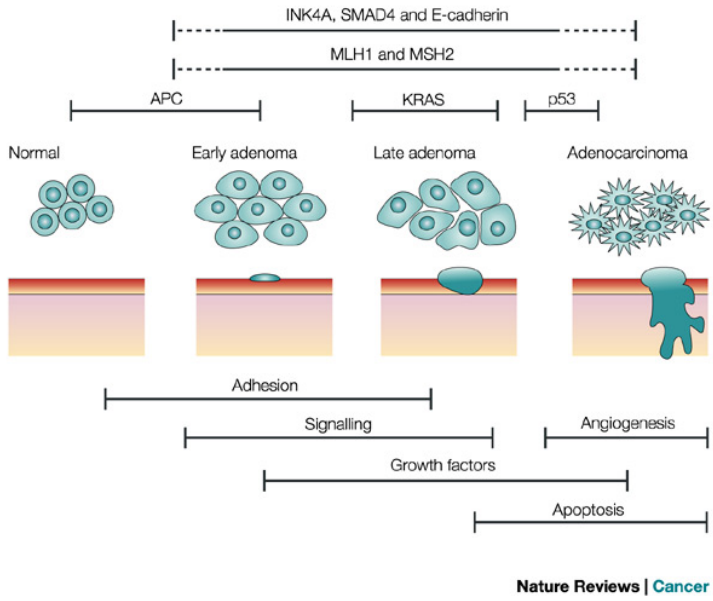


Figura 2. Secuencia temporal de la transformación adenoma-carcinoma en cáncer colorrectal [6]

La diseminación tumoral juega un papel determinante en la malignidad y en la supervivencia de los pacientes. En el momento del diagnóstico, la mayoría de los pacientes con carcinomas, incluído el CCR, están afectados por metástasis macroscópicas visibles, o micrometástasis subclínicas cuya progresión es la causa principal de su muerte[7].

1.2 Metástasis

1.2.1 Mecanismos moleculares asociados con la vascularización tumoral y el desarrollo de metástasis en cáncer colorrectal humano

La metástasis es un proceso que implica el escape de las células tumorales del tumor primario, su acceso a los vasos linfáticos (diseminación linfática), sanguíneos (diseminación hematógena) y/o líquidos intersticiales (diseminación transcelómicas) y la colonización y crecimiento de éstas células tumorales en órganos distantes [4] (**figura 3**). Las metástasis hepáticas son frecuentes en CCR y tienen gran importancia clínica ya que la mayoria de los pacientes acaban desarrollándolas, lo que limita su supervivencia.

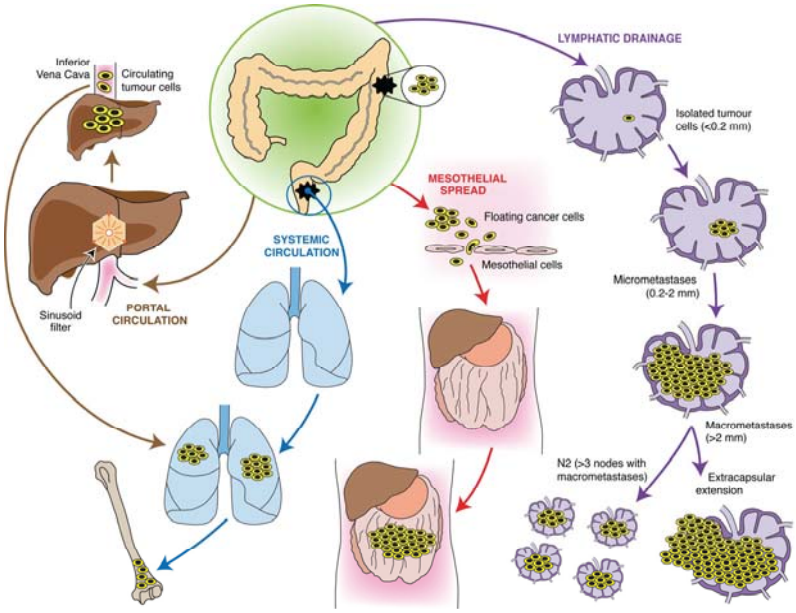


Figura 3. Vías para el desarrollo de metástasis en cáncer colorrectal. a) circulación portal hacia el hígado y posterior salida a la circulación sistemática, b) diseminación mesotelial hacía el peritoneo, c) diseminación linfática. [8]

La linfangiogénesis y la vasculogénesis son esenciales para el crecimiento del tumor primario y de los focos metastásicos en los órganos diana [9]. Factores secretados por el tumor primario juegan un papel relevante en estos procesos [10]. Los tumores con un alto grado de vascularización se asocian con mayor tasa metastásica que los escasamente vascularizados [11]. Miembros de la familia de proteínas VEGF: VEGF-C y VEGF-D, secretados principalmente por el tumor, a través de la activación de su receptor VEGFR3, expresado en células endoteliales, están implicados en la proliferación de los vasos linfáticos tumorales (ó linfangiogénesis) [12]. Por otra parte, VEGF-A participa en la diseminación hematógena, mediante la inducción de la vasculogénesis, uniéndose a los receptores VEGFR-1 y VEGFR-2 [13]. En CCR se ha descrito una correlación entre la

expresión de VEGF-C y VEGF-D y la formación de vasos linfáticos en el tumor primario y formación de metástasis en ganglios regionales [14].

1.2.2 Estroma tumoral, diseminación metastásica y tropismo

El tumor primario está formado por un microentorno complejo, que comprende no sólo las células tumorales, sino otros tipos celulares como son las células endoteliales, que componen el sistema linfático y sanguíneo, pericitos, fibroblastos y células derivadas de precursores celulares de la médula ósea (BMDCs) como macrófagos, neutrófilos, mastocitos y células mieloides. Todos estos tipos celulares derivan de las células supresoras mieloides (MDSCs) o células madre mesenquimales (MSC)[15] (**figura 4**)

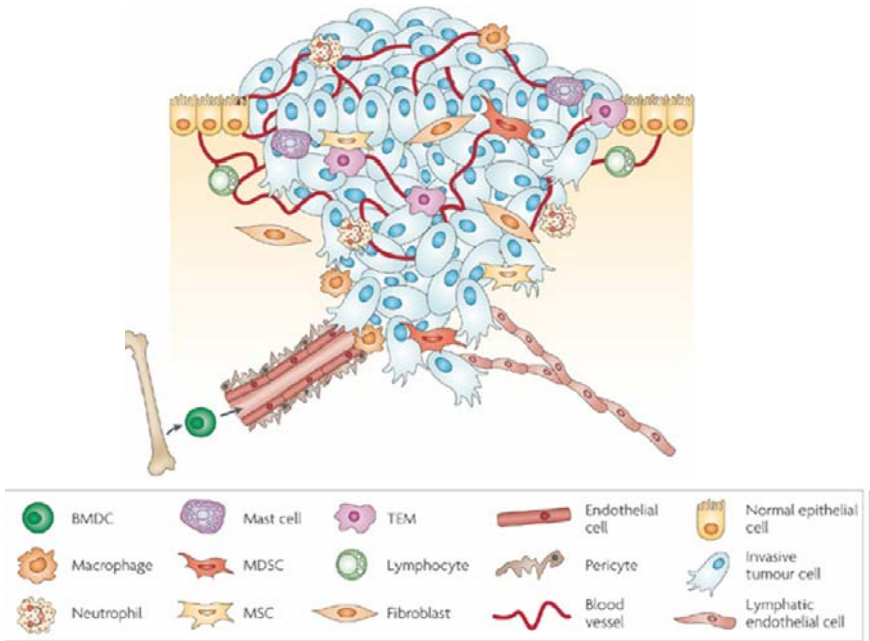


Figura 4. Componentes celulares del microentorno del tumor primario[15]

Actualmente, existen varias teorías que revelan un rol activo del microentorno tumoral en la diseminación metastásica. La teoría de la

colonización dirigida por parte de la célula tumoral sólo hacia determinados órganos (tropismo), coexiste con la idea de hace una década, de que los órganos implicados en metástasis reflejan la retención de las células tumorales en los capilares locales. En cáncer de colon, las metástasis hepáticas se forman, en parte, porque las células tumorales viajan inicialmente hasta el hígado a través de la circulación hepática portal. Algunas de estas células quedan atrapadas en los capilares hepáticos generando las metástasis. Las células que escapan de los capilares del hígado viajan por la vena cava y terminan atrapadas en los capilares del pulmón formando las metástasis pulmonares.

Se ha propuesto que la formación de las metástasis puede deberse a la capacidad que tiene una pequeña proporción de células tumorales de sobrevivir, invadir y crecer en un medio particular (formado por el nicho premetastásico) al contar con las mutaciones apropiadas que les confieren estas capacidades [16].

Trabajos recientes han descrito que el tropismo hacia determinados órganos está mediado por citoquinas, quimioquinas y/o proteasas, producidas por el tumor primario, que son las responsables de preparar el microentorno para favorecer la migración, la invasión, y la implantación de la célula tumoral, en tejidos concretos , asociándose con un determinado patrón de diseminación tumoral específico[11]. Además, la expresión y regulación anormal de las citoquinas y/o quimioquinas está implicada, también, en el proceso de migración, proliferación y diferenciación del sistema vascular, facilitando la diseminación metastásica.

Aún teniendo en cuenta un rol pasivo del microentorno en la formación del nicho metastásico; la adhesión y la invasión activa son necesarias para la colonización y el crecimiento tumoral posterior [17]. Tenemos aún un escaso conocimiento molecular de los primeros pasos implicados en este proceso. En algunos modelos, la proliferación se produce dentro de los vasos sanguíneos, y su posterior ruptura permite que el foco metastásico crezca [18]. En otros modelos, las células tumorales extravasan y luego profileran. Las integrinas expresadas en la superficie de las células tumorales son importantes en este proceso, ya que se adhieren a proteínas de la matriz extracelular, como la laminina y la fibronectina [19]

Por otro lado, el grupo de Joan Massagué ha descrito patrones de expresión génica específicos de células tumorales que median la diseminación metastásica hacía órganos concretos. Este grupo identificó dos perfiles de expresión multigénica que median la diseminación hacia los huesos o hacia el pulmón en cáncer de mama [20, 21]. Además, han identificado y validado los genes implicados en el desarrollo de las metástasis en cerebro en éste tipo de neoplasia, proponiendo un mecanismo capaz de explicar el organotropismo hacia esta localización.

1.2.2 .1 Papel de CXCR4 y VEGF en metástasis.

Los precursores hematopoyéticos, movilizados desde la médula ósea, participan en el establecimiento del nicho pre-metastásico y la formación de focos metastásicos en los órganos diana [4]. Las células madre hematopoyéticas (HSC) expresan en su superficie el receptor de citoquinas CXCR4, cuya activación las moviliza hacia los órganos que secretan su ligando, SDF-1, siguiendo un gradiente de concentración creciente [22]. El

factor de crecimiento hematopoyético G-CSF, además de producir la expansión del pool de HSC, las moviliza induciendo la liberación de proteasas a partir de células mieloides maduras y reduciendo la afinidad de las HSCs por la medula ósea[23]. Las células madre tumorales expresan también CXCR4 y cooperan con las HSC para colonizar los órganos diana, explicando, en parte, el tropismo hacia órganos específicos [22]. Previamente a la movilización de las células tumorales, las HSC migran para formar el nicho premetastásico, secretar SDF-1 y reclutar a las células tumorales que expresan CXCR4 [24]. Por otra parte, se ha descrito que la estimulación de CXCR4, por su ligando SDF-1, determina la transición de micro a macrometástasis en un modelo de metástasis hepáticas y pulmonares de carcinoma colorrectal [25,26]. Este efecto se produce, posiblemente, por activación del "switch" angiogénico mediante la inducción de la expresión de VEGF, lo que requiere la activación de la vía de PI3K/AKT [27], una de las vías efectoras de RAS. De modo consistente con su participación en el proceso metastásico, la expresión de CXCR4 en CCR humano aumenta la tasa de metástasis hepáticas y el riesgo de recurrencia lo que produce una disminución de la tasa de supervivencia [28]. La activación de la señalización a partir del receptor CXCR4 puede ser activado por el oncogén K-RAS[29].

1.2.2 .2 Papel de GCSF en metástasis.

El G-CSF, o factor estimulante y movilizador de colonias de granulocitos, es una citoquina, de naturaleza glicoproteíca, secretada por las células del endotelio, los macrófagos y células precursoras del sistema inmune. Su función fisiológica consiste en estimular la producción de granulocitos y células madre de la médula ósea y movilizarlas al torrente circulatorio[30].

Por otro lado, este factor estimula la supervivencia, proliferación y diferenciación de los precursores de los neutrófilos hacia neutrófilos, a través del receptor de G-CSF (GCSF-R) y activación de las vías de señalización (JAK/STAT), RAS/MAPK y PI3K/AKT, potenciando de este modo su función [31,32].

El papel de los neutrófilos en el sistema inmune y en el proceso inflamatorio es ampliamente conocida, actuando como primera barrera de protección contra patógenos. Su citoplasma contiene abundantes enzimas líticas y fagocíticas que destruyen a las bacterias y los hongos en respuesta a estímulos inflamatorios. La liberación de los neutrófilos desde los vasos sanguíneos está condicionada por la liberación de histamina (por mastocitos) y TNF-α (secretada por macrófagos), proteínas que actúan sobre las células del endotelio del vaso, induciendo su activación a través de la expresión de selectina-E. Los neutrófilos activados mediante IL-8 pueden unirse a la selectina-E a través de su ligando glucídico. De esa manera, son capaces de estar presentes en tejidos al poco tiempo después del inicio de la infección.

El receptor de G-CSF se expresa principalmente en neutrofilos maduros, monocitos, células endoteliales[33] y células progenitoras hematopoyéticas (HSPCs)[34]. Además, se expresa en líneas celulares tumorales derivadas de carcinoma humano de células pequeñas del pulmón[35], astrocitoma[36], cáncer de ovario[37], cáncer de vejiga[38], carcinoma de nasofaríngе [39] y en CCR[40]. Su sobrexpresión se asocia con mal pronóstico[39] , con crecimiento tumoral y neovascularización in vivo[41].

El G-CSF se utiliza en la práctica clínica para la movilización autóloga y alogénica de células madre, para aumentar el número de neutrófilos

circulantes en los pacientes con neutropenia como consecuencia del tratamiento quimioterápico, y potenciar el sistema inmune en leucemias y neumonías.

G-CSF ha demostrado ser un factor prometastásico en diversas publicaciones previas. Varios estudios, entre ellos los realizados por el grupo de Kaplan et al., 2006, demostraron que G-CSF es capaz de inducir la movilización de las células derivadas de la médula ósea que son dirigidas hacia el futuro lugar de metástasis, y participar activamente en la formación del nicho premetastásico para interaccionar con las células tumorales que migran desde el tumor primario y establecer las metástasis[15,24,42].

1.2.2 .3 Papel de las integrinas en cáncer.

Las integrinas constituyen una familia de receptores transmembrana compuestos por complejos heterodiméricos de cadenas alfa y beta unidas de manera no covalente. Las integrinas son reguladas por moléculas de señalización intracelular que incluyen a las proteínas de la matriz extracelular (por ejemplo: fibronectina, laminina, vitronectina, colágeno, trombospodina, entactina, fibrinógeno), las moléculas de adhesión intercelular (p.e. I-CAM) y de adhesión vascular (p.e VCAM). Las integrinas participan en la motilidad celular y en la activación de vías de señalización como la vía de ERK1/2[43]. Además, median el crecimiento y diferenciación celular, inducido por la matriz extracelular (ECM), y participan en la interacción célula-célula y célula-matriz extracelular, transduciendo señales desde la ECM hacia el interior de la célula y viceversa, participando en el proceso de migración celular, invasión, e intra

y extravasación, y por lo tanto, en el crecimiento del tumor y el desarrollo de las metástasis. En definitiva, la matriz extracelular juega un papel importante en el desarrollo oncogénico, el mantenimiento de la fisiología celular y reparación tisular, así como el crecimiento tumoral[44-46]. De modo consistente, la alteración en la expresión de las integrinas está asociada con la progresión tumoral y la diseminación metastásica[47-49].

La transformación hacia la malignidad está caracterizada por la desorganización del citoesqueleto, reducción de la adhesión y alteración de las respuestas adhesión-dependientes. La transducción de señal mediada por integrinas está influenciada por cambios en su estructura asociados a la alteración de su nivel de expresión y/o fosforilación. De este modo, algunas integrinas pueden dejar de expresarse o bien sobreexpresarse mientras otras se fosforilan, afectando su unión al ligando [48,50].

Estudios sobre la expresión de las integrinas en diversos tipos tumorales sugieren que varias subunidades de integrinas pueden contribuir tanto positiva como negativamente en el fenotipo de las células transformadas [51].

Por otro lado, las integrinas han estado implicadas en la formación de metástasis hacia determinados órganos[52]. Pecheur et al, demostraron que la sobreexpresión de la integrina αvβ3 en células tumorales CHO (Chinese Hamster Ovary) aumenta la frecuencia, el número y el área de las metástasis óseas osteolíticas en ratones inmunodeprimidos, a través del aumento de la invasión tumoral y la adhesión al hueso mineralizado y a las proteínas de la matriz ósea (BSP y colágeno tipo I). [53] Por otro lado, la integrina β4 se ha relacionado con la formación de metástasis pulmonares en cáncer de mama[54].

Por lo tanto, el conocimiento de las vías de señalización que involucran las integrinas y la obtención del perfil de expresión de las mismas en tumores, permitirían crear una signatura de la superficie celular propia de cada tumor, lo que posibilitaría su desarrollo como marcadores de progresión, con capacidad pronóstica y diagnóstica.

1.2.3. Activación oncogénica y transición de micro- a macrometástasis.

De todos los procesos implicados en la formación de metástasis (proteólisis, invasión tisular, intravasación, extravasación, etc.), el crecimiento de las células tumorales en el órgano colonizado parece ser el más limitante[7]. En varios tipos tumorales, se han observado focos tumorales durmientes de 1-2 mm de diámetro (micrometástasis), que son incapaces de aumentar su masa debido a la limitada difusión de nutrientes. Estos focos no son quiescentes ya que presentan elevada tasa apoptótica y mitótica [9], y sólamente abandonan su estado hipovascular, cuando adquieren la capacidad de activar la angiogénesis ("swicht" angiogénico) para realizar la transición de micro- a macrometástasis[10]. Algunos oncogenes son capaces de inducir esta activación. Por ejemplo, la transformación de fibroblastos de ratón por el oncogén K-RAS val12 (K12V) inhibe la apoptosis y aumenta la proliferación celular en un modelo de metástasis hepáticas. Estos efectos conducen a la activación de la transicición de micro- a macrometástasis tras la activación del "switch" angiogénico [55].

1.3 Inestabilidad genómica

Existen dos tipos fundamentales de inestabilidad genética en cáncer colorrectal. Una de ellas es la inestabilidad cromosómica (CIN), que se asocia con pérdidas, translocaciones o amplificaciones cromosómicas, aneuploidia y con estabilidad de microsatélites, habiéndose detectado en el 85% de pacientes con CCR. Otro tipo de inestabilidad es la de microsatélites (MSI), que se asocia con diploidía y alteración del sistema de reparación del apareamiento de bases, que afecta al 15% restante de pacientes [56,57], que genera mutaciones transformantes en oncogenes o en genes supresores de tumores –fenotipo mutador- [58]. La frecuencia de mutaciones en K-RAS Asp12 es más alta en CCR MSS que en los MSI.

2. PROTOONCOGENES RAS

Los protooncogenes *H-Ras, N-Ras* y *K-Ras* codifican para una proteína de 21-kDa, que tiene capacidad GTPasa intrínseca, y es capaz de unirse a GDP (forma inactiva) y GTP (forma activada) (**figura 5**). Las proteínas RAS son un conjunto de "interruptores" moleculares implicados en una gran variedad de rutas de señalización celular que controlan fenómenos tan diversos como la integridad del citoesqueleto, proliferación, diferenciación, adhesión, apoptosis y migración celular. Una de las rutas más importantes en la que está implicada RAS es la de quinasas activadas por mitógenos (MAPK *Mitogen-Activated Protein Kinases*), las cuales activan a otras proteínas kinasas y genes reguladores de proteínas, que afectan a la proliferación y diferenciación celular. Otras vías de activación mediadas por Ras son las vías PI3K/AKT y RalGDS/Ral/RalBP1 (**figura 6**).

Las proteínas RAS (H-RAS, N-RAS y K-RAS) comparten entre ellas el 85% de su secuencia de aminoácidos, diferenciándose únicamente en su fragmento C-terminal. Las distintas proteínas RAS se expresan de manera diferencial en los diversos tipos celulares, lo que explicaría las distintas frecuencias de mutaciones e los genes Ras encontradas en los diferentes tipos tumorales. La mayoría de las mutaciones afectando a los genes de esta familia se producen en el gen *K-RAS*, que están presentes en casi todos (95%) los adenocarcinomas pancreáticos y en un porcentaje elevado (30-50%) de tumores de pulmón y colon; mientras que las mutaciones en *N-RAS* son menos habituales y se detectan principalmente en leucemias. Más infrecuentes son las mutaciones en H-RAS, que se observan sólo en algunos tipos de cáncer de piel, vejiga y riñón [59].

La mutación en la proteína K-RAS impide la hidrólisis del GTP cuando está unido, lo que les permite permanecer en estado activado (*estado ON*) y le confiere capacidad oncogénica (**figura 5**). Las principales y más frecuentes mutaciones puntuales de los genes RAS se observan en los codones 12, 13 y 61, e inducen distintos cambios de aminoácido en las correspondientes oncoproteínas [60]. Los codones 12 y 13 en la forma salvaje del gen están codificados por GGC (glicina). Las mutaciones más frecuentes producen la sustitución de este aminoácido por Valina o Aspártico en el codón 12 o por Aspártico en codón 13 (K12V o K13D). Estas mutaciones generan proteínas RAS insensibles a la acción de proteínas activadoras de GTPasas (GAPs, del inglés GTPase Activating Proteins o GEFs) por lo que permanecen en estado activo, ya que RAS requiere GAP para ser inactivada, y no puede inactivarse debido al cambio conformacional generado por la mutación que impide la exposición del dominio G que contiene la subunidad alfa de las proteínas G heterotriméricas dónde GAP se une. Esta activación de Ras induce la fosforilación y activación constitutiva de las vías Raf/Erk, PI3K/AKT y RalGDS/Ral/RalBP1 y la transformación celular [61]. No obstante, es importante señalar que las distintas mutaciones en la proteinas Ras inducen cambios conformacionales distintos en función de la naturaleza de la mutación (.p.e K12V o K13D). Consecuentemente, cada mutación puntual puede activar diferencialmente a los efectores distales a Ras y asociarse con distinta señalización y activación diferencial de procesos celulares, como la proliferación, la regulación de la muerte celuar o la migración.

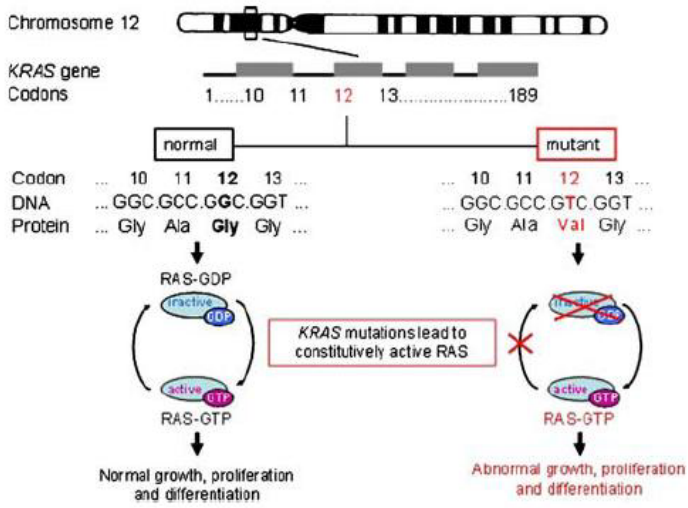


Figura 5. Ciclo de activación de las proteínas RAS.
EL gen *KRAS* localizado en el cromosoma 12, cuando presenta una mutacion en el codón 12, la más frecuentel en CCR, activa constitutivamente las vías dístales a RAS [62].

Recientemente se ha demostrado la presencia de una mutación en el codón 19 del gen *K-RAS*, sin embargo, parece ser menos frecuente que las detectadas en los codones 12, 13 o 61, ya que sólo se ha encontrado en tres de 600 casos, [63].

Otras de las mutaciones frecuentemente observadas en CCR son BRAF y PI3KCA. BRAF es una proteína kinasa involucrada en crecimiento celular y señalización intracelular. Se encuentra habitualmente mutada en cáncer, con un 40-60 % en melanoma, 40-70 % en carcinoma de tiroide papilar y 5-15 % en CCR. BRAF es un efector de KRAS que participa en la vía de RAS/BRAF/MAPK (**figura 6**). La mutación más frecuente en BRAF ocurre en el nucleótido 1796 en el que una timina es sustituída por una adenina, originando la mutación V600E y generando un aumento de la proliferación celular, de modo similar a la producida por la mutación en KRAS [64,65].

Las mutaciones en PIK3CA que codifica para la unidad catalítica de PI3K fueron descubiertas en cáncer de mama, endometrio, pulmón, cerebro y colon, siendo las más frecuentes las encontradas en el exon 9 y 20. En cáncer de colon, está presente en un 11 a 14 % de los casos. PI3K juega un papel importante en una de las vías dístales a KRAS, la vía de PI3K-AKT, involucrada en tumorogénesis fundamentalmente a través de la la inhibición de la muerte celular y la estimulación de la migración celular [66].

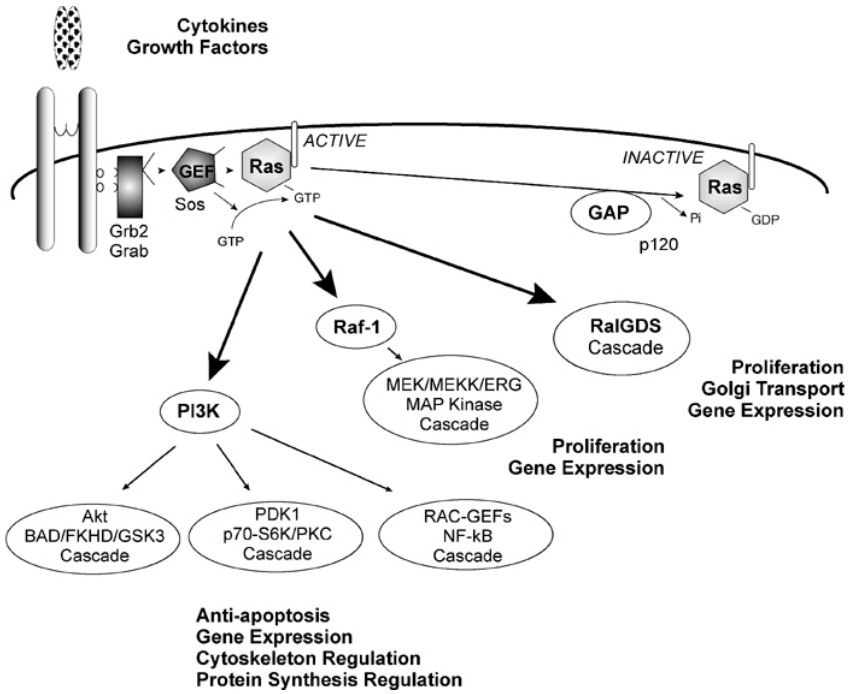


Figura 6. Vías de señalización de K-RAS[67]

En pacientes con CCR, el estado del gen K-RAS (salvaje o mutado) en el tumor es un factor esencial en la toma de decisiones terapéuticas, en relación con la utilización de inhibidores del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) [68]. Estudios recientes han demostrado que, en CCR metastático, la mutación en K-ras, está asociada con una falta de respuesta al tratamiento con anticuerpos anti-EGFR (ej. cetuximab o

panitumumab), que se utilizan en combinación con los citotóxicos clásicos, oxaliplatino y/o 5-Fluorouracilo [68]. Los tumores con K-RAS no mutado responden al tratamiento con Cetuximab y/o Panitumumab, ya que estos anticuerpos neutralizan la unión de los ligandos al receptor EGFR, bloqueando así el inicio de la señalización (**figura 7**). En cambio, los tumores portadores de K-RAS mutado presentan la activación constitutiva de las vías de señalización distales de manera contínua, con independencia de si el propio EGFR está activado o inhibido terapéuticamente [69,70]. Por ese motivo, los pacientes con tumores que tienen K-RAS mutado no responden a las terapias anti-EGFR.

Sin embargo, estudios recientes indican que no todas las mutaciones en K-RAS tienen las mismas características biológicas en cuanto a respuesta tumoral, siendo la mutación en el codón 13 la que puede estar asociada con mejor respuesta al tratamiento con fármacos anti-EGFR [71]

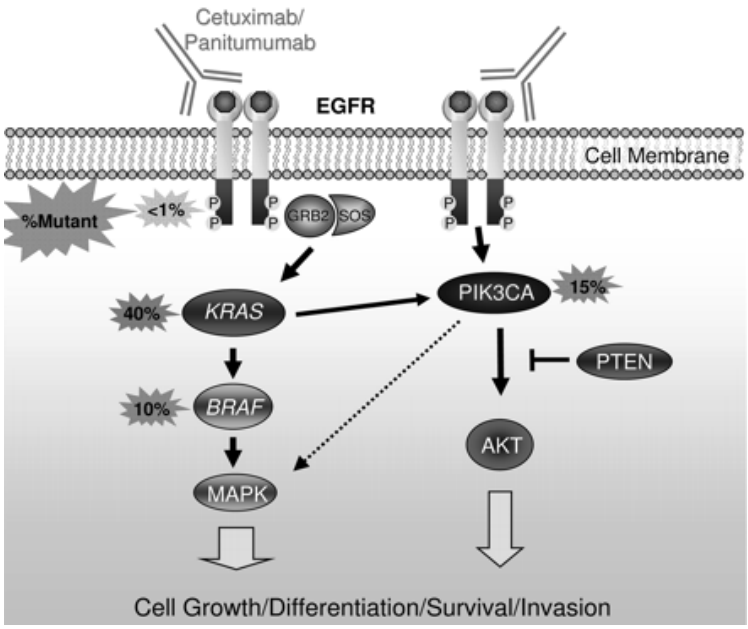


Figura 7. Tipo de respuesta tumoral a la terapia anti-EGFR en función de la presencia de mutaciones en K-RAS, B-RAF o PI3K en CCR [72]

En el tratamiento del CCR se utilizan, además, fármacos antiangiogénicos, como el anticuerpo monoclonal Bevacizumab que actúa bloqueando VEGF, el ligando del receptor VEGFR y como consecuencia, inhibiendo el desarrollo de vasos sanguineos tumorales. La respuesta tumoral a este fármaco es independiente del estado mutacional del gen K-RAS (**figura 8**).

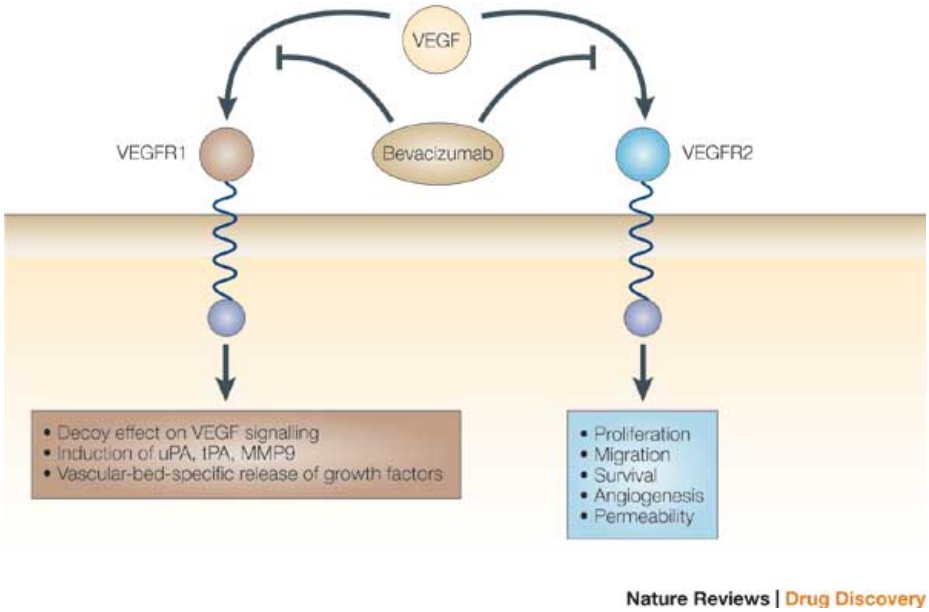


Figura 8. Efecto antitumoral y antiangiogénico del anticuerpo monoclonal Bevacizumab [73]

2.1. K-RAS y metástasis

El codón o el aminoácido alterado en el oncogén *K-RAS* afecta la agresividad de los tumores colorrectales humanos. De este modo, se han descrito diferencias en cuanto a la capacidad transformante de los oncogenes H- o K-RAS portadores de distintas mutaciones, tanto *in vitro* como *in vivo*. Así, K-RAS con una mutación en el *codón* 13 (K13) se

asocia con benignidad, mientras que *K-RAS* mutado en el *codón* 12 (K12) lo hace con agresividad. Además, K-RASD12 (aspártico 12) es frecuente en focos de criptas aberrantes y en lesiones no metastásicas, mientras que K-RASV12 está presente en adenocarcinomas y en lesiones metastásicas [74,75]. Por otra parte, K-RASV12 incrementa la tasa de recidiva tumoral y se asocia con una disminución de la supervivencia del paciente en CCR [76-78]. El oncogén K-RAS con una mutación en el codón 12 es más agresivo *in vitro* que la mutación en el codón 13. Este efecto es fundamentalmente consecuencia de un aumento de la resistencia a apoptosis por activación de la ruta PI3K/AKT [79]. De modo similar, *in vivo* distintos oncogenes K-RAS generan sarcomas de morfología y agresividad diferente tras la implantación de fibroblastos transformados en músculo [80]. Además, nuestro grupo ha demostrado que, *in vivo*, *K-RAS*V12, interacciona con Raf y activa fundamentalmente la ruta Erk, lo que induce mayor tasa proliferativa y mitótica que K-RASD12. A diferencia de V12, la mutación D12 no interacciona con Raf, y en lugar de utilizar la vía canónica Erk (MAPK), transduce señal a través de las vías de PI3K, JNK y p38 [81]. Estos resultados indican que distintos mutantes de K-RAS activan diferencialmente rutas de señalización distal, generando diferencias en el fenotipo transformante del tumor primario, un aspecto que en este trabajo proponemos estudiar en las metástasis.

El oncogén RAS estimula la angiogénesis a través de la inducción de la secreción de VEGF-A y de la inhibición de TPS-1 [82]. Bajos niveles de expresión del oncogén RAS mantienen los focos metastásicos de cáncer de mama en estado durmiente y no angiogénico, mientras que niveles elevados de este oncogén inducen la expresión de VEGF-A y su transición a tumores angiogénicos de crecimiento progresivo [83]. Por otra parte, en

carcinoma de tiroides, K12V aumenta la expresión de CXCR4, participando en la colonización metastásica, mientras que este efecto es bloqueado por un inhibidor de Erk [26].

3. MODELOS ANIMALES DE CÁNCER COLORRECTAL Y METÁSTASIS CON EXPRESIÓN DEL ONCOGÉN K-RAS

El ratón de laboratorio (*Mus muculus*) es uno de los mejores modelos para ser utilizado en oncología experimental, por su pequeño tamaño, su facilidad de reproducción en cautividad, período de vida corto (de aproximadamente 3 años), su similitud fisiológica y molecular con el humano y por contar con un genoma totalmente secuenciado.

Entre los modelos murinos más usados para el estudio del cáncer se encuentran los xenógrafos que se generan por implantación de líneas celulares tumorales o explantes humanos, los modelos generados por carcinógenesis química y/o viral y los modelos murinos modificados genéticamente (GEM).

Un buen modelo de metástasis debe replicar la histopatología tisular, los distintos pasos implicados en el proceso de diseminación y las alteraciones moleculares observadas en el tumor primario y en las metástasis en humanos.

Tradicionalmente, el estudio de las metástasis se ha realizado en modelos de colonización pulmonar tras administración intravenosa de células transformadas, que para el H-RAS, este tipo de colonización se produce cuando la vía Erk está activada constitutivamente [84]. Sin embargo, el uso de células mesenquimales de especies diferentes a la humana, o la inyección intravenosa de células tumorales, que quedan inespecíficamente atrapadas en el pulmón no reproducen la diseminación linfática y hematógena de las células epiteliales humanas transformadas, que se

observa en clínica. Por otra parte, los modelos de ratón modificados genéticamente (GEM) por activación de K-RAS *("knockin")* replican las fases tempranas del cáncer de colon, pero son ineficientes a la hora de producir metástasis [85]. Estos resultados son consistentes con la existencia de diferencias en la transformación entre especies (hombre y ratón) para el mismo tipo celular (p.e. fibroblastos), y entre tipos celulares distintos (fibroblastos vs. células de mama) dentro de una misma especie (p.e. hombre) [86]. Por tanto, un buen modelo de cáncer de colon requiere el uso de células transformadas a partir del epitelio colónico humano. La implantación ortotópica de tumores humanos en ratón inmunodeprimido genera una elevada tasa de metástasis [87]. El grupo de Hoffman utiliza la implantación quirúrgica ortotópica (SOI) de fragmentos tumorales, en la pared del colon; sin embargo, a diferencia del modelo de implantación ortotópica, OCMI, generado por nuestro grupo [88], que microinyecta células en la submucosa de la pared del colon, en la que se encuentra la mayor densidad de vasos linfáticos y sanguíneos, el procedimiento SOI no genera tumores que diseminen a ganglios linfáticos regionales, ni permite la manipulación genética *ex vivo* de las células tumorales [81] (**figura 9**). Los modelos tumorales generados mediante OCMI acortan el tiempo experimental respecto a los GEM, ya que su estudio se puede completar en 4-5 meses en lugar de los 1.5-2 años que toma el generar un *knockout* o un *knockin* [81]. Por otra parte, el procedimiento OCMI genera modelos con una tasa de metástasis significativamente mayor que los modelos "knockin" o "knockout". Es por ello que, la utilización del modelo OCMI, es más adecuada para el estudio de cáncer avanzado que la utilización de los GEM (**tabla1**). La **figura 10** muestra un resumen de la utilidad de los distintos modelos animales en función de los procesos concretos a estudiar a lo largo del curso temporal de la progresión tumoral.

Por otro lado, los ensayos de metástasis experimentales (EMA) o espontáneos (SMA), en los que se inyecta una suspensión de células en una localización heterotópica, como son la vena de la cola o la planta del pie[89-91], no replican la diseminación metastásica observada en pacientes con CCR. Por otra parte, la inyección de células colorrectales en el peritoneo, descrita por Goldrosen (1980)[92], produce bajas tasas de injerto y de metástasis, limitando el uso de este procedimiento para el estudio del CCR avanzado.

Figura 9. Tipos de implantación quirúrgica utilizadas en la generación de los modelos animales ortotópicos de CCR.
Implantación ortotópica quirúrgica (SOI) de fragmentos de tumor (a); Microinyección ortotópica (OCMI) de células tumorales (b)

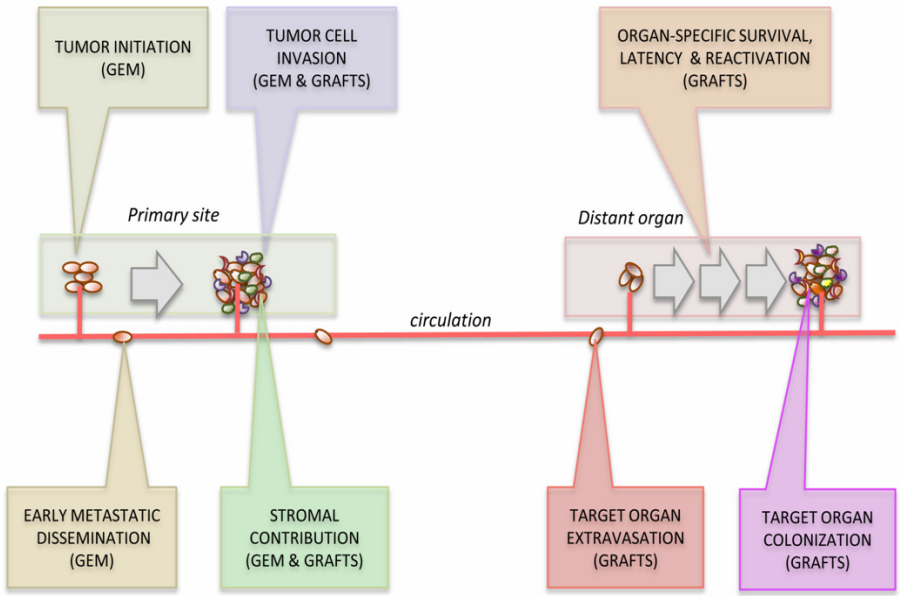


Figura 10. Contribución de los diferentes modelos animales al estudio de las diferentes etapas de la diseminación metastásica.
GEM: Animales modificados genéticamente, GRAFTS: implantación de xenografts o "allograft" [93].

En la Tabla 1 se describen las ventajas e inconvenientes de cada modelo animal para el estudio del proceso tumoral y de su utilización en desarrollo preclínico de fármacos.

Tabla 1. Ventajas e inconvenientes del uso de OCMI frente a otros procedimientos para la generación de modelos animales de CCR.

	Implantación (tumores sólidos)		Inyección de células en suspensión		
	SC	SOI	HET		ORT
VENTAJAS			EMA	SMA	
-Procedimiento quirúrgico sencillo	√		√	√	
-Crecimiento ortotópico		√			√
-Tasa de injerto y elevada diseminación metastásica		√			√
-Manipulación ex vivo			√	√	
-Relación in vivo/ in vitro			√	√	√
-Replicación de la enfermedad		√			√
DESVENTAJAS					
-Procedimiento quirúrgico complejo		√			√
-Microambiente ectópico	√		√	√	
-Baja tasa de injerto					√
-Baja tasa de diseminación metastásica	√				√
CAPACIDADES					
-Colonización de órganos distantes		√	√	√	√
-Crecimiento de tumor local	√	√	√	√	√
-Uso en estudios preclínicos	√	√			√
-Uso en estudios de metastásis		√			√
-Uso para el anàlisis de mecanismos moleculares					√

***Abreviaturas**: SC, subcutáneo; ORT: ortotópico; HET, heterotópico; EMA, ensayo experimental de metástasis; SMA, ensayo de metástasis espontáneas.*

II. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

El modelo de microinyección ortotópica, OCMI, desarrollado previamente en nuestro laboratorio[88], genera tumores locales en el colon de ratones inmuno-deprimidos, cuyo crecimiento causa su muerte cuando la mayoría de los focos metastáticos son aún microscópicos. Por otra parte, se ha descrito en la literatura que algunas líneas celulares de cáncer colorrectal humano, tras su cultivo *in vitro*, son tumorigénicas; sin embargo, pierden su capacidad metastásica, incluso si se han establecido a partir de metástasis humanas. Esta observación sugiere la posibilidad de que *in vitro*, las células tumorales generen una adaptación a este nuevo entorno, asociada con cambios moleculares que podrían ser los responsables de la pérdida de la diseminación metastásica. Estas alteraciones moleculares podrían suceder como consecuencia de la falta de interacción de las células tumorales con las células del estroma (p.e. fibroblastos) o con sus productos (factores de crecimiento local o proteínas de la matriz extracelular secretados por células del estroma), un proceso que únicamente ocurre *in vivo*.

Por este motivo, como **primer objetivo** de esta tesis doctoral, nos proponemos mejorar el modelo de inyección ortotópica OCMI de CCR, desarrollando dos estrategias dirigidas a aumentar la eficiencia metastásica de las líneas celulares de CCR: 1) Indución de un aumento en el número de neutrófilos circulantes, movilizando células derivadas de la medula ósea (BMDC) para favorecer la formación de metástasis, y 2) Desarrollo de un protocolo de condicionamiento subcutáneo de las células tumorales, previamente a su inyección ortotópica, que favorezca la interacción entre células tumorales y estromales (a través de señalización paracrina o con las proteínas de la matriz extracelular). Nuestra meta es generar un modelo de CCR metastásico, en el que sean las metástasis y no el tumor primario lo que limite la supervivencia de los animales.

Por otra parte, la literatura sobre transformación por oncogenes RAS suele tratar de forma similar a todas sus mutaciones puntuales, atribuyéndoles la misma capacidad transformante, hecho que ha podido conducir a conclusiones contradictorias en cuanto a su capacidad pronóstica [94]. Esta controversia en relación con su uso como marcador pronóstico podría explicarse por la existencia de diferencias en capacidad transformante de los oncogenes RAS dependiendo del codón mutado al generar oncoproteínas con estructura diferente. Observaciones previas de varios grupos apoyan esta posibilidad. Por ejemplo, se sabe que las mutaciones puntuales oncogénicas cambian la conformación de la proteína RAS, volviéndola insensible a la regulación por GAP o NF1, y alteran la afinidad de los Switchs I y II por los efectores Raf-1, RalGDS o PI3K. De este modo, la afinidad de los mutantes K-RASAsp13 (K13D) y K-RASVal12 (K12V) respecto a estos efectores es significativamente distinta. De modo consistente con estos hallazgos, nuestro grupo ha observado previamente, en un modelo murino de sarcoma, la capacidad de distintos mutantes del oncogen K-RAS de generar diferentes tipos de sarcomas de partes blandas[80] asociados con una sobre-activación de la vía de PI3K/Akt, en el sarcoma más agresivo que porta la mutación K12V[75].

También se ha descrito que los tumores colorrectales que expresan el oncogen K12V se asocian con peor pronóstico que otras mutaciones puntuales como Asp12, Asp13, Cys12 o Ser12 [76]. K12V podría incrementar su agresividad estimulando la formación de focos metastásicos, aumentando su proliferación e inhibiendo la apoptosis [55] y/o estimulando la angiogénesis mediante la inducción de la secreción de VEGF-A [82] y como consecuencia potenciaría la transición de micrometástasis a macrometástasis. En cambio, K13D se asocia con tumores benignos y con menor tasa de metástasis[95]. Estas diferencias

podrían deberse a la alteración de distintas vías de señalización en función de la mutación puntual en K-RAS, hecho que, como hemos indicado previamente, observamos en otros tipos tumorales, como el sarcoma de partes blandas [80].

Nuestra hipótesis de trabajo es que las distintas mutaciones en el oncogen K-RAS inducirán una señalización diferencial en las células de cáncer de colon humano, y que ésta distinta activación de las vías de señalización se asociará con diferente comportamiento biológico y generará un distinto patrón de metástasis en el modelo ortotópico. Consecuentemente, proponemos como **segundo objetivo**, evaluar si las células de CCR humano que expresan diferentes mutaciones del oncogén K-RAS (esto es: K12V o K13D) generan distinta tasa y patrón de metástasis y diferente grado de agresividad tumoral, y si estas diferencias se asocian con mecanismos distintos en términos de señalización celular. Para ello, transfectaremos vectores de expresión portadores de los distintos oncogenes RAS mutados en líneas celulares de CCR humano portadoras de K-RAS silvestre (Caco2, Colo 320 y SW48). A su vez, generaremos recombinantes que expresen K12V o K13D, en colaboración con el grupo de Alberto Bardelli (Universidad de Torino) en la línea celular de CCR humano SW48.

Este segundo objetivo incluye además del análisis de los distintos procedimientos dirigidos a aumentar la eficiencia metastásica y de las diferencias en capacidad metastásica entre los oncogenes K12V y K13D, su asociación con patrones de expresión y/o activación diferencial en cuanto a las proteínas que regulan la proliferación, muerte celular,

adhesión, invasión, diseminación tumoral y la vascularización del tumor primario y de los focos metastásicos.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Los objetivos específicos de esta tesis son:

1. Mejora del modelo OCMI de CCR metastásico, desarrollando dos estrategias dirigidas a aumentar la eficiencia metastásica de las líneas celulares de CCR y la evaluación de los mecanismos moleculares asociados:

1.1 Estudio del tiempo de supervivencia y patrón de diseminación metastásica en animales implantados ortotópicamente con la línea de CCR HCT116, administrando G-CSF.

1.2 Estudio del tiempo de supervivencia, patrón, y número y tamaño de metástasis en los distintos órganos diana de metástasis, comparando la implantación ortotópica directa de células de CCR HCT116 en el ciego de ratones inmunodeprimidos (grupo ORT) frente a esta implantación después de su pase subcutáneo previo (grupo SC+ORT).

1.3. Estudio de la asociación entre el patrón de diseminación tumoral linfática, hematógena y peritoneal en el grupo ORT y SC+ORT con la expresión o activación de proteínas que regulan la proliferación, muerte celular, adhesión, invasión, diseminación tumoral y su vascularización (AKT, MAPK, integrinas, Ki67, VEGF-A, ANGPT-2, IL-8 y CXCR4) tanto en tumor primario como en focos metastásicos.

2. Evaluación de la tasa, patrón de metástasis y agresividad de los clones que expresan K12V o K13D en células de CCR humano y su asociación con mecanismos moleculares específicos en relación con las distintos procesos implicados en la diseminación metastásica.

2.1. Obtención de transfectantes o recombinantes que expresen los oncogenes K-RAS con las mutaciones Val12 (K12V) y Asp13 (K13D), mediante la construcción de vectores de expresión y su transfección en las líneas de CCR Colo-320, Caco-2 o SW48 y su validación.

2.2. Estudio de la supervivencia, patrón de diseminación linfática, hematológica y peritoneal, y del número y tamaño de metástasis, tras la implantación ortotópica directa de células de CCR de los clones que expresen los oncogenes K12V o K13D, en el ciego de ratones inmunodeprimidos en comparación con la implantación en el ciego tras pase previo subcutáneo.

2.3. Estudio de la asociación entre el patrón de diseminación tumoral linfática, hematógena y peritoneal en los grupos K12V y K13D con la expresión o activación diferencial de proteínas que regulan la señalización distal a K-RAS (B-Raf/MAPK, PI3K/Akt) y las vías que regulan la proliferación, muerte celular, adhesión, invasión, diseminación tumoral y su vascularización (integrinas, Ki67, VEGF-A, ANGPT-2, IL-8 y CXCR4) tanto en tumor primario como los focos metastásicos.

II. METODOLOGÍA

1. MEJORA DEL MODELO DE MICROINYECCIÓN ORTOTÓPICA DE CCR

Para llevar a cabo el primer objetivo de esta tesis, se generaron distintos modelos ortotópicos de metástasis de cáncer colorrectal humano, en ratón atímico, por microinyección en el ciego mediante OCMI [88], utilizando la línea de CCR HCT116. Con intención de aumentar el patrón de diseminación metastásica del modelo OCMI, se utilizó como primera estrategia la movilización de células de la médula ósea a través de la administración, antes y después de la inyección ortotópica, de G-CSF (Sigma, Ref. G0407-5UG). Como segunda estrategia se utilizó el pase subcutáneo previo a la inyección ortotópica. A continuación se describen en detalle ambas metodologías:

1.1 Líneas celulares

Para generar los modelos animales de metástasis utilizamos la línea celular de cáncer colorrectal humano HCT116 (portadora de la mutación en K13D). Fue cultivada en medio DMEM suplementado con 10% FBS, 1% glutamina, 0.25% fungizona, y 1% penicilina/streptomicina (Life Technologies), hasta obtener el número de células necesario para su inyección en los animales.

1.2 Animales

Para generar los modelos animales de cáncer CCR metastásico se utilizaron ratones inmunodeprimidos de la cepa *Swiss nude* (Charles River Laboratories) hembras, de 5-6 semanas de edad y pesos comprendidos entre 18 y 20g. Los animales se estabularon a una temperatura de 22-24ºC

y un fotoperíodo de 12:12 horas, en un ambiente libre de patógenos (SPF), en armarios ventilados y jaulas protegidas con tapa y filtro, con viruta esterilizada en autoclave, comida irradiada y agua estéril.

Previamente a cualquier intervención quirúrgica, los ratones se anestesiaron con una solución de ketamina (100 mg/Kg) y xilacina (10 mg/kg) por administración intraperitoneal. Cada ratón se marcó con un número para su identificación y posterior seguimiento en cuanto a la evolución del crecimiento tumoral.

1.3 Aumento de la diseminación metastásica mediante administración G-CSF.

Para evaluar si la movilización y aumento en la circulación sanguínea de células madre hematopoyéticas, favorecía la diseminación metastásica, nos planteamos administrar G-CSF a ratones *Swiss nude* implantados ortotópicamente con células tumorales HCT-116. Para ello, se ramdomizaron los animales en dos grupos: Grupo Control (GC, n= 16) y Grupo Experimental G-CSF (GE, n=12). A los animales del Grupo Experimental se les administró 200 µL de G-CSF cada 24h, a una dosis de (30µg/kg) por vía subcutánea (s.c), diez días antes de la inyección de 2 millones de células HCT-116 (suspendidas en 50 µL de medio), en el ciego mediante OCMI. Posteriormente, se dejó que los animales siguieran un período de 2 días de recuperación post-operatoria y se continuó administrando G-CSF a la misma dosis, cada 24h, durante 5 días. A los animales del Grupo Control se les administró 200 µL de suero fisiológico siguiendo la misma pauta de administración que en el GE (**figura11**).

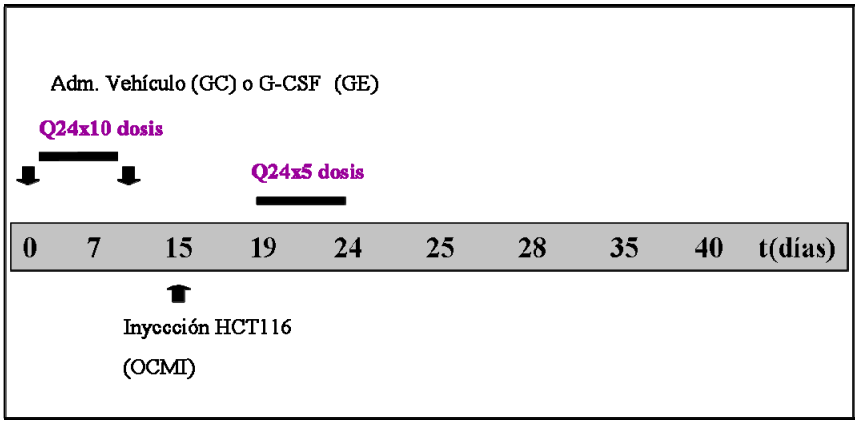


Figura 11. Pauta de administración de G-CSF e implantación de células HCT-116 en el ciego de ratones *Swiss nude*.
GC: grupo control, administrado con suero fisiológico; GE: grupo experimental administrado con G-CSF a una dosis de 30µg/kg. En color violeta se representa la frecuencia de las administraciones y el número de dosis.

Los ratones se pesaron y chequearon una vez por semana hasta el momento de su sacrificio.

Para cuantificar el efecto de G-CSF sobre la población de células hematopoyéticas, se seleccionaron aleatoramente cinco animales de cada grupo 48h antes de la implantación de las células tumorales, y se les extrajo 200 µL sangre para realizar el recuento celular.

1.3.1 Extracción de sangre en ratón

La extracción de sangre se realizó por punción en la vena mandibular. Es una técnica rápida e indolora que no requiere la utilización de anestesia. Se utilizaron agujas convencionales (BD Microlance, Becton Dickinson, EE.UU.) de 23G. Se sujetó al animal por la piel del cuello provocando la suficiente tensión como para dificultar temporalmente el retorno venoso yugular y facilitar el sangrado, pero teniendo la precaución de que el animal continuara respirando sin dificultad. La punción que permite

acceder al vaso se realizó teniendo como referencia una marca en la zona mandibular (**figura 12**), extrayéndose la sangre del grupo de vasos mandibulares (venas facial, maxilar y temporal superficial) según el método propuesto por Golde et al., 2005[96]. Tras la punción, la sangre cae por goteo y es recogida en tubos heparinizados para evitar su coagulación (Sarsted Ref:20.1341) (**figura 13**).

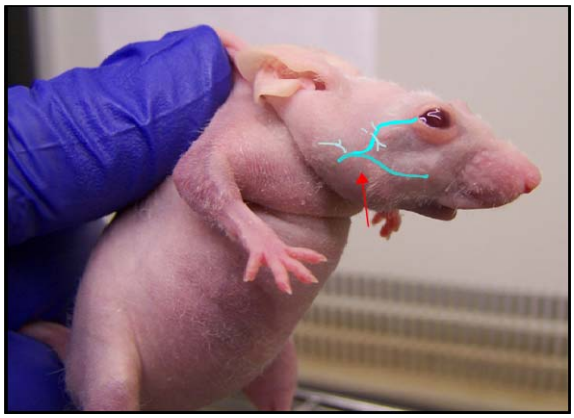


Figura 12. Vascularización de la mejilla del ratón. Venas retro-orbitales y submandibular que drenan la mejilla del ratón y desembocan en de la vena yugular. La flecha indica la zona despoblada de pelo (referencia anatómica) utilizada para realizar la punción

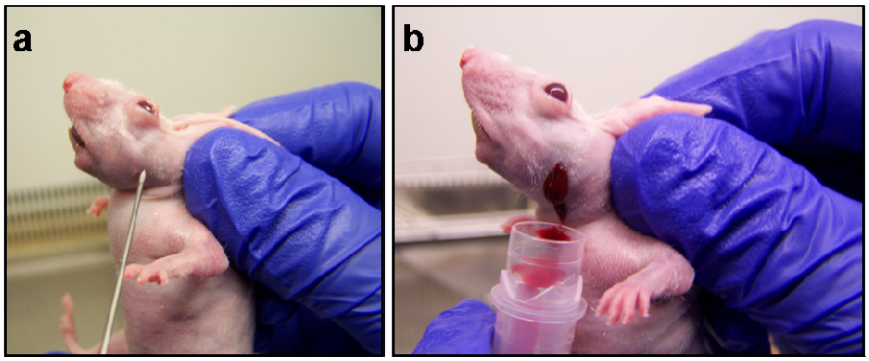


Figura 13. Extracción de sangre de la vena mandibular del ratón.
(a) Punción con una aguja de un calibre de 23G (b) Recogida de sangre en un tubo heparinizado

Para prevenir un posible sangrado prolongado, se hizo presión con una gasa seca sobre el sitio de la punción durante unos segundos. Una vez extraída, se realizó el recuento de células sanguíneas utilizando un contador Beckman coulter LH serie 70.

Paralelamente, se hizo un frotis sanguíneo y se aplicó la tinción de Diff-Quick que utiliza diferentes colorantes para obtener una tinción diferencial que discrimina entre distintos tipos celulares sanguíneos. Los colorantes utilizados son de la casa comercial QCA (Química Clínica Aplicada). Las preparaciones se sumergieron durante 30 segundos en el colorante Panóptico rápido nº 1 (Ref. 992612), luego 30 segundos en Panóptico Rápido nº2 (Ref. 993886) y posteriormente 20 segundos en Panóptico rápido nº 3 (Ref. 996116). A continuación, se lavaron con agua para retirar el exceso de solución y se dejaron secar en la estufa a 60 ºC, durante aproximadamente 10 minutos. Para finalizar, se pasaron por Xilol y se montó la preparación. Los neutrófilos son reconocidos por el núcleo de color azul violeta, el citoplasma rosa y la granulación de un color violeta rojizo. Los eritrocitos se tiñen de color rosa asalmonado y las plaquetas de color violeta.

1.3.2 Seguimiento de los animales

Se estimó el estado general de los ratones, tanto en el grupo contol como en el experimental mediante la medida de su peso corporal una vez por semana. También se observó su aspecto y comportamiento, considerando los parámetros establecidos en el protocolo de supervisión que se adjunta en anexo I. Se registró el día de inyección de las células tumorales y el día de sacrificio de los ratones, considerándose como tiempo de supervivencia la diferencia entre ambos tiempos. El sacrificio de los animales se realizó

cuando el ratón disminuyó su peso en un 20%, o bien mostró signos de estrés o de dolor.

1.3.3 Necropsia y procesado de muestras.

Los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical. Se extrajeron los órganos en bloque y se fotografiaron utilizando una cámara Kodak Z740. Se registró la presencia de tumor, se midieron sus ejes mayor y menor y se estimó el volumen tumoral utilizando la fórmula del volumen de una elipsoide (V= Eje menor^2 x Eje mayor x 0,5). Se recogieron muestras de ciego, de tumor local (desarrollado en el sitio de implantación), y de aquellos órganos en los que teóricamente pudieran haberse desarrollado metástasis (ganglios mesentéricos, hígado, pulmón y peritoneo).

Cada muestra obtenida se dividió en dos alícuotas: una se fijó en paraformaldehido al 3,7% a pH 7,4 y se incluyó en parafina, mientras que la otra se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido, y se guardó a -80ºC, para su posterior análisis molecular.

A partir de los bloques de parafina obtenidos, se realizaron cortes de 4µm, que se tiñeron con Hematoxilina-eosina (H&E) para su análisis histopatológico.

1.3.4 Análisis histopatológico e inmunohistoquímico

Dos observadores independientes realizaron el análisis histopatológico de las muestras de tumor primario y de los órganos diana de metástasis, sin conocer cuales de las muestras pertenecían al grupo control o al

experimental. Una vez teñidos con hematoxilina y eosina y observados con una magnificación de 4-20 aumentos se evaluó su grado de diferenciación, área de necrosis tumoral, tasa apoptótica y mitótica, grado de invasión tumoral y grado de vascularización. Se registró, además, el número de focos micro y macroscópicos observados en los órganos afectados, y el tamaño de los mismos, que se expresó como área (μm^2) y que fue medida utilizando el software CellD de Olympus (v 3.3).

1.3.5. Variables evaluadas y análisis estadístico.

Las variables clinico-histopatológicas analizadas en cada grupo fueron: tiempo de supervivencia, tasa de injerto, tamaño tumoral, afectación metastásica linfática, hepática, pulmonar y peritoneal, número y tamaño de los focos metastásicos en las localizaciones afectadas.

El análisis estadístico que permitió la comparación de las variables evaluadas en cuanto a evolución y diseminación tumoral, moleculares, y de supervivencia entre los grupos GC y GE (G-CSF) se realizó utilizando el programa SPSS vs.19 (SPSS INC., Chicago, IL, USA).

El análisis comparativo de las diferencias entre las variables categóricas, expresadas como porcentaje o número de casos (por ejemplo, animales afectados, tasa de injerto…) se llevó a cabo utilizando las tablas de contingencia y seguidamente el test Chi cuadrado o el Test de Fisher, éste último utilizado cuando el número de observaciones es muy bajo.

Cuando la distribución de las variables continuas (volumen tumoral, áreas de micro o macrometástasis y número de focos tumorales) cumplían los criterios de homocedasticidad y normalidad para cada uno de los grupos

comparados, la existencia de diferencias entre grupos se determinó utilizando el test paramétrico de Student. De no cumplirse estos criterios, se utilizó su equivalente no paramétrico de U de Mann Whitney.

La supervivencia para cada grupo (GC y G-CSF) se calculó usando el método de Kaplan-Meier y las distribuciones de supervivencia se compararon utilizando el test de log-rank. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando alcanzaron una probabilidad de $p<0.05$.

1.4 Generación del modelo ortotópico de CCR metastásico después de condicionamiento subcutáneo.

Este procedimiento consistió en la obtención de tumores tras la inyección subcutánea de células HCT116, que fueron posteriormente disgregados para obtener una suspensión de células, que se inyectó ortotópicamente en el ciego mediante OCMI, para generar el grupo SC+ORT. La capacidad tumorigénica y metastagénica de este grupo sería comparada con el grupo obtenido mediante microinyección ortotópica directa de celulas HCT116 (ORT).

1.4.1 Inyección subcutánea en ratón atímico

Cada ratón, previamente anestesiado con ketamina (100mg/kg) y xilacina (10 mg/kg), fue inyectado con 20 millones de células en 250 µL de medio de cultivo, utilizando una jeringa de tuberculina (23G). Las inyecciones se distribuyeron en 4 flancos (anterior derecho e izquierdo y posterior derecho e izquierdo), implantando 5 millones/flanco en el dorso del animal

repitiéndose este mismo procedimiento para cada una de las líneas celulares.

Se registró el crecimiento tumoral dos veces por semana, que se estimó mediante la fórmula del volumen de un elipsoide (V= eje menor^{2}x eje mayor x 0,5), después de medir el eje mayor y menor del tumor con un pie de rey. Se registró el peso corporal del animal y se observó su aspecto y comportamiento, considerando los parámetros establecidos en el protocolo de supervisión que se adjunta en anexo I.

1.4.2 Obtención de las células disgregadas procedentes de tumores subcutáneos

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical cuando los tumores subcutáneos alcanzaron un volumen aproximado de 700 mm^3. Se extrajo los tumores subcutáneos con la ayuda de tijeras y pinzas quirúrgicas, y se limpiaron las zonas necróticas para desechar el material no viable. Se congeló una alícuota de tumor en nitrógeno líquido para su posterior estudio molecular, mientras que otra se fijó en paraformaldehido al 3,7% a pH 7,4, y se incluyó en parafina. El resto del tumor se disgregó para obtener una suspensión celular que fue utilizada para la inyección ortotópica. Previamente a la realización del procedimiento, se optimizó el protocolo de disgregación de tejido tumoral. En la siguiente tabla se muestra la cantidad de enzimas y los tiempos de digestión utilizados:

Tabla 2. Optimización del protocolo de disgregación del tumor para la obtención de la suspensión celular a partir de tumores subcutáneos

Concentración Colagenasa (ug/ml)	Concentración tripsina	Tiempo de incubación (minutos)	Tiempo de incubación 2 (minutos)
0	0.05	10	5
0	0.25	15	10
100	0.05	10	5
100	0.25	15	10

Una vez establecidas las condiciones del proceso, se disgregó el tejido tumoral viable aplicando el siguiente protocolo. En primer lugar se sumergieron 300 mg de tejido tumoral (procedente de todos los tumores del mismo grupo, es decir aquellos que derivaban de una única línea celular con las características o la mutación oncogénica concreta a evaluar) en una solución de 3 ml de tripsina 0.05% y 30 µL de DNAsa (concentración final 100 µg/ml). A continuación, se realizaron 30 pipeteos sucesivos, utilizando una pipeta de 10 ml, para incubar después la mezcla durante 10 minutos a 37ºC, con agitación. Posteriormente, se realizaron pipeteos con pipetas de diferente volumen (10-3-1 ml) y seguidamente, se incubó durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo, se volvió a realizar el ciclo de 30 pipeteos con las pipetas de distintos calibres y luego se filtró, utilizando una malla estéril de 41 µm de tamaño de poro, para excluir los fragmentos tumorales no digeridos. Se añadió medio de cultivo al filtrado hasta alcanzar un volumen de 25 ml, y se centrifugó a 2.400 rpm durante 10 minutos. Finalmente, se contó el número de células de la suspensión en una cámara de Neubahuer.

1.4.3 Inyección ortotópica en ratón atímico

Para generar el grupo SC+ORT, se inyectó una suspensión de 2 millones de células disgregadas procedentes de los tumores subcutáneos (derivados de la inyección subcutánea de células HCT116) en 50 uL de medio en el ciego de ratones inmunodeprimidos (n=12) previamente anestesiados, mediante OCMI.

Para generar el grupo ORT, se inyectó una suspensión de 2 millones de células HCT116 directamente en 50 uL de medio en el ciego de ratones inmunodeprimidos (n=12).

El seguimiento del crecimiento del tumor en los animales de ambos grupos se realizó como se describe en el apartado 1.3.2.

1.4.4 Necropsia y procesado de muestras.

Se realizaron necropsias siguiendo el mismo protocolo descrito en el apartado 1.3.3.

1.4.5. Análisis molecular del tumor primario y de los focos metastásicos.

En las muestras de tumor primario y focos tumorales, observados en los órganos afectados de los grupo ORT y SC+ORT, durante la necropsia, se realizó un análisis molecular por inmunohistoquímica y mediante ELISA para evaluar la expresión y/o activación de reguladores de la linfangiogénesis, vasculogénesis, transición epitelio-mesenquimal, invasión y migración y su posterior comparación entre grupos.

1.4.5.1 Extracción de proteínas a partir de tejido tumoral para su estudio por ELISA

Las muestras tumorales de interés, conservadas a -80 ºC, fueron descongeladas, pesadas y disgregadas con la ayuda de un bisturí. A continuación, se procedió a la extracción de proteínas del tumor, añadiendo el tampón de extracción necesario para obtener una concentración de tejido de 150 mg/ml. La composición del tampón de extracción utilizada era la siguiente: 1M Tris/acetato, 100mM EDTA pH 8.8, 100 mM EGTA pH 8.8, 1M Sucrosa, 10% Tritó X-100 en 20mM tris/acetato,0.27M Sucrosa, 100 mM Ortovanadato, 1M Glicerofosfato, 0.5 M NaF, 100 mM Pirofosfato, 100 mM Benzamidina, 100mM PMSF, 2 mg/ml Leupeptina y 2-β-mercaptoetanol. Este tampón contiene inhibidores de quinasas y fosfatasas que impiden la alteración del estado de fosforilación de las proteínas celulares y permite la determinación de la activación de vías de señalización concretas por WB.

Seguidamente, se homogeneizó con un polytron (ciclos de 1 minuto, 3 veces), y se dejó reposar en hielo durante 20 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 14.000 rpm y 4ºC durante 10 minutos, guardando el sobrenadante a -80ºC. La muestra se mantuvo en hielo durante todo el proceso.

1.4.5.1.1. Cuantificación de proteínas

Para cuantificar los extractos proteicos utilizamos el método de Bradford, que consiste en la adición del colorante ácido azul de coomassie a la solución de proteínas, y medida posterior de la absorbancia a 595 nm con un espectrofotómetro. El colorante de Coomassie se une principalmente a

los residuos de aminoácidos básicos y aromáticos, especialmente la arginina. La absorbancia máxima cambia de 465 nm a 595 nm cuando se une a las proteínas. El valor de la concentración de proteína de una muestra en particular, se calcula interpolando el valor de su absorbancia en una curva estándar de un patrón de proteína conocido.

La cuantificación de la concentración de proteína se realizó en placas de 96 pocillos utilizando agua como blanco, la curva estándar con concentraciones crecientes de albúmina (0 a 150 µg/µL) y las muestras a cuantificar. A un total de 10 ul, se agregaron 190 µL del reactivo de Bradford (Bio Rad) diluído 1/5 en agua, incubándose durante 5 minutos, para registrar a continuación la absorbancia a 595 nm en un lector Fluo tar Optima. A partir de los valores obtenidos, y teniendo en cuenta las diluciones del ensayo, se calculó la concentración final por interpolación del valor de absorbancia en la curva estandard.

1.4.5.2 Cuantificación de Interleuquina 8 y VEGFA mediante ELISA

La técnica de ELISA ("Enzyme Linked InmunoSorbent Assay") se basa en la detección de antígeno (Ag) o anticuerpo (Ac) inmovilizado sobre una fase sólida, mediante anticuerpos que directa, o indirectamente, producen una reacción al estar conjugados con una enzima que al proteolizar un sustrato específico genera color que puede ser medido espectrofotométricamente. Esta técnica se utilizó para la cuantificación de la IL-8 y VEGFA humana en las proteínas extraídas a partir de tumor primario y de focos metastáticos. Cada uno de los kit utilizados (Ray Bio Human IL-8 ELISA Kit, cat. EHL-IL8-001C para IL-8 y, eBioscience Human VEGF-A Platinum ELISA, ref. BMS277/2CE para VEGFA) contenía el anticuerpo específico para IL-8 ó VEGFA inmovilizado en una

placa de 96 pocillos. Las muestras a partir de las cuales se contruiría la curva estándar y las muestras experimentales fueron añadidas a los pocillos, incubándose durante 2,5 horas a temperatura ambiente para favorecer la unión de la IL-8 ó VEGFA, presente en cada muestra, con el anticuerpo inmovilizado. Previamente, se optimizó la concentración de muestra necesaria mediante diluciones para obtener una concentración contenida dentro del rango lineal de la curva de calibrado. En las muestras de HCT-116, se ensayó a 1-5 µg de proteína tanto para IL-8 como para VEGFA. Después de la incubación de la muestra con el anticuerpo, se lavó cada pocillo tres veces con 300 µL del tampón de lavado (suministrado por el kit) para eliminar los antígenos fijados deficientemente o no fijados. A continuación, se añadió 100 µL de un segundo anticuerpo anti IL-8 humana biotinilado o anti-VEGFA según el ensayo realizado. Tras incubación de una hora a temperatura ambiente y con agitación, se volvió a realizar una tanda de lavados para eliminar los anticuerpos marcados que no hubieran reaccionado. Seguidamente se añadió 100 µL de estreptadivina HRP-conjugada, incubándose durante 45 minutos, y lavándose posteriormente para eliminar el segundo anticuerpo específico sobrante, añadido en el paso anterior. Finalmente, se añadió el sustrato TMB, que se incubó durante media hora, con agitación y en oscuridad. Posteriormente, se bloqueo con 50 µL de una solución stop, generando un cambio de color, de azul a amarillo, cuya intensidad de color fue medida a 450 nm con un espectrofotómetro (TECAN M200PRO). La intensidad de color es directamente proporcional a la cantidad de IL-8 o de VEGFA presente en la muestra.

1.4.5.3 Construcción del bloque celular

El bloque de parafina de las células HCT116 se realizó atrapando las células en un coágulo natural de plasma humano y trombina. Para ello, la células en cultivo se tripsinizaron y se centrifugaron durante 5 minutos a 1000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se agregó 5 gotas de plasma (proveniente del Banco de sangre del Hospital de Sant Pau) al pellet obtenido para disolverlo. A continuación, se añadieron 5 gotas de trombina (Sigma Ref. T8885-10VL), agitando continuamente, hasta que se formó un coágulo. Una vez obtenido el coágulo, se guardó en un paquete de papel (secamanos) y se introdujo dentro de un cassette y en formol 10% hasta su procesado

1.4.5.4 Análisis inmunohistoquímico

A partir de los bloques de parafina de las muestras obtenidas en la necropsia (apartado 1.4.4), se realizaron cortes de 4 μm de espesor que fueron colocados en un portaobjetos diseñado para su análisis inmunohistoquímico (Flex IHC microscope slides, Dako). Los cortes fueron incubaron en una estufa a 58 ºC, durante una hora, previamente a su tinción IHQ. La desparafinación, rehidratación y recuperación antigénica de las muestras con tampón citrato sódico (pH 6.0) (20 minutos a 97 ºC) se llevo a cabo utilizando el equipo DAKO PTLink.

Se utilizó el sistema automatizado DAKO autostainer Link48 para realizar las tinciones IHQs. Una vez recuperada la actividad antigénica, se lavó con tampón, y se bloqueó la actividad peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3% durante 10 minutos. Posteriormente, la muestra se incubó con el anticuerpo primario a la dilución que se indica en la **tabla 3**. Como

anticuerpo secundario se utilizó mouse o rabbit (EndVision, DAKO). Seguidamente, se incubaron los cortes con el revelador DAB (DAKO) durante 5 minutos, utilizándose hematoxilina para la tinción de contraste. Finalmente, se deshidrataron las preparaciones con concentraciones crecientes de etanol, para ser montadas posteriormente con medio de montaje DPX.

Los anticuerpos utilizados en el análisis inmunohistoquímico se muestran en la tabla siguiente:

Tabla 3. Anticuerpos utilizados para el análisis inmunohistoquímico de tumores

Anticuerpo Primario	Dilución	Casa comercial
Integrina β1(CD29)	1:100	BD (610468)
ANGPT2 (C-term)	1:50	Abgent (AP10103b)
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2)/Thr202/Tyr204)(20G11)	1:100	Cell signalling (4376)
Phospho-MAPK-P38	1:100	Cell signalling (9211S)
Vimentina	1:300	Dako (M0725)
Integrina (β y α) "screening" Kit		Chemicon (ECM440)
Anti-PTHLH	1:50	Abgent (ABIN394303)
VEGF-A	1:1000	Abcam (ab46154)
CD44v6 [VFF-18]	1:1000	Abcam (ab78960)
β-catenina	1:300	Dako(M33539)
Serpina-1	1:750	Abcam (ab28207)
CXCR4	1:300	Epitomics (clone UMB2; #3108-1)
AKT-P (S473)	1:10	Dako (M3628)

1.4.5.5 Análisis histopatológico e inmunohistoquímico

Dos observadores independientes realizaron el análisis histopatológico valorando los parámetros indicados en el aparatado 1.3.4 de metodología, sin conocer que ratones pertenecían al grupo ORT y cuales al SC+ORT.

Las tinciones inmuhistoquímicas fueron, también, evaluadas por dos observadores independientes. Se cuantificó el porcentaje de células teñidas respecto al número de células tumorales y la intensidad de la tinción, que se estimó entre 1 y 3, asignándose a la intensidad máxima el valor 3. Finalmente, el parámetro resultante de multiplicar ambos valores representó la expresión de la proteína en cada muestra.

El recuento de células muertas, en cada tumor primario, se realizó cuantificando 10 campos diferentes por tumor a un aumento de 400X, para obtener el número de células muertas sumando las observadas en todos los campos.

1.4.6. Variables evaluadas y análisis estadístico

Las variables clinico-histopatológicas analizadas en cada grupo fueron: tiempo de supervivencia, tasa de injerto, tamaño tumoral, afectación metastásica linfática, hepática, pulmonar y peritoneal, número y tamaño de los focos metastásicos en las localizaciones afectadas y número de células muertas en el tumor primario.

Las variables moleculares analizadas en cada grupo fueron: para inmunohistoquímica en tumor primario y en los focos metastásicos linfáticos, hepáticos y pulmonares los anticuerpos que se describen en la

tabla 3 y por ensayo ELISA la IL-8 (en tumor primario y en metástasis linfáticas) y el VEGFA (en tumor primario).

El análisis estadístico que permitió la comparación de las variables evaluadas en cuanto a evolución y diseminación tumoral, moleculares, y de supervivencia entre los grupos ORT y SC+ORT se realizó como se describe en el apartado 1.3.5 de metodología.

2. CONSTRUCCIÓN DE VECTORES CON DIFERENTES MUTACIONES EN EL GEN K-RAS.

Para llevar a cabo el segundo objetivo de esta tesis construímos, como primera estrategia, vectores portadores de diferentes mutaciones en el gen K-RAS para ser transfectados en lineas de CCR humano. Los transfectantes obtenidos serían posteriormente utilizados para generar los modelos ortotópicos en los que estudiar la asociación entre expresión de una determinada mutación en este oncogen y su capacidad metastásica. La construcción de los vectores de expresión requirió obtener fragmentos de cDNA de vectores previamente disponibles, su inserción en los vectores de expresión y la posterior generación de las mutaciones de interés en el oncogén K-RAS mediante mutagénesis dirigida. A continuación se describe en detalle esta metodología.

2.1 Obtención del fragmento c-DNA de K-RAS

Los vectores de expresión que contenían los insertos de c-DNA de *K-RAS* con las distintas mutaciones fueron construídos a partir de un c-DNA de *K-RAS* subclonado en el vector pDNR-Dual 4,9 kb (**figura 14**), que se obtuvo de Plasmid ID bank (Harvard, USA). Éste c-DNA contenía la secuencia silvestre de K_RAS en el codón 12 (G12, wt) y tenía, además una mutación en el codón 61 (H61).

Inicialmente, obtuvimos el c-DNA de *K-RAS* por amplificación mediante PCR, utilizando como molde el vector pDNR-Dual (**tabla 4 y 5**). En la **figura 15** se muestran los oligonucleótidos que se diseñaron, que contienen un fragmento de 23pb de K-RAS, permitiéndo la hibridación a éste (señalado en color azul), además de una secuencia del epitopo

Hemaglutinina humana (HA), que no se expresa en mamíferos y que permite realizar ensayos funcionales en los que se puede discriminar la proteína K-RAS exógena de la endógena, (indicado en color verde, en el caso del oligo pTRE up); y de secuencias de corte para los enzimas de restricción Not I y PuvII (Promega), señaladas en rojo. Este fragmento de c-DNA generado por PCR fue clonado en el Multiple cloning site (MCS) del vector de expresión pTRE2 pur (Clontech) entre las enzimas Not I y PuvII, permitiendo que el gen insertado se exprese a partir del promotor inducible (por doxiciclina) de Citomegalovirus (CMV) (**figuras 15 y 16**).

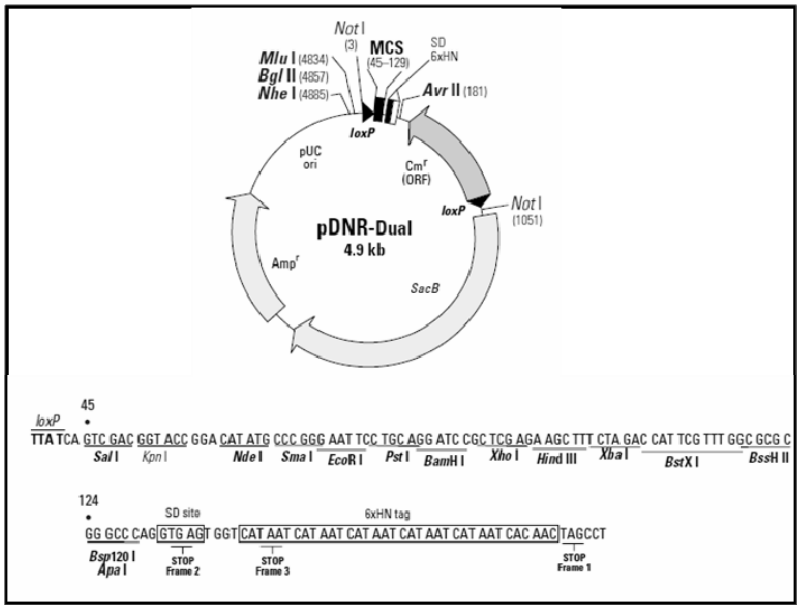


Figura 14. Plásmido pDNR-Dual con el inserto de cDNA de K-RAS.
Se presenta el mapa de restricción y el sitio de clonaje (MCS). El fragmento c-DNA de K-RAS contiene una mutación en el codón 61 (His) y la secuencia silvestre glicina (Gly) en el codón 12 (salvaje).

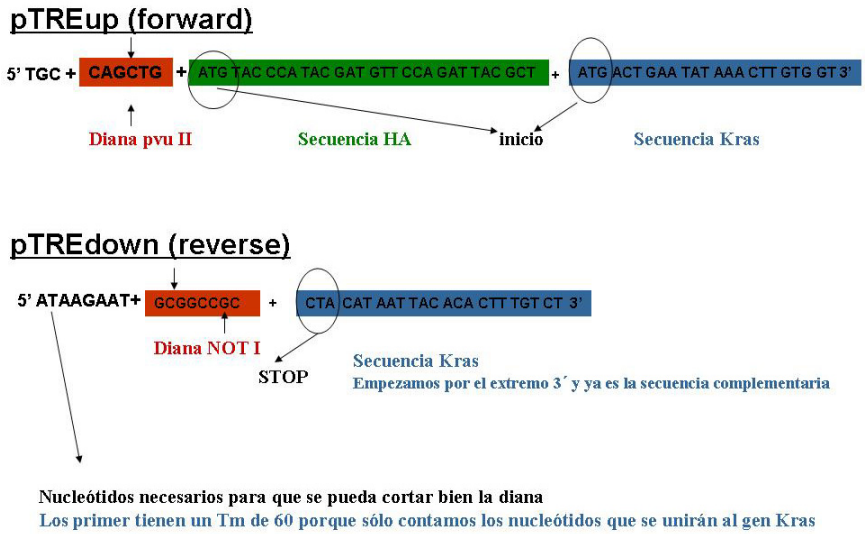


Figura 15. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación del fragmento de c-DNA de K-RAS, con las dianas de restricción para PuvII, NotI y la secuencia de HA

En las **tablas 4 y 5** se muestran los reactivos y el programa de PCR optimizado para la amplificación del c-DNA de *K-RAS* a partir de pDNR-Dual.

Tabla 4. Reactivos utilizados para la amplificación por PCR del c-DNA de K-RAS.

Reactivo	Volumen (µL) /muestra
Buffer 10X (Stratagene)	5
dNTPs 10mM (Aplied Biosystem)	4
Oligo 1(125mM)	0,2
Oligo2 (125mM)	0,2
Cloned pfu DNA polymerase (Stratagene)	1
H_2O mq	hasta 50

Tabla 5. Programa de PCR utilizado para la amplificación de K-RAS

Temperatura (ºC)	Tiempo (min)	
95	10	
95	2	34 ciclos
60	2	
72	2	
72	3	
4	∞	

Una vez amplificado el c-DNA del gen K-RAS, se comprobó la presencia y tamaño del inserto (657 pb). Para ello, 8 µL del producto de PCR y 2 µL de tampón de carga (6x loading buffer) fueron corridos en un gel al 1% de agarosa. Tras comprobar que su tamaño era correcto, se purificó el producto de PCR mediante el Kit QIAquick PCR purification (QIAGEN, ref:28104) y se determinó su concentración midiendo la absorbancia a 260 nm.

Para la secuenciación del fragmento obtenido se utilizó el kit 3.1 Big Dye terminador (Applied Biosystems, ref:4336921). Después de amplificar mediante PCR, se cargaron 60 ng del fragmento (100 ng de DNA por cada Kb del fragmento a secuenciar), y se utilizaron las condiciones que se detallan en la **tabla 6**. Los oligonucleótidos que se diseñaron para la secuenciación se muestran en la **figura 15** y se denominaron pTRE-up y pTRE-down.

Tabla 6. Reactivos y programa de PCR utilizados en la reacción de secuenciación del fragmento de K-RAS

	Volumen (µL)
Buffer	3
dNTP marcados-BD3.1	2
Oligos 5µM	1
DNA (60ng)	X
H_2O mq (µL)	Hasta 20

Temperatura ºC	**Tiempo (segundos)**	
96	60	
96	11	25 ciclos
37	5	
60	240	
4	∞	

2.2 Digestión de pTRE2 pur

Paralelamente a la obtención del c-DNA de *K-RAS*, se digirió el vector PTRE2-pur (**figura 16**) con las enzimas de restricción Not I y Puv II (Promega). Para ello fue necesario optimizar la concentración de DNA, las unidades de enzima necesarias, y el tiempo requerido para la digestión del vector. Las condiciones optimizadas fueron: 16 U de enzima NotI y 19,2 U de PuvII para la digestión de 600 ng de DNA en 4 µL de tampon (B o D) 10 x, durante 4 horas a 37ºC.

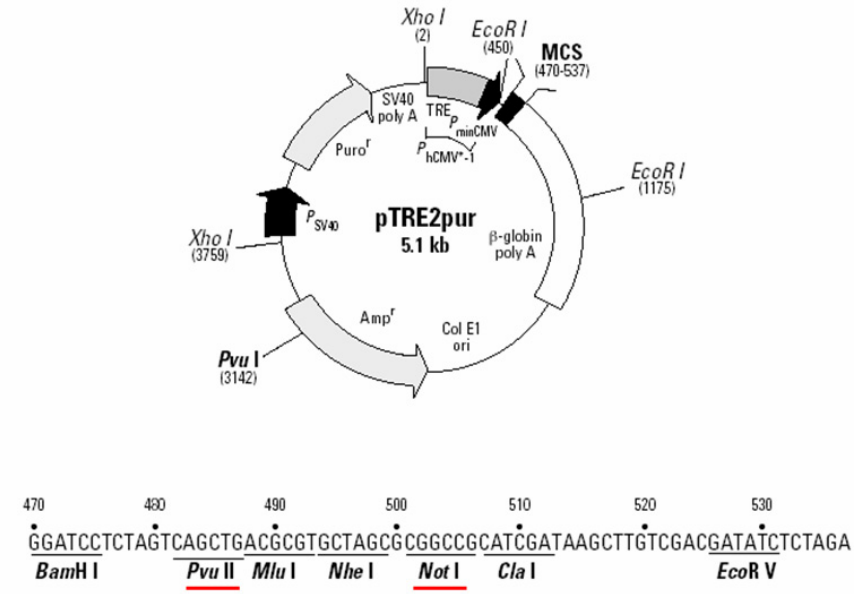


Figura 16. Vector de expresión pTRE2 pur con resistencia a puromicina

Las enzimas de restricción requirieron el uso de tampones diferentes: el "buffer D" 10x para Not I y el "buffer B" 10x para Puv II. Por este motivo, fue necesario digerir primero el vector con una de ellas, purificar el producto de la digestión para eliminar las sales del tampón mediante el Kit "QIAquick PCR purification" de QIAGEN (Ref. 28104), y posteriormente, digerir el vector ya linearizado con la otra enzima. En la reacción de digestión, se agregó BSA a una concentración final de 0.1 mg/ml. El BSA bloquea la restricción en sitios inespecíficos y permite la digestión específica del enzima.

Una vez finalizada la digestión, los extremos 5'P se desfosforilaron, para evitar la recircularización del vector, mediante incubación a 37°C durante 30 minutos, con el enzima "Shrimp Alkaline Phosphatase". Finalmente, la

reacción se detuvo calentando a 65°C durante 15 minutos. El vector desfosforilado fue purificado utilizando el Kit "QIAquick PCR purification" (QIAGEN, Ref. 28104). Los reactivos utilizados para desfosforilar se presentan en la **tabla 7**.

Tabla 7. Reactivos y condiciones utilizadas en la reacción de defosforilación del vector linearizado pTRE2 pur

DNA	10-40 µL 1-10 pmol termini)
10x Reaction Buffer para SAP	5 µL
Agua Esteril	49 µL
"Shrimp Alkaline Phosphatase"	1 µL (1 u)

Se comprobó el tamaño de los fragmentos de la digestión corriendo un gel de agarosa al 1%, que fue teñido con Bromuro de etidio. Como estándar se utilizó un marcador de DNA de 10 kb (American Tools Ref. 31005).

2.3 Inserción de K-RAS en pTRE2 pur

El vector pTRE2 pur linearizado se ligó con el inserto que contenía el c-DNA de *K-RAS* utilizando el Kit T4 DNA Ligase (Invitrogen, Ref. 15224-017) para extremos romos ("blunt ends"). Para llevar a cabo la ligación, y teniendo en cuenta la corta longitud del inserto, se probaron tres ratios molares de vector/inserto: 1:1; 1:2 y 1:3.

Teniendo en cuenta que la longitud del inserto era de 567 pb y la del vector de 5.600 pb, la fórmula que se utilizó para calcular la cantidad de inserto y de vector en nanogramos para obtener una relación molar 1:1 inserto/vector fue la siguiente:

Longitud inserto x ng vector/longitud del vector = ng inserto

Transcurrido el tiempo de incubación de la ligación (24h a 14 ºC), se añadió un total de 50 µL de bacterias competentes DH5α a 2 µLde producto de ligación que se mantuvo durante 30 minutos en hielo. A continuación se aplicó un choque térmico, a 42ºC durante 45 segundos, y posteriormente se incubó durante 2 minutos en hielo. A continuación, se añadió 950 µL de medio SOC. La mezcla se incubó a 37ºC durante 30 minutos en un baño con agitación.

Un volumen de 150 µL del producto de la transformación bacteriana se sembró en placas Petri con LB y ampicilina (0.1 mg/ml), para incubarse a 37ºC O/N. En paralelo, se verificó la ausencia de contaminación para cada uno de los componentes utilizados: control del medio SOC, control de la contaminación producida por el ambiente y control de células competentes.

Varios de los clones que presentaban resistencia a ampicilina, que por consiguiente habían incorporado el vector pTRE-K-RAS, fueron seleccionados mediante crecimiento O/N en medio LB con ampicilina 0.1 mg/ml, a 37 ºC y con agitación. Posteriormente, se extrajo el plásmido utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, ref: 27106). La presencia del inserto en el vector pTRE2-pur fue corroborada por secuenciación, utilizando los oligonucleótidos pTRE-up y pTRE-down (ver apartado 2.1 de metología) y el secuenciador 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

2.4 Mutagénesis Dirigida

Utilizamos el kit QuickChange II site directed Mutagenesis de Stratagene (Ref. 200523) para introducir las mutaciones puntuales y sustituir el aminoácido glicina de la secuencia silvestre del codon 12 de K-RAS, por valina, aspártico o cisteína o la glicina silvestre del codon 13 por aspártico, en el vector pTRE- pur-K-RAS (G12, H61) y, también, para revertir la mutación en el codón 61 a la secuencia silvestre.

Con objeto de expresar c-DNAs con una única mutación, bien en el codón 12 o en el codón 13, se debía obtener primero la secuencia silvestre en el codón 61 e introducir después la secuencia mutada en el codón 12 o 13. Por tanto, se realizó la mutagénesis en el codón 61, que presentaba una mutación que codifica para histidina, sustituyéndose por glicina, presente en la secuencia salvaje. Posteriormente, se introdujeron las mutaciones en el codón 12 sustituyéndose glicina (G12) por valina (V12), aspártico (D12) ó cisteina (C12); o bien, se sustituyó las secuencia silvestre glicina del codón 13 (G13) por aspártico (D13).

Los oligonucleótidos diseñados para realizar la mutagénesis dirigida en los codones 12 y 13 se muestran en la **tabla 8**, señalándose, en cada caso, la mutación puntual en color rojo. También se muestran los oligos Gln61 que se utilizaron para generar la secuencia salvaje de K-RAS en el codón 61.

Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados para realizar la mutagénesis dirigida en el c-DNA del gen K-RAS

Mutación introducida	codón	Oligos de mutagénesis
GLN	61	Up: CTCGACACAGCAGGTCAGGAGGAGTACAGTGCA
		down: TGCACTGTACTCCTCCTGACCTGCTGTGTCGAG
VAL	12	Up: GTGGTAGTTGGAGCTGTTGGCGTAGGCAAGAGT
		Down: ACTCTTGCCTACGCCAACAGCTCCAACTACCAC
ASP	12	Up: GTGGTAGTTGGAGCTGATGGCGTAGGCAAGAGT
		Down: ACTCTTGCCTACGCCATCAGCTCCAACTACCAC
CYS	12	Up: GTGGTAGTTGGAGCTTGTGGCGTAGGCAAGAGT
		Down: ACTCTTGCCTACGCCACAAGCTCCAACTACCAC
ASP	13	Up: GTGGTAGTTGGAGCTGGTGACGTAGGCAAGAGT
		Down: ACTCTTGCCTACGTGACCAGCTCCAACTACCAC

Una vez generados los distintos vectores con los insertos de K-RAS mutado, se transformaron bacterias competentes (XL1-Blue Super-competent Cells, facilitadas por el Kit) con cada uno de ellos para obtener un mayor número de copias de estos plásmidos, necesarios para la transfección posterior de células. Después de 16 horas de incubación a 37ºC, se seleccionaron las colonias de bacterias que habían incorporado el plásmido creciéndolas en medio LB con 0.1 mg/ml de Ampicilina. Los plásmidos se extrajeron utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN ref. 27106)

Los oligonucleótidos de secuenciación diseñados para verificar la presencia de las correspondientes mutaciones fueron PTRE-up y PTRE-down (**figura 15**). El protocolo que se aplicó se describe en el apartado 2.1.

3. OBTENCIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER COLORRECTAL CON DISTINTAS MUTACIONES EN K-RAS

3.1 Líneas celulares de CCR

Transfectamos los vectores que contenían los cDNAs de K-RAS con las distintas mutaciones en las líneas celulares de cáncer colorrectal humano Colo 320DM, Caco2 y SW48. Estas líneas celulares se obtuvieron de ATCC. Las características de los tumores de las que se derivaron y las mutaciones que portan se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 9. Origen, morfología, medio de cultivo utilizado y presencia de mutaciones en K-ras o B-Raf en las líneas colorrectales COLO320DM, SW48 y CACO2.

Línea Celular	Tumor de origen	Grado tumoral	Medio de cultivo	Mutaciones en K-RAS o BRAF
COLO320 DM	Adenocarcinoma de colon humano	Dukes tipo C	90% RPMI 1640 + 10% FBS	K-RAS wt B-Raf wt
SW48	Adenocarcinoma de colon humano	Dukes tipo C, grado IV	DMEM completo con 20% FBS	K-RAS wt B-Raf wt
CACO2	Adenocarcinoma de colon humano	No metastásica ni tumorogénica	DMEM completo con 20% FBS	K-RAS wt B-Raf mutado

3.2 Determinación de la concentración óptima de antibiótico para la selección de los clones transfectados.

Para determinar la concentración del antibiótico de selección de los clones transfectados, sembramos las células a una densidad de $35x10^4$/ml en placas de 96 pocillos (100 µL de medio/pocillo), incubándolas durante 24

horas. A continuación, se expusieron al antibiótico de selección, que en el caso del vector construído pTRE2, (**figura 16**) fue puromicina y en el vector que incluía el minigen de K-RAS fue geneticina, para ser después incubadas durante 24, 48 o 72 horas. Trascurrido este tiempo, se añadió el reactivo XTT (50 µL/pocillo) y se midió la absorbancia a 490nm (Fluo tar Optima) a las 4 horas. Se determinó el porcentaje de células viables dividiendo la absorbancia obtenida a cada concentración de antibiótico de selección por la absorbancia obtenida en las células control (no expuestas a antibiótico), después de restar el valor del blanco (que contenía medio de cultivo sin antibiótico).

3.3 Transfecciones

Los métodos utilizados para transfectar las células con los distintos vectores pTRE-KRAS fueron:

- Lipofectamina (Invitrogen; Ref. 15338100). Esta técnica permite la formación de complejos entre los lípidos catiónicos del reactivo y el DNA, lo que permite su paso a través de la membrana hasta el citosol.
- Fugene de Roche (Ref. 11818443001). Utiliza un reactivo (mezcla de lípidos y otros componentes protegidos por patente) que forman un complejo con del ADN, que lo transporta a través de la membrana lipídica hasta el interior de la célula. Se probaron los ratios 3:1, 3:2 y 6:1 (µL Fugene: ug DNA).
- Nucleofección (Amaxa Biosystems). Este método se basa en la electroporación, por el que se aplica un elevado voltaje a las células durante un período corto de tiempo para inducir la despolarización de la membrana, formando poros a través de los cuales penetra el DNA.

Veinticuatro horas después de la transfección se seleccionatron las células transfectadas, para todos los procedimientos utilizados, exponiéndolas a 2 μg/ml de puromicina (**figura 16**) durante 10 días. Se eligió ésta concentración al ser la concentración mínima que producía una muerte del 100% en las células transfectadas.

Se aislaron los clones resistentes mediante el sistema "cloning cylinder glass"(Sigma, ref. c-1059). Las células se despegaron utilizando 150 μLl de tripsina 0.05%. Posteriormente, se crecieron en el medio de cultivo, de acuerdo con la línea celular utilizada, reduciendo a la mitad la concentración de antibiótico utilizada para la selección. Durante el proceso de selección y posterior crecimiento, se observó si se producía un cambio en la morfología de las células y se evaluó además, el tiempo de duplicación.

Cuando obtuvimos un número suficiente de células, se congeló una alícuota en FBS con 10% DMSO a – 80ºC para mantener el clon. Otra alícuota se utilizó para extraer DNA utilizando el Kit QIAAmp DNA Mini Kit (QIAGEN, ref. 51306) para su secuenciación. Para verificar la presencia del vector con la mutación correspondiente mediante secuenciación, se utilizaron los mismos oligonucleótidos (**figura 15**) y el mismo protocolo descrito en el apartado 2.1.

Por otra parte, y paralelamente, se transfectó la línea celular SW48 con el vector pMLC12 (obtenido de Manuel Perucho, Burhman Institute, California), que contenía el minigen de K-RAS con la mutación en V12 y operado bajo su propio promotor (**figura 17**), siguiendo el mismo protocolo utilizado para el vector pTRE-KRAS. En este caso, las células se seleccionaron con geneticina a 800 μg/ml, concentración que fue determinada utilizando el mismo procedimiento descrito en el apartado 3.2,

durante 10 días, reduciéndose la concentración del antibiótico a la mitad transcurrido este tiempo.

Para verificar la presencia del vector y la mutación correspondiente, secuenciamos los clones obtenidos, utilizando el mismo protocolo descrito en el apartado 2.1, y utilizando los oligonucleótidos KRASmini down y KRASmini up que se muestran a continuación:

KRASmini down: 5' GAGAAACCTTTATCTGTATCA 3'

KRASmini up: 5' TGGTGGAGTATTTGATAGTGTAT 3'

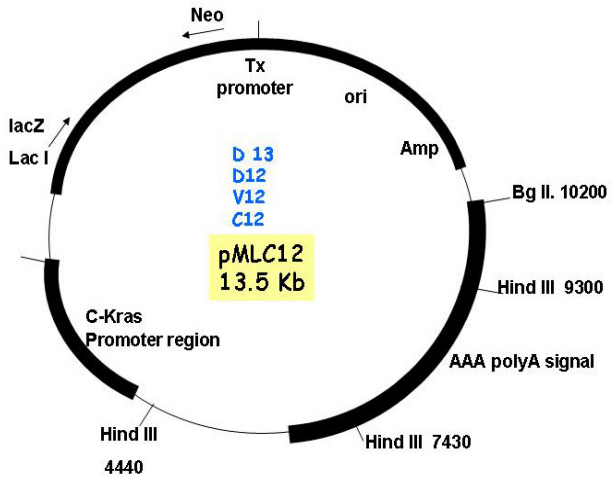


Figura 17. Vector que contiene como inserto el minigen de K-RAS.
Presenta las secuencias codificantes del gen K-RAS (sin secuencias intrónicas) que se expresan bajo su propio promotor, además de portar un gen de resistencia a geneticina**.**

3.4 Generación del modelo animal de CCR con expresión de K-RAS mutado

3.4.1 Líneas celulares de CCR humano que expresan K-RAS mutado

Para generar los modelos animales de cáncer colorrectal metastásico, se utilizaron las líneas celulares humanas Colo320DM y Caco2 transfectadas con distintos mutantes de K-RAS. Primeramente, se cultivaron en medio DMEM (Life Technologies) suplementado con 1% glutamina, 0.25% fungizona, 1% penicilina/streptomicina, y 10% FBS durante tiempo suficiente para obtener el número de células necesario para su inyección (2 millones por animal). Para cuantificar su número, centrifugamos las células durante 10 minutos a 1500 rpm, el pellet se resuspendió en 1 ml y se realizó el recuento en una cámara de Neubauer.

3.4.2 Animales

Se utilizaron ratones inmunodeprimidos Swiss nude, hembras, de cuatro semanas (18-20g). Las condiciones de estabulación se describen en el apartado 1.2.

3.4.3 Tipos de implantación utilizados y seguimiento

Previamente a la implantación de las células tumorales, se anestesió los ratones con una solución de ketamina y xilacina (100 y 10 mg/kg de peso, respectivamente; en administración intraperitoneal). Cada ratón fue identificado con un número para el posterior seguimiento de su evolución en relación al crecimiento tumoral.

3.4.3.1 Implantación ortotópica inmediata a la transfección en ratón atímico

En animales previamente anestesiados (n=9), se inyectaron ortotópicamente en el ciego, $2x10^6$ células Colo-320 o Caco-2, transfectadas 24 horas antes con los vectores portadores de las distintas mutaciones en el gen K-RAS, siguiendo el procedimiento OCMI desarrollado por nuestro grupo[88]. Este procedimiento se realizó para determinar si la implantación inmediata en la pared del colon de las células tumorales transfectadas aumentaba su viabilidad respecto a la selección de los clones transfectados en cultivo in vitro.

El seguimiento de la evolución de los animales se llevó a cabo como se describe en el apartado 1.3.2 de metología.

3.4.4 Necropsia y análisis histopatológico.

A los 5 meses de la implantación, aquellos animales que no mostraban signos de progresión tumoral se sacrificaron mediante dislocación cervical. Se extrajeron los órganos siguiendo el mismo protocolo descrito en el apartado 1.3.3.

4. GENERACIÓN DE LÍNEAS DE CCR PORTADORAS DE DISTINTAS MUTACIONES EN K-RAS POR RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA

La ausencia de líneas de CCR viables que expresaran los oncogenes K-RAS durante el desarrollo del segundo objetivo de esta tesis, que consistió en la construcción de vectores que expresaban distintas mutantes de K-RAS bajo el promotor de CMV y su transfección en líneas de CCR humano, no permitió la generación de modelos ortotópicos en los que estudiar la asociación entre la expresión de este oncogén y su capacidad metastásica. Como consecuencia, y para cumplir con este objetivo, desarrollamos una aproximación alternativa que consistió en la obtención de líneas de CCR humano que expresaban distintos mutantes de K-RAS obtenidos por recombinación homóloga.

Por este motivo, se inició una colaboración con el grupo de Alberto Bardelli (Universidad de Turín, Candiolo, Italia) que se inició estudiando el papel de los oncogenes K-RAS Val12 (K12V, de secuencia en codon 12 G12V), K-RAS Asp13 (K13D, de secuencia en el codon 13 G13D) y de determinadas mutaciones en sus efectores distales PI3K y B-Raf mediante la generación de clones obtenidos por recombinación homologa que expresasen sólo un alelo mutado a partir del propio promotor de cada gen, utilizando la línea tumoral colorrectal SW48, que expresa estos tres proto-oncogenes (y no presenta por tanto mutaciones activantes en ninguno de ellos).

4.1 Técnica de recombinación homóloga

Para introducir las mutaciones de interés por recombinación homóloga, se utilizó un casette de expresión formado por dos secuencias homólogas (aproximadamente de 1Kb) del gen de interés, una de las cuales contenía la mutación y un marcador de selección flanqueado por dos dianas LoxP, que permiten su eliminación del genoma a través de la acción de la recombinasa Cre. La casette se clonó entre los extremos ITR de un vector de virus Adeno-asociado (AAV) (**figura 18**). Después de infectar las células con rAAV y seleccionar con G418 (800µg/ml), se obtuvieron clones resistentes, que por consiguiente habían integrado la mutación de interés, de los que se extrajo DNA para confirmar la presencia de las mutaciones específicas por PCR.

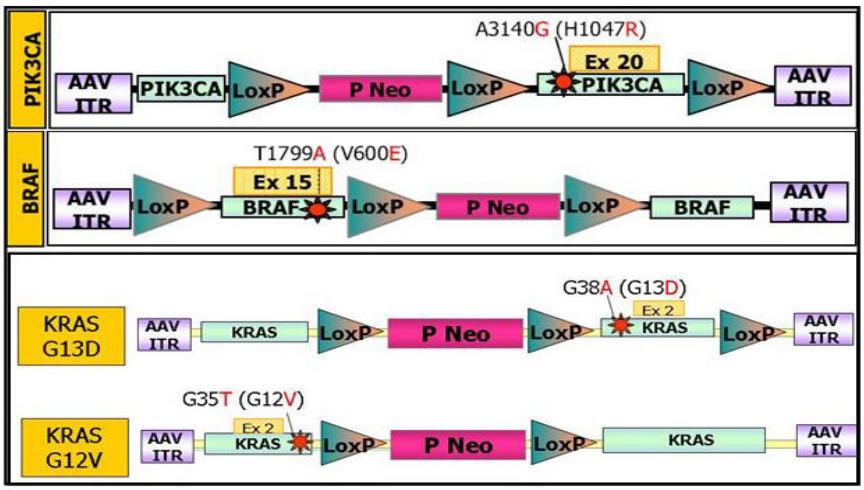


Figura 18. Estructura de los Virus adeno-asociados (AVV) construídos para introducir las mutaciones puntuales en los genes K-RAS Val12 (G12V), K-RAS Asp13 (G13D), B-Raf o PI3K mediante recombinación homóloga, en la línea celular SW48.

Abreviaturas: Vectores de AAV portadores del alelo oncogénico que introducen las mutaciones puntuales de interés en células humanas por recombinación homóloga. ITR: Terminaciones repetitivas del AAV; Neo, gen de resistencia a geneticina; P, SV40 promotor; triángulos: secuencias loxP. El nucleótido y el amino ácido alterado están indicados. Figura cedida por Federica DiNicolantonio[97].

Todos los vectores utilizados para introducir las mutaciones de interés se construyeron utilizando un plásmido pBluescript modificado, denominado pSA-5A, que contiene un gen de resistencia a Neomicina bajo el promotor de SV40 y dos dianas LoxP que flaquean el marcador de selección G418 (Invitrogen, Ref. 10131-027)[98].

En la **tabla 11** se muestran los ADN genómicos provenientes de distintas líneas celulares que se utilizaron para generar las secuencias homólogas de los genes K-RAS, PI3K, o BRAF y la lista de oligonucleótidos utilizados para amplificar estas secuencias. Para la amplificación se utilizó la Platinum Taq DNA Polimerasa (Invitrogen, Carlsbad. CS). Las condiciones de PCR y los primers de clonaje se muestran en las **tablas 10 y 13**. Los productos de PCR correspondiente a las secuencias homólogas 3' y 5' fueron purificados con el kit de purificación de PCR MinElute (Qiagen, Valencia, CA) y digeridos con las enzimas correspondientes (**tabla 10**) según el tipo de vector, para ser clonados, a continuación, en el vector, pSA-5A.

Para construir el vector pAAV –GEN KD, se extrajo el casette GEN-KD (que comprende el gen de resistencia a Neo flanqueado por las dos secuencias homólogas del gen de interés: PI3K, BRAF, KRASVal12 o KRASAsp13, del vector pSA-5A mediante una digestión con las dianas de restricción correspondientes (**tabla 10**). Este casette se subclonó en el vector pAAV-MCS (Stratagene, la Jolla, CA) para obtener los vectores pAAV-GEN-KD que contenían cada uno de los genes de interés.

Tabla 10. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de las regiones homólogas de los vectores

Gen	Amino ácido mutado	Secuencia	Fuente gDNA	Primers (F, foward; R, Reverse)	Dianas Restricción
BRAF	V600E	5'	HT29	F:gaaaaGAATTCGCGGCCGCataacttcgtataatgtatg Ctatacgaagttatgttttcatgctaagttcgat R:aaataaGAATTCtgatttttgtgaatactgggaac	EcoRI, NotI,loxP EcoRI
		3'	hTERT-RPE1	F tcacaaTCTAGAgtgttcttatttttatgta R ctcactTCTAGAagcaggccagtcaactcct	XbaI XbaI
PI3K	H1047R	5'	HCT116	F:ggtttcGAATTCGCGGCCGCgctggtcttgaactcccaa R: ttggagGAATTCatgttaataccttcaggtctttgc	EcoRI EcoRI
		3'	HCT116	F:aggtatTCTAGAcatttgctccaaactgacca R:tgtccaTCTAGAataacttcgtataatgtatgctatacgaagttat GTGACTGCTTCCAAAACTGC	XbaI Xba I, loxP
KRAS	G13D	5'	hTERT-RPE1	F: taggcgGAATTCGCGGCCGCcggctcacttgcatctctta R: tgactgGAATTCtgtatcgtaatgaactgtacttc	EcoRI EcoRI
		3'	DLD-1	F :cattacTCTAGAcgtctgcagtcaactggaat R:gacagtTCTAGAataacttcgtatagcatacattatacgaagtta tatatcctcatctgcttgggatg	XbaI XbaI, loxP
KRAS	G12V	5'	hTERT-RPE1	F: taggcgGAATTCGCGGCCGCcggctcacttgcatctctta R: tgactgGAATTCtgtatcgtaatgaactgtacttc	EcoRI EcoRI
		3'	DLD-1	F :cattacTCTAGAcgtctgcagtcaactggaat R:gacagtTCTAGAataacttcgtatagcatacattatac gaagttatatatcctcatctgcttgggatg	XbaI XbaI, loxP

4.2. Verificación del vector viral adeno-asociado construído con las diferentes mutaciones de interés

A continuación, en las **tablas 11, 12 y 13**, se describen los oligonucleótidos y las condiciones de la reacción utilizados para la amplificación por PCR y verificación de la incorporación de cada uno de los alelos mutados:

Tabla 11. Oligonucleótidos utilizados para la secuenciación de los clones recombinantes de SW48

Gen	mutación	Oligos PCR	Oligo secuenciación
PI3K	H1047R	F: CTGTGAATCCAGAGGGGAAA R: TGGGTAGAATTTCGGGGATA	GGGAAAAATATGACAAAGAAAGC
BRAF	V600E	F: TTCGAGGCCAGAGTCCTTTA R:TGATTTTTGTGAATACTGGGAAC	TGTTTTCCTTTACTTACTACACCTCA
KRAS	G13D	F: CGTCTGCAGTCAACTGGAAT R: AACAAGGACAGTTGGGGAAT	GGTGGAGTATTTGATAGTGTATTAACC
KRAS	G12V	F: GTTCTTCTTTGCCTCAGTGTT R: GTAAACTCCTCTTCAGACCTA	GGTGGAGTATTTGATAGTGTATTAACC
	NEO	F: GTTCTTCTTTGCCTCAGTGTT R: AGAATGGTCCTGCACCAGTAA	GGTGGAGTATTTGATAGTGTATTAACC

Tabla 12. Reactivos utilizados para la amplificación por PCR de los clones recombinantes en la línea SW48

	Volumen (µL)
Buffer (10X)	2
dNTP (2.5mM c/u)	2
$MgCl_2$ 25mM	1.2
DMSO	1.2
Taq Platinum	0.1
Primer up (10 M)	0.2
Primer down (10 M)	0.2
DNA (50-100ng)	
H_2O mq (µL)	hasta 20

Tabla 13. Programa de PCR utilizado para la amplificación de las regiones a secuenciar de los clones recombinantes de SW48

Ciclos		3			3			3			35				
Temperatura (ºC)	94	94	64	70	94	61	70	94	58	70	94	57	70	70	8
Tiempo (segundos)	120	15	30	90	15	30	90	15	30	90	15	30	90	300	∞

4.3 Obtención de los vectores por recombinación homóloga

Una vez verificados los vectores, se transfectaron de manera transitoria los componentes del virus AVV GEN-KD en células 293T utilizando el método del fostato cálcico. Para ello, se sembraron un total de $3x10^6$ células 293T en placas petri de 10 cm. A las 24 horas se realizó la transfección en medio de cultivo Iscove Modified Dulbecco (JRH

Biosciences), suplementado con 10% FBS y P-S (100 unidades/ml). Se utilizó 10mg del vector pAAV GEN-KD mezclado con con 10 µg de plásmido pAAV-RC y pHelper del sistema AAV Helper-Free (Stratagene, La Jolla, CA) en 450 µL de tampón TE (0.1×) y 50 µL de 2.5 M $CaCl_2$. A la mezcla se le añadió 500 µL de tampon Hepes salido 2× [281 mM NaCl, 100 mM Hepes/1.5 mM Na2HPO4 (pH 7.12)], agitándose a continuación. La mezcla se añadió posteriormente, al cultivo celular. A las 14-16 horas se recogieron los virus de acuerdo con el protocolo establecido en el sistema AAV Helper-Free; aspirando el medio de cultivo junto con las células 293. Se sometió a tres ciclos de congelación y descongelación, que consistieron en incubarlas durante 10 minutos en hielo seco y baño de etanol y después durante 10 minutos a 37°C en un baño de agua, agitando después de cada descongelación. El lisado obtenido se centrifugó a 12.000 rpm para quitar el debris, y el sobrenadante, que contenía los virus recombinates rAAV fue dividido en alícuotas que fueron guardadas a -80 ºC.

4.4 Generación de los clones recombinantes

Para la generación de los clones recombinantes, las células se crecieron en una placa de 10-cm hasta una confluencia de 60-80%. Se cambió el medio de cultivo por 5ml de medio nuevo. A éste, se añadió 150 µL de lisado de rAAV y se incubó durante 4 horas a 37°C. A continuación, se añadieron 5 ml de medio de cultivo y se incubó durante 16 horas adicionales. Posteriormente, se sembraron las células en placas de 96 pocillos y se seleccionaron con geneticina. Las células se mantuvieron a 37°C durante 2-3 semanas antes de proceder al cribado de los recombinantes por PCR. Para el cribado, se utilizaron dos oligonucleótidos: un primer forward dentro del gen Neo (5' TCTTGACGAGTTCTTCTGAGC 3') y un primer

reverse localizado fuera de la secuencia homóloga (5' CGAGAGGACATTGGGATGAC 3'). El cribado por se realizó por PCR utilizando las mismas condiciones mencionadas anteriormente para la amplificación de las secuencias homólogas (apartado 4.1 de metodología). El DNA genómico (gDNA) de los clones fue obtenido a partir de lisados celulares, utilizando el reactivo "Lyse and Go" (Pierce, Rockford, IL) y siguiendo el protocolo establecido. Para inducir la recombinación, los clones heterocigotos se infectaron con un adenovirus que expresaba la proteína Cre, proporcionado por el Dr. Ben Ho Park (Johns Hopkins University, Baltimore, MD). Posteriormente, las células se sembraron en placas de 96 pocillos sin antibiótico y se determinó la presencia o ausencia de las secuencias de interés mediante PCR como se describe en el apartado 4.2

5. CARACTERIZACIÓN DE LOS CLONES DE CCR CON EXPRESIÓN DE LOS ALELOS ONCOGÉNICOS

5.1 Análisis de Viabilidad celular

Para determinar si los clones recombinantes mantenían su viabilidad a lo largo del tiempo de cultivo utilizamos el test de XTT "Cell proliferation Kit II XTT" (Roche Applied Science, ref: 1465015). Este ensayo se basa en la determinación de la capacidad metabólica celular, ya que únicamente las células viables son metabólicamente activas y capaces de transformar la sal de tetrazolium (XTT) en formazan, un colorante naranja que se cuantifica por espectrofotometría a una longitud de onda de 450-500nm. Por tanto, una disminución del número de células viables se correlaciona directamente con una disminución de la cantidad de formazan formado respecto a las células control viables y con una menor absorbancia.

5.2 Western Blot

5.2.1 Extracción de proteínas

En los clones recombiantes, se evaluó la expresión de la proteina K-RAS por western blot para determinar si la incorporación del alelo mutado se traducía en expresión de esta oncoproteína. El Western blot (WB) es una técnica analítica utilizada para detectar proteínas específicas dentro de un extracto protéico, utilizando anticuerpos que reconocen epítopos en las proteínas de interés.

Analizamos molecularmente, por WB, los clones obtenidos por recombinación homóloga antes de ser inyectados en el ratón.

Para ello, se obtuvo extractos proteícos de las células crecidas a 80 % de confluencia en dos flascones de 75 cm3. Se eliminó el medio de cultivo, se lavó con PBS, y se agregaron 300 µL de tampón de extracción, manteniendo el flascon en hielo durante todo el proceso. La composición del tampón de extracción se describe en el aparatado 1.4.5.1. Con la ayuda del "scrapper" se desengancharon las células, se traspasaron a un criotubo y se sonicaron (sonicador Bandelin) 3 veces durante 1 minuto, antes de lisarlas. A continuación, se incubaron durante 20 minutos en hielo. Finalmente, se centrifugaron a 14.000 rpm, durante 10 minutos 4ºC y se recogió el sobrenadante, que se conservó a -80ºC hasta el momento del análisis.

La cuantificación de las proteínas se realizó mediante el método de Bradford (véase apartado 1.4.5.1.1 de metodología).

5.2.2 Electroforesis

Esta técnica permite separar las proteínas según su peso molecular. Utilizamos un gel que contenía dos partes: la parte superior consistía en el primer gel llamado "staking" que tenía un poro de mayor tamaño (menor porcentaje de acrilamida+bisacrilamida), y pH más ácido que el segundo gel, llamado "separating", que es el que separa las proteínas. Este sistema es adecuado para analizar muestras diluídas sin perder resolución, ya que las concentra primero y luego las separa.

Primeramente, se cargó la parte inferior, compuesta por 15% de arcrilamida, 0.003% de bis-acrilamida, 0.375 M Tris-HCl pH 8,8, 0,1% APS y 0.07% TEMED. Tras mezclar los componentes, se dejó polimerizar

aproximadamente durante 30 minutos, cubriendo posteriormente el borde superior del gel con agua.

La fase superior del gel contenía 2.7% de acrilamida, 0.006% de bis-acrilamida, 0.08 M Tris-HCl pH 6,8, 0,1% APS y 0.07% TEMED. Después de polimerizar la parte inferior, se añadió la parte superior y se dejó polimerizar durante 2h.

Previamente a la carga de la muestra en el gel, se diluyeron 35 µg del extracto protéico con el tampón de carga 3X, que contenía 150 mM Tris-HCl pH 6,8, 6% de SDS, 0,15% de azul de bromofenol, 30% de glicerol y 300 nM de dithiothreitol o DTT. Seguidamente, se desnaturalizó durante 3 minutos a 100ºC y finalmente, se incubó en hielo durante 5 minutos.

La electroforesis se corrió a un voltaje de 100 mV en tampón Tris-Glicina (25mM Tris, 250 mM glicina pH8.3, 0.1% SDS). Como Standard se utilizó 10 µg del marcador de proteínas Prestained SDS-PAGE (Biorad Ref. 161-0318), que contiene una mezcla de proteínas (marcadores) de peso molecular conocido.

5.2.3. Transferencia por Electroblotting

Para hacer accesibles las proteínas a la detección por los anticuerpos específicos, se transfirieron desde el gel de arcrilamida/bisacrilamida a una membrana de nitrocelulosa (Potran®, Whatman) aplicando una corriente eléctrica en un tampón de transferencia (Electroblotting). Para ello, se apilaron los siguientes elementos, en el orden descrito (del polo negativo al positivo): una esponja, tres papeles de filtro empapados en buffer de

transferencia, el gel con la muestra protéica sometida previamente a la electroforesis, la membrana de transferencia, otros tres papeles de filtro y otra esponja. Este montaje, llamado "sandwich", permite que el gel y la membrana estén en contacto durante todo el proceso. El tampón de transferencia estaba compuesto por glicina 39 mM, Tris base 48 mM, SDS 0.037% y metanol al 20%. La transferencia se realizó a 300 mA y duró hasta que dejaron de detectarse los marcadores Standard en el gel.

5.2.4 Hibridación de membranas

Al finalizar la transferencia y para verificar que se había realizado correctamente, se incubó la membrana durante 10 minutos con una solución de 0.2 % Ponceau (Sigma-Aldrich) en 3% de ácido acético, con agitación. Seguidamente, se lavó con agua y se comprobó la aparición del bandeado en la membrana de nitrocelulosa, correspondiente a las proteínas transferidas. A continuación, se bloqueó la membrana durante 2 horas con una solución de leche descremada al 5% en tampón TBS-T (132 M NaCl, 20 mM Tris pH 7.5, 0.1% Tween 20). Se realizaron 3 lavados con TBS-T de 15, 5 y 5 minutos y se incubaron con el anticuerpo primario de interés diluído en TBS-T con 0,1% de albumina (BSA), con agitación durante una hora, y en algún caso, a 4ºC O/N. Una vez finalizada la primera incubación, se realizaron tres lavados de 15, 5 y 5 minutos con TBS-T y se incubó durante una hora con el anticuerpo secundario correspondiente, disuelto en TBS-T a una dilución de 1:10,000. Se realizaron tres lavados con TBS-T y la membrana se reveló con el kit Supersignal (Pierce) durante 5 minutos, obteniéndose una imagen quimioluminiscente de la banda específica con el equipo G-BOX Syngene (Imagen Technologies).

En la siguiente tabla se describen los anticuerpos y condiciones utilizadas para el análisis por Western Blot de la proteína K-RAS y de sus vías de señalización distal.

Tabla 14. Anticuerpos utilizados para el análisis por Western Blot de los clones que expresan los distintos oncogenes K-RAS

Anticuerpo Primario	Dilución	Anticuerpo secundario	Casa comercial
K-RAS	1:2000	Mouse	Sant Cruz (sc-30)
GAPDH	1:10000	Mouse	Millipore (MAB374)
PI3K	1:2500	Mouse	BD (610046)
B-Raf	1:2000	Mouse	Cell Signaling (9434)

6. ESTUDIOS IN VIVO DE TUMOROGÉNESIS Y METASTAGÉNESIS PARA LOS DISTINTOS MUTANTES DE K-RAS

6.1 Líneas celulares

Para generar los modelos animales de metástasis necesarios par evaluar la eficiencia metastásica asociada a la expresión de distintos mutantes del oncogén K-RAS, utilizamos la línea celular de cáncer colorrectal humano SW48 parental (WT) (**tabla 10**, apartado 3.1 de metodología) y los recombinantes que expresaban K-RASVal12 (K12V) o K-RASAsp13 (K13D). Todas ellas se cultivaron en medio DMEM (Life Technologies) suplementado con 10% FBS, 1% glutamina, 0.25% fungizona y 1% penicilina/streptomicina, hasta obtener el número de células necesario para su inyección.

6.2 Animales

Se utilizaron 13 (3 para la implantación subcutánea y 10 para la ortotópica) ratones inmunodeprimidos Swiss nude, hembras, de cuatro semanas (18-20g) para cada uno de los grupos analizados WT, K12V y K13D. Las condiciones de estabulación se describen en el apartado 1.2.

6.3 Generación del modelo ortotópico de CCR metastásico después de condicionamiento subcutáneo.

Este procedimiento consiste en la obtención de tumores tras la inyección subcutánea de células SW48. Los tumores subcutáneos WT, K12V y K13D generados son posteriormente disgregados, para obtener una suspensión de

células que se inyecta ortotópicamente, mediante OCMI, en el ciego de los ratones inmunodeprimidos para obtener modelos en los que comparar la capacidad metastagénica entre los grupo WT, K12V y K13D.
Previamente a la microinyección de células los ratones se anestesiaron con una solución de ketamina (100 mg/Kg) y xilacina (10 mg/kg) administrados por vía intraperitoneal. Cada ratón se marcó con un número para su identificación y su posterior seguimiento de la evolución del crecimiento tumoral.

6.3.1 Inyección subcutánea en ratón atímico

La inyección subcutánea se realizó siguiendo el protocolo descrito en el apartado 1.4.1

6.3.2 Obtención de las células disgregadas procedentes de tumor subcutáneo

La obtención de células disgregadas a partir de los tumores subcutáneos se realizó siguiendo el protocolo descrito en el apartado 1.4.2. Previamente, se analizó la viabilidad celular de las células disgregadas, determinando su capacidad metabólica, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 5.1.

6.3.3 Inyección ortotópica en ratón atímico

Se generaron modelos ortotópicos de metastásis de CCR humano WT, K12V y K13D en ratón atímico por microinyección en el ciego mediante OCMI [88]. Para ello, en animales previamente anestesiados (n=10/grupo), se

inyectó una suspensión de 2 millones de células en 50 uL de medio, obtenidas de la disgregación de los tumores subcutáneos correspondientes.

El seguimiento del crecimiento del tumor en los animales, se estimó mediante palpación abdominal y el estado general del animal mediante la medida del peso corporal una vez por semana. Se registró el día de inyección de las células y el día de su sacrificio, considerando el tiempo de supervivencia la diferencia entre ambos. El sacrificio de los animales se realizó cuando el ratón disminuyó su peso en un 20%, o bien mostró signos de estrés o de dolor.

6.3.4 Necropsia y procesado de muestras.

Las necropsias se realizaron siguiendo el mismo protocolo descrito en el apartado 1.3.3

6.3.5. Análisis molecular del tumor primario y de los focos metastásicos.

En las muestras de tumor primario y focos tumorales observados en los órganos afectados de los grupos WT, K12V y K13D, obtenidas durante la necropsia, se realizó el análisis molecular por ELISA o inmunohistoquímica como se describe en los apartados 1.4.5. Se evaluó la expresión y/o activación de reguladores de la linfangiogénesis, vasculogénesis, transición epitelio-mesenquimal, invasión y migración y proteínas implicadas en las vías distales de K-Ras para su comparación entre grupos.

6.3.6 Análisis de los niveles de IL8 y VEGFA

El análisis de los niveles de Il- 8 y del VEGFA se realizó mediante ensayo ELISA. Se utilizó el mismo kit y procedimiento descrito en el apartado 1.4.5.2, sin embargo, para la línea celular SW48, previamente se tuvo que optimizar la concentración de tejido tumoral necesario para obtener un valor dentro del rango lineal de la curva de calibrado, que fué de 100-300 µg de tejido tumoral.

6.3.7 Análisis histopatológico e inmunohistoquímico

El análisis histopatológico se realizó como se describe en el apartado 1.4.5.4 de metología. Los anticuerpos utilizados en inmunohistoquímica se muestran en la tabla siguiente:

Tabla 15. Anticuerpos utilizados para en análisis inmunohistoquímico de tumores derivados de los transfectantes de K-RAS estudiados

Anticuerpo Primario	Dilución	Casa comercial
Integrina β1(CD29)	1:100	BD (610468)
ANGPT2 (C-term)	1:50	Abgent (AP10103b)
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2)/Thr202/Tyr204)(20G11)	1:100	Cell signalling (4376)
Phospho-MAPK-P38	1:100	Cell signalling (9211S)
Vimentina	1:300	Dako (M0725)
Integrina (β y α) "screening" Kit		Chemicon (ECM440)
Anti-PTHLH	1:50	Abgent (ABIN394303)
VEGF-A	1:1000	Abcam (ab46154)
β-catenina	1:300	Dako(M33539)
Serpina-1	1:750	Abcam (ab28207)
CXCR4	1:300	Epitomics (clone UMB2; #3108-1)
AKT-P (S473)	1:10	Dako (M3628)

6.3.8. Variables evaluadas y Análisis estadístico.

Las variables clinico-histopatológicas analizadas en cada grupo fueron: tiempo de supervivencia, tasa de injerto, tamaño tumoral, porcentaje de necrosis, afectación metastásica linfática, pulmonar y peritoneal, número y tamaño de los focos metastásicos en las localizaciones afectadas.

Las variables moleculares analizadas en cada grupo fueron: para inmunohistoquímica en tumor primario y en los focos metastásicos linfáticos, hepáticos y pulmonares los anticuerpos que se describen en la tabla 3 y por ensayo ELISA la IL-8 (en tumor primario y en metástasis linfáticas) y el VEGFA (en tumor primario).

El análisis estadístico que permitió la comparación de las variables evaluadas en cuanto a evolución y diseminación tumoral, moleculares, y de supervivencia entre los grupos WT, K12V y K13D se realizó como se describe en el apartado 1.3.5 de metodología

IV. RESULTADOS

1. NUEVAS ESTRATEGIAS PARA MEJORAR LA EFICIENCIA METASTÁSICA EN EL MODELO DE CCR

Los resultados obtenidos en estudios previos en los que los animales inyectados ortotópicamente, mediante OCMI, morían por crecimiento del tumor primario y no por diseminación metastásica, forzaron el desarrollo y la evaluación de nuevas estrategias para aumentar la eficiencia metastásica. El primer abordaje que utilizamos fue la movilización de las células madre de la médula ósea, en un intento de promover la formación del nicho premetastásico y aumentar así la capacidad de diseminación [24], antes de la inyección ortotópica de las células de CCR HCT116. La segunda estrategia que utilizamos fue la implantación subcutánea de las células de CCR HCT116, utilizando el pase previo a la inyección ortotópica, basándonos en el aumento de la diseminación tumoral, mediante pases sucesivos *in vivo*, descrita anteriormente por otros autores, tanto en modelos animales de CCR [99,100] como mediante pase SC en modelos de linfoma [101].

Para estudiar la efectividad de estos procedimientos, utilizamos la línea celular colorrectal HTC116, de la que ya conocemos su capacidad tumorigénica y su patrón de metástasis, ya que se utilizó previamente para el desarrollo del modelo de metástasis de CCR mediante la microinyección de éstas mismas células en la pared del colon (OCMI), generándose numerosas micrometástasis a nivel linfático y hematógeno, pero muy pocas macrometástasis, las cuales están circunscritas a ganglios linfáticos mesentéricos y focos tumorales diseminados en la cavidad peritoneal[88].

1.1 Efecto de la movilización de células de la medula ósea por administración de G-CSF sobre la eficiencia metastásica de la línea celular HCT116

Para estudiar si la movilización de células de la medula ósea, previamente a la inyección ortotópica, aumentaba la eficiencia de diseminación, se utilizaron dos grupos de animales: un grupo experimental, administrado con G-CSF, desde dos semanas antes de la inyección ortotópica de las células tumorales mediante OCMI, hasta una semana después de la misma, y un grupo control que se administró con el vehículo siguiendo el mismo esquema de administración. El hemograma realizado antes de la inyección de las células de CCR HCT116, a cinco animales pertenecientes a ambos grupos, mostró que la administración de G-CSF aumentaba los niveles de células circulantes, concretamente de los neutrófilos en un 40%, y disminuía, en un porcentaje similar, el número de linfocitos en la sangre de los estos ratones (**figura 19**). Iniciada la administración de G-CSF, y a lo largo de todo el experimento, se registró el peso de los animales, dos veces por semana, para evaluar si G-CSF producía toxicidad (**figura 20**).

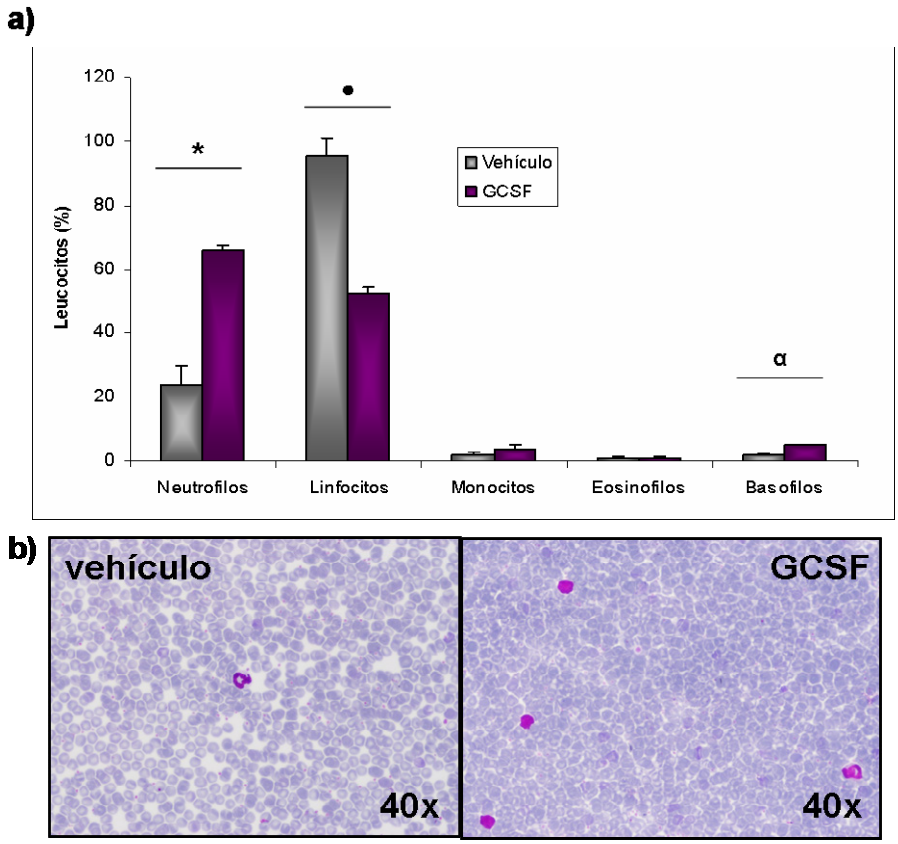


Figura 19. Aumento de leucocitos circulantes en el grupo tratado con G-CSF respecto al grupo control

(a). Microfotografía de una extensión de sangre teñida con Diff-Quick (b). Se observa mayor cantidad de leucocitos en el grupo tratado con G-CSF Análisis estadístico: *p=0.019, ● p=0.016 y α p=0.027. *(Test de Mann Whitney)*

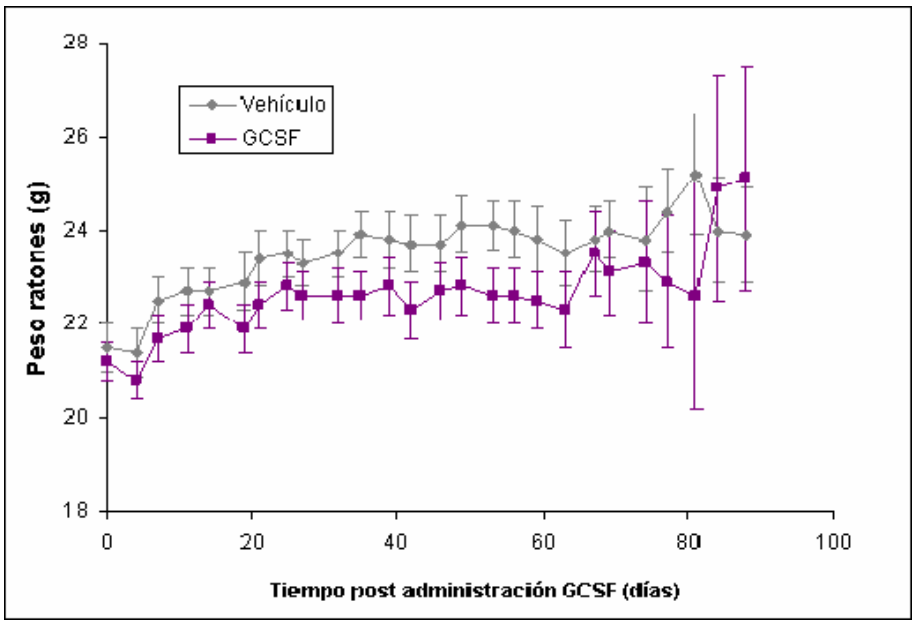
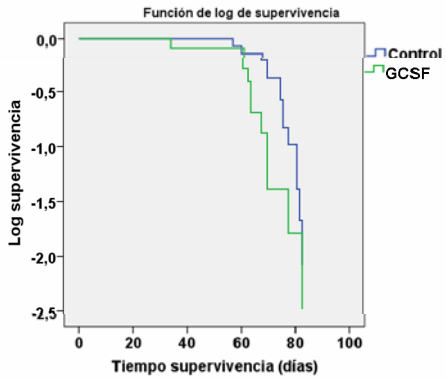


Figura 20. Evolución del peso de los animales por administración de G-CSF.
SE registró el peso de los ratones desde el primer día de administración del vehículo o G-CSF, y durante todo el experimento.

La administración de G-CSF, no cambió de modo significativo el tiempo de supervivencia de los animales en comparación con el grupo control (**tabla 16 y figura 21**).



	Chi-cuadrado	gl	Sig
Log Rank (Mantel-cox)	1,691	1	0,193
Breslow (Wilcoxon generalizado)	**3,260**	1	**0,071**
Tarone-Ware	2,645	1	0,104

Figura 21. Análisis de supervivencia aplicando el método de Kaplan-Meier entre el grupo control y G-CSF.
Las distribuciones de supervivencia se compararon utilizando los tests log- rank, Breslow y Tarone-Ware**.**

En las tablas 19 y 20 se muestra la tasa de injerto, el volumen tumoral y una estimación de la capacidad invasiva local (en la pared del ciego) por parte del tumor primario, así como el tiempo de supervivencia de los animales para los grupos control y experimental. Para el cálculo de la supervivencia se consideró solamente los animales positivos en tumor primario y/o con afectación metastásica.

Tabla 16. Tasa de injerto, volumen del tumor primario y tiempo de supervivencia obtenidos en los grupos control y en el tratado con G-CSF

		Tumor Local			
Grupo	Ratón (n)	Tasa de injerto [ratón (%)]	Volumen Tumoral (mm^3) Media±EE	mDPI (cm)	Supervivencia (días) Media±EE
HCT-116 (Vehículo)	16	100	**3.949±446**[a]	**1,9±0,1**[b]	76±2
HCT-116 (G-CSF)	12	100	**1.467±237**[a]	**1,3±0,1**[b]	67±4

*mDPI= distancia al punto de inyección.*Análisis estadístico: [a] *p= 0.0001,* [b] *p=0.005 (test de Mann Whitney)*

La administración de G-CSF disminuyó significativamente el volumen del tumor primario con respecto al grupo control (p=0.0001). A nivel macroscópico, y como estimación indirecta de invasión local, definimos un parámetro morfométrico que identificaba la distancia máxima al punto de inyección (mDpi), midiendo el desplazamiento de las células tumorales en el ciego desde el punto de inyección hasta el punto máximo alcanzado por la masa tumoral. Este parámetro fue significativamente inferior en el grupo tratado con G-CSF que en el grupo control, como se muestra en la **figura 22 y tabla 16**.

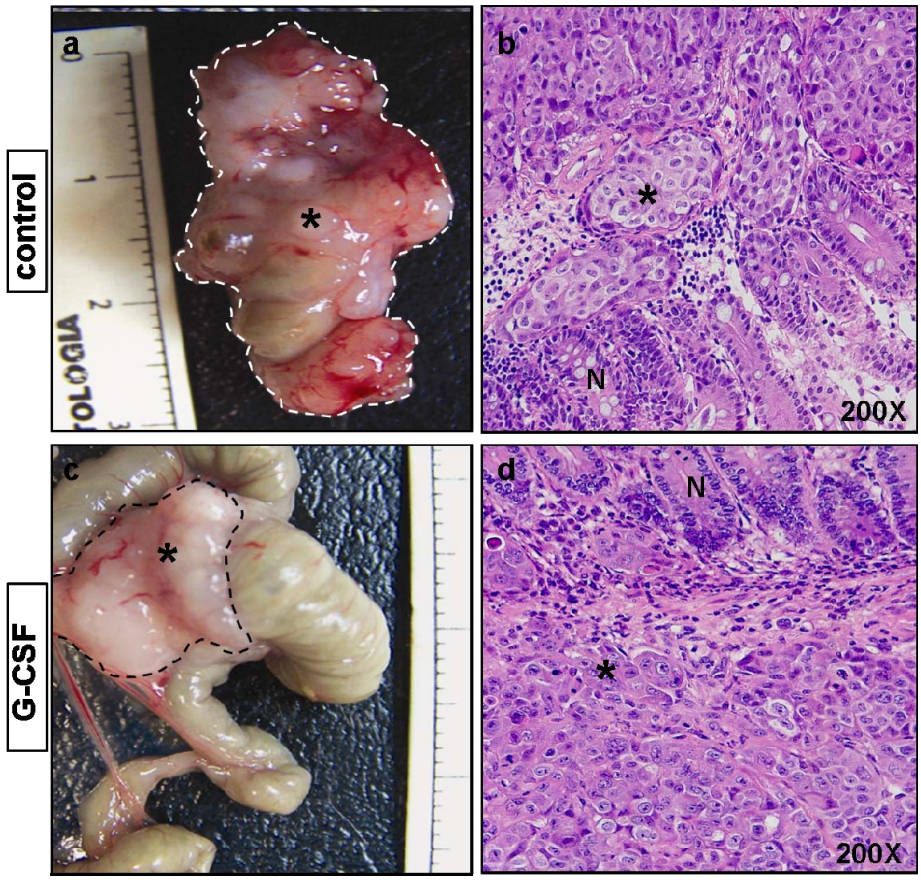


Figura 22. Fotografía de los tumores primarios del grupo control y del grupo G-CSF.
Macro y microfotografía de un tumor primario representativo del grupo control (a y b), y un tumor representativo del grupo G-CSF (c y d)

El análisis de las metástasis linfáticas (**tabla 17**), a nivel macroscópico, mostró una disminución significativa (p=0.044) del número de animales afectados en el grupo tratado con G-CSF, respecto al grupo control (88% frente al 50%), encontrándose una tendencia similar en el número de animales afectados por carcinomatosis peritoneal (81% versus 67%), aunque no llegó a ser significativa.

Tabla 17. Número de ratones afectados con macrometástasis en el grupo control y en el grupo tratado con G-CSF

Grupo	Ratón (n)	Análisis histopatológico Metástasis macroscópicas [na/nt (%)]			
		Linfáticas	Hepáticas	Pulmonares	Carcinomatosis
HCT-116 (Vehículo)	16	**14/16 (88)** [a]	0	0	13/16 (81)
HCT-116 (G-CSF)	12	**6/12 (50)** [a]	0	0	8/12 (67)

Análisis estadístico: [a] *p= 0,044 (Test de Fisher)*

El análisis de las metástasis hepáticas mostró que el número de ratones afectados por metástasis en este órgano se redujo significativamente (p=0.044) en el grupo tratado con G-CSF respecto al grupo control (8% *versus* 43%). Además, se observó una reducción, tanto a nivel micro como macroscópico en el número de focos, y en su área, alcanzando significación estadística únicamente en relación al número de focos microscópicos (14 para el grupo control frente a 3 para el grupo tratado con G-CSF) (**tabla 18**).

Tabla 18. Número y área de focos metastásicos hepáticos en el grupo control y tratado con G-CSF

Grupo	Ratón (n)	Metástasis Hepáticas				
		Ratones afectados **[na/nt (%)]**	Microfoci		Macrofoci	
			(n)	Área (mm^2)	(n)	Área (mm^2)
(HCT-116) (Vehículo)	16	**7/16 (43)** [a]	**14** [b]	0,5±0,2	1	41
(HCT-116) (G-CSF)	12	**1/12 (8)** [a]	**3** [b]	0,1±0,06	0	0

Análisis estadístico: [a] *p= 0,044 (Test de Fisher),* [b]*p= 0,066 (Test de Mann Whitney)*

A nivel pulmonar, también se observó una disminución significativa (p=0.009) en el número de animales afectados tras la adminitración de G-CSF (17% en el grupo tratado con G-CSF frente a 69% en el grupo control). Además, el número de focos microscópicos disminuyó significativamente (p=0.038) en el grupo tratado con G-CSF (86 focos en el grupo control frente 44 en el grupo G-CSF), mientras que no se observaron diferencias en el área de estos microfocos entre ambos grupos. (**tabla 19**)

Tabla 19. Área y número de focos metastásicos pulmonares en el grupo administrado con el vehículo y en el grupo administrado con G-CSF

Grupo	Ratón (n)	Metástasis Pulmonares				
		Ratones afectados **[na/nt (%)]**	Microfoci		Macrofoci	
			(n)	Área (mm^2)	(n)	Área (mm^2)
HCT-116 (Vehículo)	16	**11/16 (69)** [a]	**86** [b]	1,3±0,7	1	21
HCT-116 (G-CSF)	12	**2/12 (17)** [a]	**44** [b]	3,8±2,1	1	16

Análisis estadístico: [a] *p= 0,009 (Test de Fisher),* [b]*p= 0.038 (Test de Mann Whitney)*

A nivel linfático, los resultados mostraron una disminución significativa (p=0.044) en el número de animales afectados por éste tipo de metástasis en el grupo experimental respecto al control. El análisis de los focos linfáticos reveló, a su vez, una disminución significativa (p=0.002) del número de focos macroscópicos (5 versus 29 focos), así como una disminución significativa (p=0.010) en su área en el grupo G-CSF respecto a GC (**tabla 20**). Sin embargo, no se encontraron diferencias a nivel microscópico ni en el número de focos, ni en su área (**tabla 20**).

Tabla 20. Número y área de los focos metastásicos linfáticos en el grupo administrado con el vehículo y en el grupo tratado con G-CSF

		Metástasis linfáticas				
Grupo	Ratón (n)	Ratones afectados **[na/nt (%)]**	Microfoci		Macrofoci	
			(n)	Área (mm^2)	(n)	Área (mm^2)
HCT-116 (Vehículo)	16	**14/16 (88)** [a]	20	1,0±0,3	**29** [b]	**121±10** [c]
HCT-116 (G-CSF)	12	**6/12 (50)** [a]	14	1,3±0,5	**5** [b]	**25±4** [c]

Análisis estadístico: [a] *p= 0,044 (Test de Fisher)* [b] *p= 0.002,* [c] *p= 0.010 (Test de Mann Whitney)*

En la **figura 23** se muestra el efecto global de la administración del G-CSF en cuanto al número de animales afectados y el número y área de los focos metastáticos linfáticos, hepáticos y pulmonares, tanto microscópicos como macroscópicos en relación con el grupo control.

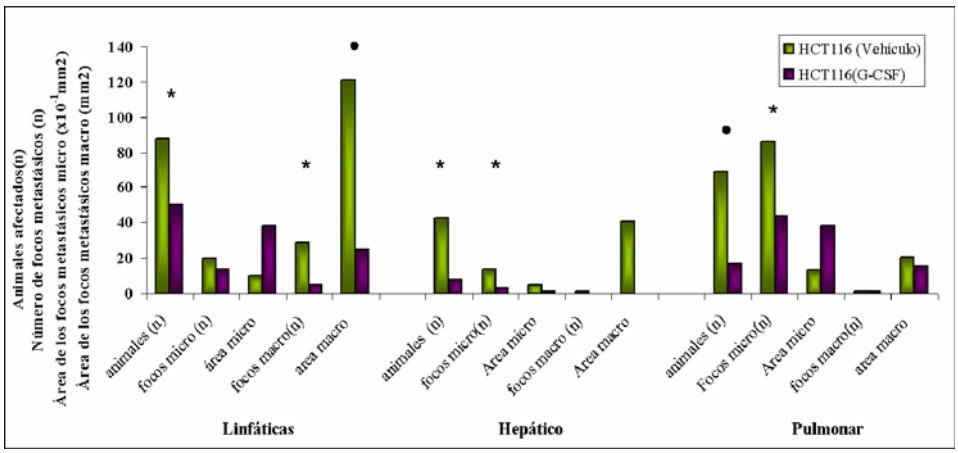


Figura 23. Diseminación linfática, hepática y pulmonar asociada a la administración de G-CSF
La diferencias estadísticas se muestran como * ($p<0,05$) y ● ($p<0,01$)

En resumen, la movilización de las células circulantes de la médula ósea, y concretamente, el aumento de la circulación de los neutrófilos produjo una disminución del volumen y de la capacidad invasiva del tumor primario, a la vez que una reducción de la diseminación metastásica, en el modelo de metástasis de CCR. Éste efecto fue contrario al esperado según nuestra hipótesis de partida.

1.2 Efecto del pase previo subcutáneo sobre la capacidad metastásica de la línea celular HCT116 inyectada ortotópicamente.

La segunda estrategia que utilizamos para aumentar la eficiencia en la diseminación metastásica fue el condicionamiento mediante pase subcutáneo previo a la inyección ortotópica. Para ello, se implantaron dos grupos de animales. En un grupo se inyectaron células HCT-116 directamente en el ciego de ratones *Swiss nude*, mediante OCMI (grupo ORT), mientras que en otro grupo se inyectó ortotópicamente el mismo número de células, pero aisladas previamente de tumores crecidos

subcutáneamente y disgregados (SC+ORT). Una vez inyectados, se realizó un seguimiento de los animales dos veces por semana hasta ser sacrificados por el desarrollo del tumor en el ciego y/o las metástasis en los distintos órganos.

Para el cálculo de volumen tumoral y tiempo de supervivencia se consideró solamente a los animales positivos en tumor primario y/o con afectación metastásica. Los resultados obtenidos tras las necropsias se muestran en las **tablas 21 y 22**.

Tabla 21. Tasa de injerto, volumen del tumor primario y tiempo de supervivencia obtenido en los grupos ORT y SC+ORT

grupo HCT116	Tasa Injerto (%)	Volumen tumoral (mm^3) media±EE	Tiempo de Supervivencia (días) media±EE
ORT	100	1275± 299	67±8
SC+ORT	78	1158± 215	69±5

La utilización del pase subcutáneo previo, no modificó significativamente la tasa de injerto ya que fue similar a la descrita previamente para esta línea celular, que es del 70-100% [88]. El análisis del volumen tumoral mostró una ligera disminución tras el pase subcutáneo, pero no alcanzó significación estadística.

El tiempo de supervivencia tampoco mostró diferencias significativas entre ambos grupos, siendo de 69±5 días en el grupo SC+ORT y 67±8 días para el grupo ORT.

Los tumores primarios generados eran de tipo indiferenciado en ambos grupos (**figura 24**), con una formación de luces inferior a un 5% y un porcentaje de necrosis entre el 40 y 70%. Ambos grupos presentaron

invasión de las capas submucosas, musculares y serosa (Estadío IV). Además, se observó una elevada invasión vascular en un porcentaje elevado de tumores de ambos grupos.

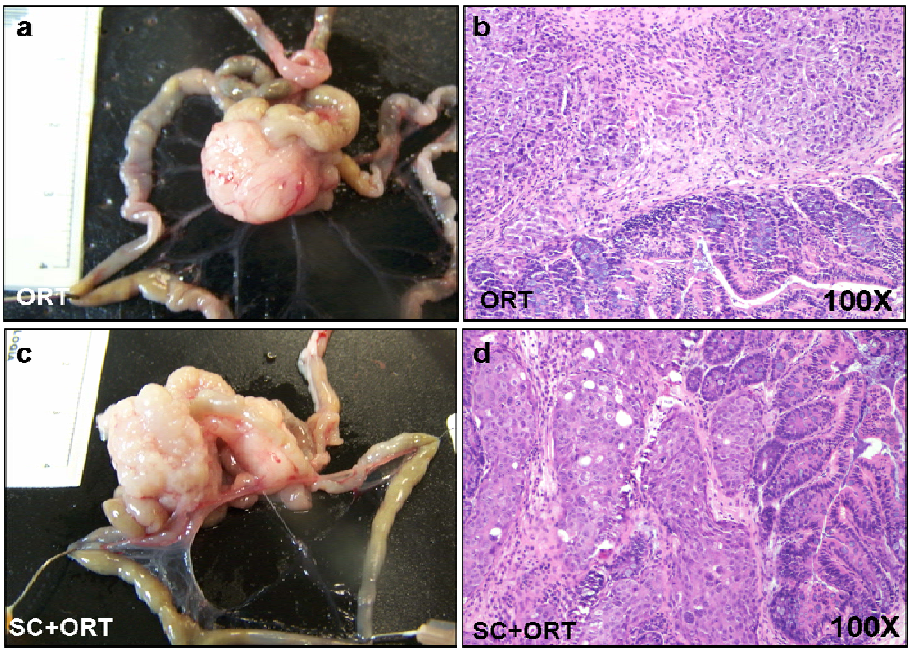


Figura 24. Fotografía de los tumores primarios de los grupos ORT y SC+ORT
Macro y microfotografía de un tumor primario representativo del grupo ORT (a y b), y de otro tumor representativo del grupo SC+ORT (c y d).

El análisis del porcentaje de necrosis y el contaje de células en muertas entre los tumores de ambos grupos no mostró diferencias significativas (p=0,58 y p=0,105 respectivamente), siendo la media de células muertas para el grupo ORT de 17,42± 2,69 y de 25,87±3,27 para el grupo SC+ORT.

El análisis histopatológico de los órganos afectados con crecimiento tumoral tras la necropsia, se resume en la **tabla 22**. En el grupo SC+ORT

se registraron 3 ratones que no habían desarrollado ni tumor primario ni metástasis, por lo que no se utilizaron en el análisis estadístico.

Tabla 22. Número de ratones afectados por micro y/o macrometástasis en el grupo inyectado ortotópicamente (ORT) y en el grupo con pase subcutáneo previo a la inyección ortotópica (SC+ORT).

		Metástasis Totales $[n_a/n_t$ (%)] [a]			
Grupo HCT116	Ratón (n)	Linfáticas	Hepáticas	Pulmonares	Carcinoma-tosis
ORT	12	6/11 (55)	9/11 (90)	**4/11 (30)** [b]	11/11 (100)
SC+ORT	9	5/9 (56)	8/9 (89)	**8/9 (89)** [b]	9/9 (100)

a. Metástasis totales: agrupación de metástasis macroscópicas y microscópicas, expresadas en ***[na/nt (%)]:*** *[número de ratones afectados en el grupo/número de ratones positivos totales en el grupo (porcentaje de ratones afectados)]*
b. Diferencias estadísticamente significativas a $p<0.05$ (Test de Fisher)

El análisis histopatológico de las metástasis totales (microscópicas y macroscópicas) mostró que la utilización del pase subcutáneo aumentaba significativamente el número de animales afectados por metástasis pulmonares, con un 89 % en el grupo SC+ORT frente a un 30% en el grupo ORT.

En el resto de las localizaciones analizadas propensas a desarrollar metástasis (linfáticas, hepáticas y/o carcinomatosis) no se observaron diferencias entre ambos grupos en cuanto al número de ratones afectados, 55 frente a 56% a nivel linfático, 89 frente a 90% en el hígado y del 100 % a nivel peritoneal.

1.2.1 Diseminación metastásica linfática

El análisis de las metástasis linfáticas, tanto a nivel regional (ganglios linfáticos mesentéricos) como distal (nódulos linfáticos peripancreáticos) (**figura 26**) mostró focos microscópicos, y macroscópicos en ambos grupos. Se consideró como foco macroscópico aquel cuyo diámetro superaba 1 mm y por ende el área era mayor de 785000 μm^2. A nivel linfático, en el grupo SC+ORT, se observaron focos macroscópicos visibles (diámetro>3mm, que eran fácilmente apreciables visualmente en la preparación, como conglomerados ganglionares, **figura 26e y tabla 23**) mientras que en el grupo ORT no se observó ninguna metástasis ganglionar visible.

Tabla 23. Cuantificación del número de focos metástásicos linfáticos en los grupos ORT y SC+ORT.

Grupo HCT116	Focos Micro (n)	Focos Macro Totales[a] (n)	Visibles-conglomerado ganglionar * (n)	% del conglomerado ganglionar que invade parénquima
ORT	21	**12**[b]	**0**	**0**
SC+ORT	14	**29** [b]	**4**	**95%**

** Los múltiples focos microscópicos y macroscopicos coalescian, formando un conglomerado dificilmente cuantificable, por lo que fue considerado como una unidad*
[a] Focos Macro totales incluye focos macro y visibles
Análisis estadístico [b] p=(0.069 (Test de Mann Whitney)

Los focos tumorales metastásicos que afectaban a los gánglios linfáticos presentaban un área significativamente mayor (p=0.008) en el grupo SC+ORT que en el grupo ORT.

Por tanto, el pase subcutáneo generó no sólo un mayor número de focos macroscópicos sino también macrofocos de mayor tamaño (**tabla 24 y figura 25**).

Tabla 24. Cuantificación del área de los focos tumorales en ganglios linfáticos mesentéricos en los grupos ORT y SC+ORT.

Grupo HCT116	**Área Micro** Media±EE ($x10^5$ μm^2)	**Macro Área** Media±EE ($x10^5$ μm^2)	**Visibles-Área** Media±EE ($x10^5$ μm^2)
ORT	1,3	**56** [a]	**0**
SC+ORT	1,5	**113** [a]	**1813**

Análisis estadístico [a] *p=0.008 (Test de Mann Whitney)*

En la **figura 25** se presenta una visión integrada del efecto del pase subcutáneo previo a la inyección ortotópica (SC+ORT), respecto a la inyección ortotópica directa (ORT) en términos de aumento del número y área de los focos metastáticos linfáticos, ya sean microscópicos, macroscópicos o visibles.

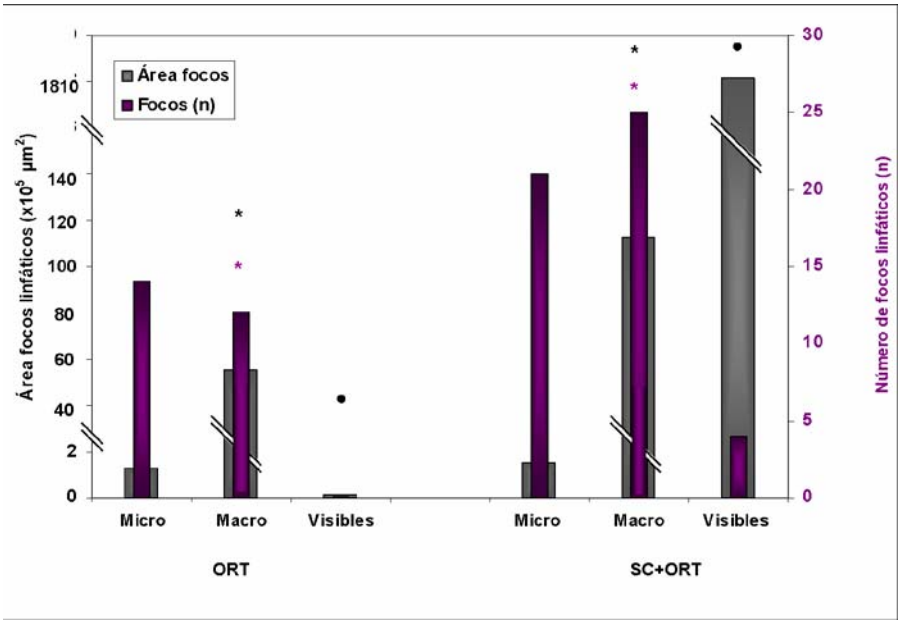


Figura 25. Comparación del número y el área de focos metastásicos linfáticos a nivel microscópico, macroscópico y visible entre el grupo ORT y SC+ORT.
Los simbolos * y ● muestran la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos comparados (test Mann Whitney).

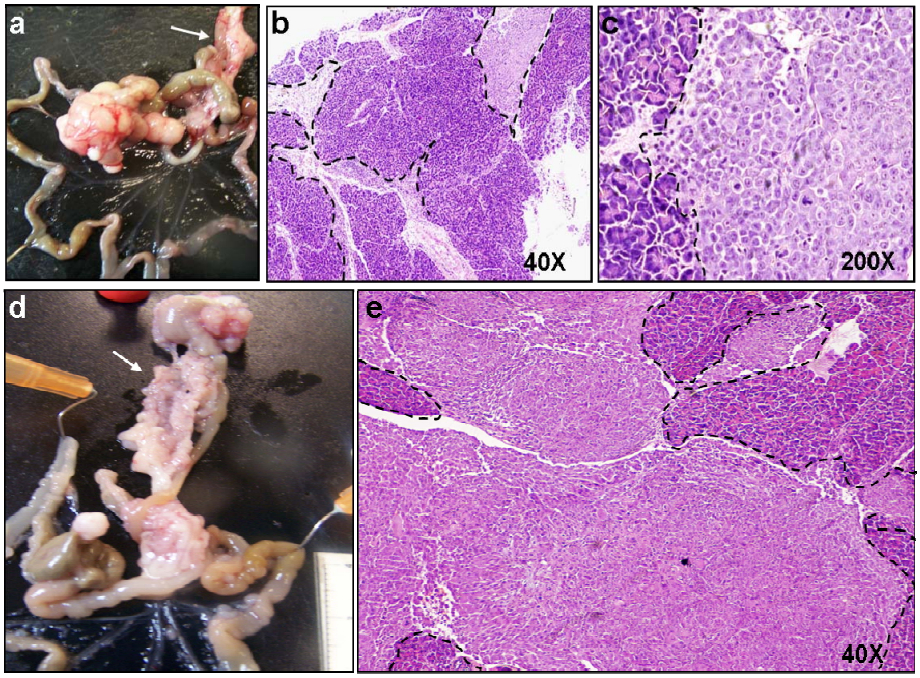


Figura 26. Metástasis linfáticas desarrolladas en los grupos ORT y SC+ORT
Macro y microfotografía teñida con H&E, de una metástasis linfática representativa del grupo ORT, conteniendo una micrometástasis (a y b) y microfotografía del grupo SC+ORT en la que se observan numerosas metástasis macroscópicas (e). Las flechas indican afectación macroscópica (magnificación de 40x y 200x).

1.2.2 Diseminación hepática

También se analizó el número de focos metastásicos encontrados en cada órgano afectado por animal y grupo experimental, observándose un incremento significativo en el número de focos tumorales hepáticos en el grupo SC+ORT respecto al ORT (**tabla 25, figura 27**).

Tabla 25. Área y número de focos metastásicos hepáticos en los grupos ORT y SC+ORT.

Grupo HCT116	Ratón (n)	Focos totales (n)	Micro Focos (n)	Área Micro Media± EE ($x10^5$ µm²)	Macro Focos (n)	Área Macro Media±EE ($x10^5$ µm²)	Focos Visibles % de Área tumor que invade hígado*	Área Macro Visible Media±EE ($x10^5$ µm²)
ORT	9/12	18[a]	18[b]	3,6±1,7[c]	0	0[d]	0	0[d]
SC+ORT	9/9	124[a]	109[b]	1,4±0,1[c]	13	19,8±6,7[d]	95%	Aprox 211,2[d]

*Análisis estadístico :[a] p<0,01, [b] p=0,003, [c] p=0.09, , [c,d] p<0,05 * Se da el porcentaje del parénquima hepático que ha sido invadido por el tumor. Media ± EE . Área tumoral/Área tejido (%).*

En el hígado de los ratones del grupo ORT se observaron un total de 18 focos metastásicos frente a más de 122 en el grupo SC+ORT.

Además del número de focos, se analizó el área de los mismos. A nivel hepático se observó que todos los focos originados en el grupo ORT eran microscópicos mientras que en el grupo SC+ORT se encontraron focos macroscópicos visibles (diámetro>3mm, fácilmente apreciables visualmente en la preparación). Cuando estos focos, se observaban, tanto externa como microscópicamente, se constataba que invadían alrededor del 95% del parénquima hepático en los dos casos encontrados. Además de los macrofocos visbles, en el grupo SC+ORT, se identificaron 13 focos macroscópicos (diámetro >1 y <3 mm), y 109 focos microscópicos. En ninguno de los ratones del grupo ORT se observaron metástasis hepáticas visibles. Por tanto, la utilización del pase subcutáneo previo a la inyección ortotópica, aumentó significativamente la transición de micro a macrometástasis hepáticas y permitió la aparición de macrometástasis visibles (**figura 28, tabla 25**).

En la **figura 27** se presentan los hallazgos histológicos representativos, observados en el grupo ORT (únicamente micrometástasis) y en el grupo SC+ORT (micro y macrometástasis y metástasis visibles), en cuanto a

diseminación hepática, por lo que se puede determinar el efecto que se obtuvo mediante el pase subcutáneo previo a la inyección ortotópica en términos de aumento del número y del área de los focos metastáticos hepáticos, ya fueran microscópicos, macroscópicos o visibles.

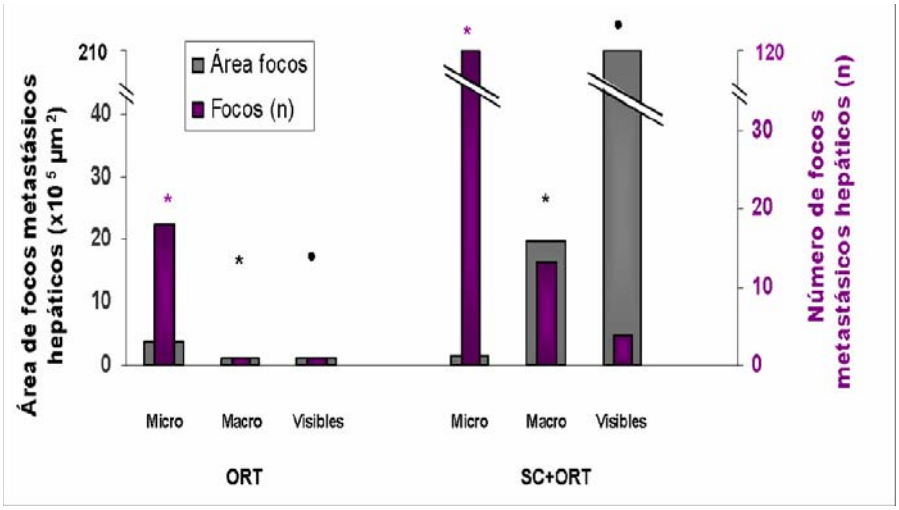


Figura 27 . Número y área de los focos hepáticos metastásicos a nivel microscópico, macroscópico y visible en los grupos ORT y SC+ORT.
El asterisco muestra las diferencias significativas entre grupos (test Mann Whitney).

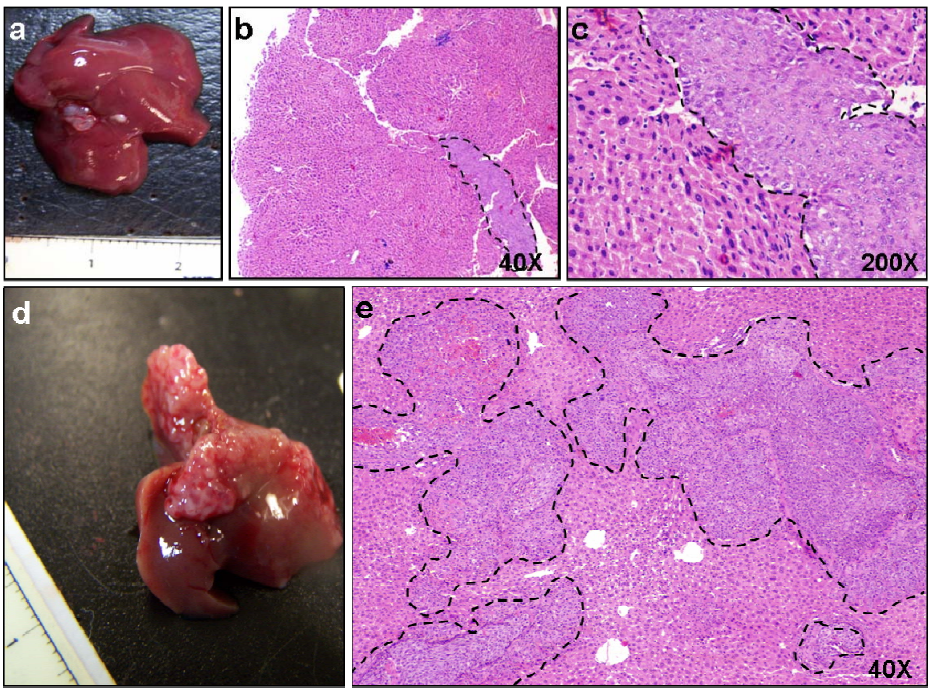


Figura 28. Metástasis hepáticas desarrolladas en los grupos ORT y SC+ORT. Macro y microfotografía de un hígado representativo de los animales del grupo ORT, conteniendo una micrometástasis fotografiada a bajo (a) y a gran aumento (c). Macrofotografía de un hígado representativo de los animales del grupo SC+ORT, en el que se observa el hígado infiltrado por numerosas metástasis macroscópicas y su correspondiente H&E, un hallazgo presente únicamente en este grupo (d y e). La línea punteada en la tinción con H&E muestra el área afectada por la metástasis (color violeta) dentro del parenquima hepático (color rojizo).

1.2.3 Diseminación pulmonar

También se determinó en número y tamaño de las metástasis pulmonares en los grupos ORT y SC+ORT. En ambos grupos se observaron focos macro y microscópicos, pero no visibles. Se registró un aumento significativo en cuanto al número de focos microscópicos en el grupo SC+ORT (176 focos), respecto al grupo ORT (80 focos). Sin embargo, su área media fue similar en ambos grupos tanto a nivel micro como macroscópico (**figura 29 y 30, tabla 26**).

Tabla 26. Área y número de focos metastásicos pulmonares en los grupos ORT y SC+ORT.

Grupo HCT116	**Animales Afectados** (%)	**Micro Focos** (n)	**Área Micro** media± EE ($x10^5$ μm^2)	**Macro Focos** (n)	**Área Macro** media±EE ($x10^5$ μm^2)
ORT	**30%**[a]	**80**[b]	0,6± 0,1	1	39,8
SC+ORT	**89%**[a]	**176**[b]	0,8± 0,1	3	20±2,9

Análisis estadístico [a] $p<0,05$, [b] $p=0.018$, $p=0.921$ entre grupos en el área de los micro focos (test Mann Whitney)

En la **figura 29** se presenta una visión global del efecto del pase subcutáneo previo a la inyección ortotópica en términos de aumento del número de focos metastáticos por animal y del número de animales afectados por focos metastáticos pulmonares, constatando su efecto potenciador del desarrollo de metástasis en el pulmón.

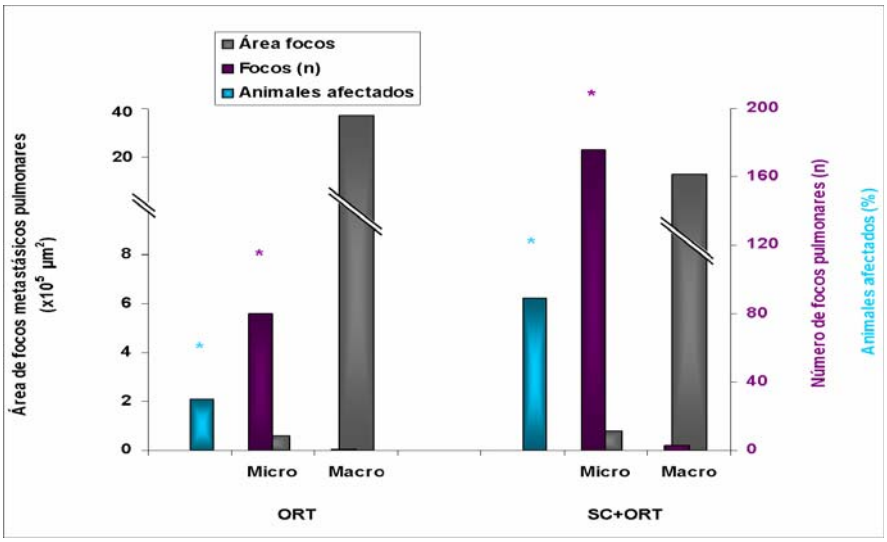


Figura 29. Comparación del número y área de los focos micro y macro pulmonares y el número de animales afectados entre los grupos ORT y SC+ORT. El asterisco muestra las diferencias significativas entre grupos (Test de Mann Whitney)

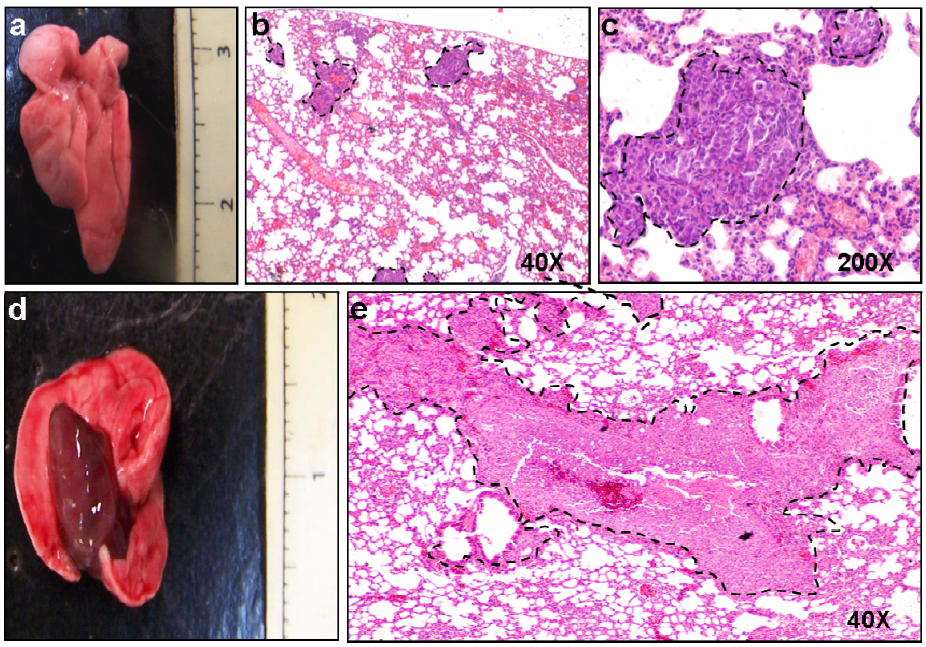


Figura 30. Metástasis pulmonares desarrolladas en los grupos ORT y SC+ORT. Macro (a) y microfotografía de un pulmón representativo de los animales del grupo ORT, conteniendo una micrometástasis en bajo (b) y a mayor aumento (c); y microfotografia representativa del grupo SC+ORT (d y e), en el que se observa el pulmón infiltrado por numerosas micrometástasis además de una macrometástasis (e). H&E. La línea punteada circunscribe cada una de las metástasis.

1.3. Análisis molecular de tumor primario y focos metastáticos en los grupos ORT y SC+ORT

A continuación, se describen los resultados del análisis molecular realizado en tumor primario y focos metastáticos en los animales del grupo ORT y del grupo SC+ORT que persigue la identificación de patrones de expresión y/o activación de proteinas asociados con el aumento de la eficacia metastásica observada por inyección ortotópica tras pase subcutáneo previo. Las proteínas estudiadas están implicadas en la regulación de la proliferación, muerte celular, adhesión, invasión, diseminación tumoral y vascularización tumoral.

1.3.1. Expresión de integrina beta 1 en tumor primario y metástasis

Para evaluar si el pase subcutáneo alteraba la expresión de las distintas integrinas, se realizó un "screening", por inmunohistoquímica, en el que se evaluó la expresión de las α integrinas (1, 2, 3, 4, 5, 6 y ν) y las β integrinas (1, 2, 3, 4, 5 y 6). Las integrinas median la adhesión de la célula epitelial a la membrana basal, y participan en la migración, proliferación y la supervivencia de las células tumorales en distintos tipos de cáncer.

Esta evaluación se inició con la puesta a punto de la tinción inmunohistoquímica para los distintos anticuerpos y una vez optimizados, se determinó el nivel de expresión de cada proteína en secciones de tumor primario, para cada uno de los ratones de ambos grupos, utilizando únicamente zonas viables del tumor y descartando las zonas próximas a las áreas necróticas. De las trece integrinas evaluadas, únicamente la integrina β1, que tenía un patrón de tinción de membrana, registró una expresión

diferencial, con expresión elevada en todos los tumores primarios del grupo ORT y débil en los tumores del grupo SC+ORT ($p<0.01$**, figura 31 y 32**)

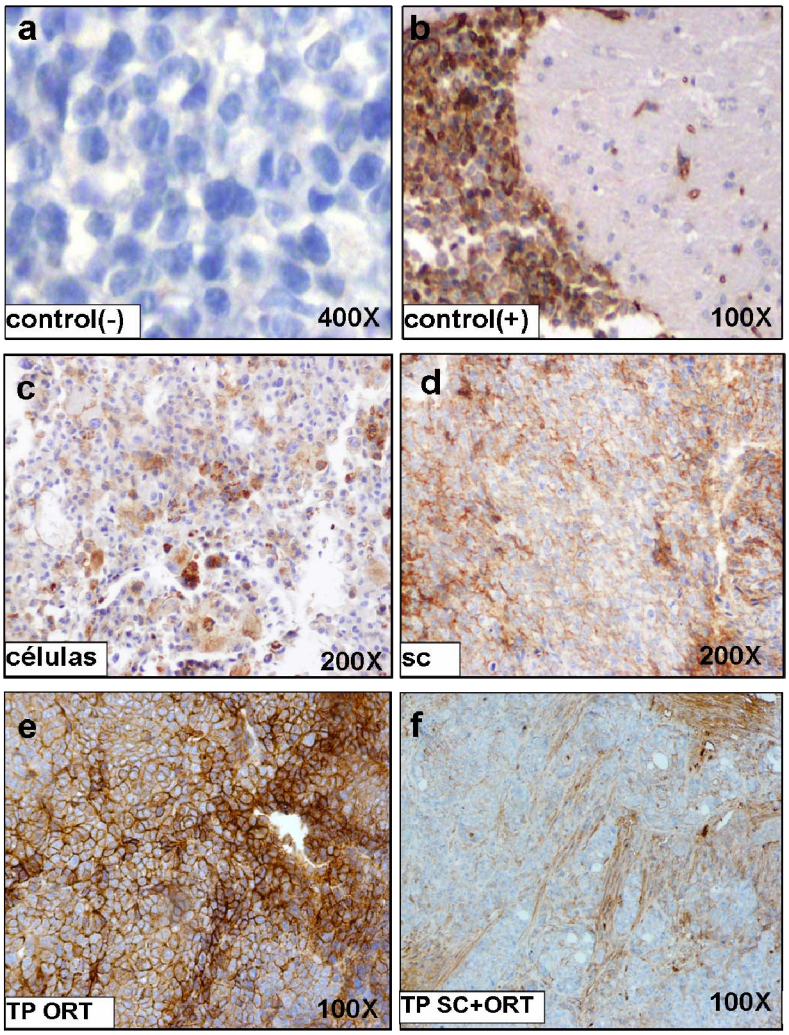


Figura 31. Tinción inmunohistoquímica de Integrina β1 en muestras de tumor primario de ratones inyectados con la línea tumoral HCT116 para los grupos ORT y SC+ORT.
Control negativo: bloque celular de células HT de linfoma difuso de células grandes (a); control positivo: cerebro de ratón infiltrado con células HT tras pase subcutáneo (b). Células de CCR HCT116 (c); tumor subcutáneo de ratones inyectados con la línea celular HCT116 (d), tumor primario de ratones inyectados con la línea tumoral HCT116 directamente en el ciego, ORT (e) y tumor primario desarrollado por inyección ortotópica tras pase subcutáneo, SC+ORT (f). Magnificación 400x y 100x.

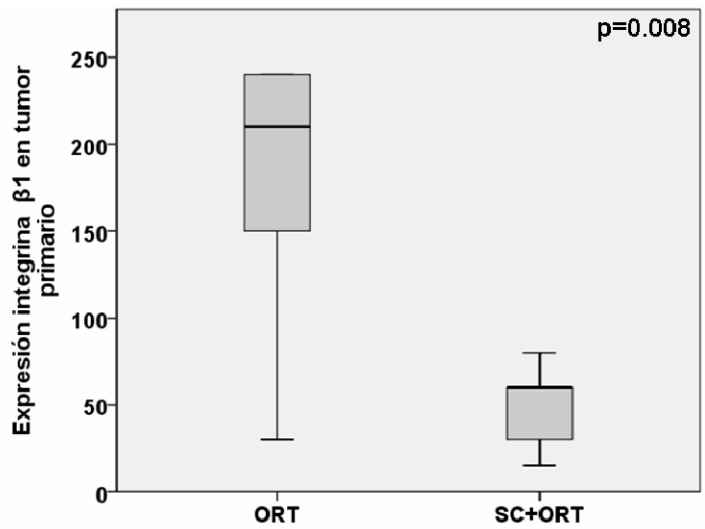


Figura 32. Cuantificación de la expresión de integrina β1 en tumor primario de los grupos ORT y SC+ORT.
Análisis estadístico: p=0.008 (Test de Mann-Whitney)

También se analizó la expresión de integrina β1 en los focos metastáticos pulmonares y hepáticos, encontrándose diferencias significativas entre ambos grupos en ambas localizaciones en el mismo sentido que en el tumor primario, es decir registrándose un nivel de expresión significativamente mayor en el grupo ORT que en el SC+ORT (**figura 33,34**)

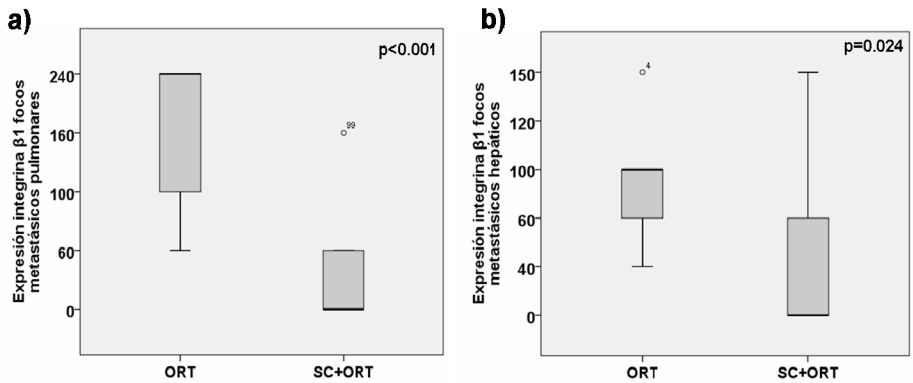


Figura 33. Cuantificación de la expresión de integrina β1 en los focos metastáticos pulmonares (a) y hepáticos (b) de los grupos ORT y SC+ORT
Análisis estadístico: p=0.0001 (a) y p= 0.024 (b) (Test de Mann-Whitney)

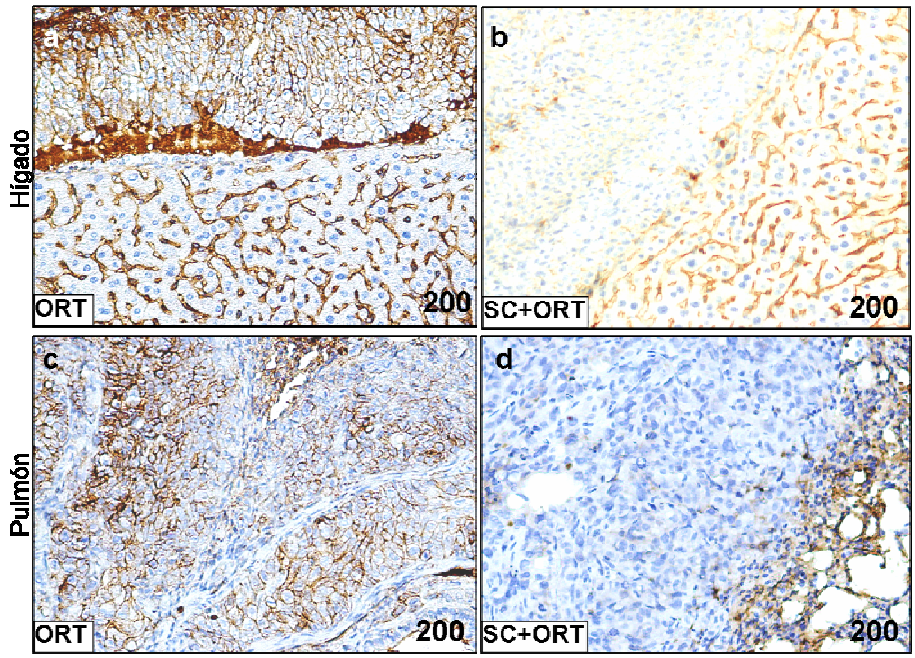


Figura 34. Tinción por inmunohistoquímica de Integrina β1 en muestras de hígado y pulmón afectados por metástasis en los ratones inyectados con la línea tumoral HCT116 en los grupos ORT (a y c) y SC+ORT (b y d).
Magnificación 200x

1.3.2 Activación de las vías de MAP quinasa y AKT

Se analizó si el pase subcutáneo influía en la expresión y/o activación de las proteínas de la vía ERK (MAPK) y de la vía PI3K/AKT. La activación de MAPK, medida como "phospho-MAPK", disminuyó ligeramente tras el pase subcutáneo en la mayoría de los casos, sin embargo esta diferencia no fue significativa (**figura 35 y 36**)

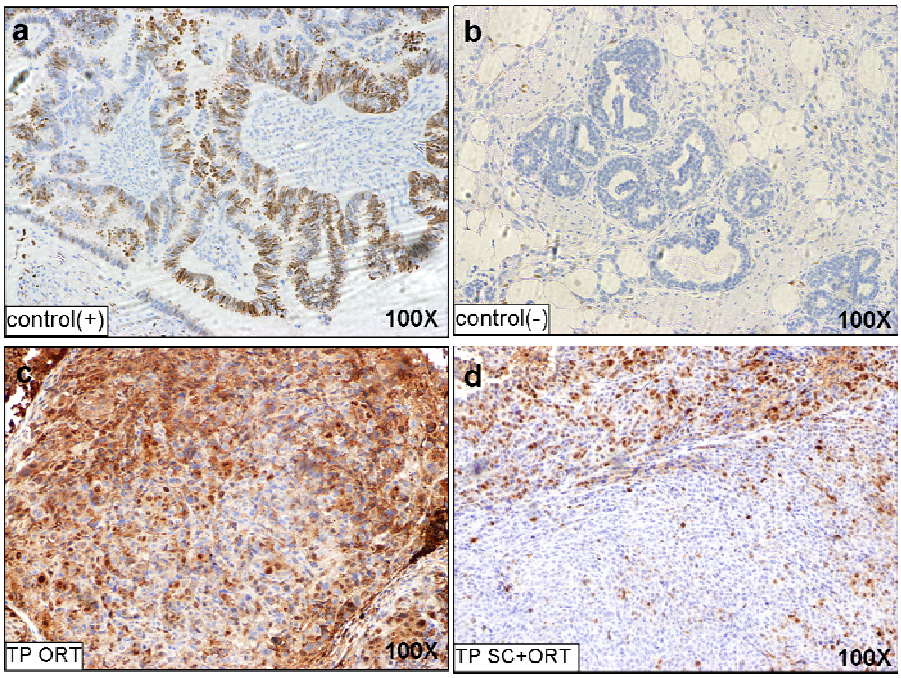


Figura 35. Análisis de la activación de MAPK en los grupos ORT y SC+ORT por IHQ, utilizando anticuerpo contra formas fosforiladas.
a: ovario (control positivo); b: mama (control negativo), c: tumor primario del grupo ORT y d: tumor primario del grupo SC+ORT. Magnificación de 100x.

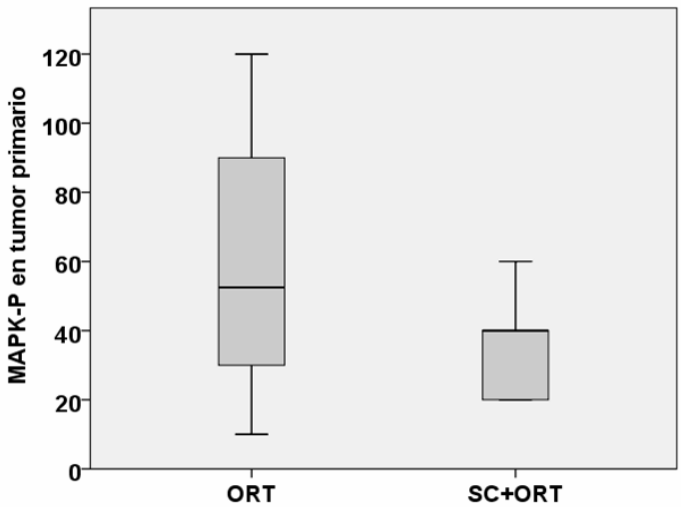


Figura 36. Niveles de activación de MAPK en los grupos ORT y SC+ORT.
Análisis estadístico: p=0,135 (Test de Mann-Whitney)

El análisis de la activación de la proteína MAPK en las metástasis linfáticas, hepáticas y pulmonares no mostró diferencias significativas entre grupos (p> 0,05), a pesar de mostrar una tendencia hacia una mayor activación en el grupo ORT

Además de MAPK, se analizó la activación de AKT. Esta es una proteína de la vía de PI3K, implicada en angiogénesis y proliferación celular. El análisis de la activación de AKT, determinada mediante un anticuerpo anti AKT-"phospho", resultó significativamente mayor en los tumores primarios del grupo SC+ORT que el el grupo ORT (**figura 37 y 38**). A pesar de que encontramos expresión y activación de AKT-P en el parénquima pulmonar y hepático, no hubo positividad en tejido tumoral de los focos metastáticos en ninguna de las localizaciones metastásicas: linfática, hepática y pulmonar (**figura 39**), por lo que una vez colonizado el órgano el tejido tumoral parecía perder la activació de AKT en ambos grupos.

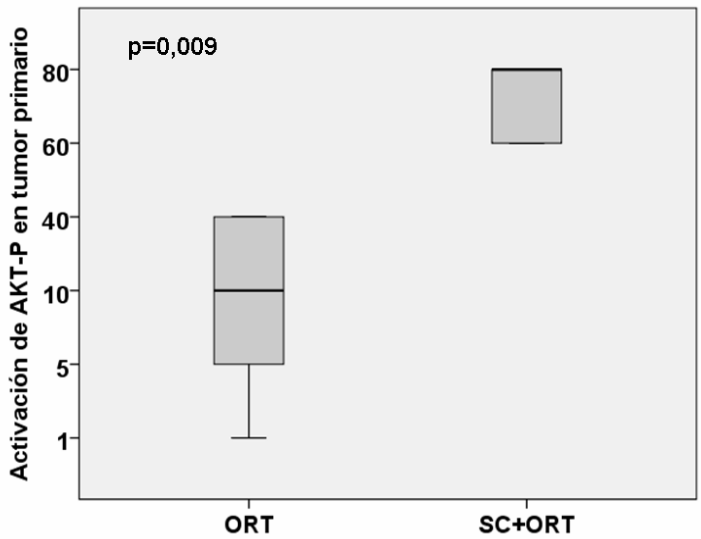


Figura 37. Cuantificación de la activación de AKT (AKT-p) en los grupos ORT y SC+ORT
Análisis estadístico: p=0,009 (Test de Mann-Whitney)

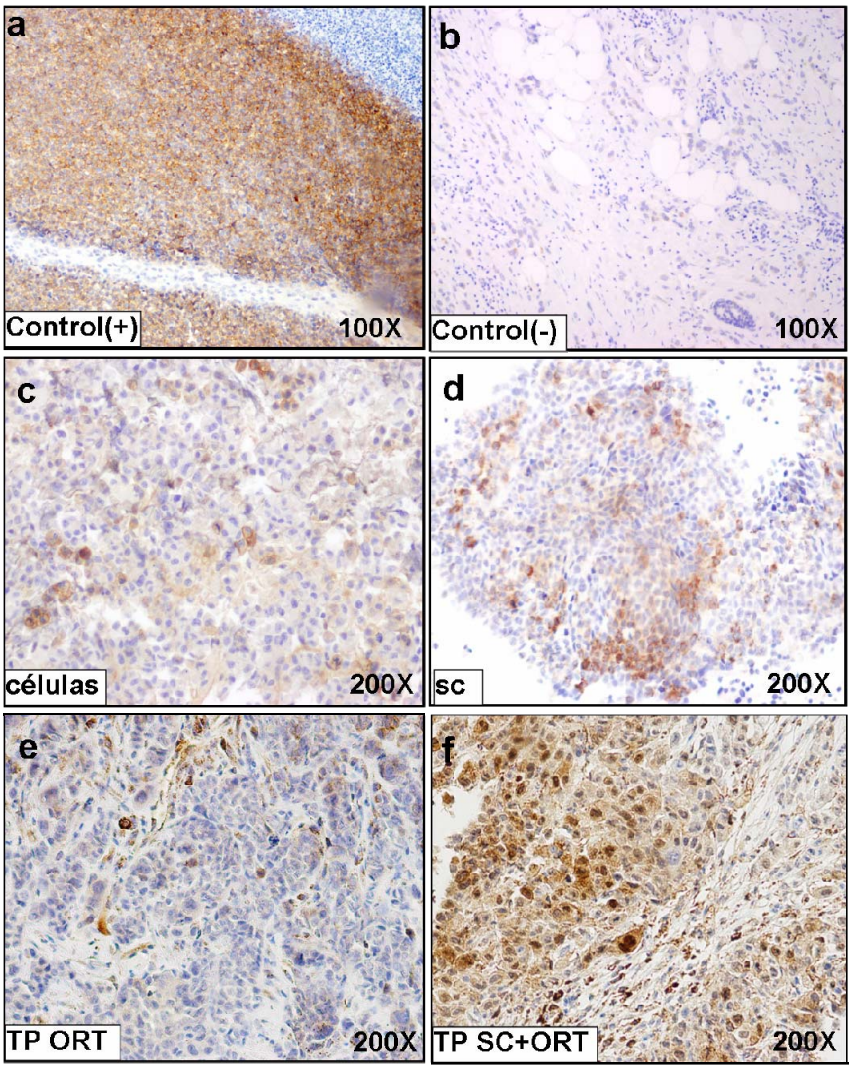


Figura 38. Análisis de la activación de AKT por IHQ en tumor primario de los grupos ORT y SC+ORT.

a: tumor subcutáneo WSU (control positivo); b: mama (control negativo), c: células HCT116; d: tumor subcutáneo de un ratón inyectado con línea celular HCT116 y e y f: tumor primario del grupo ORT y SC+ORT; Magnificación 100x y 200X.

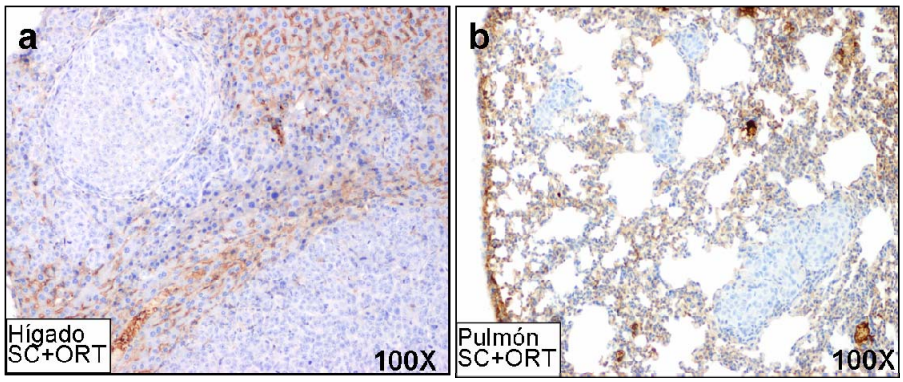


Figura 39. Análisis de la activación de AKT (AKT-p) por IHQ en metástasis (a) pulmonar y (b) hepática en el grupo SC+ORT.
Magnificación 100x.

1.3.3 Análisis de la expresión de VEGFA en tumor primario

La expresión de VEGFA en las muestras de tumor primario se determinó mediante ensayo ELISA. Se observó un aumento significativo (p=0.04) de VEGF-A en el grupo SC+ORT respecto al grupo ORT (**figura 40**)

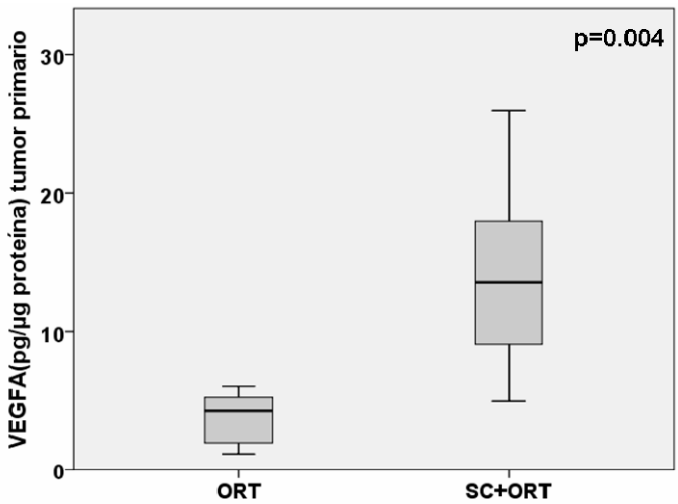


Figura 40. Análisis de la expresión de VEGFA en tumor primario en los grupos ORT y SC+ORT mediante ensayo ELISA
Análisis estadístico: p=0,004 (Test de Mann-Whitney)

El análisis de la expresión de VEGF-A en focos metastáticos se realizó mediante inmunohistoquímica. La aplicación de este procedimientro demostró que, de modo similar al tumor primario, las metástasis pulmonares registraban un aumento significativo (p<<0,001) de expresión de VEGFA en el grupo SC+ORT respecto al grupo ORT (**figura 41 y 42**). No obstante, el análisis IHQ de VEGF-A en los focos linfáticos y hepáticos no mostró diferencias significativos entre ambos grupos (valor de probabilidad, p=0,0798 y p=0,967, respectivamente).

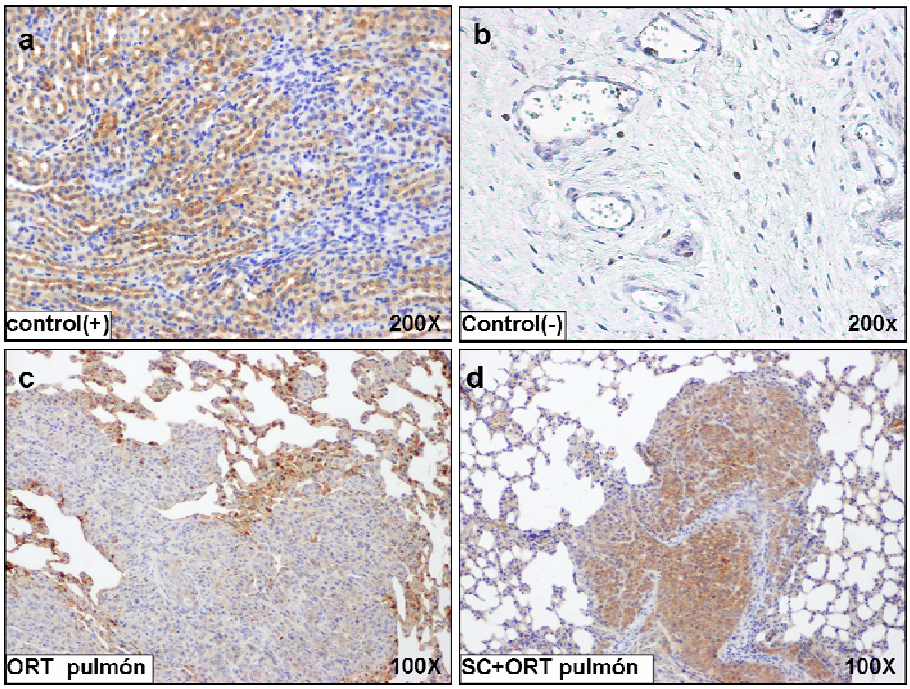


Figura 41. Análisis de la expresión de VEGFA en las metástasis pulmonares observadas en los grupos ORT y SC+ORT.
a: control positivo; b: control negativo; c: pulmón grupo ORT; d: pulmón grupo Sc+ORT. Análisis estadístico: p=0,001 (Test de Mann-Whitney). Magnificación: 100X y 200X.

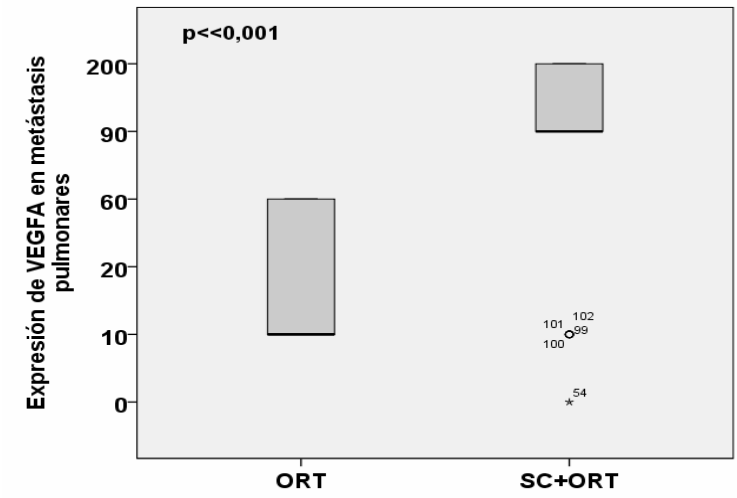


Figura 42. Expresión de VEGFA en las metástasis pulmonares observadas en los grupos ORT y SC+ORT.
Análisis estadístico: p=0,001 (Test de Mann-Whitney).

1.3.4 Análisis de la expresión de Ki67 en tumor primario

Se analizó, a su vez, la expresión del marcador de proliferación Ki67 en ambos grupos ORT y ORT+SC. A pesar de observarse un ligero aumento de la proliferación en el grupo SC+ORT repecto al ORT, no se alcanzó significancia (**figura 43**).

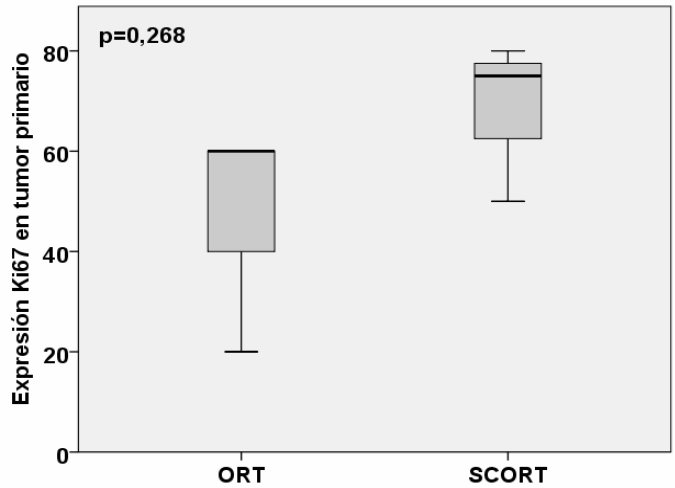


Figura 43. Cuantificación de la expresión de Ki67 en tumor primario de los grupos ORT y SC+ORT mediante IHQ.
Análisis estadístico: p=0,268 (Test de Mann-Whitney)

1.3.5 Análisis de la expresión de IL-8 en tumor primario y focos metastáticos

También analizamos la expresión de interleuquina 8 (IL-8) en muestras de tumor primario y metástasis en cada uno de los grupos estudiados, mediante ensayo ELISA.

En tumor primario, se observó un ligero descenso, aunque no significativo (p=0.11), en los niveles de expresión de IL-8 en el grupo SC+ORT respecto al ORT (**figura 44**)

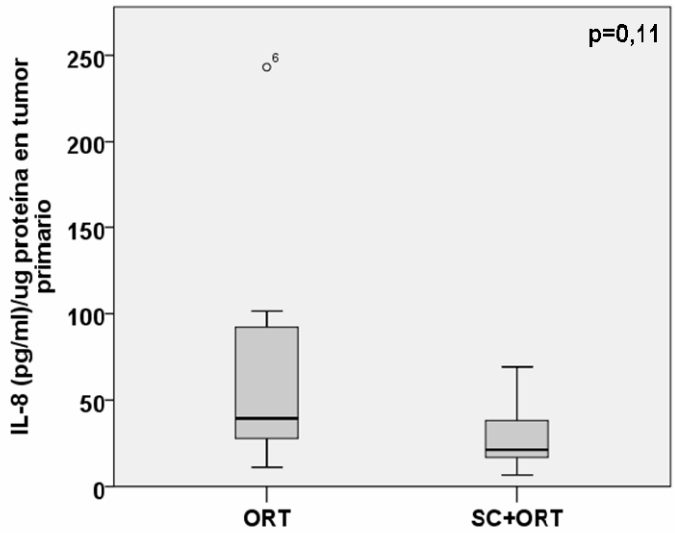


Figura 44. Análisis de la expresión de IL-8 en tumor primario en los grupos ORT y SC+ORT mediante ensayo ELISA.
Análisis estadístico: p=0,11 (Test de Mann-Whitney)

Se comparó, además, dentro de cada grupo (ORT o bien SC+ORT) la expresión de IL-8 en las metástasis linfáticas respecto al valor determinado en el tumor primario correspondiente. Este análisis mostró una expresión de IL-8 significativamente mayor en metástasis linfáticas que en tumor primario en el grupo SC+ORT (p=0.014), una diferencia que no se observó en el grupo ORT (**figura 45**).

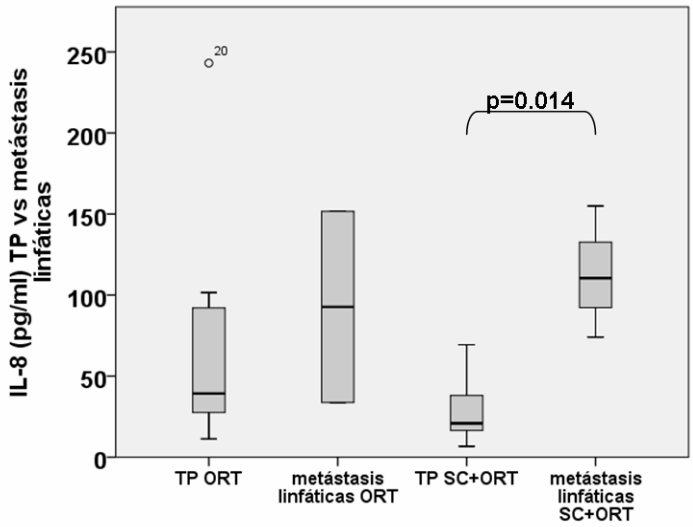


Figura 45. Comparación del nivel de expresión de IL-8 en tumor primario y en metástasis linfáticas para el grupo ORT y para el grupo SC+ORT, mediante ensayo ELISA.
Análisis estadístico: p=0,014 (Test de Mann-Whitney)

Aparte de la expresión de las proteínas descritas previamente, se analizaron marcadores adicionales relacionados con la regulación de la proliferación, muerte celular, transición epitelio-mesénquima (EMT) y diseminación metastásica en muestras de tumor primario de ambos grupos. No obstante, ninguno de estos marcadores adicionales pudo ofrecer información relevante relacionada con cambios moleculares asociados al pase subcutáneo previo a la inyección ortotópica de las células tumorales, ya que se observaba una expresión nula de la proteína estudiada (vimentina, snail1, Angpt2, Integrinas α1-v y β2-4 y β-catenina**)** o bien la ausencia de diferencias significativas de expresión entre entre el grupo ORT y el SC+ORT (serpina1, MAPK-P38-phospho, Ki67, γ-H2AX, IL8, PTHLH y CD44 v6). Los resultados obtenidos se resumen en la tabla siguiente.

Tabla 27. Análisis de la expresión de Vimentina, Serpina-1, MAPK-P38, Ki67, γ-H2AX, Snail1, IL-8, PTHLH, β-catenina, CD44v6, Integrinas α1-v y β2-4 y ANGPT2 en muestras de tumor primario de los grupos ORT y SC+ORT.

Anticuerpo	TP ORT	TP SC+ORT	p Value(grupo con mayor expresión)
Vimentina	negativo	negativo	-
Serpina1	=	=	0.643 (ORT up)
MAPK-P38-phospho	=	=	0,159 (ORT up)
Ki67	=	=	0,268 (SC+ORT up)
γ-H2AX	=	=	0,659 (SC+ORT up)
Snail1	negativo	negativo	-
IL-8	=	=	0,11 (ORT up)
ANGPT2	negativo	negativo	-
CD44 v6	=	=	p=1,0
Integrinas α1-v y β2-4	negativo	negativo	-
PTHLH	=	=	p= 0,157 (SC+ORT up)
β-catenina	Negativo	negativo	-

TP: *tumor primario; (=) expresión sin diferencias significativa entre grupos; Up=expresión elevada*
Down=baja expresión

2. GENERACIÓN DE LÍNEAS CELULARES DE CCR HUMANO QUE EXPRESAN DIFERENTES MUTACIONES DE K-RAS

Con objeto de estudiar la implicación de las diferentes mutaciones puntuales de K-*RAS* en tumorigénesis y en el desarrollo de metástasis en cáncer colorrectal, utilizamos diferentes abordajes. Nuestra primera aproximación fue construir vectores que expresaran distintas mutaciones del oncogén *K-RAS,* bajo su propio promotor o bajo el promotor de CMV, para ser transfectados en líneas celulares de CCR. Una segunda aproximación fue la de seleccionar los transfectantes en el modelo ortotópico in vivo en lugar de in vitro. La tercera aproximación fue utilizar clones que expresaran distintos alelos mutados del oncogén K-RAS previamente obtenidos por recombinación homóloga. Una vez obtenidos los clones que expresaran las distintas mutaciones de K-RAS, nuestro objetivo fue comparar su eficiencia en tumorigénesis y en metástasis en un modelo ortotópico y estudiar los posibles mecanismos moleculares asociados con los diferentes fenotipos observados.

2.1. Obtención de vectores de expresión portadores de diferentes mutaciones en el oncogén KRAS

Para la amplificación de K-*RAS* a partir del vector pcDNR Dual, se analizaron cada uno de los parámetros críticos de la PCR, como son la concentración de los reactivos utilizados en la mezcla (mix) y el programa de PCR diseñado.

Utilizamos la enzima pfu, ya que es mucho más específica, altamente termoestable, con mayor capacidad de procesamiento y con actividad

correctora de errores (proof-reading) debido a su actividad 3'-5' exonucleasa en comparación con otras polimerasas. Esta enzima no presenta actividad endonucleasa, de tipo nicking, ni actividad 5'-3' exonucleasa o nucleotidil transferasa terminal por lo que los productos de amplificación pueden ser utilizados directamente para su clonación en vectores de expresión con extremos romos, en este caso pTRE2pur.

Inicialmente, se procedió a optimizar las condiciones de la PCR variando la concentración de sulfato de magnesio (0-3 mM), dNTPs (0.4-1 mM) y el tiempo de extensión de 1-2 minutos /Kb (**figura 46**). Se utilizó el producto de PCR número 6 para la continuación del estudio.

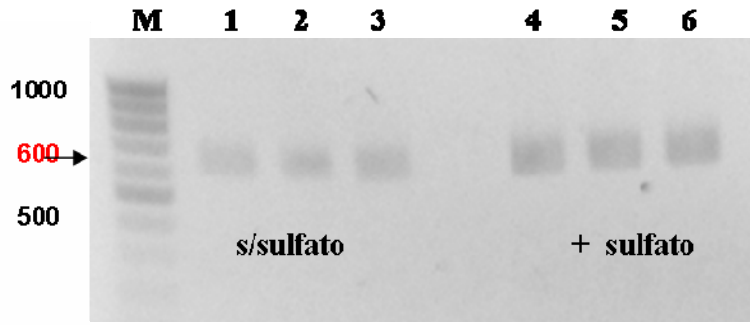


Figura 46. Productos de la amplificación de K-RAS a partir de pcDNR Dual.
Se cargaron 8 µl del producto de las diferentes amplificaciones, con y sin sulfato de magnesio en un gel de 1 % agarosa-bromuro de etidio (BME). Marcador de ADN Ladder 1 Kb (carril M); los números corresponden a las diferentes condiciones ensayadas

Se eligió el vector pTRE2 pur con el promotor de CMV como vector de expresión constitutiva para insertar oncogenes K-RAS con las distintas mutaciones. Las condiciones de la digestión de PTRE2pur también se optimizaron, variando la concentración de DNA, las unidades de enzima y el tiempo de incubación. Después de varios ensayos, los tests de digestión 4, 5 y 6 (**figura 47**) dieron resultados satisfactorios y reproducibles,

utilizándose 16 U de enzima NotI y 19,2 U de PuvII para digerir 200, 400 y 600 ng de DNA en 4 µl de tampón 10 x (B o D) durante 4 horas a 37ºC. Se utilizó el producto de digestión número 6 para la continuación del estudio. Posteriormente, el fragmento de K-RAS amplificado se clonó en el vector pTRE2pur linearizado y desfosforilado. El producto de la ligación se utilizó para transformar bacterias competentes DH5α que se seleccionaron en medio LB con ampicilina 0.1 mg/ml. Se verificó el clonaje del inserto de K-RAS por secuenciación y digestión con las enzimas de restricción utilizadas para linearizar el vector pTRE2pur (**figura 48 y 52).**

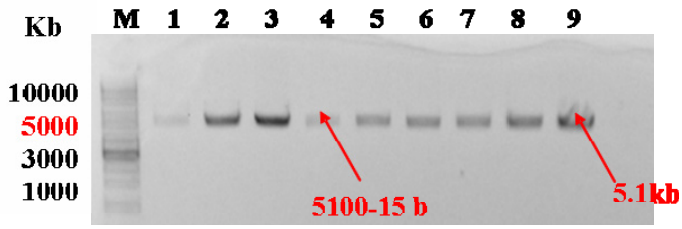


Figura 47. Digestión de pTRE2 pur.
Gel de agarosa -BME al 1 % sobre en el que se cargaron 8 µl del producto de digestión de las diferentes digestiones con concentraciones diferentes de ADN. Marcador ADN Ladder 10 Kb (carril M); los números corresponden a los diferentes tests realizados para optimizar la digestión. Carril 4: vector pTRE2pur digerido con ambas enzimas; carril 9: pTRE2pur digerido con Not I.

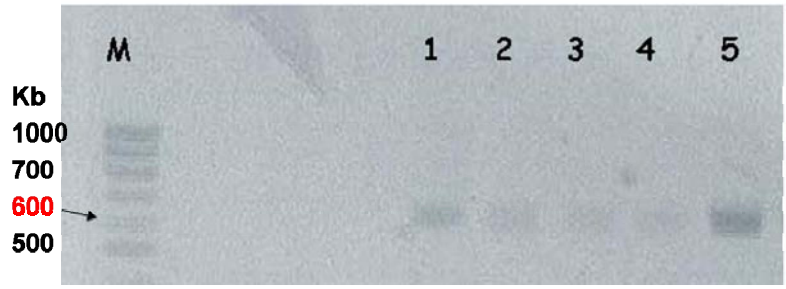


Figura 48. PCR de la ligación para verificar el inserto de K-RAS
PCR correspondiente al plásmido extraído de los diferentes clones transformados con el producto de la ligación y seleccionados en LB Amp. 1 % Gel de agarosa –BME al 1% en el que se cargaron 8 µl del producto de PCR. Marcador de tamaño ADN Ladder 10 Kb (carril M); los números corresponden a las diferentes colonias seleccionadas. La escogida para estudios posteriores fue la número 5.

Las secuencias del producto 5 y la de K-RAS teórica descrita en PubMed, se alinearon con la ayuda del software BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) (**figura 49**). En rojo, se indica la secuencia HA perteneciente al oligo pTRE up. En naranja se indica la diana de la enzima Not I perteneciente al oligo pTRE down y en verde se señala parte de la secuencia de *k-RAS.*

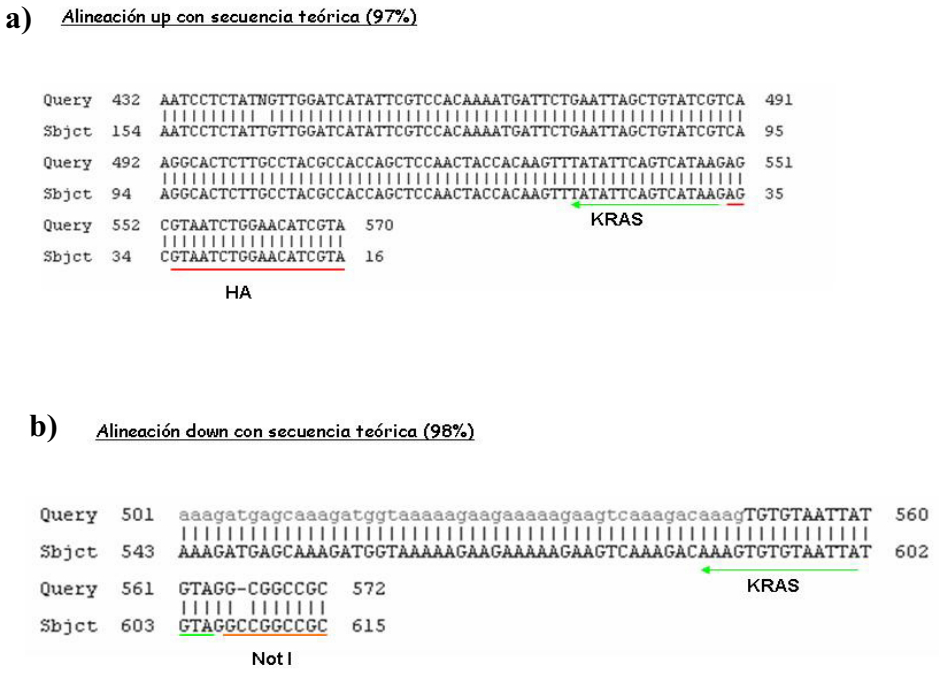


Figura 49. Verificación por secuenciación de la construcción del vector de expresión.
Alineación de la secuencia del clon 5 (**figura 48**) con la secuencia teórica de *k-RAS* incluídos los oligos pTRE del vector pTRE-*k-RAS*.

Una vez verificada la construcción del vector pTRE2pur-*k-RAS*, se realizó la mutagénesis para la obtención de los diferentes mutantes de interés para *k-RAS*.

Inicialmente, al vector pTRE2 pur *k-RAS* G61 wt12 (vector G61), se le quitó la mutación en el codón 61 para obtener la secuencia salvaje en este codon. Posteriormente, se utilizaron los oligos pTRE2pur (**figura 15** de metodología) para comprobar la presencia de las mutaciones en el codón 12 o 13 de K-ras tras la mutagénesis dirigida, amplificando por PCR y secuenciando (ver apartado 1.2 de metodología). Los resultados se

muestran en la **figura 50 y 51**. Se obtuvo una eficiencia para la mutagénesis del 90-100 % en todos los casos.

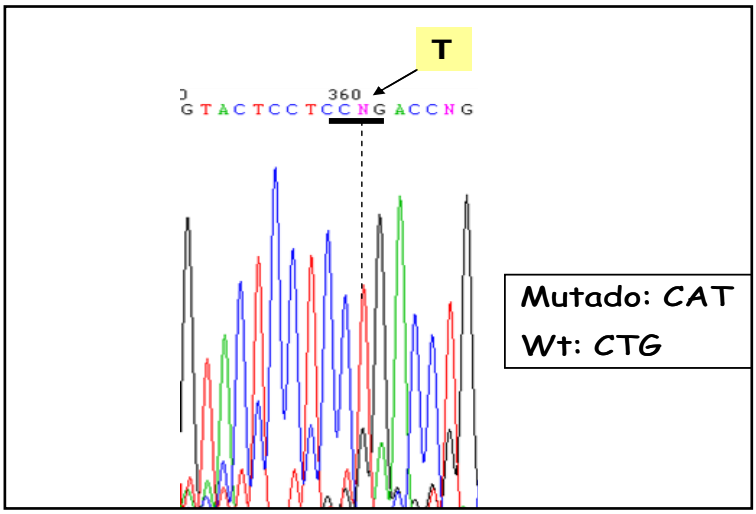


Figura 50. Verificación de la mutagénesis del codón 61 por secuenciación, para revertir la mutación a la secuencia silvestre. Cromatograma representativo de la secuencia de uno de los clones transformados con el producto de la mutagénesis del codón 61 seleccionados en LB Amp. Se confirmó que la mutagénesis se realizó correctamente. La base sustituida es una A (Adenina) por una T (Timina)

Una vez obtenido el vector pTRE2 pur *k-RAS* wt12, se realizaron paralelamente las mutagénesis en el codón 12, sustituyéndose por Valina (K12V), Aspártico (K12D) o Cisteína (K12C) y en el codón 13, por Aspártico (K13D). De la misma manera, todas las mutaciones introducidas fueron verificadas por PCR y secuenciación (**figura 51**), y posterior digestión con las enzimas de restricción utilizadas para la linearización del vector pTRE2 pur (**figura 52**). Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación por PCR y secuenciación se muestran en la **figura 15**.

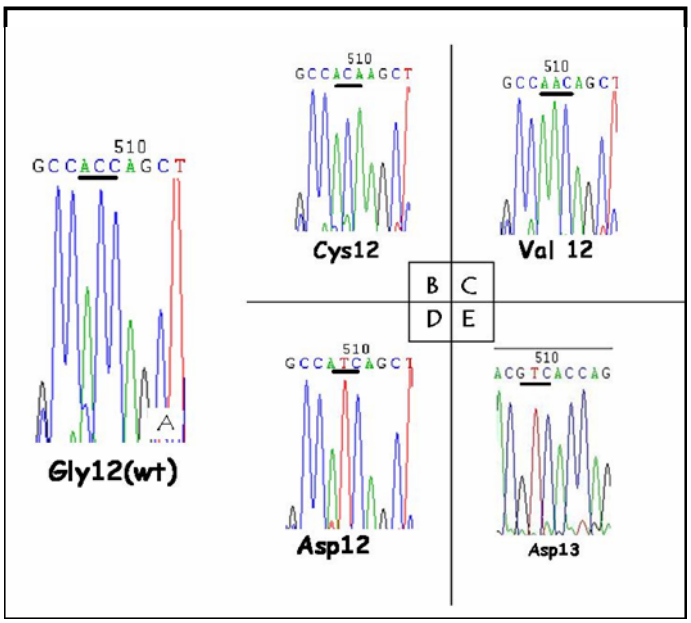


Figura 51. Verificación de la mutagénesis dirigida en el codón 12 y codón 13 por secuenciación.
Secuencia representativa de diversos clones transformados con el producto de la mutagénesis del codón 12 seleccionados en LB Amp. A la izquierda se presenta el cromatograma con, la secuencia wt, antes de la mutagénesis (A). A la derecha, se presentan los cromatogramas con la secuencia para cada uno de los clones transformados con el producto de las diferente mutagénesis realizadas: Cisteína 12 (B), Valina 12 (C), Aspártico 12 (D) y Aspártico 13 (E).

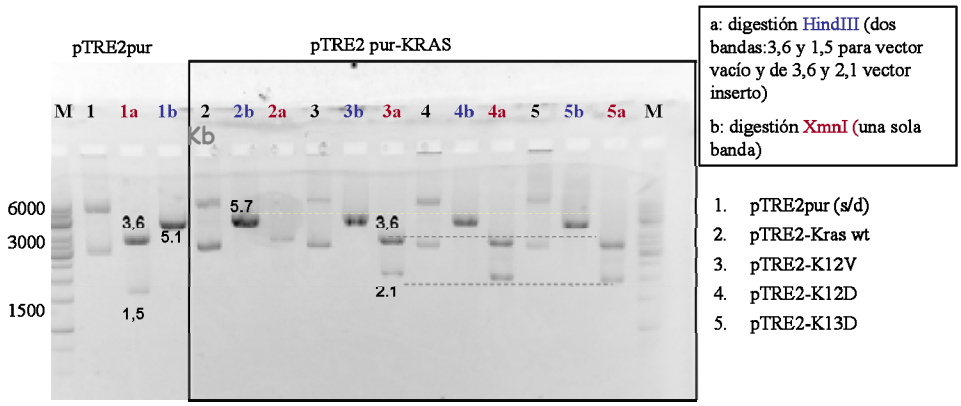


Figura 52. Verificación de la construcción del vector por digestión enzimática con las enzimas HindIII y XmnI.
Gel de agarosa -BME al 1% en el que se cargaron 8 µl del producto de digestión de los diferentes vectores construídos. Se utilizó el marcador ADN Ladder 10 Kb (carril M) para determinar el tamaño de los fragmentos. Los números y letras corresponden a las diferentes digestiones y los números sobre el gel indican al peso molecular del vector linearizado expresado en kb

2.2 Obtención de líneas celulares de CCR con expresión de las distintas mutaciones en el oncogén K-RAS y análisis fenotípico

Una vez generados los vectores, se transfectaron las líneas celulares de cáncer colorrectal humano MSI y MSS (**tabla 9** de metodología). Para ello, se utilizaron diversos procedimientos basados en distintos fundamentos físicos y/o químicos (lipofectamina, fugene y nucleoporación), descritos en el apartado 3.3 de metodología, siguiendo los protocolos especificados en cada kit y utilizando como control positivo un vector de expresión de GFP. De todas ellas, FUGENE fue el que dio mejores resultados.

Se probaron varias concentraciones de vector pTRE2pur con el inserto para aumentar las probabilidades de transfección. Los resultados de las transfecciones realizadas con FUGENE se resumen en la **tabla 28**. Todas las líneas celulares se transfectaron con el vector pTRE Neo y pTRE K12V, esta última considerada la mutación más agresiva [79, 102, 103,77]

Utilizamos dos líneas tumorales colorrectales que tenían la secuencia silvestre en los codones 12 o 13 del gen K-*RAS,* como son Colo320DM y Caco2, para obtener trasnfectantes que expresaran la mutación. Tras la transfección, en ambas líneas tumorales, Colo 320 (**figura 53**) y Caco2 (**figura 54**), se observó un cambio morfológico en las células. De presentar una morfología epitelial, pasaron a tener una morfología mesenquimal. A su vez, se observó un patrón de crecimiento distinto, pasando de un crecimiento en grandes clones, con numerosos contactos intercelulares, a un crecimiento en pequeños grupos o en células individuales. Se aislaron cinco clones independientes para ser secuenciados, utilizando los oligos que flanqueaban el inserto que contenía K-RAS para así verificar la incorporación del vector de expresión con el inserto adecuado y la presencia de la mutación en las células. Sorprendentemente, ninguno de los cinco clones presentó mutación en K-RAS (**figura 55**), a pesar de haberse producido un cambio morfológico y un patrón de crecimiento evidentes, que se mantenían en pases sucesivos.

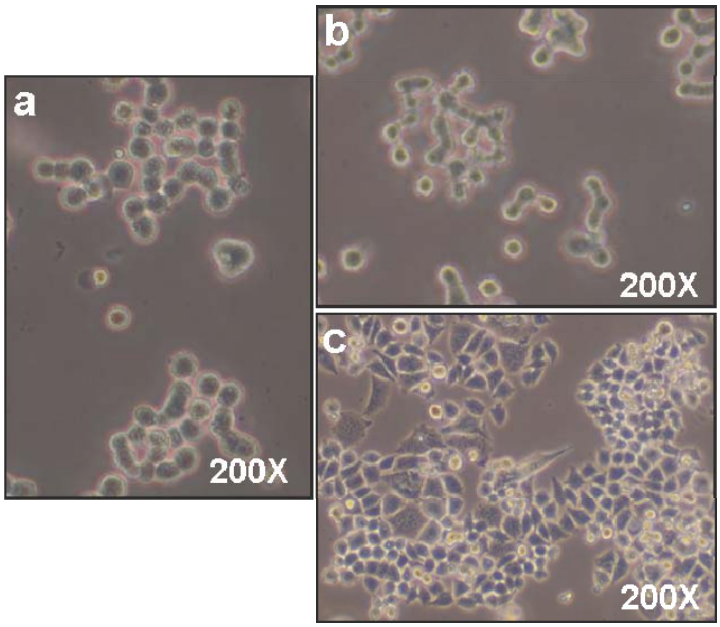


Figura 53. Microfotografias de la línea de cáncer colorrectal Colo320DM en cultivo

Células parentales, (b) Colo320DM transfectadas con pTRE *k-RAS* neo y (c) Células colo320DM transfectadas con pTRE K12V (magnificación 200x)

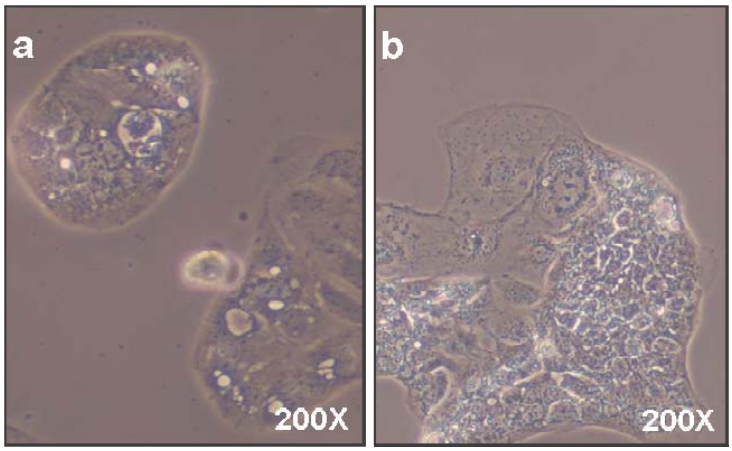


Figura 54. Microfotografías de la línea de cáncer colorrectal Caco2 en cultivo.

(a) Células parentales. (b) Caco2 transfectadas con pTRE (aumento 20x)

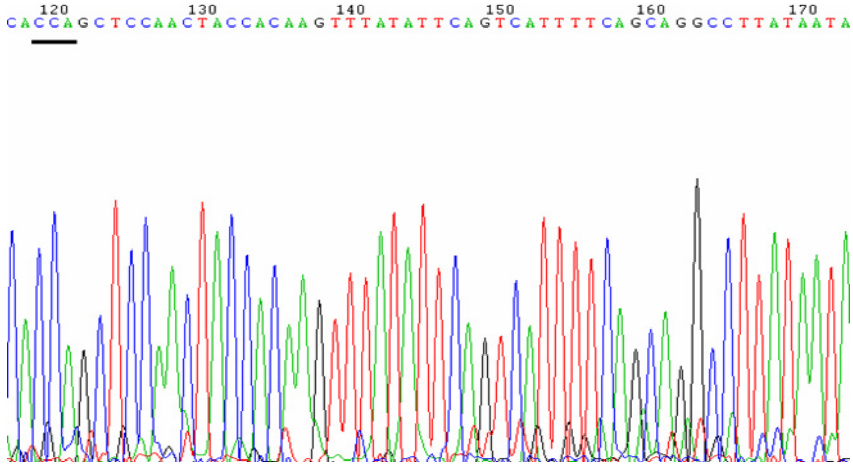


Figura 55. Cromatograma representativo de uno de los clones transfectados con el vector pTRE K12V en la línea colo320DM.
Ausencia de la mutación (AAC) en el codón 12, que porta el vector, y presencia de la secuencia wt (ACC) en este codon.

Los resultados obtenidos para la línea tumoral de CCR Caco-2 transfectada con el vector pTRE- K12V fueron similares a los descritos para Colo-320DM. (**figura 56**)

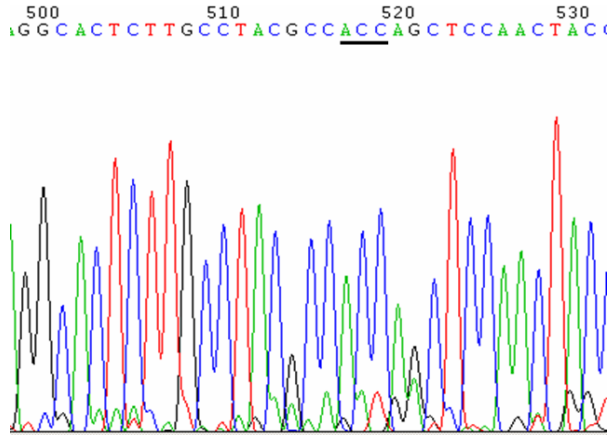


Figura 56. Cromatograma representativo de los clones transfectados con el vector pTRE K12V en la línea Caco2.
Se observó ausencia de la mutación en el codón 12 de K-ras (AAC), y la presencia de la secuancia wt (ACC) en este codón.

También transfectamos la línea colorrectal SW48, que presenta K-RAS silvestre, con los vectores pTRE-K12V y pTRE-K13D. Los clones obtenidos durante la selección con el antibiótico cambiaron la morfología, siendo ésta más mesenquimal, pero no se pudieron aislar, ya que al poco tiempo de iniciar su desarrollo, morían.

Por otra parte, transfectamos vectores que contenían el minigen de KRAS Neo (vector vacío) y K12V en la línea SW48. Las células transfectadas con K12V cambiaron su morfología al poco tiempo de la transfección, durante el período de selección (**figura 57**). Los clones aislados se secuenciaron para evaluar la presencia o ausencia de la mutación. Sin embargo, de los clones secuenciados ninguno presentó la mutación, a pesar de que el cambio morfológico era evidente y se mantenía en el tiempo (**figura 58**).

La **tabla 28** muestra el resumen de los resultados obtenidos de las transfecciones realizadas

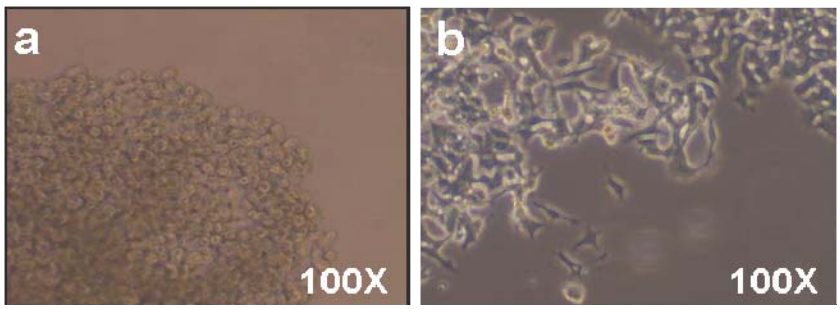


Figura 57. Microfotografías de la línea SW48 en cultivo.
A la izquierda células SW48 transfectadas con el mini gen de K-RAS NEO. A la derecha, estas mismas células transfectadas con K12V (aumento 100x)

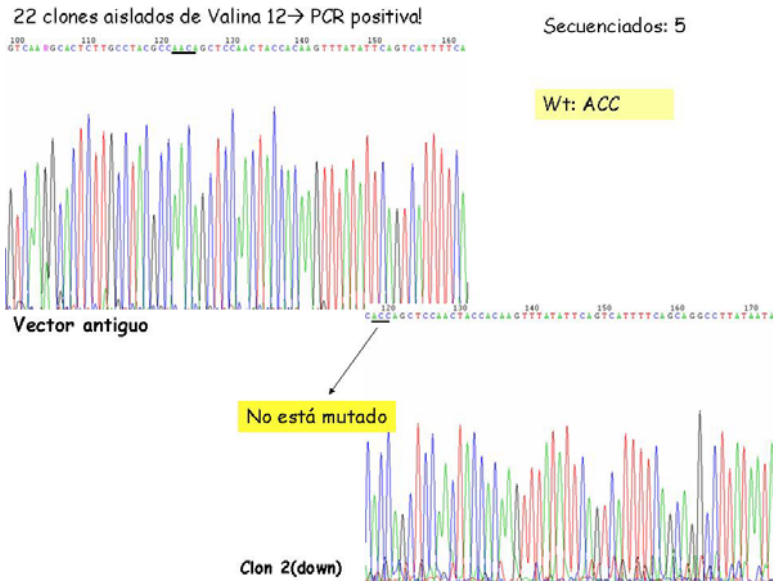


Figura 58. Cromatogramas representativos obtenidos a partir de los clones transfectados con el vector que contiene el mini gen K12V.
Se observa la ausencia de la mutación en el codón 12 (AAC) que porta el vector de expresión y la presencia de la secuencia wt (ACC) en este codón.

En la Tabla 28 se presenta un resumen de los resultados obtenidos en los clones generados mediante la transfección de los distintos vectores de expresión en las líneas celulares de CCR humano Colo320DM, Caco2 y SW48. Se describe la viabilidad, cambio morfológico y presencia o ausencia de la mutacio´n en el oncogén K-ras en los clones obtenidos.

Tabla 28. Resumen de los resultados de las transfecciones con los distintos vectores de expresión del oncogén K-RAS en las distintas línias celulares de CCR humano

Línea celular	Colo320 DM	Caco2	SW48	SW48	SW48
Mutación Interés	K- wt	K- wt B-mut	K-wt	K-wt	K-wt
Inestabilidad	MSS	MSS	MSI	MSI	MSI
Vector Transfectado	pTRE2 K12V	pTRE2 K12V	pTRE2-K12V	pTRE2-K13D y Neo	Mini gen KRAS
Promotor Vector Transfectado	CMV	CMV	CMV	CMV	Promotor KRAS
Cambio morfológico	Si	Si	Si, pero mueren antes de formar clones	Si, pero mueren antes de formar clones	Si
Supervivencia Clones	Si	Si	No	No	si
Presencia Mutación	Ausencia	Ausencia	No evaluado	No evaluado	Ausencia

2.3 Obtención de tumores por inyección ortotópica y selección in vivo de células de CCR portadoras de las distintas mutaciones

La pérdida de la mutación de K-RAS en los clones tras la transfección de las células con el vector portador del oncogén K12V y su posterior cultivo *in vitro*, nos llevó a explorar si las condiciones *in vivo* eran más adecuadas para conservar la mutación y/o mantener la viabilidad de las células que las condiciones *in vitro,* considerando que el microentorno tisular ortotópico tendría más similitudes al encontrado cuando se genera la tumorigénesis y

sería más adecuado para la selección de clones que el ofrecido mediante el cultivo celular. Con ese objetivo, se inyectaron ortotópicamente las células Colo-320 y las Caco-2 que habían sido transfectadas 24 horas antes con el vector pTRE- K12V en un grupo de ratones, y las células parentales sin transfectar en el grupo control. Tras la inyección ortotópica de ambas líneas celulares, ninguna dió resultados satisfactorios, ya que no se formó tumor local en ninguno de los nueve ratones s*wiss nude* inyectados del grupo control (células parentales) o del grupo experimental (células transfectadas con pTRE-K12V).

2.4 Introducción de mutaciones en K-RAS, B-Raf y PI3K (H1047R) en células SW48 utilizando recombinación homóloga

La falta de viabilidad de las células de CCR que expresaban los distintos mutantes de K-RAS bajo el promotor de CMV, o múltiples copias del minigén de K-ras bajo su propio promotor, sugirió que los niveles de expresión elevados de los mutantes de K-RAS podrían inducir la muerte de los transfectantes, ya que un promotor potente y/o la integración de multiples copias del oncogén en los trasnfectantes podrían inducir niveles elevados de expresión de los transgenes asociados. Consecuentemente, se pensó como tercera estrategia el utilizar la recombinación homóloga para introducir las mutaciones de interés en un solo alelo en la línea celular SW48. Este procedimiento permitiría que se expresara un solo alelo mutado a partir del propio promotor de K-RAS, y por tanto que se alcanzaran niveles significativamente menores que los obtenidos mediante la utilización del promotor de CMV o múltiples copias del oncogén K-ras. La línea SW48 es portadora de K-RAS silvestre y es una línea celular que está bien caracterizada en la bibliografía. Por ese motivo, contactamos con

el grupo de Alberto Bardelli que es experto en la generación de clones recombinantes con distintas mutaciones en líneas de CCR humano.

En colaboración con el grupo del Dr. Bardelli, nos enfocamos en la generación de recombinates para mutaciones encontradas con mayor frecuencia en pacientes y que presentan más relevancia clínica en CCR, como son KRAS (G12V) y KRAS (G13D), presentes en un 15 % y un 10% de los tumores de CCR, respectivamente [104], BRAF (V600E) en un 4-15% y PI3KCA (H1047R) en un 10-18% de los casos. El procedimiento de obtención de recombinantes se ha descrito en detalle en DiNicolantonio [97]. Se trata de utilizar un virus adeno-asociado para producir la recombinación sustituyendo uno de los alelos silvestres del proto-oncogén correspondiente, por el alelo mutado del oncogén de interés (K-RAS, PI3KCA o BRAF).

Una vez obtenidos los clones por recombinación homóloga (disponíamos de dos clones por mutación), éstos se secuenciaron para confirmar la presencia de las distintas mutaciones antes de ser utilizados en los experimentos *in vivo* (f**igura 60 y 61**). En todos los clones recombinantes se demostró la presencia de las mutaciones en K-RAS (G12V y G13D), B-Raf (V600E) ó PI3K (H1047R). Además se comprobó la expresión de la proteína por Western Blot con anticuerpos contra K-RAS, PI3K y B-RAF, observándose niveles de expresión similares entre clones y entre mutaciones respecto al grupo control (WT) y su parental (**figura 59**).

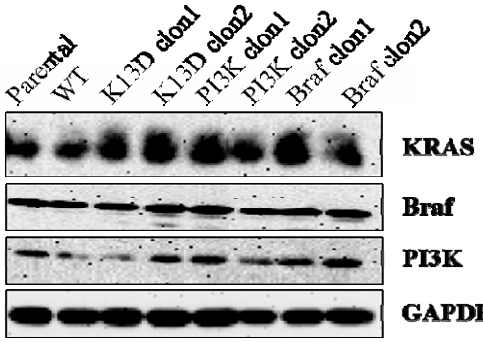


Figura 59. Análisis de la expresión de K-RAS, B-RAF y PI3K en los clones de la línea celular SW48.
WT: SW48 WT (wild-type). GADPH se utilizó como control de carga

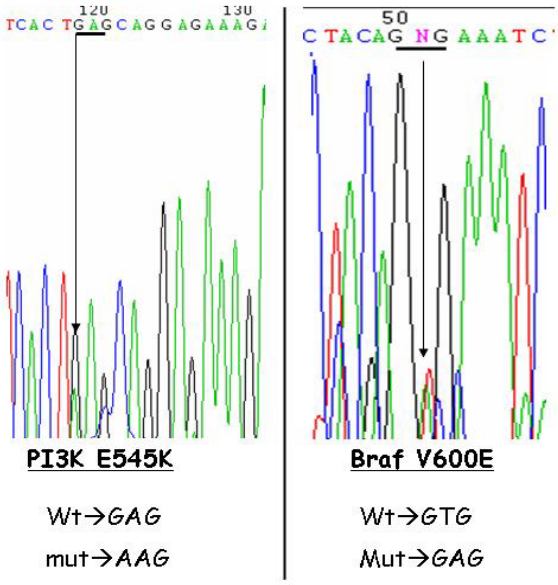


Figura 60. Cromatograma representativo de la secuenciación de los recombinantes de SW48 con mutación en PI3K (E545K) y B-RAF(V600E).

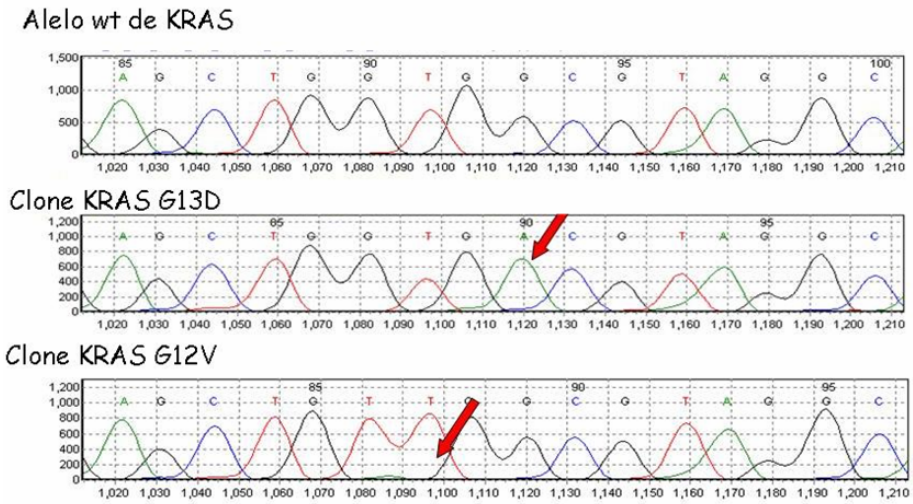


Figura 61. Cromatogramas representativos de la secuenciación de los recombinantes de SW48 con mutación en K13D ó K12V.

3. PAPEL DE *PI3K, BRAF y KRAS D13* EN TUMOROGÉNESIS Y METÁSTASIS EN CCR

3.1. Formación de tumor primario y patrón de diseminación metastásica de los recombinantes de SW48 con mutación en PI3K, B-raf o KRAS D13 tras inyección ortotópica.

Una vez obtenidos los clones recombinantes de la línea celular SW48, portadores de las mutaciones en PI3KCA (H1047R), BRAF (V600E) o KRAS (G13D), se crecieron las células y se inyectaron directamente (inyección ortotópica, ORT) en el ciego de ratones inmunodeprimidos de la cepa *Swiss nude*, utilizando el procedimiento OCMI. Este estudio permitió conocer la capacidad tumorogénica y metastásica de la línea celular SW48 *in vivo* tras la introducción de las distintas mutaciones heterocigotas. Tras la necropsia, se tomaron muestras del ciego (lugar del punto de inyección y localización del tumor local), así como de los órganos visiblemente afectados, o de aquellos órganos en donde se esperaba que se desarrollaran metástasis (ganglios linfáticos mesentéricos regionales y distales, hígado, pulmón, y órganos intraperitoneales afectados).

Tabla 29. Número de ratones inyectados, tasa de injerto y número de ratones afectados con micrometástasis linfáticas, hematógenas (hígado y pulmon) y carcinomatosis, tras inyección ortotópica directa de los recombinantes de SW48 con mutación en PI3K, BRAF y KRAS D13

Línea celular	Ratón (n)	Tasa injerto [ratón(%)]	Diseminación Micro [na/nt (%)][a]			
			Linfática	Hepática	Pulmonar	Carcinomatosis
SW48 WT	7	1/7 (14)	0	0	0	0
SW48 PI3K	8	1/8 (13)	1/8 (13)	0/8 (0)	1/8 (13)	0/8 (0)
SW48 B-RAF	8	1/8 (13)	0	0	0	0
SW48 K13D	8	1/8 (13)	0	0	0	0

a. ***[na/nt (%)]:[*** *na: número de ratones afectados en el grupo/nt: número de ratones positivos totales en el grupo (porcentaje de ratones afectados)]*

Obtuvimos una baja tasa de injerto, entre el 13-14% en todos los grupos inyectados. Además, el análisis de las metástasis reveló la afectación metastásica de un solo ratón en el grupo PI3K, que presentaba una micrometástasis linfática y otra hematógena, circunscrita a nivel pulmonar (**tabla 29**).

Aumento de capacidad metástasica utilizando el pase previo sc en la línea de cáncer colorrectal SW48

En base a la baja tasa de injerto y de diseminación metastásica obtenida al inyectar los clones recombinantes de la línea celular SW48, portadores de las mutaciones en PI3KCA (H1047R), BRAF (V600E) o KRAS (G13D) mediante inyección ortotópica directa de la línea celular (OCMI), se decidió utilizar el pase previo subcutáneo para potenciar la capacidad metastásica de la línea, según se había demostrado durante el desarrollo del objetivo 1 de este trabajo. Para ello, se utilizaron los recombinantes de SW48 WT y SW48 K13D y se inyectaron ortotópicamente con y sin pase

previo subcutáneo, en un experimento preliminar al del estudio de la capacidad metastásica de los mutantes K12V y K13D. Se observó, de modo similar a lo demostrado con la línea HCT116, que el pase subcutáneo de la línea SW48 aumenta considerablemente su tasa de injerto y de diseminación metastásica. El número de animales positivos para tumor primario en el grupo SC+ORT (22% en WT y 57% en KD13) fue mucho mayor que el de el grupo ORT correspondiente para cada mutante Además, la afectación linfática, tanto micro como macroscópica, y la diseminación peritoneal y hematógena pulmonar pasó de ser inexistente tras inyección ORT directa a alcanzar un 22% en WT y un 29% en K13D, tras el pase subcutáneo seguido de inyección ortotópica (**figura 62).**

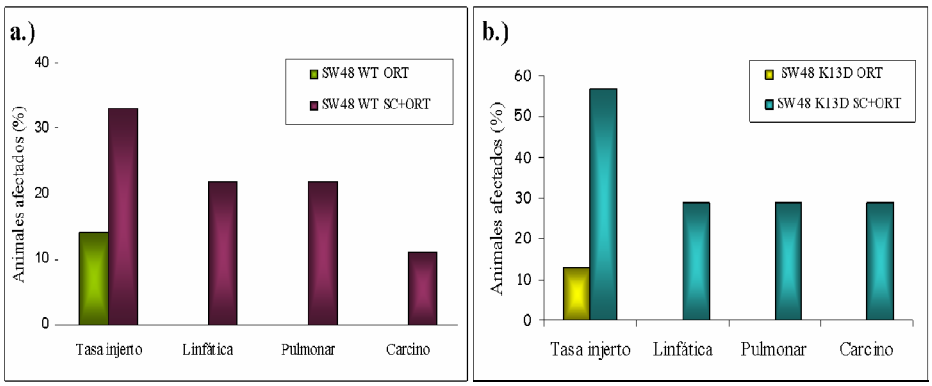


Figura 62. Mejora de la capacidad metastásica mediante el pase SC previo a la inyección ortotópica, evaluado en la línea de CCR humano SW48
(a)) Tasa de injerto y de metástais en la línea SW48 parental (K-ras WT) para el grupo ORT y el grupo SC+ORT, y (b) Tasa de injerto y de diseminación metastásica para los recombinantes K13D en el grupo ORT y SC+ORT.

4. PAPEL DE LAS MUTACIONES K12V y K13D EN TUMOROGÉNESIS Y EN METASTAGÉNESIS EN CCR

En base a los resultados previos con la línea SW48, por los que se cofirmaba el aumento de la capacidad metastásica de esta línea por inyección ortotópica tras pase subcutáneo (SC+ORT), de modo similar a los resultados con la línea celular HCT116, decidimos utilizar el procedimiento SC+ORT para comparar la capacidad metastagénica de SW48 WT, K12V y K13D. Con ese objetivo, los distintos recombinantes de la línea celular SW48 portadores de las mutaciones en K12V o K13D, y del vector vacío control (WT), obtenidos por recombinación homóloga, fueron inyectados subcutáneamente en ratones de la cepa *Swiss nude*. La **figura 63** describe la evolución del crecimiento de los tumores subcutáneos generados. Los tumores que expresaban KrasD13 (D13) mostraron un crecimiento mayor que los que tenían la mutación K12V y la línea parental con el vector vació (K-ras WT).

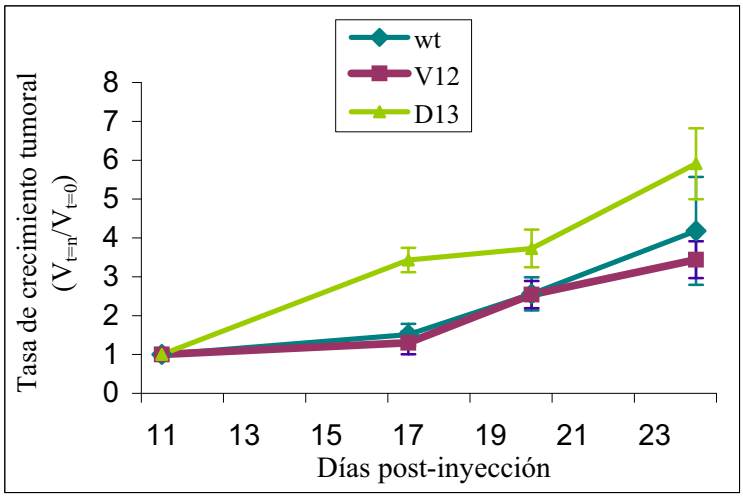


Figura 63. Tasa de crecimiento tumoral tras inyección subcutánea de los clones recombinantes SW48 WT, K13D y K12V.
La tasa de crecimiento se expresa en Vf/Vi=Volumen final/Volumen inicial. Diferencias significativas al día 24 post-inyección entre el grupo WT *vs* KD13 y KV12 vs KD13 (p=0.03, test de Mann-Whitney).

4.1 Formación de tumor primario, patrón de diseminación metastásica y supervivencia de los animales a partir de la inyección ortotópica, tras pase dubcutáneo, de los recombinantes SW48 WT, K13D o K12V.

Una vez extraídos los tumores subcutáneos generados por la inyección de los rembinates SW48 WT, K12V y K13D, las células aisladas fueron inyectadas en el ciego de ratones *Swiss nude* mediante OCMI. La viabilidad celular después de la disgregación del tumor fue del 87%-90% (**figura 64 y 65**). Una alícuota que contenía 8 millones células disgregadas y aisladas, fue recultivada para determinar posteriormente su viabilidad, que resultó ser del 87%-90% en los tres grupos a las 36h post-cultivo, sin observarse diferencias significativas entre ellos en este parámetro.

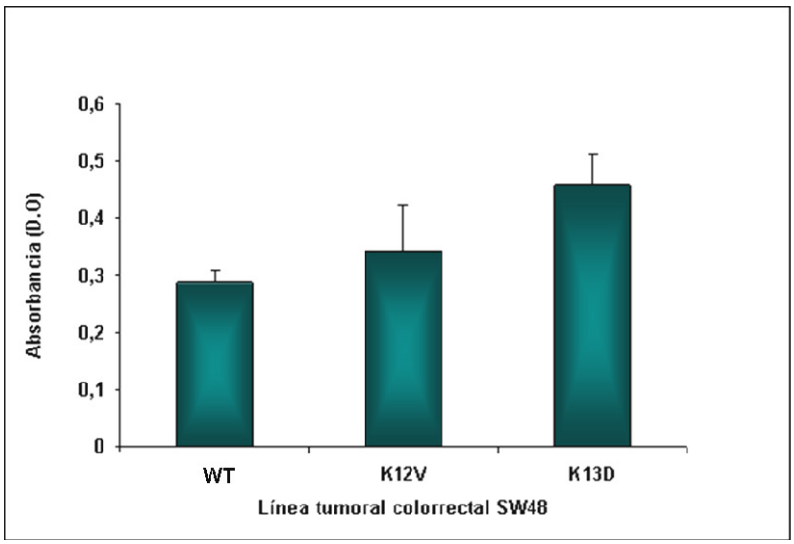


Figura 64. Verificación de la viabilidad de las células SW48 WT, K12V y K13D aisladas y recultivadas tras la disgregación del tumor SC.
Ensayo realizado a las 36 horas de recultivo.

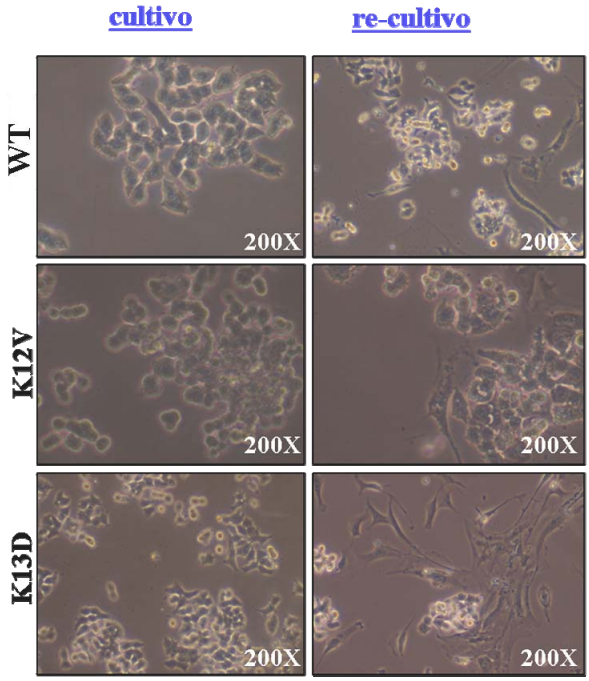


Figura 65. Microfotografías de los clones de SW-48 K-RAS (WT, KV12, KD13) en cultivo, antes y después del crecimiento SC en ratón y posterior re-cultivo.
Magnificación: 200X.

El seguimiento de los animales tras la inyección de los recombinantes de SW48 fue idéntico al descrito para el experimento HCT116 (apartado 3.4.3 de metodología). Tras la necropsia, se tomaron muestras del ciego (lugar del punto de inyección y de formación del tumor primario), así como de los órganos afectados, o aquellos órganos en los que se esperaba que se desarrollasen metástasis (ganglios linfáticos mesentéricos regionales y distales, hígado, pulmón y cavidad peritoneal). En la **tabla 30** se muestra los resultados obtenidos en cuanto a tasa de injerto volumen tumoral y supervivencia de los animales.

Tabla 30. Tasa de injerto, volumen del tumor primario y tiempo de supervivencia para los grupos SW48 WT, K12V y K13D, inyectados ortotópicamente tras pase subcutáneo.

		Tumor Local	
Grupo SW48	**Tasa de injerto [ratón (%)]**	**Volumen Tumoral (mm^3) Media±EE**	**Supervivencia (días) Media±EE**
WT	**33[a]**	**964±23[b,c]**	**265±18[d]**
K12V	**73[a]**	**1201±83[c]**	**190±20[d]**
K13D	57	**1395±118[b]**	**188± 36 [d]**

Análisis estadístico [a]p=0.08 (Test de Fisher), [b]p= 0.001 y [c]p= 0.04 (T-student), [d]p= 0.030 (Kaplan-Meyer).

El análisis histopatológico mostró tumores de tipo indiferenciado, con presencia de luces inferior a un 5%, y un 40-70% de necrosis. En todos los animales analizados, para cada uno de los tres grupos, el tumor primario invadió todas las capas colónicas hasta alcanzar la capa serosa (estadío IV), presentando además, invasión vascular (**figura 66**).

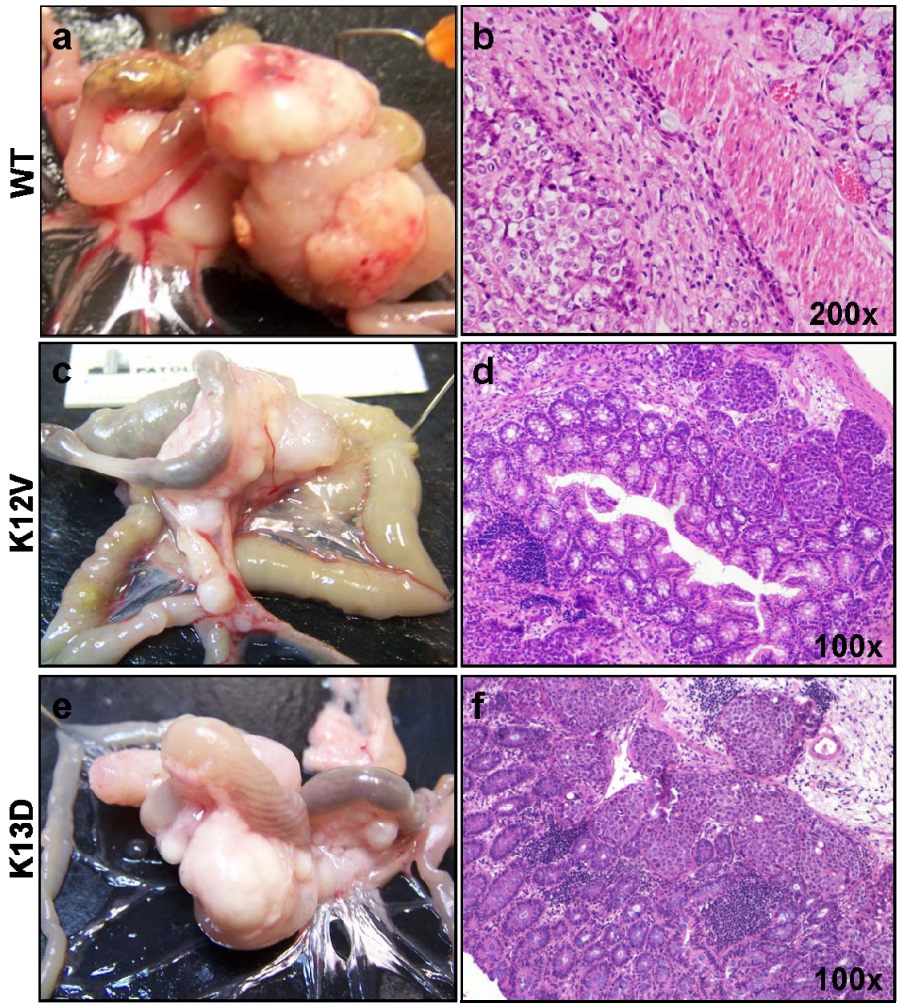
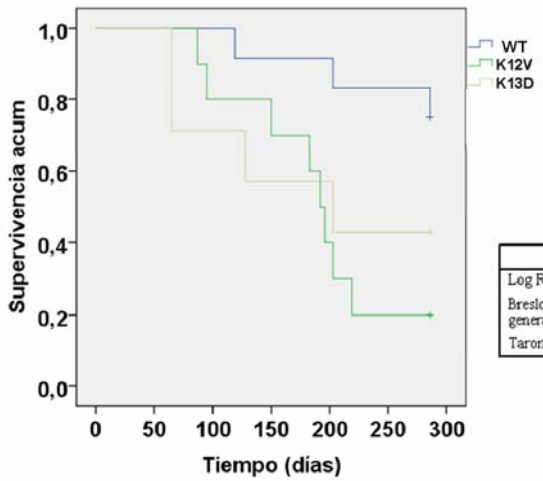


Figura 66. Macrofotografía de tumores primarios representativos de los grupos SW48 WT, K12V y K13D, obtenidos mediante inyección ortotópica tras pase subcutáneo previo.
Los tumores primarios crecen en todos los grupos de forma tangencial y circunferencial, ocupando la totalidad del área del ciego (a), H&E del tumor primario mostrando su histología a 100X y 200X magnificación.

El desarrollo de tumores que expresaban los oncogenes K12V o K13D redujo significativamente el tiempo de supervivencia de los animales que los portaban respecto a los animales control WT, que expresaban KRAS

silvestre, siendo estas diferencias significativas entre los grupos WT y K12V, y entre los grupos WT y K13D (**figura 67**).



Comparaciones globales

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	6,989	2	,030
Breslow (Wilcoxon generalizado)	6,571	2	,037
Tarone-Ware	6,799	2	,033

Figura 67. Análisis de supervivencia utilizando el método de Kaplan_Meier entre los animales de los grupos K12V, K13D y WT
Las distribuciones de supervivencia fueron comparadas utilizando el test log- rank, Breslow y Tarone-Ware.

Para el análisis estadístico relacionado con el estudio de la metastagénesis, se incluyeron únicamente los animales positivos en cuanto a desarrollo de tumor primario y/o afectación metastásica. El análisis del tumor primario mostró un aumento significativo de la tasa de injerto en los animales portadores de las mutaciones KV12, respecto al grupo de animales control WT, además de un aumento significativo del volumen tumoral en los animales de los grupos KV12 y K13D frente a los del grupo control WT ($p<0.05$). Es importante destacar que la media del volumen tumoral fue significativamente mayor en el grupo K13D que en grupo K12V, como sucedió en los tumores crecidos subcutáneamente ($p=0.03$) (**tabla 30**).

El análisis de los órganos afectados tras la necropsia se resume en la **tabla 31**. Para hacer comparables los hallazgos histopatológicos entre grupos, en el grupo WT sólo se consideraron los animales con un tiempo de supervivencia igual o inferior al de los otros dos grupos (K12V y K13D) ya que el tiempo de supervivencia en el grupo WT fue significativamente mayor que el de los grupos que expresaban el oncogén K12V o K13D. Los animales inyectados con los recombinantes de SW48 que expresan K12V mostraron mayor número de animales afectados por metástasis linfáticas microscópicas (73%) que en el grupo K13D (29%) o que en el grupo WT (11%), siendo estas diferencias significativas (**tabla 31**). No se registraron metástasis hepáticas en ninguno de los grupos analizados (WT, K12V o K13D) derivados de la línea celular SW48, sugiriendo que ésta línea no tiene capacidad de metastatizar en este órgano.

Tabla 31. Porcentaje de animales afectados por micro y macrometástasis linfáticas, hepáticas, pulmonares y peritoneales en los grupos WT, K12V y K13D, obtenidos por inyección ortotópica tras pase subcutáneo.

		Metástasis totales [n_a/n_t (%)] [a]			
Grupo SW48	Ratón (n_t)	Linfática mesentérica	Pulmonar	Carcino-matosis	Otras linfáticas
WT	9	**1/9 (11)** [b]	1/9(22)	1/9(11)	0/9 (0)
K12V	11	**8/11 (73)** [b,c]	4/11(36)	2/11 (27)	1/11 (9)
K13D	7	**2/7 (29)** [c]	2/7 (29)	2/7 (29)	0/7 (0)

a Metástasis totales se refiere a la agrupación de metástasis microscópicas y/o macroscópicas
Análisis estadístico: , b p= 0.03, c p=0.08
***[na/nt (%)]:** Afectación metastásica expresada en número de ratones afectados en el grupo/número de ratones positivos totales en el grupo (% de ratones afectados)*

4.2 Número de focos y área de las metástasis hematógenas y linfáticas

Se analizó el número de focos tumorales formados en pulmón y a nivel linfático en cada uno de los grupos: WT, K12V y K13D.

4.2.1 Número de focos y área de las metástasis linfáticas

El análisis del número de focos linfáticos mostró un incremento significativo en los grupos K12V y K13D con respecto al control WT. Al comparar ambos recombinantes entre sí, se observó que K13D generó un mayor número de focos que K12V (**tabla 32, figura 68**)

Tabla 32. Número y área de ganglios afectados y focos tumorales linfáticos en los animales inyectados con los recombinantes WT, K12V y K13D.

Grupo SW48	Ratón (n)	Focos (n_f)	Micro Focos (n_f)	Área Micro Media± EE ($x10^4$ µm²)	Macro Focos (n_f)	Área Macro Media±EE ($x10^4$ µm²)	Visible focos (n_f)	Visible-Área Media±EE ($x10^4$ µm²)
WT	1/9[a]	2[c, d]	0	0[g,h]	0	0[i,j]	2	2486±1754
K12V	8/11[a,b]	26[c,e]	12	30,3±8,3[f,g]	4	193,2 ±28,6[i]	10	7523 ±1937[k]
K13D	2/7[b]	37[d,e]	27	12,1±2,8[f,h]	1	158,5[j]	13	2622±400[k]

n_f: número de focos
Análisis estadístico: [a] p= 0.03 y [b] p=0.08 (Test de Fisher), [c] p=0.002, [d] p=0.026 y [e] p=0.047 (T-Student), [f] p= 0,02, g p=0,05, [h] p=0,028, i,j p<0.05 y k p=0,05.

El análisis del área de los focos metastásicos a nivel microscópico (focos de menos de 1 mm de diámetro, con un área menor a 785000 µm²) mostró que los animales del grupo K12V presentaban focos de un tamaño significativamente mayor que los animales del grupo K13D, mientras que el grupo control, WT no generó ningún foco (**figura 68 y 69**).

A nivel macroscópico (focos con un diámetro >1mm e <3mm), el grupo KV12 presentó mayor número y tamaño de los focos que el grupo K13D,

aunque esta diferencia no llegó a ser significativa. Por el contrario WT no presentó ningún foco macroscópico.

Además, se observaron focos macroscópicos visibles (diámetro>3mm, que son fácilmente apreciables visualmente en la preparación), observándose áreas significativamente mayores para el grupo de K12V que para el grupo K13D (p=0.05).

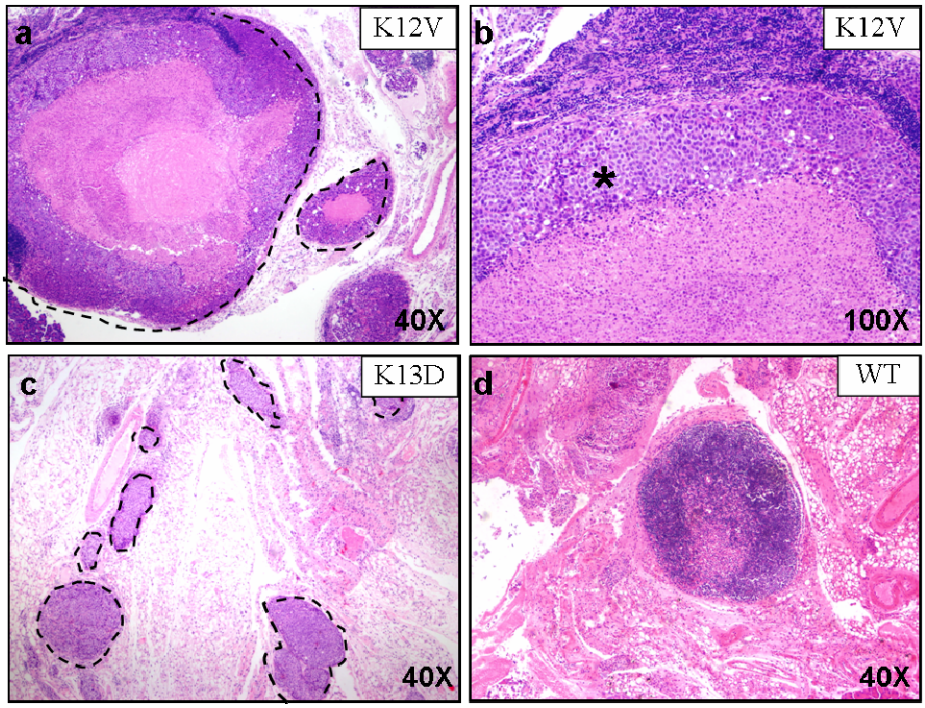


Figura 68. Metástasis linfáticas desarrolladas en los grupos K12V y K13D. Macro y microfotografía de una metástasis linfática del grupo K12V (a y b) en la que se observa un ganglio infiltrado por células tumorales (b, *), c: microfotografía del mesenterio de un ratón del grupo K13D en la que se observan múltiples focos metastásicos; d: microfotografía de un ganglio linfático del grupo WT sin ningún tipo de afectación tumoral. La línea punteada señaliza las afectaciones metastásicas. Magnificación 100x y 40x.

En la Figura 69 se presenta un resumen comparativo del número de animales afectados, y del número y área de focos linfáticos desarrollados entre los grupos K12V y K13D.

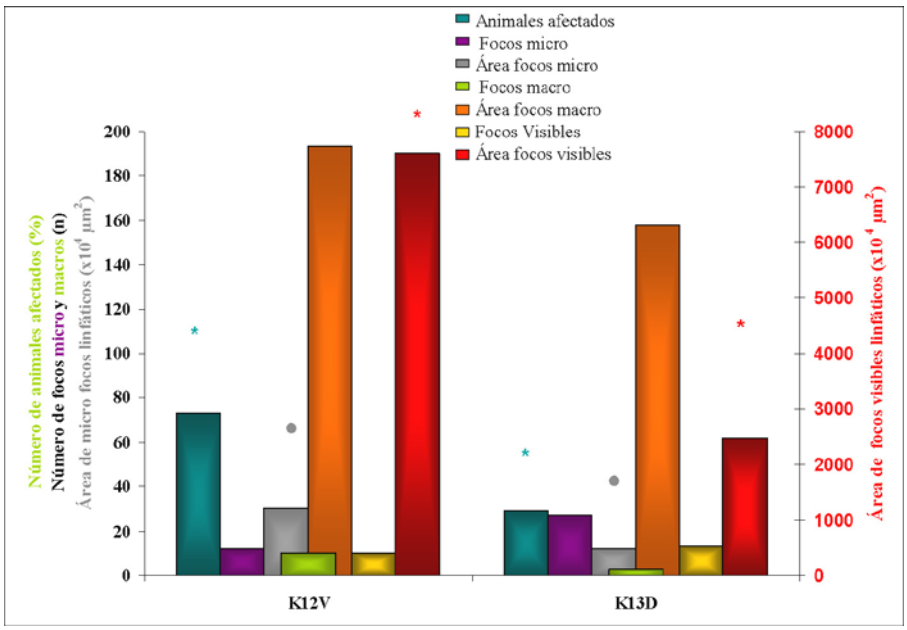


Figura 69. Análisis comparativo del tamaño del tumor primario, número de animales afectados, número y área de los focos micro, macro y visibles de las metástasis linfáticas en función de la expresión del oncogén K12V o K13D.
En * y ● se muestran las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

4.2.2 Análisis del número de focos metastásicos y área en las metástasis pulmonares

En pulmón no se observaron diferencias significativas en cuanto al número de animales afectados o el número de focos (**tabla 33**). Sin embargo, el análisis del área de los focos metastásicos reveló que en el grupo K13D se generaron focos de un tamaño significativamente mayor que en el grupo WT ($p<0.05$) o que con el grupo K12V ($p<0.01$) (**figura 70 y 71**).

Tabla 33. Número y área de los focos tumorales pulmonares en los animales inyectados con los recombinantes WT, K12V y K13D.

Grupo SW48	Ratón (n)	Focos (n_f)	Micro Focos (n_f)	Área Micro Media± EE ($x10^4$ μm^2)
WT	1/9	10	10	8,9 ± 0,2
K12V	4/11	34	34	**6,4 ± 1,5[a]**
K13D	2/7	27	27	**11,9 ± 3,8[a]**

n_f: número de focos
Análisis estadístico: a $p<0,05$ y b $p<0,01$ (Test de Mann Whitney)

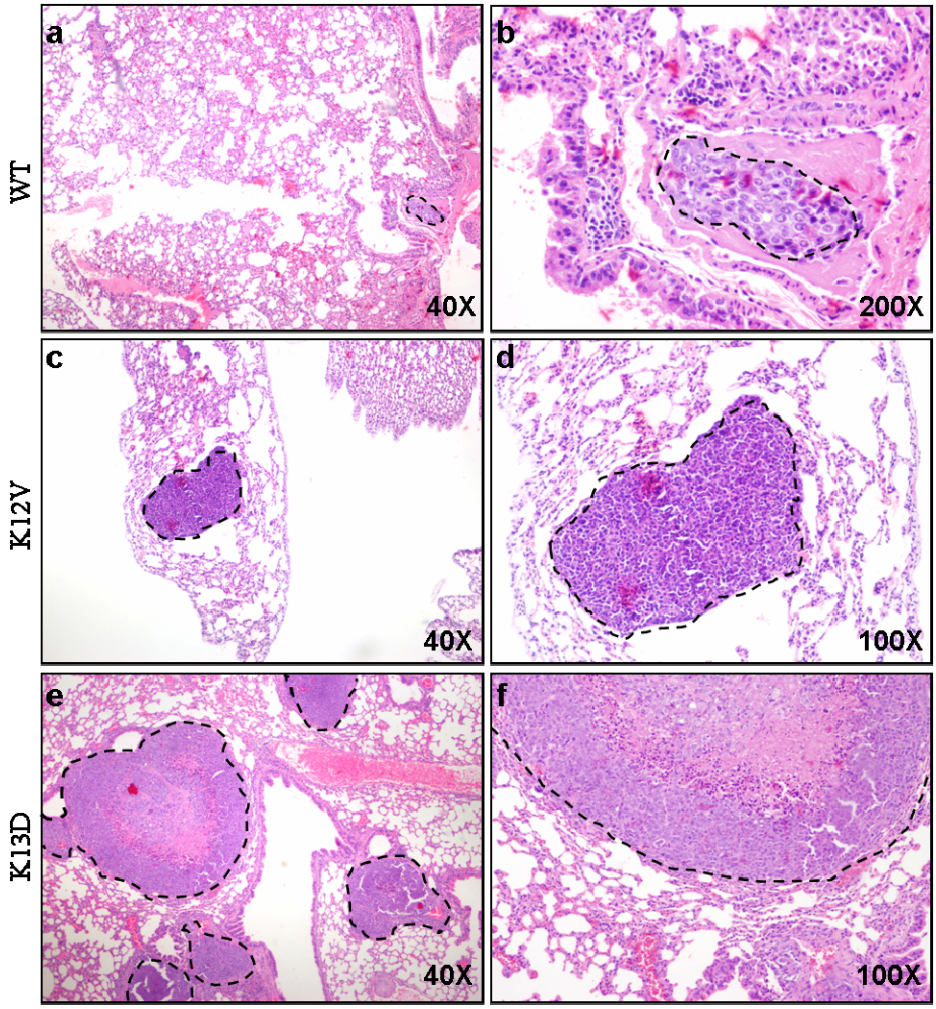


Figura 70. Tinción con H&E de las metástasis pulmonares en los ratones inyectados ortotópicamente con células SW48 aisladas de tumores subcutáneos. a y b. Microfotografía de un pulmón del grupo WT conteniendo una micrometástasis; Micrometástasis pulmonares en el grupo K12V (c y d) y K13D (e y f). En el grupo K13D se observa el pulmón infiltrado por numerosas micrometástasis, un número mayor que en K12V. La línea punteada señaliza los focos tumorales. Magnificación 40x,100x y 200x

En la Figura 71 se presenta un resumen comparativo del número de animales afectados, y del número y área de focos pulmonares desarrollados entre los grupos K12V y K13D.

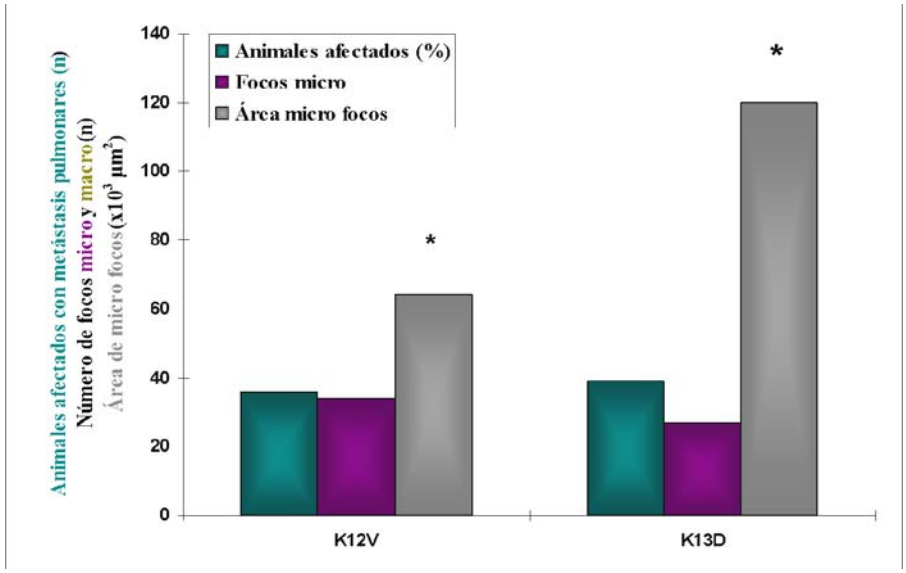


Figura 71. Comparación entre el número de animales afectados y el número y área de los focos micro y macrometastásicos pulmonares en los grupos K12V y K13D.
(*)Diferencias estadísticamente significativas a una probabilidad $p<0.01$

4.3. Alteraciones moleculares observadas en tumor primario y focos metastáticos en los grupos K12V y K13D

A continuación, se describen los resultados del análisis molecular comparativo realizado en tumor primario y focos metastáticos en los animales de los grupos K12V y K13D que persigue la identificación de patrones de expresión y/o activación de proteinas asociados con las diferencias en eficiencia metastásica en los distintos órganos en función del tipo de mutación. El número de focos metastásicos en el grupo WT era limitado (número de casos, n, baja), hecho que no permitía su comparación estadística con los grupos K12V o K13D. Por ese motivo nos hemos centrado en la comparación de la expresión de proteínas entre los gtupos K12V y K13D en los que si existían suficiente número de casos a

comparar, y hemos excluido el grupo WT en el que el número de casos era bajo. Las proteínas estudiadas están implicadas en la señalización distal a la oncoproteína K-RAS, así como proteínas reguladoras de la proliferación, muerte celular, adhesión, invasión, diseminación tumoral y vascularización tumoral.

4.3.1. Expresión y activación de las vías dístales a K-RAS en los grupos K12V y K13D

Analizamos la expresión y activación de las principales proteínas implicadas en las vías de señalización dístales a K-RAS para determinar si existía una activación diferencial en los tumores primarios y metástasis de los grupos K12V y K13D que explicara el distinto patrón de diseminación observado entre ambos mutantes. El análisis, mediante IHQ, de una de las principales vías efectoras, la vía de MAP-K, mostró una activación de MAPK-P mayor en el grupo K12V que en K13D, aunque esta diferencia no alcanzó significancia en tumor primario (p=0.07) (**figura 72 y 73**).

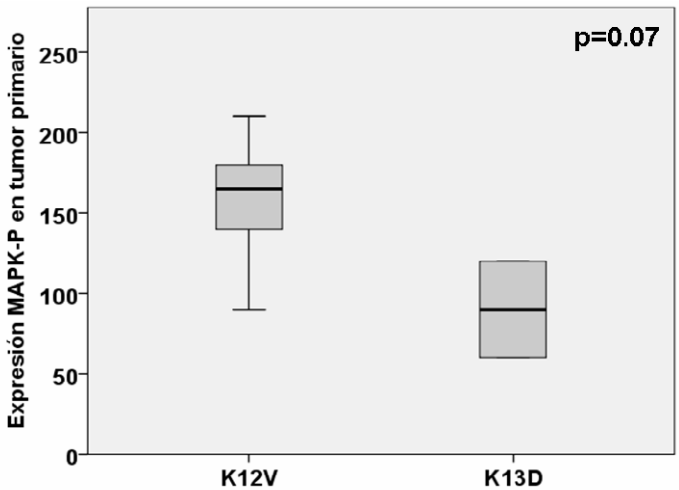


Figura 72. Cuantificación de la activación de MAPK en los grupos K12V y K13D.
Análisis estadístico: p=0,07 (Test de Mann-Whitney)

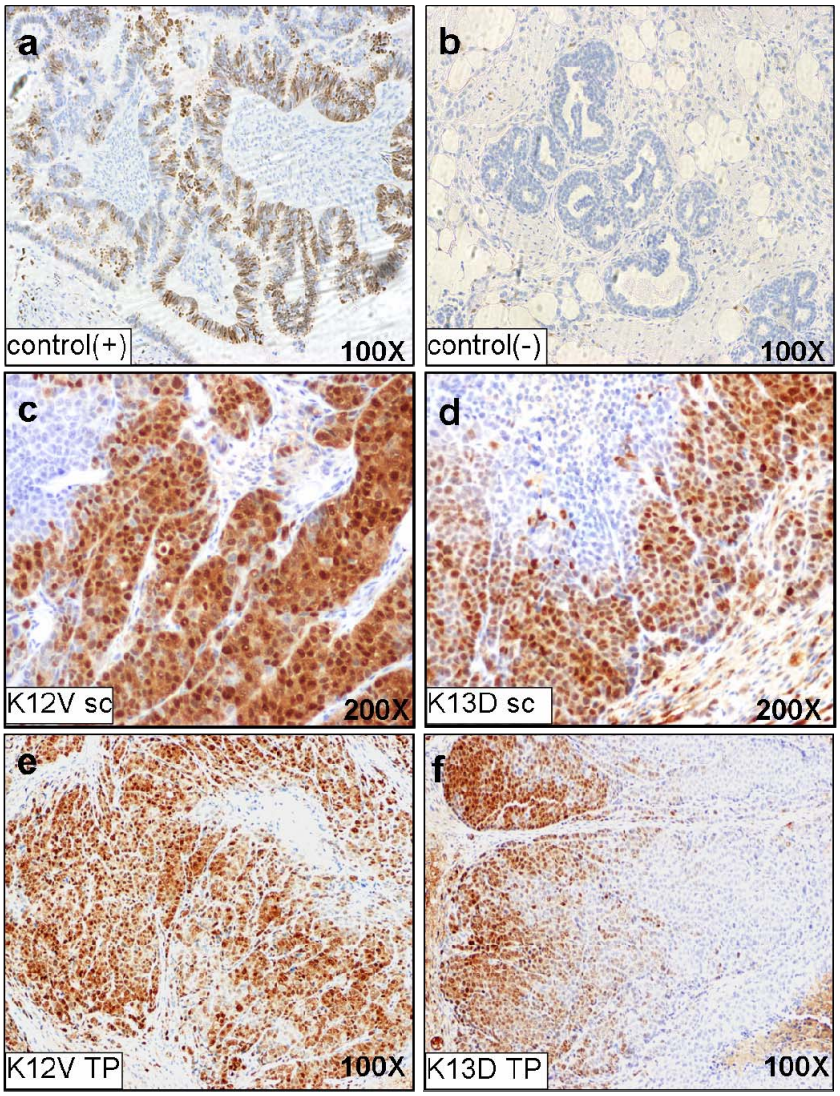


Figura 73. Análisis de la activación de MAPK por IHQ en los grupos K12V y K13D.

(a) adenocarcinoma de ovario como control positivo, y (b) adenocarcinoma de mama como control negativo, (c y d): Inmunohistoquímica de MAPK en tumores primarios K12V (c) y K13D (d)

El análisis de la activación de MAPK en las metástasis linfáticas y pulmonares tampoco dió resultados significativos entre los grupos K12V y K13D ($p>0,05$).

En lo que concierne a la vía PI3K, se analizó también por imnunohistoquímica el nivel de AKT-p en tumores primarios, observándose un nivel de activación significativamente mayor en los tumores del grupo K12V que en los del grupo K13D (**figura 74 y 75**).

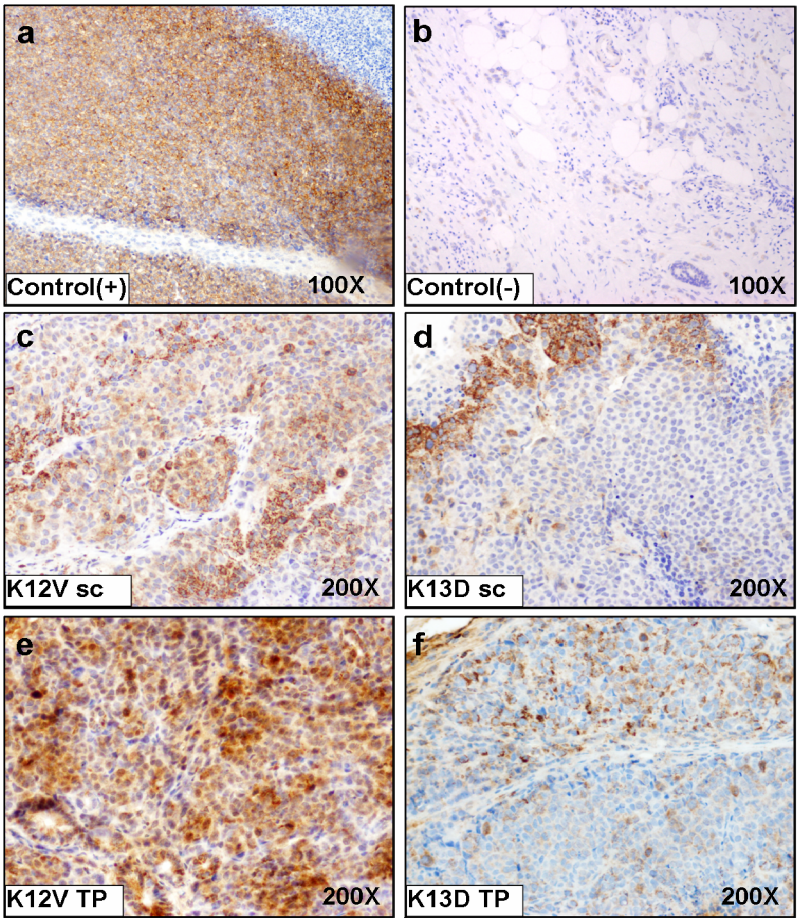


Figura 74. Análisis por IHQ de la activación de AKT en los grupos K12V y K13D.
a y b: Controles positivo (adenocarcinoma de ovario) y negativo (adenocarcinoma de mama); c y d: Microfotografía de dos tumores primarios de K12V (c) y K13D (d) teñidos con AKT-P; e y f: Microfotografía de dos tumores primarios de K12V (e) y K13D (f) teñidos con AKT-P: Magnificación 100X y 200X.

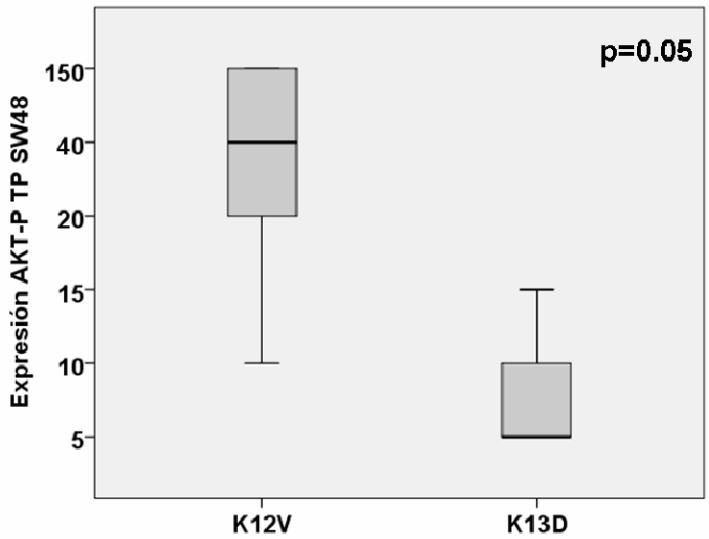


Figura 75. Cuantificación de la activación de AKT en los grupos K12V y K13D.
Análisis estadístico: p=0,05 (Test de Mann-Whitney)

Las diferencias en los niveles de activación de AKT en muestras de metástasis pulmonares (p=0,997) ó de metástasis linfáticas (p=0,465) entre los grupos K12V y K13D no fueron significativas.

4.3.2. Análisis de la expresión de la integrina beta 5 y beta 1

Para evaluar si el tipo de mutación puntual (Val12 ó Asp13) en el oncogén K-RAS regulaba la expresión de las distintas integrinas en las células de CCR SW48 que lo expresaban, utilizamos IHQ para realizar el mismo "screening" que se aplicó anteriormente a la línea HCT116 (apartado 2.1 de Resultados), y determinar la expresión de las α integrinas (1, 2, 3, 4, 5, 6 y v) y β integrinas (1, 2, 3, 4, 5 y 6).

De las trece integrinas evaluadas, únicamente las integrinas β5 y β1 presentaron expresión diferencial entre los grupos K12V y K13D. En el

caso de la integrina β5, se observó un nivel de expresión elevado en los tumores primarios del grupo K12V y significativamente menor en los tumores del grupo K13D (p= 0.037, **figura 76 y 77**)

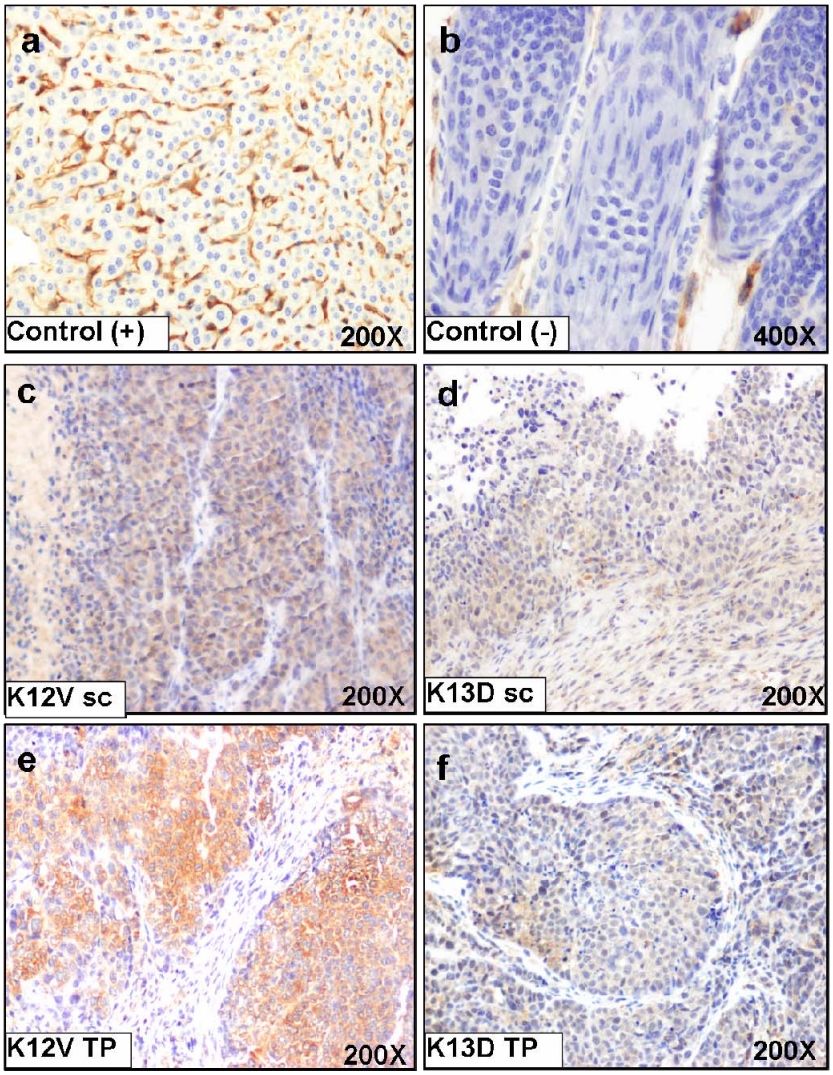


Figura 76. Análisis de la expresión de integrina beta 5 por IHQ en los grupos K12V y K13D.
a y b: control positivo (hígado de ratón) y negativo (anejo cutáneo de ratón); c y d: fotografía de dos tumores subcutáneos de K12V (c) y K13D (d) y e y f: tumores primarios de K12V (e) y K13D (f) teñidos con integrina beta 5.

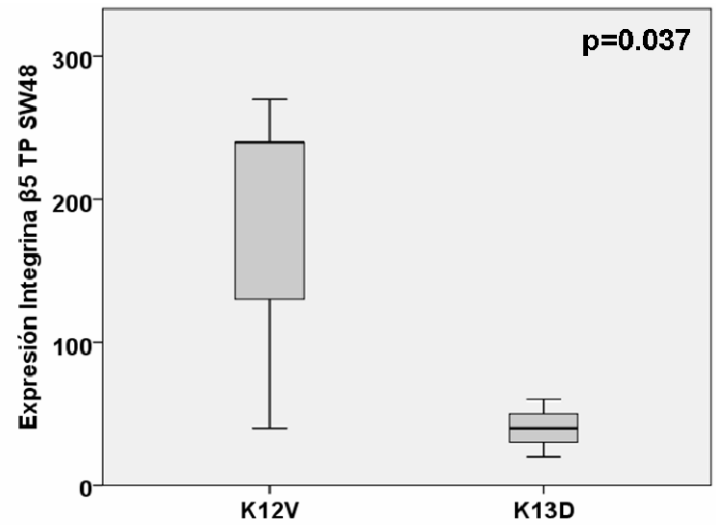


Figura 77. Cuantificación de la expresión de integrina β5 en los grupos K12V y K13D
Análisis estadístico: p=0,037 (Test de Mann-Whitney)

Contrariamente a los hallazgos en tumor primario, el análisis de la expresión de beta 5 en las localizaciones metastásicas (ganglios linfáticos y pulmón) no registró diferencias significativas entre K12V y K13D (p=0,496 a nivel linfático y p=0,065 en pulmón).

Por otra parte, la integrina β1 mostró mayor nivel de expresión en los tumores primarios del grupo K13D que en los del grupo K12V (p=0,039, **figura 78 y 79**)

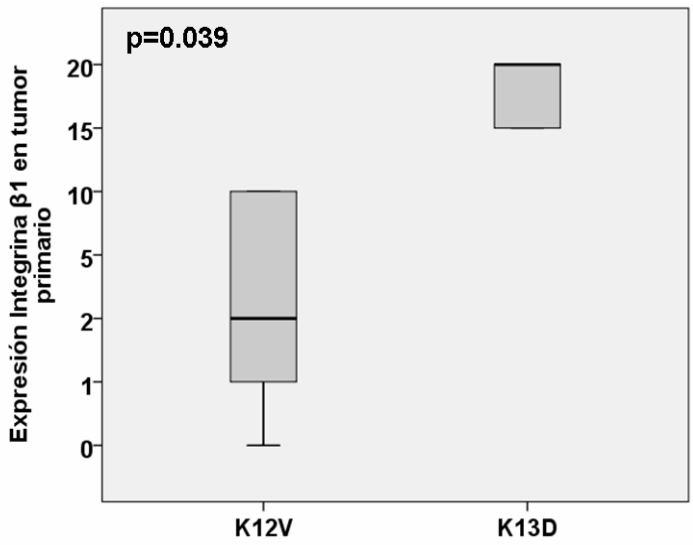


Figura 78. Cuantificación de la expresión de integrina β1 en los grupos K12V y K13D en tumor primario.
Análisis estadístico: p=0,039 (Test de Mann-Whitney)

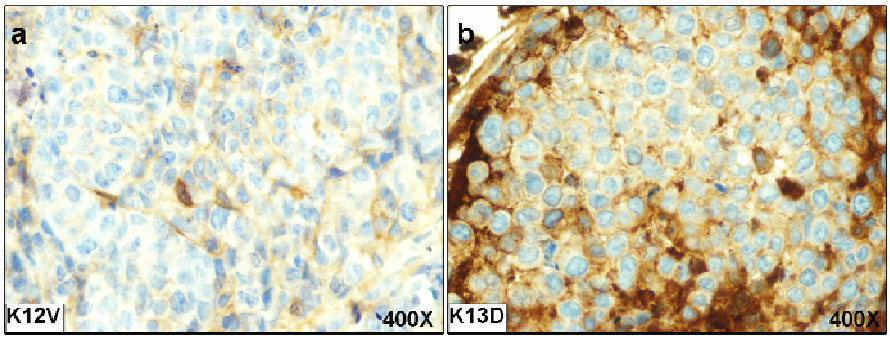


Figura 79. Análisis de la expresión de integrina beta 1 por IHQ en los grupos K12V y K13D.
a y b: Microfotografía de dos tumores primarios de K12V (a) y K13D (b) teñidos con el anticuerpo para integrina beta 1. Magnificación 400X

De nuevo, a diferencia de los hallazgos en tumor primario, el análisis de expresión de integrina β1 en muestras de metástasis linfáticas y pulmonares no registró diferencias significativas entre los grupos K12V y K13D (p>0,05).

4.3.3 Análisis de la expresión de la angiopoyetina 2

La angiopoyetina-2 (ANGPT2) se describe en la literatura como una proteína implicada en el proceso de angiogénesis tumoral, cuyo mecanismo de acción es la inhibición de la unión de angiopoietina1 al receptor Tie-2 [105], lo que provoca una desestabilización de los vasos y la formación de nuevos vasos en presencia de factores angiogénicos como el VEGF, que vascularizan el tumor. En nuestro modelo la expresión de ANGPT2, evaluada por IHQ, fue más elevada en los tumores primarios del grupo K13D que en los del grupo K12V (**figura 80 y 81**).

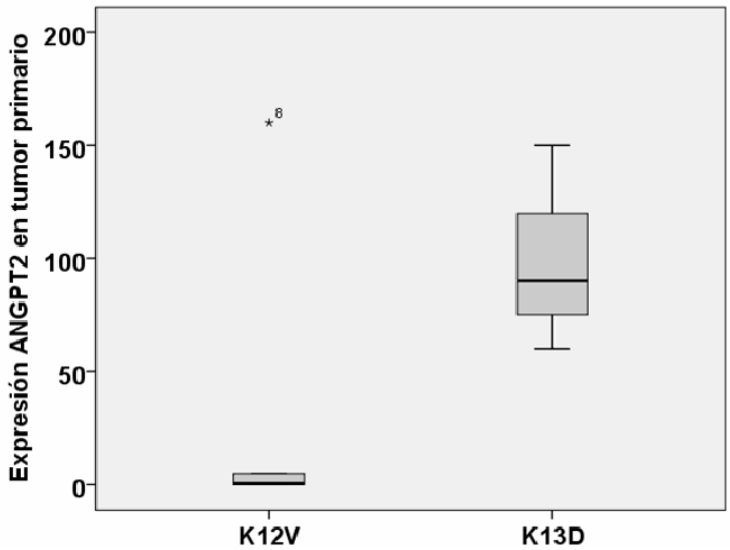


Figura 80. Cuantificación de la expresión de ANGTP2 por IHQ en los grupos K12V y K13D.
Estadística: p=0,046 entre Neo y K13D, p=0.022 (Test de Mann-Whitney). El valor representado con el * se exculyó del análisis estadístico por ser un outlier[106].

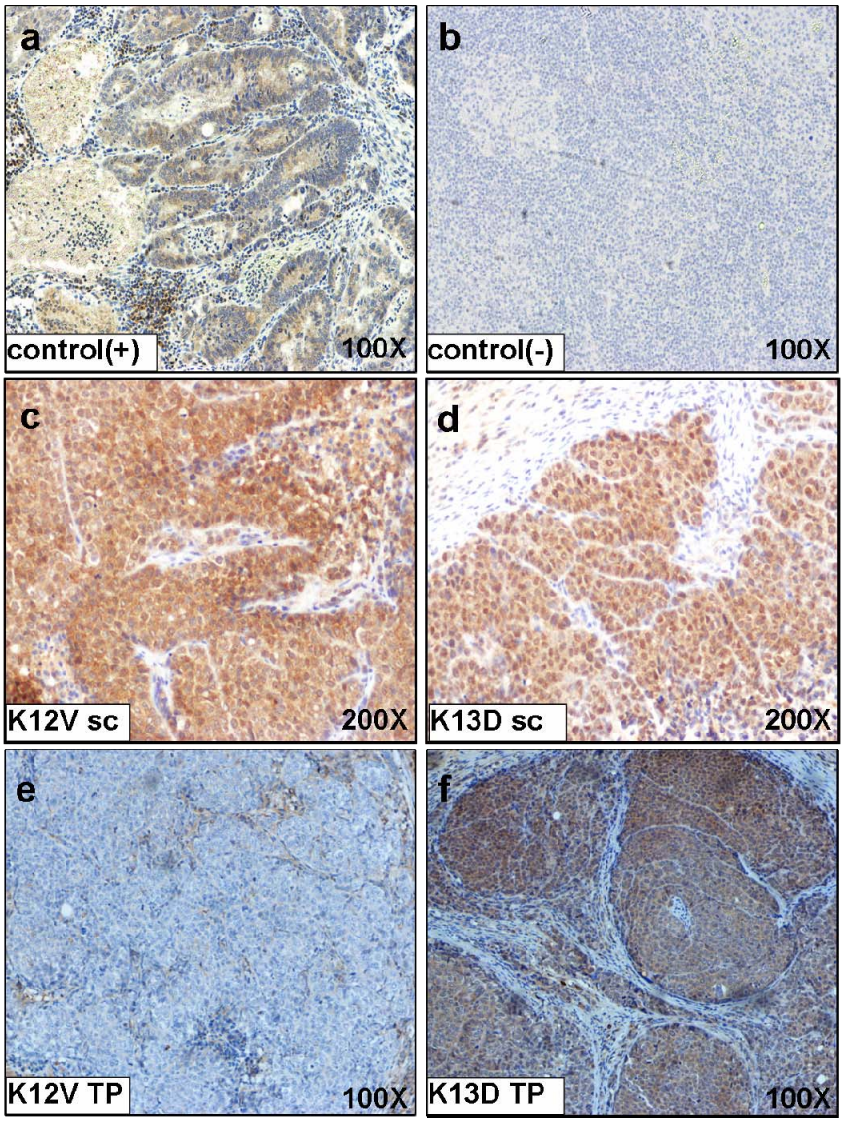


Figura 81. Análisis de la expresión de ANGTP2 por IHQ en los grupos K12V y K13D.
a: control positivo (adenocarcinoma de colon); b: control negativo (amigdala); c y d: tumores subcutáneos de K12V (c) y K13D (d); e y f: tumores primarios de K12V (e) y K13D (f) teñidos con ANGPT2.

También se analizaron las diferencias en la expresión de ANGPT2 en los focos metastáticos entre ambos grupos, observando un incremento significativo en la expresión de ANGPT2 en el grupo K13D con respecto a

K12V, en los focos metastáticos pulmonares ($p<0.001$) y en los linfáticos ($p=0.048$) (**figura 82-84**). Así mismo, la expresión de la ANGPT2 aumentó en los focos metastáticos pulmonares y linfáticos comparados con el tumor primario del grupo K12V, aunque la diferencia no fue significativa.

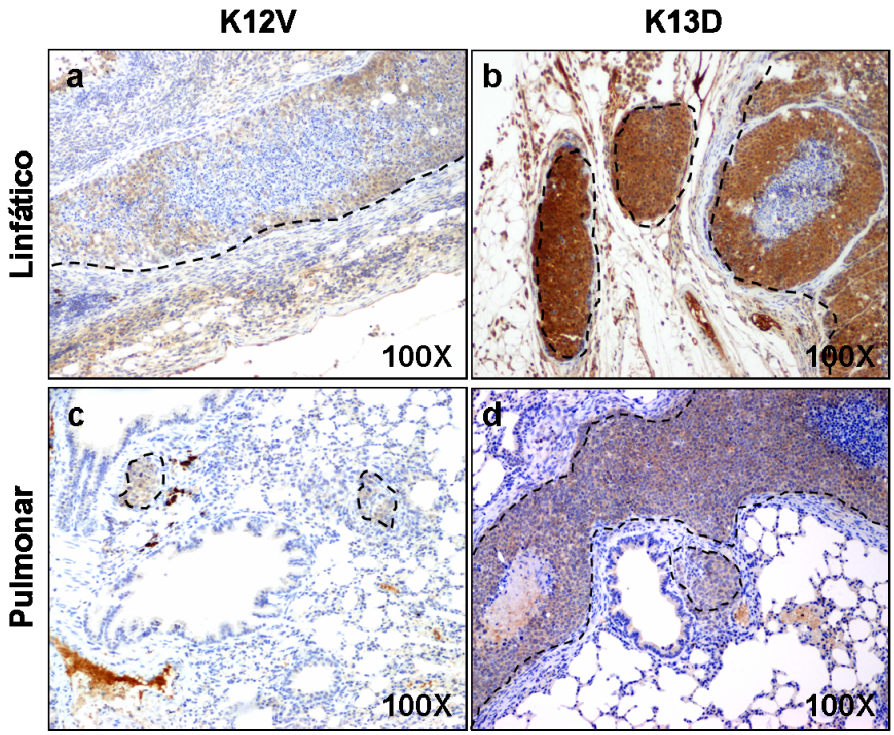


Figura 82.Análisis de la expresión de ANGTP2 por IHQ en las metástasis linfáticas y pulmonares de los grupos K12V y K13D.
a: linfático K12V, b: linfático K13D, c: pulmón K12V; d: pulmón K13D. La línea punteada muestra los focos tumorales. Magnificación 100X.

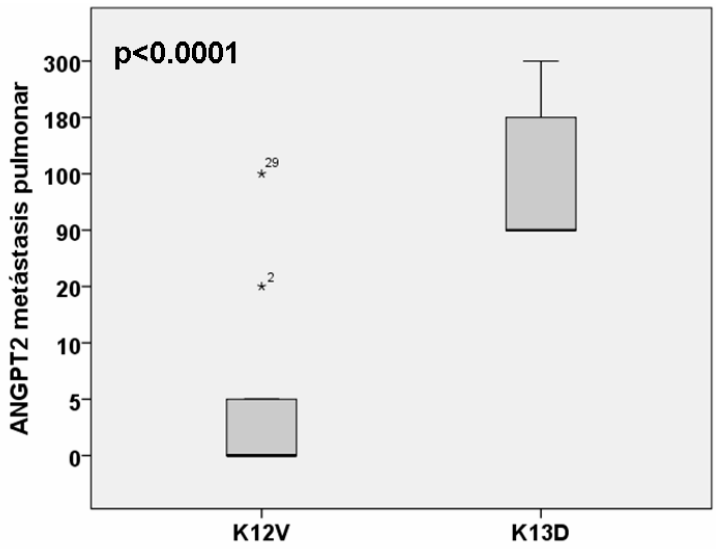


Figura 83. Cuantificación de la expresión de ANGTP2 en los focos metastáticos pulmonares de los grupos K12V y K13D.
Análisis estadístico: p<<0,01 (K13D con respecto a K12V y Neo) (Test de Mann-Whitney)

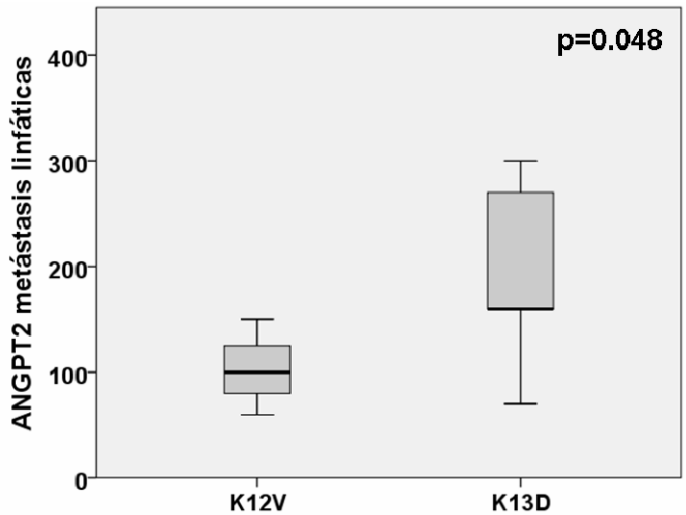


Figura 84. Análisis de la expresión de ANGTP2 en los focos metastáticos linfáticos en los grupos K12V y K13D.
Análisis estadístico: p=0.048 (Test de Mann-Whitney)

4.3.4 Análisis de la expresión de Serpina-1 en muestras de tumor primario

Se analizó la expresión de Serpina-1 en las muestras de tumor primario y de los tumores subcutáneos antes de ser disgregados, observándose una expresión similar en los tumores subcutáneos de ambos grupos y un aumento significativo (p=0,033) de la expresión en los tumores ortotópicos tras el pase subcutáneo en elgrupo K12V respecto a K13D (**figura 85 y 86**).

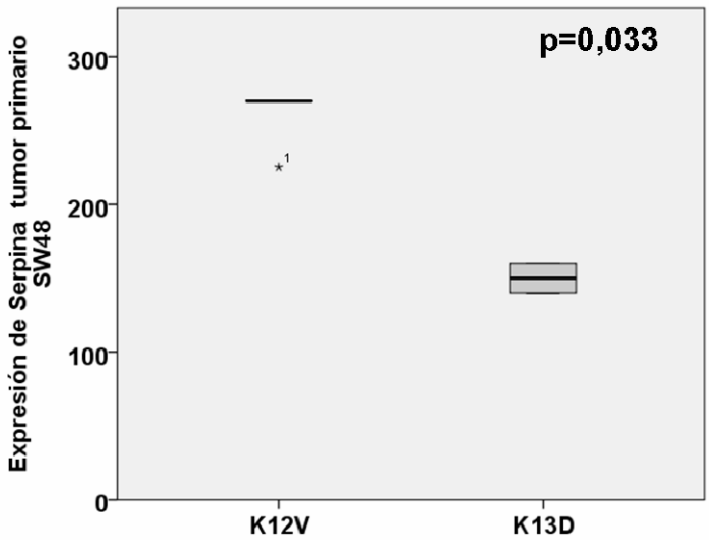


Figura 85. Análisis de la expresión de serpina-1 en muestras de tumor primario en los grupos K12V y K13D.
Análisis estadístico: p=0.033 (Test de Mann-Whitney)

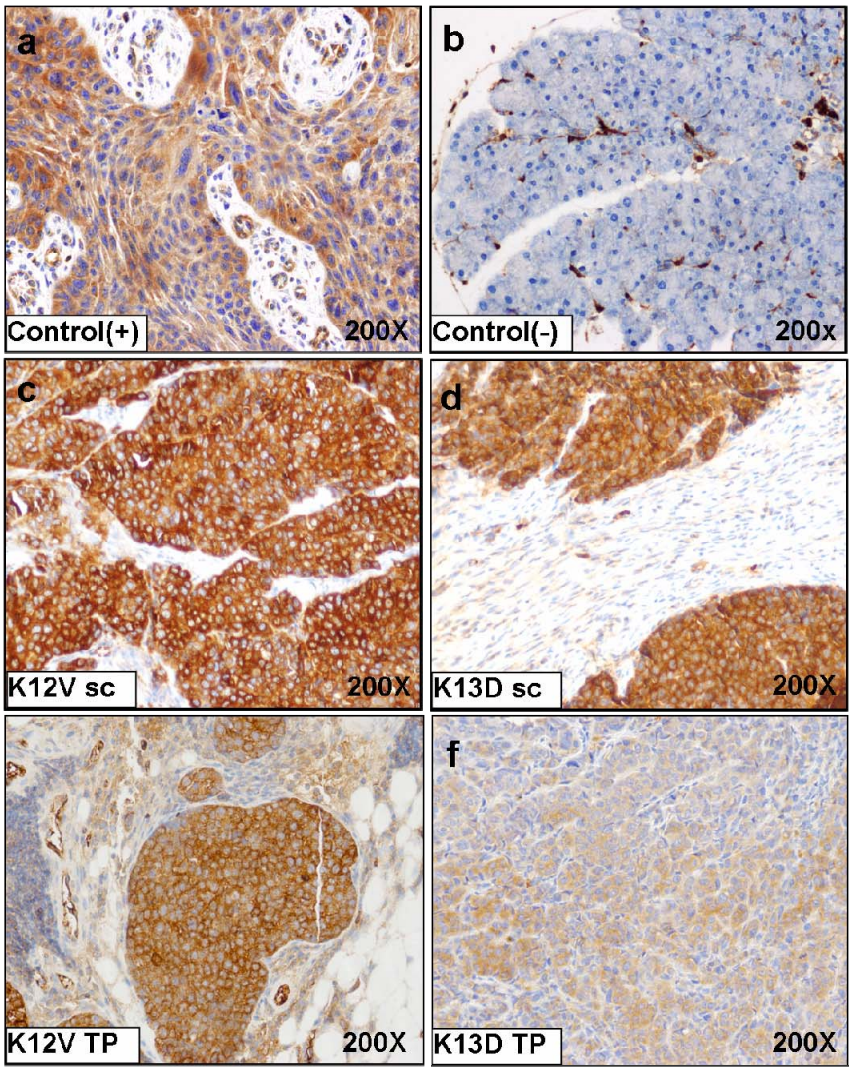


Figura 86. Análisis de la expresión de serpina 1 por IHQ en los grupos K12V y K13D.
a: control positivo (carcinoma escamoso de cabeza y cuello); b: control negativo (páncreas murino) ; c y d: tumores subcutáneos de K12V (c) y K13D (d); e y f: tumores primarios de K12V (e) y K13D (f) teñidos con serpina 1.

Contrariamente a los hallazgos en tumor primario, el análisis de la expresión de Serpina1 en los focos metastáticos pulmonares mostró un incremento significativo de su expresión en el grupo K13D con respecto a

K12V ($p<0.001$, **figura 87**). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los grupos K12V y K13D en la expresión de la Serpina1 en metástasis linfáticas ($p=0,137$).

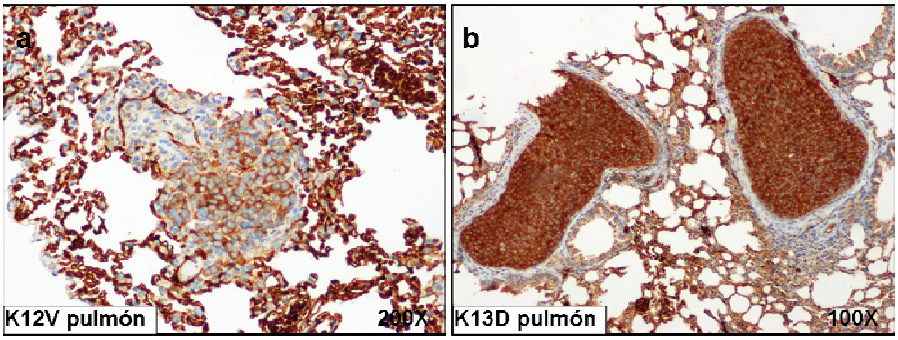


Figura 87. Análisis de la expresión de Serpina1 por IHQ en las metástasus pulmonares de los grupos K12V y K13D.
a y b: fotografía de dos metástais pulmonares de K12V (a) y K13D (b) teñidos con el anticuerpo para serpina 1. Magnificación 100 y 200X

4.3.5 Análisis de la expresión de Vimentina en las muestras de tumor primario

Por otra parte, se analizó la expresión de Vimentina, como marcador de la transición epitelio-mesenquima (EMT) en los tumores primarios de ambos grupos observándose una mayor expresión de esta proteína en el grupo K13D que en el grupo K12V (**figura 88 y 89**). En los tumores subcutáneos también se registró mayor nivel de expresión de Vimentina en los tumores del grupo K13D que en K12V.

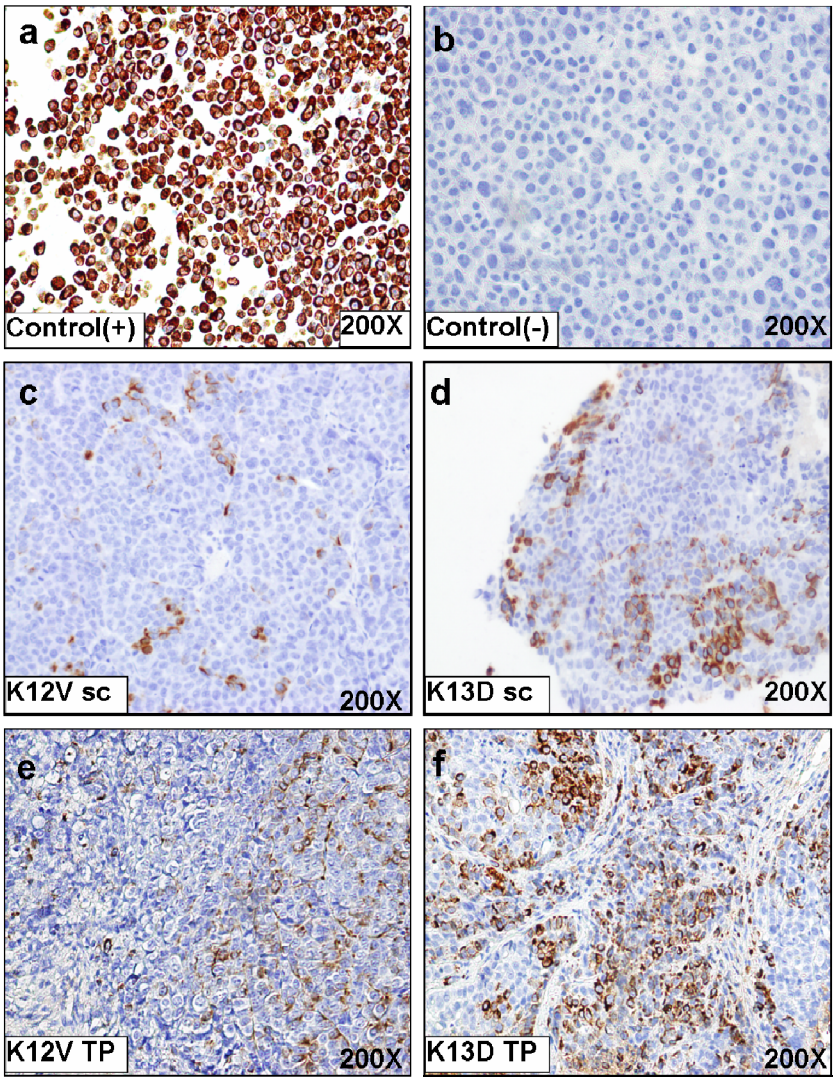


Figura 88. Análisis de la expresión de vimentina por IHQ en los grupos K12V y K13D.

a: control positivo (línea celular de carcinoma escamoso de cabeza y cuello UM-SCC-74B); b: línea celular hipofaringea Fadu (negativo); c y d: tumores subcutáneos de K12V (c) y K13D (d); e y f: tumores primarios de K12V (e) y K13D (f) Magnificación 200X.

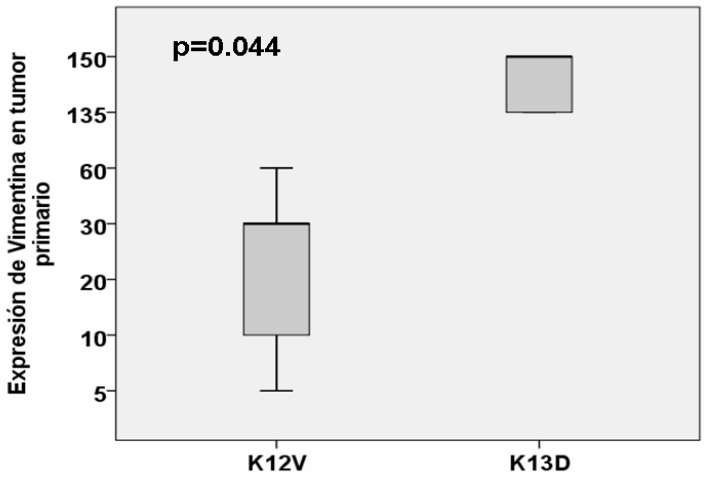


Figura 89. Análisis de la expresión de vimentina en muestras de tumor primario entre los grupos K12V y K13D.
Estadística: p=0.044 (Test de Mann-Whitney)

También se analizaron las diferencias en la expresión de Vimentina en los focos metastáticos entre ambos grupos, observando un incremento significativo en la expresión de Vimentina en el grupo K13D con respecto a K12V, en los focos metastáticos linfáticos (p=0,034) y en los pulmonares (p=0,022) (**figura 90 y 91**).

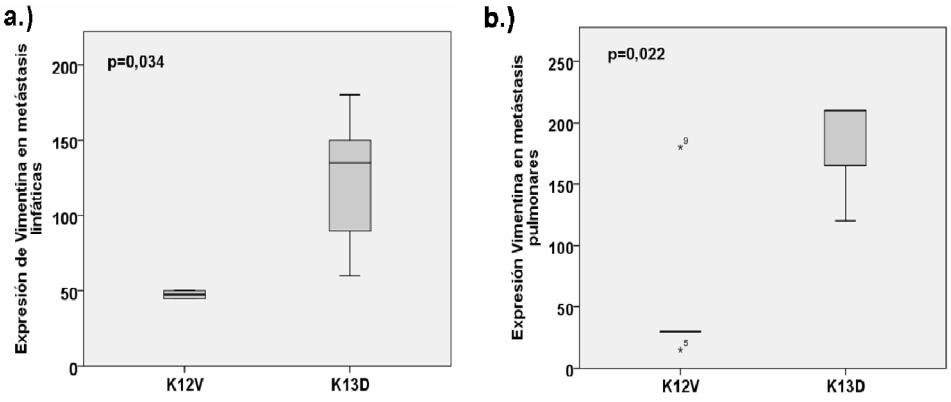


Figura 90. Análisis de la expresión de vimentina en metástasis linfáticas y pulmonares entre los grupos K12V y K13D.
Estadística: p=0.034 (metastasis linfáticas) y p= 0,022 (metástasis pulmonares, Test de Mann-Whitney)

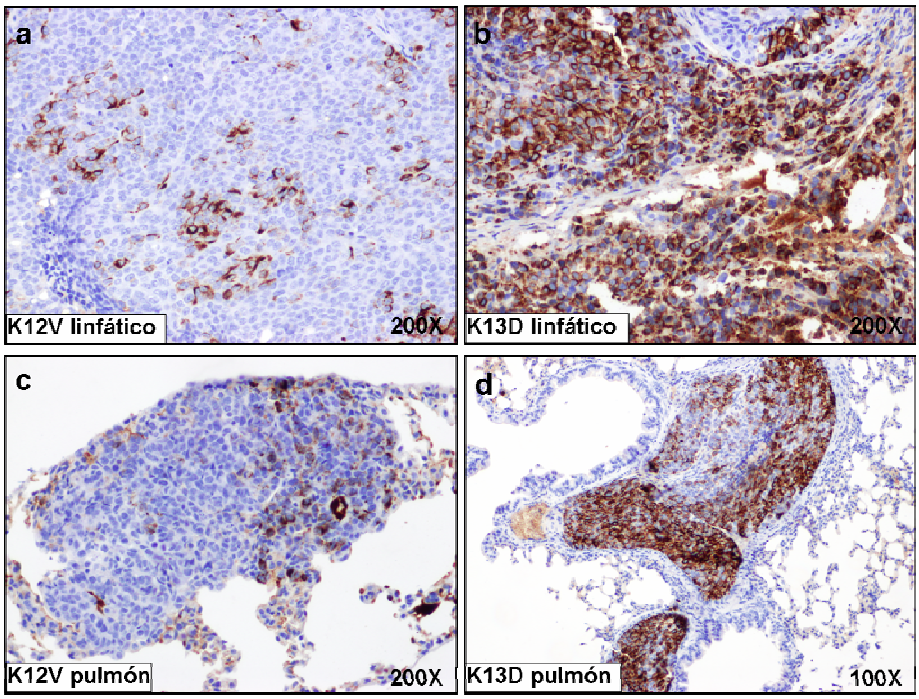


Figura 91. Análisis de la expresión de vimentina en metástasis pulmonares y linfáticas en los grupos K12V y K13D.

4.3.6 Análisis de la expresión de Ki67 en las muestras de tumor primario

Se utilizó inmunohistoquímica para determinar el marcador de proliferación celular Ki67 en muestras de tumor primario. Este análisis no registró diferencias significativas (p=1.0) en la expresión de Ki67 entre los grupos K12V y K13D (**figura 92)**

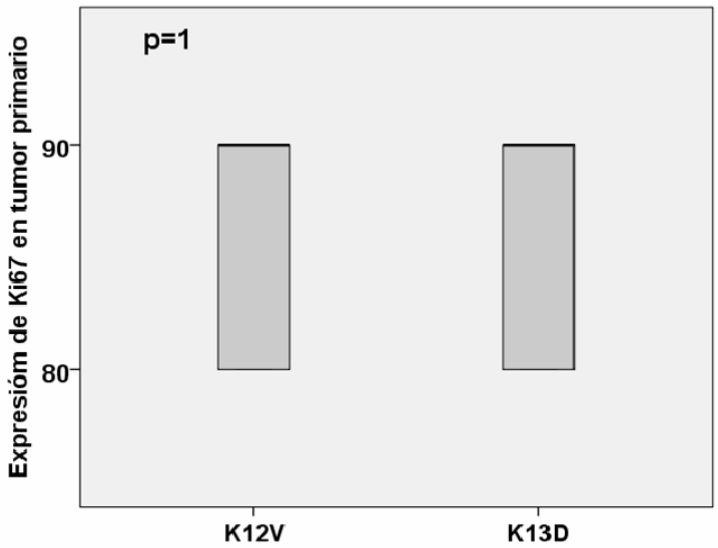


Figura 92. Cuantificación de la expresión de Ki67 en muestras de tumor primario en los grupos K12V y K13D.
Estadística: p=1 (Test de Mann-Whitney)

4.3.7 Análisis de la expresión de VEGFA en tumor primario

La expresión de VEGFA fue determinada mediante ensayo ELISA en las muestras de tumor primario en los dos grupos mutantes, K12V y K13D, observándose un disminución significativa (p=0.025) en los niveles de VEGFA en el grupo K13D con respecto a K12V (**figura 93**).

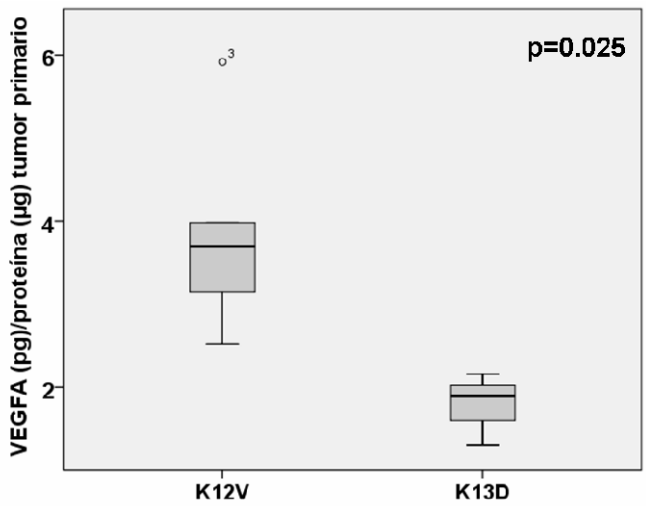


Figura 93. Cuantificación de la expresión de VEGFA mediante ensayo ELISA, en el tumor primario de los grupos K12V y K13D.
Análisis estadístico: p=0,025 (Test de Mann-Whitney)

Además, el análisis de expresión de VEGFA por inmunohistoquímica en los focos metastásicos, registró mayor nivel de expresión de VEGF-A en las metástasis pulmonares del grupo K12V que en las del grupo K13D (p<0,001, **figura 94 y 95**), una observación contraria a la observada en el tumor primario ya que en este caso se observó un aumento de la expresión de VEGFA en el grupo K13D frente a K12V.

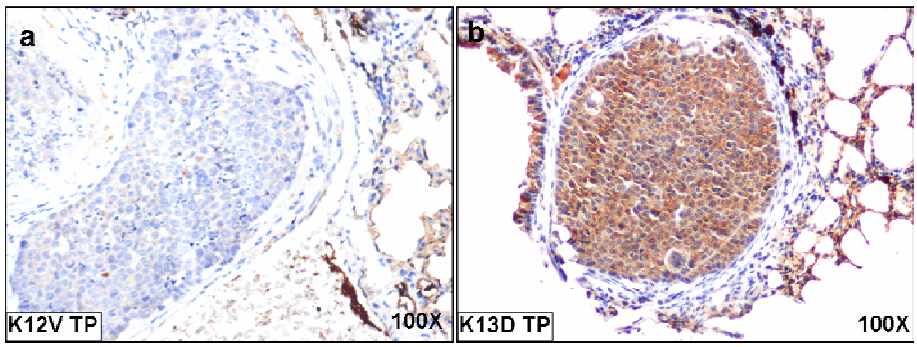


Figura 94. Análisis de la expresión de VEGFA por IHQ en las metástasis pulmonares en los grupos K12V y K13D.
a: metástasis pulmonar K12V; b: metástasis pulmonar K13D.

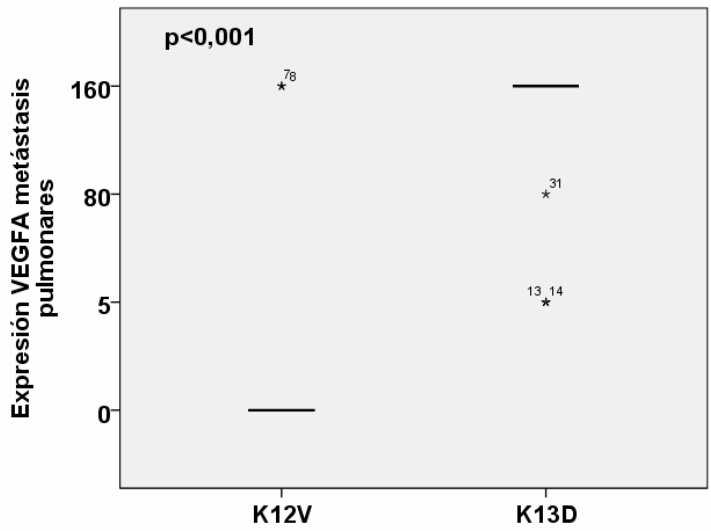


Figura 95. Análisis de la expresión de VEGFA en metástasis pulmonares en los grupos K12V y K13D mediante ensayo de ELISA.
Análisis estadístico: p<0,001 (Test de Mann-Whitney)

4.3.8 Análisis de la expresión de CXCR4 en los émbolos tumorales

Se analizó, además, la expresión de CXCR4 en los émbolos tumorales, que participan en la diseminación del tumor, dentro de los vasos de la capa submucosa y grasa pericólica próxima al tumor primario, observándose, una mayor expresión de CXCR4 las células tumorales que formaban parte de los émbolos tumorales en el grupo K12V respecto a K13D (**figura 96 y 97**).

También se analizó la expresión de CXCR4 en los focos tumorales linfáticos y pulmonares, siendo significativamente mayor en las metástasis linfáticas en el grupo K12V que en el grupo K13D (p=0,009, **figura 98**).

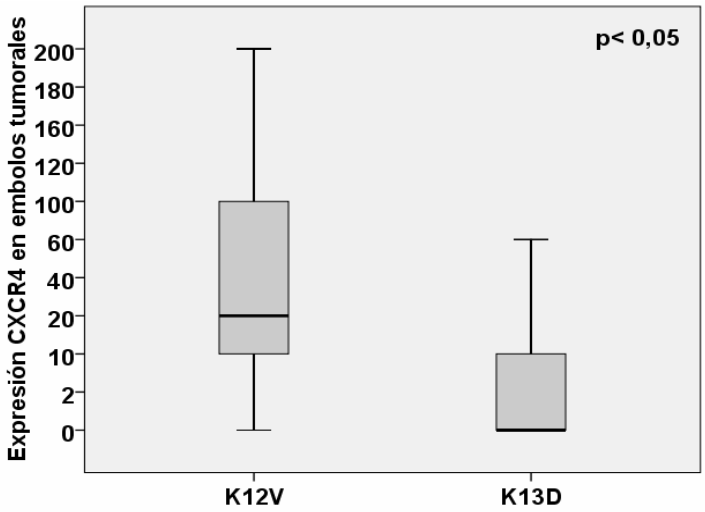


Figura 96. Cuantificación de la expresión de CXCR4 en los émbolos tumorales intravasados en tumores primarios de los grupos K12V y K13D.
Análisis estadístico: p<0,05 (Test de Mann-Whitney)

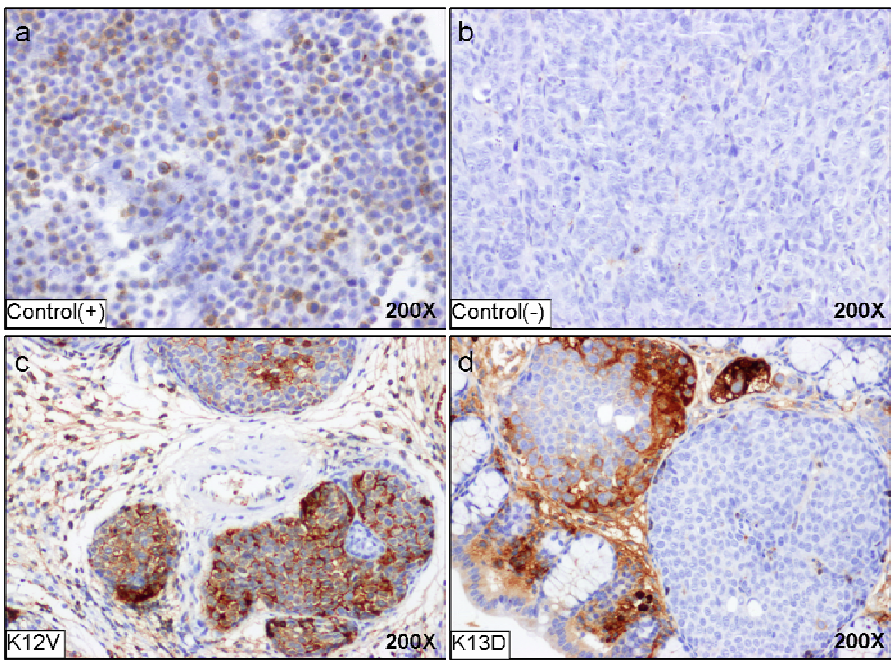


Figura 97. Análisis de la expresión de CXCR4 por IHQ en los embolos tumorales intravasales de los grupos K12V y K13D.
a: células en bloque SW1417 (control positivo), b: tumor primario de la línea celular HCT116 (control negativo), c: K12V, d: K13D,. Magnificación 200X.

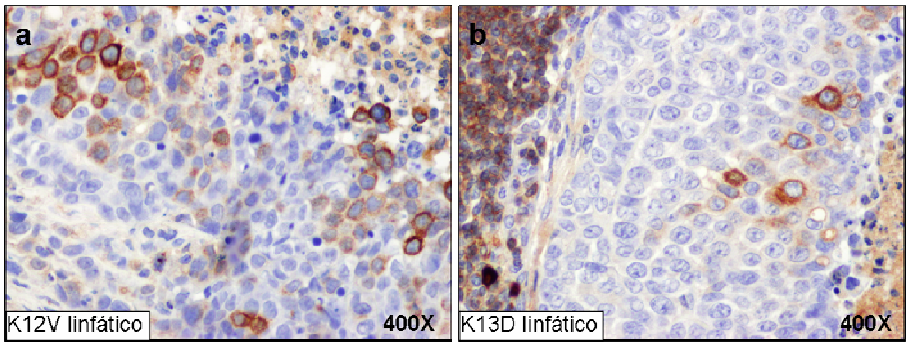


Figura 98. Análisis de la expresión de CXCR4 por IHQ en las metástasis linfáticas de los grupos K12V y K13D.
a y b: fotografía de dos metástasis linfáticas de K12V (a) y K13D (b) teñidos con el anticuerpo para CXCR4. Magnificación 400X

4.3.9 Análisis de la expresión de PTHLH en las muestras de tumor primario

Se analizó la expresión de la hormona paratiroidea-like debido a su implicación en carcinogénesis y diseminación metastásica en cáncer de mama. Trabajos anteriores, utilizando xenógrafos de cáncer de mama, la relacionan con progresión tumoral y como la responsable de la diseminación metastásica hacia sangre periférica, medula ósea, pulmón y metástasis distales[107]. Teniamos interés en estudiar la expresión de esta citoquina para determinar si estaba asociada con el tipo de mutación en el oncogén KRAS y con las las diferencias encontradas en diseminación metastásica entre mutantes. No obstante, se observó una ligera disminución de expresión en el grupo K13D con respecto a K12V, pero no fue estadísticamente significativa. (**figura 99 y 100**).

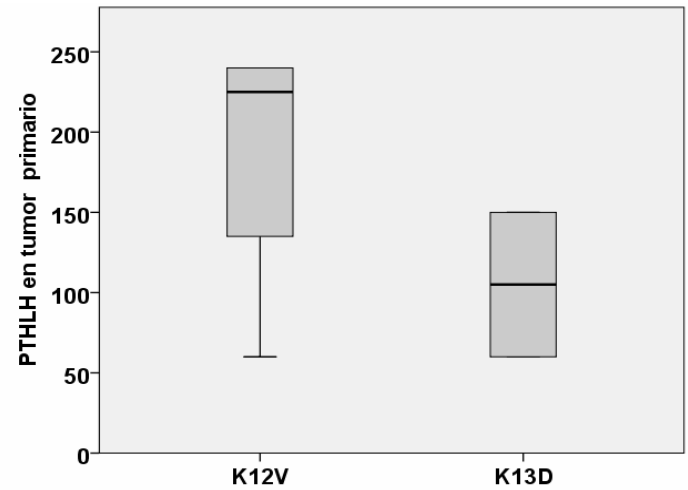


Figura 99. Cuantificación de la expresión de PTHLH en tumor primario de los grupos K12V y K13D
Análisis estadístico: K12V vs K13D p=0.23 (Test de Mann-Whitney)

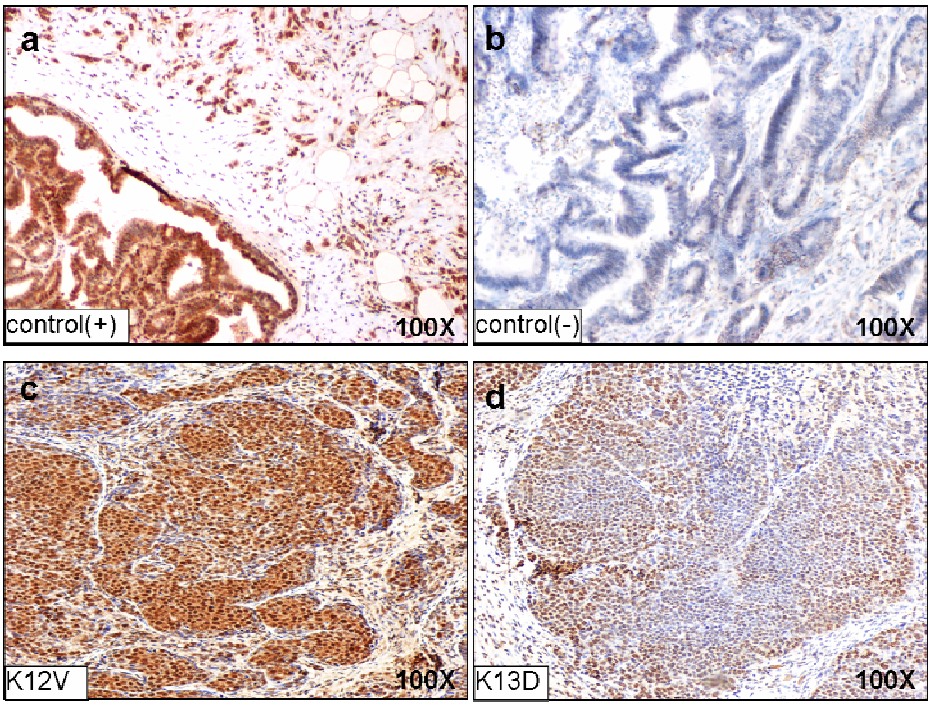


Figura 100. Análisis de la expresión de PTHLH por IHQ en los tumores primarios de los grupos K12V y K13D.
a: adenocarcinoma de mama (control positivo), b: adenocarcinoma de colon (control negativo), c: Tumor primario K12V, d: Tumor primario K13D,. Magnificación 100X.

Finalmente, analizamos otros marcadores relacionados con proliferación, muerte celular, EMT y diseminación metastásica (MAPK-P38, γ-H2AX, Snail1, Il-8 y Integrinas α1-v y β2-4) que se han asociado previamentecon prognosis en cáncer colorrectal. Los resultados obtenidos en muestras de tumor primario comparando el nivel de expresión de estas proteínas entre los grupos K12V y K13D se resumen en la siguiente tabla, en la que se muestra un nivel de expresión indetectable o ausencia de diferencias significativas entre ambos grupos.

Tabla 34. Análisis de la expresión de MAPK-P38, Ki67, γ-H2AX, Snail1, IL8 y Integrinas α1-v y β2-4 en muestras de tumor primario de los grupos K12V y K13D.

Anticuerpo	TP K12V	TP K13D	p Value (grupo con mayor expresión)
Phospho-MAPK-P38	=	=	0,481 (K12V up)
Ki67	=	=	1
γ-H2AX	=	=	0,105 (K13D up)
Snail	negativo	negativo	-
IL-8	=	=	=
Integrinas α1-v y β2-4	negativo	negativo	-

TP: *tumor primario; = expresión sin diferencias significativas*

V. DISCUSIÓN

Esta tesis ha tenido dos objetivos generales: la mejora del modelo de inyección ortotópica OCMI de CCR metastásico, y el estudio del papel de distintas mutaciones de K-ras en metastagénesis.

Respecto al primer objetivo se llevaron a cabo dos abordajes para aumentar la eficiencia metastásica de las líneas celulares de CCR. En primer lugar se optó por la administración del factor estimulante de la formación de colonias de granulocitos (G-CSF) a ratones inmunodeprimidos, previamente a la inyección ortotópica de las células tumorales y como segunda estrategia, se utilizó el pase subcutáneo para generar tumores a partir de la línea celular, que una vez disgregados, y aisladas las células tumorales, se inyectaron ortotópicamente en el ciego de ratones inmunodeprimidos.

Para evaluar ambas aproximaciones, se utilizó la línea celular de CCR humano HCT116 de la que conocíamos su patrón de diseminación metastásica. Esta línea genera metástasis linfáticas a nivel macroscópico, y micrometástasis hepáticas y pulmonares por lo que es válida y útil para valorar procedimientos de mejora del modelo de metástasis en CCR. La elevada eficiencia tumorogénica y metastásica de esta línea tumoral permite la obtención de resultados a corto plazo en comparación con otras líneas celulares de CCR que tardan más tiempo en generar el tumor primario y más aún en producir metástasis.

1. EFECTO ANTITUMORAL Y ANTIMETASTÁSICO DE GCSF EN EL MODELO ORTOTÓPICO DERIVADO DE LA LÍNEA CELULAR HCT-116

Se esperaba que la administración de G-CSF a múltiples dosis generara un aumento de la diseminación metastásica. Este abordaje se sustentaba en los numerosos trabajos publicados que describen a G-CSF ó al aumento de neutrófilos como un factor pro-tumorogénico y pro-metastagénico, que favorece la formación del nicho premetastásico y, como consecuencia, aumenta la eficiencia metastásica.

En este sentido, se ha descrito que G-CSF eleva el número de leucocitos circulantes en sangre y potencia la capacidad metastásica de los carcinomas de ovario[37], vejiga[38], nasofaríngeo [39] y CCR[40], promoviendo además, un comportamiento invasivo en los tumores no metastásicos a través de la sobreexpresión de metaloproteínasas (por ejemplo, MMP9) y TGF-β1 y de la inducción de la expresión de la proteína Bv8, que funciona como un quimioatrayente, aumentando la movilización y colonización de los granulocitos hacía el pulmón antes de la llegada de las células tumorales[108].

Este efecto ha sido demostrado, además, en un modelo de xenógrafo de cáncer de mama, que produce tumores metastásicos que sobreexpresan G-CSF, permitiendo la movilización de leucocitos y su colonización en los órganos distantes antes de la llegada de las células tumorales. Este trabajo demuestra, además, que la administración de G-CSF es suficiente para la movilización de leucocitos hacia los lugares de diseminación metastásica, mejorando la capacidad invasiva de los tumores no metastáticos. En

particular, G-CSF contribuye a la formación de metástasis pulmonares estimulando la movilización de neutrófilos y monocitos (población de células Gr-1+CD11b+) y favorece la formación del nicho premetastásico pulmonar mediante la creación de un entorno inflamatorio y proliferativo, que genera una red vascular atípica y promueve la diseminación metastásica[109]. Por otra parte, el grupo de Pekarek demostró que los neutrófilos estimulan el crecimiento del tumor primario a través de la secreción de factores pro-tumorigénicos que estimulan la angiogénesis e inhiben la respuesta inmune[110]. También se ha descrito que G-CSF tiene un efecto supresor de la apoptosis en células de CCR humano HT-29[111]

La mayoría de los tumores activan una respuesta inflamatoria y reclutan leucocitos mediante la producción de varias citoquinas y quimiocinas[112] siendo ésta población de células heterogénea, y formada principalmente por neutrófilos asociados a tumor (NAT). Aunque se ha descrito que la infiltración de los leucocitos está asociada con buen pronóstico en algunos tipos de cáncer[113,114], en modelos animales tanto transgénicos como xenógrafos, los NAT tienen un efecto pro-tumorogénico. En este sentido, Natori, T et al., observaron que G-CSF promueve el crecimiento tumoral y la neovascularización *in vivo*, mientras que no tiene efecto sobre la proliferación celular *in vitro*[41].

Los numerosos estudios citados anteriormente que atribuyen un efecto pro-tumorogénico al aumento de neutrófilos, nos condujeron a plantear el uso de G-CSF, antes y después de la inyección ortotópica mediante OCMI, para estimular la progresión tumoral y favorecer la formación del nicho premetastásico y como consecuencia, aumentar la eficiencia metastásica.

Los resultados de nuestro estudio en el modelo de CCR HCT116 demostraron que la administración de G-CSF antes de la inyección de células tumorales aumenta la cantidad de neutrófilos circulantes, a la vez que disminuye de la cantidad de linfocitos en sangre en el grupo experimental con respecto al grupo control. Además, observamos que su administración no era tóxica ya que no se encontraron diferencias significativas en cuanto al tiempo de supervivencia o al peso de los animales entre el grupo experimental y el control.
Contrariamente a la hipótesis de partida, el análisis histopatológico de los tumores y focos metastásicos obtenidos en este modelo al final del experimento, mostró una disminución del volumen de los tumores primarios, y de su capacidad invasiva a nivel local, además de una disminución significativa en el número y área de los focos metastásicos encontrados, tanto a nivel linfático como metástasis hematógenas en hígado y pulmón en el grupo experimental respecto al grupo control.

A pesar de que G-CSF tiene un efecto antitumoral y antimetastásico, estos efectos no se asociaron con la prolongación de la supervivencia de los animales, ya que los ratones morían, tanto en el grupo control como en el experimental, por obstrucción intestinal. Aunque el volumen tumoral de los animales tratados con G-CSF es significativamente inferior al del grupo control, esta diferencia no prolonga la vida de los animales.

Consecuentemente, nuestros resultados demuestran que, en la línea celular de CCR HCT116, G-CSF tiene efecto antitumoral y antimetastásico, una observación contraria a la esperada. Este hallazgo, nos indujo a evaluar de nuevo la bibliografía sobre el efecto de G-CSF en cáncer. Encontramos, que de la misma forma que existe literatura que apoya el efecto pro-

tumoral y pro-metastásico de G-CSF, también existen publicaciones que apoyan su posible efecto antimetastásico. En este sentido, nuestros hallazgos son consistentes con estudios recientes en modelos transgénicos y xenógrafos de cáncer de mama, en los que se describe un efecto antitumoral mediado por neutrófilos. Los neutrófilos se activan por secreción de las citoquinas CCL2/5, por parte de la célula tumoral, que estimula a los receptores, CCR2 y CCR1, que expresan en su membrana. Esta estimulación conduce a un incremento en su producción de H_2O_2 (a través del complejo NADPH oxidasa) y la muerte de las células tumorales por explosión ("burst") oxidativa. La adquisición de la capacidad antitumoral se asocia con el fenotipo N1 en los neutrófilos, que está regulado por TGF-β (proteína secretada por el tumor). El bloqueo de la señal de TGF-β sería el inductor del efecto antitumoral mediado por los neutrófilos[115].

En nuestro modelo, los neutrófilos podrían tener un efecto citotóxico similar al descrito por Granot et al., tanto sobre el tumor primario como sobre las metástasis, destruyendo las células tumorales y disminuyendo la colonización y posterior crecimiento del foco tumoral[116].

A continuación se describen tres mecanismos alternativos basados en publicaciones previas, que podrían explicar también nuestros resultados:

a) G-CSF podría tener un efecto directo sobre la célula tumoral a través de la unión a su receptor (G-CSF-R) mediante el cual inhibiría su proliferación y/o migración o induciría la muerte celular. En este sentido, el trabajo de Faderl et al describe un efecto pro-apoptótico, asociado con la inducción de la expresión de procaspasa 3 y activación de caspasa 3,

además de la expresión de las proteínas SOCS y SHP1 en líneas de leucemia[117].

b) G-CSF generaría un aumento del número de neutrófilos que podrían actuar a nivel de tumor primario, reduciendo el número de células tumorales circulantes capaces de colonizar el órgano diana, por tanto, disminuyendo el número de focos metastáticos generados, y

c) El aumento del número de neutrófilos circulantes inducido por G-CSF podría destruir las células tumorales bien en el torrente circulatorio o en el mismo órgano diana para las metástasis, impidiendo la colonización y el crecimiento de los focos metastásicos.

Considerando que en la literatura existen suficientes trabajos que demuestran tanto un efecto pro-tumorigénico como anti-tumoral para G-CSF, creemos bastante probable que dependiendo del "background" genético y de las mutaciones presentes en cada tumor, o en cada una de las líneas celulares tumorales estudiadas, G-CSF pueda estimular o inhibir la diseminación metastásica. En el caso de la línea celular de CCR HCT116, G-CSF tendría claramente un efecto antitumoral y antimetastásico.

Para continuar esta línea de trabajo, nos proponemos estudiar si, en nuestro modelo, los neutrófilos limitan el número de células tumorales circulantes capaces de colonizar, los distintos órganos diana para las metástasis, limitando de este modo la eficiencia en su diseminación. También, queremos estudiar marcadores de apoptosis (p.e. caspasa 3 y caspasa 9) en muestras obtenidas de focos metastásicos, así como el estado de activación del receptor de TGF-β en el tumor primario, ya que trabajos recientes

muestran que la inhibición de este receptor promueve un fenotipo citotóxico para los neutrófilos; por el que adquieren la capacidad de inducir la muerte de las células tumorales e inhibir el crecimiento del tumor. [115].

En concreto, queremos determinar si la vía de TGF-β está o no inhibida en nuestro modelo, ya que su inhibición explicaría que el aumento de neutrófilos que se obtiene tras la administración de G-CSF, produjera la disminución del volumen tumoral y de la colonización de los órganos diana para las metástasis.

2. AUMENTO DE LA DISEMINACIÓN METASTÁSICA MEDIANTE CONDICIONAMIENTO SUBCUTÁNEO PREVIO A LA INYECCIÓN ORTOTÓPICA DE LA LÍNEA HCT-116

Debido a que la administración de G-CSF no consiguió su objetivo de mejorar el modelo de metástasis en CCR, nuestra segunda aproximación fue evaluar si el pase subcutáneo (SC) previo a la inyección ortotópica de la línea celular HCT116 aumentaba la eficiencia metastásica. Para ello, se llevó a cabo un estudio comparativo inyectando ortotópicamente esta línea celular con y sin pase subcutáneo previo.

Esta propuesta estaba basada en diversos estudios que describían que la utilización de pases sucesivos *in vivo* aumentaba la capacidad tumorogénica y metastásica de las células tumorales. En este sentido, Fidler et al., demostraron que la re-inyección sucesiva, en el páncreas o el bazo de ratones inmunodeprimidos, de células tumorales aisladas a partir de metástasis hepáticas de cáncer de páncreas, aumentaba la incidencia de metástasis linfáticas y hepáticas en comparación con su inyección directa (una sola vez) en el páncreas. Este incremento de la capacidad metastásica fue atribuido a un aumento de la expresión de factores de crecimiento pro-angiogénicos, en particular del factor de crecimiento vascular endotelial VEGF-A e IL-8 por parte de las células tumorales. Estos autores observaron, además, que las células tumorales que se habían sometido a pases sucesivos incrementaban su motilidad e invasividad, a través de la sobre-expresión de colagenasa de tipo IV (MMP-9) y la infraexpresión de E-caderina[100].

Por otro lado, resultados previos generados por nuestro grupo que tenían como objetivo el desarrollo de un modelo animal de linfoma no-Hodgkin, utilizando la línea de linfoma difuso de células grandes WSU-DLCL-2, mostraron un aumento de la tasa de injerto y la diseminación metastásica, tras la utilización de un pase subcutáneo previo a la inyección orotópica. Este aumento de la capacidad de diseminación estaba asociada con una mayor expresión de las proteínas de adhesión FAK, p130Cas y con la activación de AKT[101].

En nuestro modelo de CCR derivado de la línea de CCR humano HCT116, el pase subcutáneo previo a la microinyección ortotópica de las células tumorales (condicionamiento subcutáneo) aumentó la eficiencia de diseminación metastásica. Esto es, en el grupo SC+ORT observamos macrometástasis hepáticas visibles, y mayor número de micro- y o macrometástasis a nivel linfático, hepático y pulmonar que en grupo ORT, sometido únicamente a microinyección ortotópica directa. Estos efectos se observaron, a pesar de no existir diferencias en la tasa de injerto, en el tamaño del tumor primario o en el tiempo de supervivencia de los animales entre los grupos SC+ORT y ORT. Por tanto, la utilización del condicionamiento subcutáneo en el modelo de CCR HCT116, induce un aumento significativo de la diseminación metastásica, a través del incremento del número de colonias y la estimulación de la transición de micro- a macrometástasis en la mayoría de los órganos colonizados.

A nivel linfático observamos que en el grupo SC+ORT se producía un incremento del área y del número de focos macroscópicos respecto al grupo ORT. Además, únicamente el grupo SC+ORT desarrollaba focos metastáticos visibles. Es decir, a pesar de no aumentar la frecuencia de

colonización de los ganglios linfáticos por parte de las células tumorales, el condicionamiento subcutáneo altera el comportamiento de las células tumorales, estimulando la transición de los focos metastáticos microscópicos a macrometástasis. Esto es, una vez el ganglio ha sido colonizado, las células tumorales procedentes del grupo SC+ORT poseen mayor capacidad de activación angiogénica (capacidad para inducir la formación de nuevos vasos) y de inducir la proliferación de los focos metastáticos.

El mayor impacto del condicionamiento subcutáneo se observó en las metástais hepáticas. Así, el grupo SC+ORT registró mayor número y área de focos micrometastásicos, y mayor número y área de focos macrometastásicos que el grupo ORT. Además, únicamente el grupo SC+ORT desarrolló focos hepáticos visibles. Estos resultados indican que el pase subcutáneo previo a la inyección ortotópica aumenta la colonización hepática por parte de las células tumorales así como la transición de micro metástasis a macrometástasis y de estas a metástasis visibles. Estos efectos sugieren que el condicionamiento subcutáneo induce la activación angiogénica (neoangiogénesis) a la vez que la proliferación de los focos metastásicos.

Consideramos especialmente relevante el hallazgo de que en nuestro modelo de CCR el pase subcutáneo aumente la diseminación metastásica, especialmente en el hígado, hasta desarrollar metástasis hepáticas visibles que afectaban al 95% del parénquima en un subgrupo de animales. Su relevancia deriva del hecho de reproducir fielmente la observación clínica de que numerosos pacientes con CCR mueren por el crecimiento de las metástasis hepáticas[118]. Previamente, se han descrito modelos de metástasis

hepáticas en CCR, obtenidas por inyección de las células tumorales en el bazo[100], pero consideramos que estos modelos no reproducen el proceso patológico observado en CCR en pacientes, teniendo por tanto menos capacidad traslacional en cuanto al estudio de los mecanismos de metástasis o el desarrollo de fármacos antimetastásicos.

Por otra parte, en nuestro modelo observamos que el condicionamiento subcutáneo estimuló la colonización del pulmón, a pesar de no aumentar el crecimiento de los focos metastásicos en este órgano. Este argumento se basa en la observación de un mayor número de focos microscópicos pulmonares y de un mayor número de animales afectados por metástasis pulmonares en el grupo SC+ORT que en el ORT. Cabe destacar que las metástasis a pulmón son la segunda localización en cuanto a incidencia de metástasis a distancia en CCR, después de las hepáticas[119]

En definitiva, el condicionamiento subcutáneo aumenta la eficiencia metastásica de los modelos ortotópicos en todos los órganos afectados por metástasis en pacientes con CCR (ganglios linfáticos, hígado y pulmón).

A pesar de que el pase subcutáneo previo a la inyección ortotópica de las células tumorales aumenta significativamente la tasa de metástasis, tanto en número de focos que colonizan el órgano diana como su crecimiento una vez establecidos en estos órganos, esto no se traduce globalmente en una reducción del tiempo de supervivencia ya este parámetro era similar entre los grupos SC+ORT y ORT. Esta observación está probablemente relacionada con que los animales continuaban muriendo por obstrucción intestinal debido al crecimiento del tumor primario, no por la mayor tasa de metástasis generada. Sin embargo, es importante destacar que los animales que presentaron macrometástasis

visibles en el hígado tuvieron una media de supervivencia más baja que la media del grupo (59 frente a 69 días tras la inyección de las células tumorales en la pared del colon). Es posible que estos animales murieran antes que el resto, como consecuencia de las metástasis hepáticas visibles que afectaban la mayor parte del parénquima hepático, pudiendo comprometer la función de este órgano. Para que los animales mueran por diseminación metastásica y no por obstrucción intestinal, en el futuro nos proponemos realizar un experimento en el que resecaremos el tumor primario para evitar la muerte del animal por obstrucción intestinal asociada al crecimiento del tumor primario, y permitir un mayor desarrollo de las metástasis.

En resumen, consideramos que la utilización del pase subcutáneo previo a la inyección ortotópica genera modelos de CRC más cercanos a la situación clínica, ya que aumenta la eficiencia de metástasis en todas las localizaciones metastásicas observadas en pacientes (ganglios, hígado y pulmón), siendo en la actualidad el modelo que mejor replica estas observaciones. Especialmente, este modelo permite el desarrollo de las metástasis hepáticas visibles que comprometen la función hepática lo que no se había conseguido anteriormente con el modelo OCMI, o con otros modelos animales de cáncer colorrectal, ya sean de metástasis experimentales o mediante la generación de modelos genéticamente modificados[81].

En la literatura se describen otros modelos como el generado por Fidler, ya citado anteriormente, que utiliza pases sucesivos en el bazo, para generar metástasis hepáticas; sin embargo, este modelo no reproduce el proceso patológico observado en pacientes y necesita más tiempo para su

desarrollo, debido al largo período que se requiere para generar focos metastásicos entre pases sucesivos *in vivo* (alrededor de seis meses para cada pase). En comparación, nuestro modelo es más rápido ya que utiliza un único pase *in vivo*, que requiere un período de 15 a 20 días para desarrollar el tumor subcutáneo, y aproximadamente dos meses adicionales para obtener las metástasis en el modelo ortotópico subsiguiente.

2.1 Cambios histológicos y moleculares asociados al incremento de la metastagénesis en HCT-116 tras condicionamiento subcutáneo previo a la inyección ortotópica.

El pase subcutáneo previo a la inyección ortotópica de las células HCT116 afectó más al desarrollo de metástasis que al crecimiento del tumor primario. De este modo, la tasa de proliferación, los niveles de necrosis y de apoptosis, y el volumen final del tumor primario fueron similares entre los grupos ORT y SC+ORT, mientras que la eficiencia metastásica aumentó en el grupo SC+ORT en todos los órganos estudiados. Por ese motivo, los cambios moleculares observados tras el condicionamiento subcutáneo deben relacionarse más con la potenciación de la capacidad metastásica que con el crecimiento del tumor primario.

El aumento de la diseminación metastásica observado en el grupo SC+ORT se asocia con activación de la vía de PI3K/AKT, la sobreexpresión de VEGF-A y la infraexpresión de la integrina β1 en el tumor primario. La proteína AKT forma parte de la vía de transducción de señal PI3K/AKT, actuando como efector de PI3K y estando implicada en la regulación de la proliferación (aumento del número de células), el crecimiento (aumento del tamaño de las células), la supervivencia y la

migración celular, procesos que contribuyen a la progresión tumoral, incluida la diseminación metastásica[120]. La activación de AKT y en particular su fosforilación en la serina 473 (AKT-p medido en este trabajo), es uno de los principales mecanismos de mantenimiento de la supervivencia celular[121], ue conduce a un aumento de la resistencia a la apoptosis por pérdida de anclaje celular (anoikis), que es esencial en muchos de los pasos del proceso de metástasis[122].

La activación de AKT también contribuye a la inducción del mantenimiento de la transición epitelio-mesénquima a través de la fosforilación y estabilización de la beta-catenina[123], que aumenta la capacidad de migración y diseminación celular y por tanto, la agresividad del tumor[124] . Además, la señalización a través de AKT es esencial para la angiogénesis tumoral ya que la activación de esta vía en el tumor media la formación de nuevos vasos que se induce mediante la secreción de VEGF[125] .

En nuestro modelo, la activación de AKT se induce en el pase subcutáneo, ya que se observa AKT-p localizado focalmente en los tumores subcutáneos, en cambio se expresa menos en las células HCT116 en cultivo, previamente a su inyección. Además, el pase subcutáneo determinó que los tumores primarios generados en el grupo SC+ORT presentaran una activación de AKT significativamente mayor que la de los tumores derivados de la inyección ortotópica directa de la línea celular (grupo ORT). No obstante, el aumento de la activación de AKT observada en el tumor primario del grupo SC+ORT no se mantuvo en los focos metastásicos hepáticos o pulmonares, siendo indetectable tanto en las metástasis del grupo ORT como en las del SC+ORT. Este hallazgo sugiere

que la regulación de AKT en las células tumorales es dependiente del tejido que colonizan. Es posible que la activación de AKT sirva para incrementar la supervivencia de las células tumorales durante la migración y diseminación a través del torrente sanguíneo y que posteriormente, esta actividad no sea necesaria para el crecimiento tumoral una vez se han adherido y colonizan el órgano diana.

Nuestros resultados son consistentes con trabajos que describen que AKT se encuentra sobreactivado en numerosos tipos tumorales y con su implicación en la transformación neoplásica[120], y en la progresión tumoral de los carcinomas de mama, ovario[126], próstata[127] y páncreas[120,128].

El grupo de Roy demostró que la sobreexpesión de la AKT en cáncer colorrectal ocurre en estadios premalignos, sugiriendo que esta sobreexpresión es importante para la inhibición temprana de la apoptosis durante la progresión tumoral[129].

Por otra parte se ha demostrado que en pacientes con cáncer de ovario y mama, el efecto anti-apoptótico de AKT parece estar mediado por el factor nuclear NFκB[130], la inhibición de la activación de las caspasas 9 y 3 y la activación de la vía Wnt, una vía central en el inicio de la carcinógenesis colorrectal. Por otra parte, la activación de AKT inhibe la kinasa pro-apoptótica glicogenasa (GSK) 3β, que genera un aumento en los niveles de β catenina (que activa rutas antiapoptóticas entre otros efectos)[131]. Además, en líneas celulares de cáncer colorrectal, se ha demostrado que AKT regula la expresión de la proteína antiapoptótica COX2 e induce la motilidad celular a través de la prostaglandina E2[132,133]. También, se ha

observado que AKT regula la progresión del ciclo celular[134] y la angiogénesis[135].

Por su parte, la expresión de VEGF-A en tumor primario de pacientes con CCR es un factor de mal pronóstico asociado con baja supervivencia[136] como lo es su expresión en metástasis pulmonares[137]. La expresión de VEGFA en tumor primario se asocia con el desarrollo de metástasis linfáticas[138]. Además, la transfección de VEGF-A en una línea celular de CCR humano aumentó la angiogénesis, el crecimiento tumoral y la eficiencia metastásica[139]. Por otro lado, la activación AKT conjuntamente con la sobre-expresión de VEGF-A podría ser sinérgica, ya que AKT juega un papel importante en el inducción de la angiogénesis, a través del factor de hipoxia HIF-1 α y del factor VEGF-A[120], justificando en parte el incremento de eficiencia metastásica observada en el grupo SC+ORT.

Con respecto a la integrina β1, el pase subcutáneo induce la infraexpresión de esta proteína, de modo que, tanto los tumores subcutáneos generados tras la inyección de la línea celular en el subcutis como los tumores primarios en el grupo SC+ORT expresaban niveles de esta proteína significativamente menores que los del grupo ORT. De modo similar, las metástasis hepáticas y pulmonares generadas en el grupo SC+ORT presentaban una expresión de integrina β1 significativamente menor que las metástasis correspondientes metástasis en el grupo ORT.

Habiéndose realizado un cribado extenso para detectar posibles cambios en la expresión de numerosas integrinas (integrinas α 1, 2, 3 , 4, 5, 6 y V, y β 1, 2 ,3 ,4 ,5 y 6) en el tumor primario del grupo SC+ORT en relación con el grupo ORT, y observándose únicamente una infra-expresión de la

integrina beta1, se puede argumentar que la alteración de la expresión de esta integrina es específica del pase subcutáneo. Por otra parte, la asociación de la infrarregulación de la integrina beta1 en el tumor primario así como en las metástasis, en el grupo SC+ORT, sugiere que el pase subcutáneo altera las propiedades de adhesión y diseminación de las células tumorales de modo que este cambio de expresión está posiblemente implicado en el aumento de la capacidad metastásica observada en el grupo SC+ORT.

Estos resultados son consistentes con trabajos previos en cáncer de mama en los que se describe una asociación entre transformación maligna y pérdida de expresión de la β1 integrina, en varias líneas celulares humanas derivadas de este tipo tumoral, así como con la correlación entre el nivel de infra-expresión de esta integrina y la capacidad metastásica y agresividad del tumor[140]. La infrarregulación de la integrina β1 también se observa en cáncer de próstata[141], en el que la migración dependiente de esta integrina se asocia con inactivación de la vía de AKT [142] mientras que su infrarregulación se asocia con activación de esta vía.

La infra-expresión de la integrina β1 podría indicar un cambio en las propiedades migratorias e invasivas tras el condicionamiento subcutáneo, explicando en parte sus diferencias en capacidad metastásica. En concreto, proponemos un cambio del mecanismo de invasión, entre los grupos ORT y SC+ORT.

En este sentido, la visión más aceptada de la migración celular y la invasión tumoral se relaciona con migración dependiente de la expresión diferencial de integrinas, asociada a cambios en la regulación de factores de crecimiento y citoquinas, y de sus receptores, y al aumento de la

proteólisis de la ECM. De este modo, en el proceso de diseminación metastásica, la entrada de las células tumorales en el sistema vascular implica la pérdida de adhesión celular y la liberación de enzimas proteolíticas para digerir la membrana basal. Este proceso involucra la remodelación de los contactos con diferentes componentes de la ECM que requiere la inducción de cambios en las integrinas expresadas por el tumor primario. Las células tumorales presentan alteraciones genéticas que cambian la expresión de integrinas en su superficie y su adhesividad, así como de receptores de factores de crecimiento o citoquinas que responden a la estimulación paracrina y autocrina de manera anormal. Estas alteraciones son necesarias para que las células tumorales pueden migrar utilizando como sustratos la ECM (fibronectina, colágeno, vitronectina...), y las diversas integrinas[143,144].

Por otra parte, se han descrito tres tipos de migración e invasividad tumoral: colectiva (dependiente de uniones intercelulares y de adhesión a sustrato y proteólisis), mesenquimal de células aisladas (independiente de adhesión a sustrato y dependiente de proteólisis), ameboide de células aisladas (independiente de contactos células-célula, de adhesión a ECM y de proteólisis) [145]. Existen, además, mecanismos de migración alternativos a la migración colectiva que puede, directa o indirectamente a través de un paso de migración mesenquimal, dar lugar a la difusión ameboide individual de las células[146].

De este modo, una posible explicación para la observación en nuestro modelo del aumento de la capacidad metastásica en el grupo SC+ORT asociada a la infra-regulación de la integrina β1, que hemos observado tras el pase subcutáneo, sería pasar de la invasión colectiva, del grupo ORT, a la amboide en el grupo SC+ORT, asociado a un aumento de la

colonización metastásica. Esta propuesta es consistente con los hallazgos en melanoma, en el que la migración colectiva depende de la función de integrina β1 mientras que la inhibición de esta integrina induce la migración ameboide[147]. Otros autores han descrito que la migración ameboide es independiente de la expresión o activación de integrina β1[147]. La migración colectiva ha sido previamente descrita en pacientes con carcinoma colorrectal [148], mientras que la migración ameboide ha sido también descrita en el modelo de cáncer de colon BE asociada a la infra-expresión de Smurf1 [149].

En contraposición a la migración ameboide, la migración colectiva requiere tanto del establecimiento de contactos célula-célula como de la adhesión a la matriz ECM[145]. Se ha demostrado la necesidad de mantener activada la proteasa MT1-MMP para que se ejecute la transición del tipo de migración ameboide al de invasión colectiva[150], así como que la infraexpresión de esta proteasa induce la transición de migración colectiva a ameboide[151]. Por ese motivo, nos proponemos en el futuro comparar el nivel de expresión de esta proteasa entre el grupo ORT y el SC+ORT para apoyar o descartar la utilización de este tipo de migración.

El aumento de la capacidad metastásica por la trasnsición de migración colectiva (del grupo ORT) a mesenquimal/EMT en el grupo SC+ORT, no se sustenta por nuestros hallazgos de que el pase subcutáneo no conduce a un incremento de la expresión de integrina β5, como tampoco a un incremento de la expresión de vimentina o de beta-catenina nuclear (estos dos últimos son marcadores de la transición epitelio-mesénquima). De modo consistente con este argumento, la migración colectiva requiere la expresión de la integrina β1, mientras que la migración asociada a EMT es

dependiente de la expresión de integrina β5[152]. Sin embargo, esta integrina no se expresa ni en tumores del grupo ORT ni en los del SC+ORT.

En resumen, el aumento significativo de la eficiencia metastásica a nivel linfático, hepático y pulmonar obtenido mediante el pase subcutáneo previo a la inyección ortotópica de la línea celular HCT-116 se ha asociado con la sobre-activación de AKT, la sobre-expresión de VEGF-A y la infra-regulación de la integrina β1. Estos cambios podrían indicar una alteración en el fenotipo de la células tumorales, especialmente de una posible transición desde la invasión colectiva del grupo ORT a la ameboide del grupo SC+ORT, que determinarían la mayor capacidad de diseminación observada en la que participarían, entre otros factores aún no determinados, las proteínas AKT, VEGF-A e integrina β1. No obstante, esta propuesta deberá confirmarse con estudios funcionales futuros.

El siguiente esquema muestra de una forma gráfica los efectos del condicionamiento subcutáneo sobre la colonización y crecimiento de las metástasis en los distintos órganos, así como los mecanismos moleculares asociados:

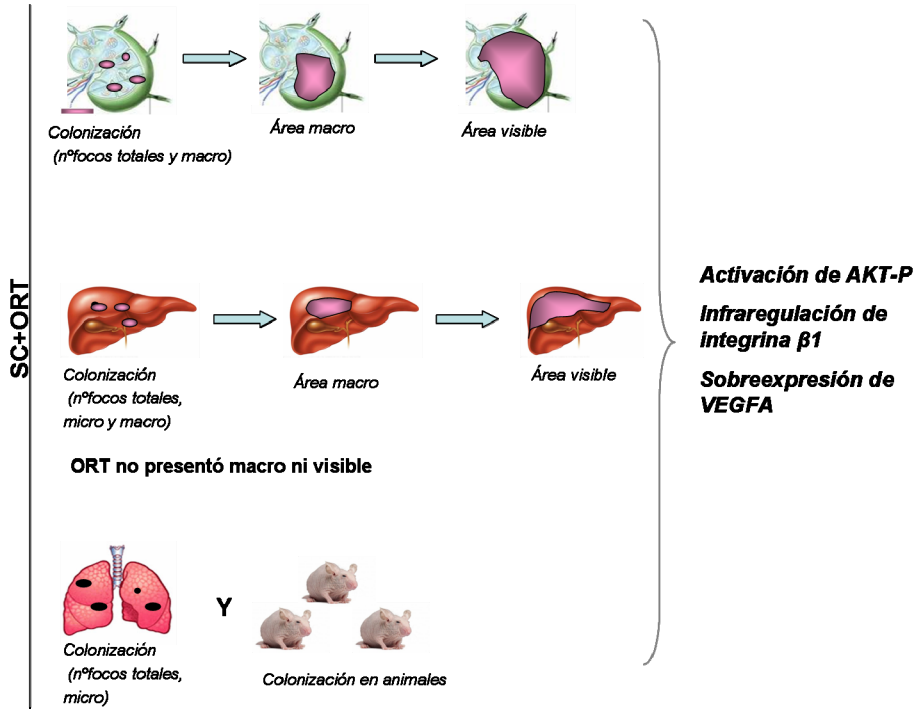


Figura 101. Esquema global de los cambios histopatológicos y moleculares observados tras la utilización del pase subcutáneo previo a la inyección ortotópica de la línea celular HCT116

3. ESTUDIO DE LAS DIFERENCIAS EN CAPACIDAD METASTÁSICA ENTRE LOS ONCOGENES K12V Y K13D

El segundo objetivo de esta tesis fue el estudio de las posibles diferencias en capacidad metastásica entre los oncogenes K12V y K13D, y los cambios moleculares asociados en relación con la activación o expresión de las vías distales a K-RAS, moléculas de adhesión y reguladores de migración, supervivencia celular y angiogénesis. Estos hallazgos nos permitieron proponer una explicación a las diferencias en capacidad metastásica en este modelo que sirva para aumentar nuestro entendimiento de los posibles mecanismos que subyacen en la distinta agresividad de los tumores portadores de diferentes mutantes del oncogén K-RAS observadas en clínica en pacientes con CCR[153,154] .

Para poder evaluar las posibles diferencias en capacidad metastásica entre K12V y K13D, generamos primeramente líneas celulares de CCR humano que expresaran cada uno de estos mutantes, y a partir de ellas los modelos metastásicos utilizando el pase subcutáneo previo a la inyección ortotópica para potenciar su capacidad metastásica, como se estableció en el objetivo 1.

3.1 Generación de transfectantes y recombinantes del oncogén K-ras

En primer lugar, generamos líneas de CCR con expresión de los mutantes de K-RAS utilizando vectores con expresión ectópica en distintas líneas de CCR humano, como primer procedimiento, y recombinantes "*knockin"* para K12V y K13D en la línea SW48, como segunda aproximación.

En el primer abordaje se utilizó el vector pTRE, con promotor de citomegalovirus que induce la expresión de niveles muy elevados de los transgenes (en este caso los oncogenes K-RAS) y otro vector que contiene el propio promotor de K-RAS, que expresa el oncogén a niveles más bajos (minigen de K-RAS).

No obstante, aplicando estas dos aproximaciones no se consiguió obtener clones transformantes estables que expresaran el oncogén K-RAS para ninguna de las células de cáncer colorrectal utilizadas. Cuando se utilizó la línea SW48 se obtuvieron resultados distintos en función del nivel de expresión del oncogén. La expresión de niveles elevados, ya sea de K12V o de K13D, bajo el promotor de CMV (vector de expresión pTRE) indujo durante cierto tiempo un cambio de morfología epitelial a mesenquimal en las células pero fue seguida de muerte celular de modo que no se pudo aislar clones estables.

Por otra parte, la expresión de niveles bajos de K12V, bajo el propio promotor de K-RAS (minigen) generó clones transformados, a diferencia de los controles transfectados con vector vacío que no contenían el inserto de K-RAS y que generaron clones sin morfología transformada, en dos experimentos independientes. Estos hallazgos apoyaban lo que se había tenido descrito en la generación de transformantes de K12V como consecuencia de la expresión de este oncogén; no obstante, la secuenciación del ADN obtenido de estos clones transformados a las dos o tres semanas de la transfección no detectó la presencia de esta mutación oncogénica, a pesar de que las células continuaban mostrando una morfología transformada.

Obtuvimos resultados similares a la línea celular SW48, utilizando dos líneas adicionales de CCR humano. Así, la transfección de las células Caco-2 o Colo-320 con el vector pTRE-K-RAS que expresa niveles altos del oncogén K12V generó clones con morfología transformante, claramente diferente a los controles transfectados con vector vacío, que no cambiaron de morfología, por lo que la transformación podría haber sido debida a la expresión de K-RAS. Sin embargo, la secuenciación a las dos semanas de la transfección no mostró mutación en Val12 en K-RAS.

La obtención de una clara morfología transformante es consistente con la inducción de fenotipo mesenquimático a partir de las células transfectadas con K-RAS mutado y la ausencia de morfología transformante en los controles transfectados con el vector vacío indica que la transformación inicial de las células es debida a la expresión de K-RAS mutado. Sin embargo, la falta de detección de la mutación en K-RAS sugiere que a pesar de que K-RAS mutado podía haber generado un fenotipo transformante, ésta no se mantiene por la expresión del oncogén. Es probable que estas células de cáncer colorrectal () una vez transformadas por el oncogén K-RAS no toleren su expresión y dejen de ser viables. De hecho SW48, Caco-2, y Colo-320son líneas celulares obtenidas a partir de tumores de CCR humano, que no portaban mutaciones en K-RAS, que podrían haber seguido en su transformación una secuencia de mutaciones incompatible con la expresión del oncogén K-RAS. Otra posible explicación sería, la existencia de una selección de clones que hayan perdido la expresión del oncogén K-RAS al haber dejado de ser dependientes de K-RAS después de la transformación. Estos clones podrían haber adquirido mutaciones adicionales como consecuencia de que la expresión del oncogén K-RAS haya incrementado la inestabilidad

genética, induciendo de este modo nuevas mutaciones en genes supresores o en oncogenes distintos de K- RAS que serian los que mantendrían finalmente el fenotipo transformante.

La viabilidad de los clones transfectantes parece depender de los niveles de expresión del oncogén K-RAS. Así, mientras las células SW48 transformadas con niveles bajos del oncogén K-RAS (vector con el minigen de K-RAS bajo su propio promotor) son viables, las que expresan niveles altos del mismo oncogén (usando el vector pTRE que utiliza el promotor de CMV) no lo son. Una explicación a estos hallazgos sería la posibilidad de que hubiera ocurrido una reversión de la mutación puntual en K-RAS. Aún cuando en la literatura no se ha descrito la reversión de una mutación en el gen RAS, sí se ha descrito que en el gen HPRT de células CHO de hámster, una corrección de la mutaciones puntuales a la secuencia wt [155]. De hecho, se ha publicado la generación de revertientes ("flat revertants") de la transformación por el oncogén RAS como consecuencia de la sobre-expresión del alelo silvestre (indicando que la transformación es dependiente de la dosis del oncogén) o como consecuencia de la pérdida del alelo K-RAS mutado[156]. Finalmente, estos hallazgos concuerdan con la dependencia del fenotipo transformante inducido por el oncogén K-RAS respecto al mantenimiento de la diferenciación epitelial[157]. Estos autores indican que la transición EMT en las células trasnsformadas por K-RAS hace perder su dependencia respecto a K-RAS en el mantenimiento del fenotipo transformante, volviéndose por tanto independientes del oncogén K-RAS, y siendo otras las mutaciones que mantienen el fenotipo transformado.

Por otra parte, la ausencia de viabilidad de los transformantes que expresan niveles elevados del oncogén K-RAS es consistente con la observación de que la sobre-expresión del oncogén K12V produce apoptosis en tirocitos PCCL3, a través de la activación de ERK (kinasa extracelular), sugiriendo que la muerte celular sucede posteriormente a las alteraciones en el DNA[158] . Además, también se ha demostrado en tirocitos PCCL3, que el oncogén RAS induce un incremento de la inestabilidad genómica a través de la activación de la vía MAPK[159]. De modo similar, se ha demostrado que la presencia del oncogén RAS activado inhibe la formación de colonias de tirocitos FRTL-5[160]. Nuestros hallazgos son, a su vez, consistentes con la parada del ciclo celular e inducción de apoptosis que ocurre cuando se induce EMT en células epiteliales de mama transformadas por el oncogén RAS expuestas a niveles altos de TGF-β[161].

Como consecuencia de no obtener clones trasnformantes viables del oncogen K-RAS mediante transfección de vectores de expresión, se optó por la recombinación homóloga como alternativa más eficaz para introducir las mutaciones puntuales de K-RAS en las células de interés. Los modelos de expresión ectópica, que implican las transfecciones y/o infecciones con virus, del vector que contiene el cDNA de la proteína mutada en células humanas o de ratón, pueden generar sobre-expresión de la mutación, que no representa el nivel de expresión que ocurre a nivel clínico. Por otro lado, la expresión del cDNA mutado se alcanza bajo el control de un promotor viral no endógeno y por consiguiente, los alelos mutados podrían no reproducir el nivel de expresión y de regulación que ocurre en la transformación de las células de pacientes.

Utilizamos, por tanto, la recombinación homóloga para introducir de manera estable la expresión únicamente un alelo mutado (KRAS Val12 ó KRASAsp13) en la línea celular SW48. En éste caso, el nivel de expresión de la proteína mutada debe ser más bajo que el obtenido por el minigen, ya que a pesar de que ambos alelos se expresan a partir del promotor endógeno de K-RAS, en las células transfectadas con el minigén se integran y expresan múltiples copias del oncogén K-RAS, mientras que en los recombinates sólo se integra y expresa un único alelo mutado. Con esta aproximación, obtuvimos recombinantes viables que expresaban cada una de las mutaciones descritas.

3.2. Estimación de la tasa de metástasis en el modelo ortotópico derivado de los recombinantes del oncogén Kras de línea celular SW48 tras su pase subcutáneo previo

Una vez obtenidos los recombinantes con expresión de los distintos oncogenes, se realizó un estudio preliminar para estimar si el procedimiento más eficiente desarrollado en el objetivo 1, en modelos derivados de la línea de CCR HCT-116 generaría una tasa de metástasis óptima en ganglios linfáticos y en pulmón que nos permitiera abordar con garantías el objetivo 2 de la tesis, es decir, la comparación de la capacidad metastásica de K12V y K13D en un modelo ortotópico de CCR. Cabe destacar que esta línea celular (SW48) no genera metástasis hepáticas por lo que sólo ha sido posible determinar si los oncogenes K12V o K13D aumentan la eficiencia metastásica en localizaciones distintas al hígado (ganglios, pulmón y peritoneo).

Realizamos un estudio preliminar *in vivo*, en el que se inyectaron ortotópicamente, mediante el modelo OCMI (sin pase subcutáneo previo), los distintos recombinantes obtenidos de la línea de CCR humano SW48 que presentaban mutaciones puntuales en PI3KCA (H1047R), BRAF (V600E) ó KRAS (G13D) para estudiar su capacidad tumorogénica y metastagénica. La tasa de injerto obtenida fue muy baja. Únicamente el 13-14% de los animales generaron tumores en el ciego, y sólo un caso en el grupo de PI3K (12,5%) desarrolló una micrometástasis pulmonar. En el resto de los grupos, no se observó diseminación metastásica. Un factor que pudo contribuir a la escasa agresividad de estos recombinantes es que la introducción de mutaciones heterocigotas (un alelo mutado y el otro WT) directamente en el DNA de células epiteliales humanas, utilizando recombinación homóloga, no fuera suficiente para conferirles propiedades tumorigénicas al expresar niveles bajos del oncogén[97] , a diferencia de las mutaciones expresadas ectópicamente (por tansfección de vectores de expresión con promotores potentes y constitutivos) como se ha descrito en la literatura, que sí son tumorigénicas[162-164]. Dicho de otro modo, la baja expresión de estos oncogenes permitía que los recombinantes fueran viables pero que tuvieran propiedades tumorigénicas limitadas. Debíamos, por tanto, alcanzar una situación de compromiso en cuanto a generar un procedimiento que evitara niveles elevados de expresión de los oncogenes para que fueran viables, pero suficientemente elevados como para ser capaces de generar tumores y desarrollar metástasis. Por ese motivo, y considerando la baja tasa de injerto y de diseminación metastásica observada tras la inyección ortotópica directa de los recombinantes, se procedió a utilizar el condicionamiento subcutáneo previo a la inyección ortotópica. De esta manera, se esperaba aumentar la tasa de injerto y la

eficiencia metastásica de los recombiantes de la línea SW48 de forma similar a lo demostrado previamente con la línea HCT116.

Como se anticipaba, el número de animales positivos para tumor primario en el grupo SC+ORT (22% en WT y 57% en KD13) fue mucho mayor que el de los grupos ORT correspondientes. Además, la afectación linfática, tanto micro como macroscópica, y la diseminación peritoneal y pulmonar pasó de ser inexistente, tras inyección ORT directa, a alcanzar un 22% en WT o un 29% en K13D, tras el pase subcutáneo seguido de inyección ortotópica. Consecuentemente, habíamos conseguido recombinates viables que expresaran distintos mutantes del oncogén K-RAS y desarrollado el procedimiento que permitiría alcanzar suficiente eficiencia metastásica como para abordar el objetivo 2 de esta tesis.

3.3 Diferencias en la capacidad tumorigénica y metastásica de los mutantes del oncogén K-RAS K12V y K13D en la línea celular SW48

Para estudiar el papel de las distintas mutaciones de K-RAS en metastagénesis, se inyectaron las líneas celulares de CCR SW48 WT, K12V y K13D ortotópicamente previo paso subcutáneo, con objeto de comparar las diferencias en la formación de tumor primario y generación de metástasis linfáticas, y pulmonares en función del tipo de mutación presente en el oncogén K-RAS.

Nuestra primera observación fue que las mutaciones en K-RAS, ya sea V12 o D13, en la línea SW48, aumentaban la agresividad del tumor ya que reducían significativamente el tiempo de supervivencia respecto al control WT, de modo consistente con la mayor agresividad observada en pacientes

portadores de tumores con mutación en el oncogén KRAS que en los portadores de tumores con K-RAS silvestre[76]. Por otra parte, K13D generó un volumen de tumor primario mayor que K12V, al igual que se observó cuando estos recombinantes se inyectaron para generar tumores subcutáneos. Además, y a diferencia del efecto del oncogén K13 sobre el crecimiento del tumor primario, K12V favorece la colonización del ciego, ya que se observa una mayor tasa de injerto para K12V que para K13D en cuanto al crecimiento del tumor primario.

Seguidamente, se evaluó histopatológicamente la presencia de focos metastásicos en los distintos órganos (ganglios linfáticos, pulmón y peritoneo) para comparar la eficiencia metastásica de K12V frente a K13D.

La observación de que la supervivencia no mostrara diferencias significativas entre K12V y K13D; y que sin embargo, los ratones en ambos grupos murieran por el crecimiento del tumor primario y no por las metástasis, no permitió establecer si el aumento de la diseminación metastásica observada en K12V frente a K13D hubiera podido aumentar la agresividad de los tumores, ya que no eran las metástasis la causa de la muerte de los animales. En estudios futuros, nos planteamos evaluar si la mutación K12V es o no más agresiva que K13D, resecando el tumor primario y haciendo un seguimiento de los animales para determinar si el grupo K12V tiene mayor eficiencia metastásica generando una menor supervivencia que K13D.

El análisis histopatológico mostró que los recombinantes de SW48 que expresan K12V o KD13 presentan mayor capacidad de diseminación que el grupo control WT, tanto a nivel pulmonar como linfático. En cuanto a

número de focos totales no existen diferencias entre K12V y K13D, sin embargo, el número y el tamaño de los focos obtenidos en los distintos órganos (ganglios linfáticos vs. pulmón) es específico de la mutación del oncogén K-RAS que expresan. Así, K12V estimula el crecimiento de los microfocos y de las metástasis visibles en ganglios linfáticos en mayor medida que K13D. En cambio, K13D estimula más el crecimiento de los microfocos pulmonares que K12V.

3.3.1 Cambios moleculares asociados con las diferencias en metastagénesis por expresión de K12V o de K13D

A nivel molecular, se analizó la expresión y activación del las principales proteínas que integran las vías distales a K-RAS, así como las principales proteínas reguladoras de la proliferación, migración, invasión, angiogénesis, EMT y adhesión, para las que se ha descrito, previamente, su asociación con el proceso de diseminación metastásica. Estos hallazgos sustentan la existencia de un patrón de expresión de proteína diferencial entre los tumores que expresan K12V y K13D.

La mayor eficiencia metastásica demostrada por el oncogén K12V en relación al número y tamaño de las metástasis linfáticas, respecto a K13D, se asoció con la activación de AKT-p, con la sobre-expresión de integrina β5, Serpina1 y VEGF-A en tumor primario y con la sobreexpresión de CXCR4 en los émbolos tumorales localizados en el interior de los vasos de la periferia del tumor. A su vez, la mayor capacidad metastásica en pulmón del oncogén K13D, en relación con un aumento del tamaño de los focos, se asoció con la sobre-expresión de integrina β1, ANGPT2 y vimentina.

Cabe destacar que los tumores subcutáneos previos a la inyección ortotópica de los recombinantes K12V y K13D ya presentaban en su mayoría los niveles de expresión de proteínas característico de los tumores ortotópicos obtenidos en los grupos SC+ORT. Además, los perfiles de expresión en los tumores subcutáneos diferían de los detectados tras el crecimiento de los recombinates *in vitro*, para aquellas proteínas en las que fue posible su determinación. Este hallazgo apoya nuestra hipótesis del condicionamiento subcutáneo y establece que el pase subcutáneo cambia la expresión proteíca de cada recombinante, probablemente alterando las funciones de las células tumorales (p.e. capacidad de adhesión y migración). De este modo, los recombinantes que expresaban K12V presentaban mayor activación de AKT y mayor expresión de integrina β5 que K13D, tanto en los tumores subcutáneos como en el ortotópicos subsiguientes. Estos hallazgos sugieren también que el perfil de expresión molecular observado presenta un nivel de dependencia mayor respecto al tipo de mutación concreta que se expresa de K-RAS, con respecto al entorno en el que crecen los recombinantes.

La diferencia específica en el perfil de expresión observado entre los grupos K12V y K13D es consistente con la utilización de mecanismos de migración e invasión distintos, y puede contribuir a explicar la distinta capacidad de diseminación metastásica observada en estos grupos. En este sentido, hemos detectado cambios en moléculas de adhesión (p.e. integrinas) o en reguladores de la supervivencia (p.e. p-AKT) o migración (p.e Serpina 1) celular entre ambos grupos, cuya expresión se asocia con comportamientos biológicos concretos descritos en la bibliografía. Considerando conjuntamente la expresión diferencial de las proteínas

analizadas, proponemos que el grupo K12V presentaría una invasión de tipo mesenquimal, asociada a transición EMT, mientras que K13D tendría una migración e invasión de tipo colectivo. De modo consistente con este argumento, la expresión de integrina β5 se asocia con migración mesenquimal[152], mientras que la expresión de integrina β1 se asocia con migración colectiva[147]. Como apoyo adicional para esta propuesta se puede entender la observación, en líneas de cáncer colorrectal humano, de la existencia de una interacción cruzada entre la integrina β5 y la integrina β1 asociada a una regulación diferencial de la migración celular y de la activación de la vía de AKT[165]. Nuestros resultados parecen, por tanto, estar de acuerdo con el concepto de que en una determinada célula tumoral, la migración mesenquimal excluye a la migración colectiva y viceversa. A continuación, describimos las publicaciones previas que dan apoyo a esta propuesta.

Las diferencias en expresión de integrinas entre K12V y K13D (K12V sobre-expresa integrina β5 y K13D sobre-expresa integrina β1) apoya el uso de distintos mecanismos de migración en las células que expresan estos diferentes mutantes de K-RAS. De todas las integrinas estudiadas (α1, 2, 3, 4, 5 6 y V, y beta 1, 2 ,3 ,4 5, y 6), solamente la integrina β5 y de la β1 mostraron una expresión diferencial entre los tumores derivados de K12V y K13D.

Los tumores que expresan el oncogén K12V podrian presentar capacidad invasiva compatible con una migración de tipo mesenquimal. Este tipo de migración se asocia con transición epitelio-mesénquima (EMT), y es dependiente de la expresión de integrina β5[152], una integrina sobre-expresada en el grupo K12V. La integrina β5 forma parte del receptor de

vitronectina (αV β 5) y está frecuentemente expresada en células de diversos carcinomas, incluyendo el carcinoma colorrectal[166]. Esta proteína media, a su vez, el proceso EMT inducido por TGFβ, a través de la acción de las proteínas Smad 3 y Smad 4. De este modo, los tumores K12V podrían tener mayor capacidad de migración como consecuencia de haber sufrido una transición EMT, ya que la inducción de EMT en células de carcinoma por TGF-β es dependiente de la activación de la expresión de integrina β5 (y de la activación de αVβ5) e independiente de la expresión de integrina β1[152]. Además, algunas líneas celulares de cáncer de mama humano, responden a la exposición a TGF-β induciendo la sobreexpresión de la integrina β5, un evento que contribuye a su potencial tumorigénico e invasivo[152]. Estos autores demuestran que la integrina β5 induce la formación de fibras de estrés activando la vía FAK-paxilin, facilitando, de esta manera la adhesión celular a la matriz extracelular en respuesta a TGF- β.

Adicionalmente, la integrina β5 está implicada en procesos, como la adhesión, migración y diseminación celular,[167-170] que requieren de la co-estimulación por factores de crecimiento. En este sentido, exploraremos la expresión de factores de crecimiento como IGF-1 o EGF en nuestros tumores para evaluar la consistencia de nuestra propuesta. Así, el factor de crecimiento de insulina (IGF-1), secretado por las células tumorales, coopera con la integrina β5 para promover metástasis, ya que sin una estimulación de citoquinas las células que expresan esta integrina son incapaces de migrar[167,169]. Por otra parte, la interacción directa de la proteína PAK4 (p21-activated kinase 4) con la integrina β5 promueve la migración celular y consecuentemente la diseminación metastásica, sin afectar el crecimiento del tumor primario. Además, la actividad

proinvasiva de la integrina β5 puede estar asociada por EGF, ya que este factor es capaz de activar a la integrina β5 integrina a través de la activación de Scr, lo que conduce a un aumento de la metastagénesis[170].

Por otra parte, la asociación de niveles elevados de Serpina 1 (inhibidor del sistema activador del plasminógeno uPA/uPAR), de integrina β5 y la activación de AKT en los tumores K12V y entre la infra-expresión de Serpina 1, la sobre-expresión de integrina β1 y la infra-activación de AKT en tumores K13D, es consistente con distintos tipos de migración observados en CCR dependiendo de la activación o inactivación del sistema uPA/uPAR[171] y de la vía de AKT. De este modo en células de CCR el sistema uPA/uPAR controla la degradación de integrina β5. La activación del sistema uPA/uPAR por sobre-expresión de uPA induce la downregulación de integrina β5 y la migración celular sobre colágeno activando la integrina α2β1 de modo independiente a la vía de AKT. En cambio, cuando este sistema uPA/PAR está inhibido (p.e. por downregulación de uPA, equivalente a sobre-expresión de Serpina 1) la integrina β5 (y el receptor de vitronectina αVβ5) se sobre-expresa al tiempo que se reduce la expresión de β1 y se promueve la diferenciación hacia miofibroblastos que tienen una capacidad migratoria incrementada y dependiente de la activación de la vía de AKT.

Nuestros resultados apoyan, además, que los tumores derivados de K12V y K13D difieran no sólo en su mecanismo de migración celular, sino también en su capacidad angiogénica, un aspecto que contribuye, a su vez, a explicar el incremento de diseminación metastásica observado en K12V. En este sentido, K12V podría inducir un mayor nivel de angiogénesis ya que expresa la integrina β5 conjuntamente con VEGF-A, y es conocido que la integrina β5 esta implicada en la angiogénesis inducida por VEGF-A. De

acuerdo con este argumento, VEGF-A promueve la adhesión y la migración celular de modo dependiente de la activación de la integrina αVβ5 y de la vía de Akt[172], moléculas que se encuentran sobre-expresadas o sobre-activadas en el grupo K12V. Adicionalmente, estudios *in vitro* e *in vivo* demuestran que VEFG activa la kinasa Src, que a su vez induce la fosforilación de la tirosina 861 (Y861) en la proteína FAK, facilitando la adhesión mediada por integrina β5[173 174]. Esta inducción de angiogénesis, a través de VEGF e integrina β5, promueve la permeabilidad vascular y, como consecuencia, la diseminación metastásica[175,176]. Los trabajos descritos previamente son consistentes con la mayor capacidad metastásica que hemos observado en el grupo K12V. Además, el análisis histológico ha demostrado que en el grupo K12V el área de los focos linfáticos microscópicos y de las metástasis linfáticas visibles era significativamente mayor que en el grupo K13D. La sobre-expresión de VEGFA observada en K12V, apoya por tanto que el aumento de diseminación metastásica a ganglios linfáticos ocurra a través del aumento de la angiogénesis inducido por la expresión de VEGF y de integrina β5.

Para VEGFA, se ha descrito también su capacidad de estimular la proliferación de las células endoteliales y de actuar como un factor antiapoptótico[177] . Generalmente, los niveles de expresión de VEGF están relacionados con el aumento de la densidad microvascular, la disminución del índice apoptótico, y con el incremento de la incidencia de metástasis, el decremento de la supervivencia y mal pronóstico[178]. En cáncer colorrectal, la regulación de la expresión de VEGF está asociada con diferentes vías de señalización, como la vía de Wnt y las vías distales a KRAS, más concretamente con la activación de ERK y la activación de AKT (por fosforilación) a través de PI3K. Nuestros resultados son consistentes con la

activación de esta última vía y la sobreexpresión de VEGFA, ya que hemos observado una mayor activación de AKT-P en el grupo de K12V.

Los tumores K13D podrían presentar, en cambio, migración colectiva. Estos tumores sobre-expresan la integrina β1 y tienen infra-activada la vía de AKT. De acuerdo con esta propuesta, la migración colectiva depende de la función de integrina β1[147], un evento independiente de la activación de la vía de Akt. En este sentido, en cáncer de próstata la migración dependiente de integrina β1 se asocia con inactivación de la vía de AKT[141] [142].

El patrón de expresión molecular observado en los tumores K13D, no sólo está de acuerdo con el uso de un tipo específico de migración, sino también con mecanismos de diseminación metastásica diferenciales. Así, la diseminación observada en el grupo K13D presentaba mayor eficiencia de metástasis pulmonares, a pesar de ser menos eficiente que K12V en cuanto a eficiencia de metástasis linfáticas. El aumento de las metástasis pulmonares en K13D se asocia con la sobreexpresión de ANGPT2 e integrina β1 en tumor primario, a la que se añade la sobre-expresión de VEGFA exclusivamente en metástasis pulmonares (no en metástasis linfáticas, ni en tumor primario). Estos hallazgos son consistentes con publicaciones previas. En este sentido, la angiopoyetina 2 (ANGPT2) es un miembro de la familia Ang, implicado en el reclutamiento de los vasos y la supervivencia de las células del tumor primario y de las metástasis. La ANGPT2 juega un papel importante en procesos como la inflamación, la extravasación vascular y la angiogénesis durante el crecimiento y desarrollo del tumor. Esta proteína tiene un efecto antagonista sobre el receptor Tie2, que es activado por angiopoyetina 1, siendo responsable de la estabilización y maduración de los vasos sanguíneos.

Por otro lado, se ha demostrado que la ANGPT2 modula la angiogénesis conjuntamente con VEGFA. Su sobreexpresión por parte de los nuevos vasos sanguíneos tumorales lleva a la desestabilización de los vasos y a una relativa hipoxia que conduce a la liberación de VEGF y por consiguiente a la angiogénesis. En cáncer de mama se ha demostrado que la ANGTP2 actúa en los primeros pasos de la diseminación metastásica, promoviendo la retención de las células tumorales en pulmón y la supervivencia celular; es decir, estimulando las metástasis pulmonares en cáncer de mama, un efecto que requiere la activación de la vía integrina α5β1-ILK[179]. Por otra parte, el crecimiento de los microfocos tumorales está asociado con la expresión simultánea de VEGF-A, de su receptor VEGFR-2 y de Angpt2[180] .

La única proteína cuya regulación no está de acuerdo con los tipos de migración propuestos para los tumores que expresaban K12V o K13D en nuestro modelo era la vimentina. Nosotros proponemos que K12V podría presentar un tipo de migración mesenquimal (asociada a EMT), mientras que K13D podría utilizar la migración colectiva. No obstante, hemos observado infra-expresión de vimentina en K12V y sobre-expresión de esta proteína en K13D. Estos hallazgos podrían ser inconsistentes con la utilización de vimentina como un marcador de EMT [181]. Sin embargo, esta aparente contradicción, podría no ser tal si se considera que la migración colectiva se asocia con expresión de vimentina[182], y que también se ha descrito que la expresión de vimentina puede no asociarse con migración mesenquimal[183].

Adicionalmente, proponemos que el aumento de diseminación metastásica observado en el grupo K12V, no estaría únicamente asociado con una

mayor capacidad de invasión y vascularización por parte del tumor primario con respecto al grupo K13D, sino que también podría estar asociado con un incremento de la capacidad de las células del tumor primario de intravasar a los vasos linfáticos y sanguíneos. La existencia de émbolos tumorales que expresan CXCR4 en el grupo K12V, no observada en el grupo K13D, apoyarían este argumento. De acuerdo con este hallazgo, se ha descrito un nivel elevado de expresión de CXCR4 en células tumorales circulantes[184]. Que sepamos, esta es la primera vez que se asocia el incremento de la capacidad metastásica con el aumento de la capacidad de intravasación en un modelo animal de cáncer colorrectal.

En relación con este tema, cabe señalar la importancia creciente que actualmente está teniendo la diseminación metastásica mediada por émbolos tumorales, a pesar de haberse descrito su existencia hace varias décadas. Tradicionalmente, la diseminación metastásica se ha asociado con un aumento de la capacidad del tumor de invadir los tejidos circundantes a la vez que a la capacidad de generar émbolos a partir del tumor primario con capacidad de intravasar a vasos sanguíneos y linfáticos peritumorales. Estos émbolos son transportados a través del torrente sanguíneo hasta los órganos diana, en los que acabarán colonizando su parénquima[185]. Recientemente, se ha descrito la ventaja que supone la formación de émbolos tumorales, en comparación con las células circulantes aisladas una vez alcanzan el torrente sanguíneo, en cuanto a su capacidad de generar metástasis dado su aumentada resistencia a la apoptosis.[186 187]

Nuestros hallazgos son, además, consistentes con el aumento de la angiogénesis en tumores que expresan el oncogén K12V, que podría estar mediado por la sobre-expresión de CXCR4 y VEGF, y la activación de

AKT. Es conocido que la hipoxia se asocia con la secreción del factor HIF1 que es un potente inductor del VEGF[188,189]. No obstante, la sobre-expresión de VEGF en líneas celulares en condiciones normóxicas sugiere la existencia de factores adicionales que regulan VEGF, [190] entre los que se incluye la activación de la vía de AKT. De hecho, recientemente se ha demostrado que la expresión de VEGF requiere la activación conjunta de las vías HER-2/neu y PI3K/Akt[191]. También se ha descrito la intravasación de células tumorales que expresan CXCR4 a través de su adhesión a células endoteliales que secretan SDF-1 α en condiciones de hipoxia, un proceso que se sigue de migración transendotelial e intravasación en vasos sanguíneos[192].

En relación con este tema, el grupo de Liang ha demostrado, en un modelo *in vivo* de cáncer de mama, que la activación de CXCR4 aumenta la fosforilación del AKT y la expresión de VEGF[193]. La unión de este receptor a su ligando, CXCL12 (ó SDF1α) aumenta la fosforilación de AKT, lo que muestra una relación directa entre la señalización por CXCR4 y AKT. También se ha observado que CXCL12 induce la secreción de VEGF *in vitro* en líneas celulares de cáncer de próstata (PC3 y 22Rv1)[194] y en células hematopoyéticas[195]. Estos mismos autores han descrito que la inhibición de la interacción entre CXCR4 y su ligando disminuye significativamente la expresión del VEGF y la angiogénesis en células de cáncer de mama. Por otra parte, la expresión de VEGF, que se induce por la interacción entre CXCR4 y CXCL12, puede reducirse de manera significativa utilizando un antagonista de CXCR4 o un inhibidor de la vía PI3K/AKT. Estos resultados indican que la activación de CXCR4 induce la expresión de VEGF a través de la vía de AKT. Liang et al, demostraron también que los niveles de expresión de CXCR4 correlacionan con la

expresión de VEGF en tumor primario de pacientes con cáncer de mama[193].

El incremento de expresión de CXCR4 que hemos observado en émbolos tumorales podría explicar particularmente el aumento de la diseminación metastásica linfática detectada en el grupo K12V. De esta manera, en CCR se ha descrito que la expresión de CXCR4 en tumor primario se asocia con riesgo de recurrencia y con menor supervivencia[196]. Además, la coexpresión de CXCR4 y VEGF-A, también en CCR, se asocia con el desarrollo de metástasis linfáticas[197] y con recidiva temprana como consecuencia del desarrollo de metástasis a distancia[198]. Por otra parte, en cáncer de mama, la expresión de CXCR4 potencia la intravasación y el desarrollo de metástasis linfáticas[199]. De modo análogo, en células de CCR humano, se ha descrito que la expresión de CXCR4 favorece su extravasación[200] y el crecimiento de las micrometástasis, una vez colonizado el órgano diana[25].

En resumen, los oncogenes K12V y K13D presentan diferente eficiencia metastásica en distintos tejidos. Estas diferencias en su patrón de metástasis, se asociada con un perfil de expresión y activación de proteínas distinto, ya sea en tumor primario, metástasis o émbolos tumorales. Estos hallazgos sugieren que la naturaleza de la mutación puntual que implica al oncogén K-RAS puede contribuir a mantener fenotipos distintos en la célula tumoral que redunda en un patrón y capacidad distinta de diseminación a los órganos diana. En la Figura 102 se resumen las diferencias en cuanto a colonización y crecimiento de las metástasis en gánglios linfáticos y en pulmón entre los oncogenes K12V y K13D, así como los mecanismos moleculares asociados a estos procesos.

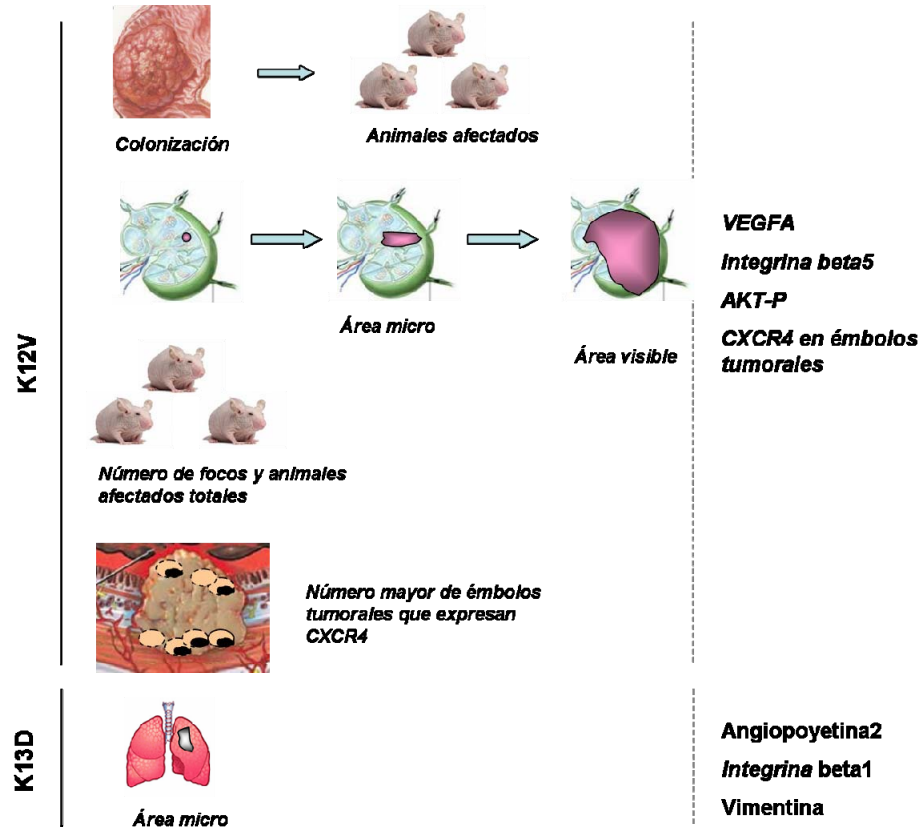


Figura 102. Esquema global de las diferencias en cuanto a diseminación metastásica y cambios moleculares entre los grupos K12V y K13D.

Nuestros hallazgos son consistentes con la existencia de diferencias en capacidad transformante descrita para los distintos mutantes de K-RAS in vitro[80], con una distinta capacidad tumorigénica observada in vivo[80] y con una diferente respuesta a tratamiento antitumoral (p.e. al inhibidor de EGFR cetuximab), tanto *in vitro* como en pacientes con CCR[71], entre los distintos mutantes de K-RAS.

Finalmente, este estudio puede tener aplicaciones pronósticas, ya que contribuye a explicar la mayor agresividad de los mutantes de K-RAS Val12 observada en cáncer colorrectal humano, e introduce las vías de señalización cuya activación podría estar asociada con una capacidad metastásica incrementada. Es evidente que la naturaleza de las mutaciones en los genes RAS es crítica para el comportamiento biológico de los tumores. Consecuentemente, el conocimiento del estado de K-RAS en carcinomas colorrectales humanos, y concretamente del aminoácido alterado, puede ayudar a identificar subgrupos de pacientes con distinta agresividad tumoral. Además, este conocimiento puede impulsar la evaluación inmunohistoquímica de la oncoproteína K-RAS en estudios pronósticos, dirigida a distinguir la proteína mutada de la silvestre. Esta distinción puede ser importante, especialmente si se considera que hasta la fecha ambas formas se miden conjuntamente, ya que la mayoría de los anticuerpos disponibles no distinguen con suficiente eficiencia a las distintas oncoproteínas K-ras mutadas entre sí, o a estas de la proteína silvestre.

VI. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El factor de estimulación de colonias de granulocitos, GCSF, tiene efecto antitumoral y antimetastásico sobre la línea celular de cáncer colorrectal (CCR) humano HCT-116. Su administración en un modelo ortotópico reduce significativamente el tamaño y la invasividad del tumor local en el ciego, a la vez que reduce la tasa, el número y/o el área de las metástasis linfáticas, hepáticas y pulmonares, sin alterar la carcinomatosis peritoneal.

2. El pase subcutáneo previo a la inyección ortotópica de la línea de CCR HCT-116 aumenta significativamente la diseminación metastásica, potenciando el desarrollo de las macrometástasis y metástasis linfáticas visibles, de las micrometástasis, macrometástasis y metástasis visibles en el hígado y de las micrometástasis pulmonares y sin alterar el crecimiento del tumor local en el ciego ni la tasa de carcinomatosis.

3. Se ha generado un modelo animal que aumenta la eficiencia metastásica en todas las localizaciones clínicamente relevantes en CCR, mediante el condicionamiento subcutáneo previo a la inyección ortotópica. Este modelo genera macrometástasis hepáticas visibles que afectan el 95% del parénquima lo que determina su utilidad para el estudio molecular de los mecanismos de metástasis que habitualmente limitan la supervivencia del paciente.

4. El incremento de la tasa de metástasis obtenido mediante condicionamiento subcutáneo previo a la inyección ortotópica en la línea celular de CCR HCT116 se asocia con activación de la vía de AKT, sobre-

expresión de VEGF-A e infraexpresión de la integrina β1, tanto en tumor primario como en focos metastásicos.

5. El pase subcutáneo previo a la inyección ortotópica de recombinantes de la línea de CCR humano SW48 que expresan KrasVal12 o KrasAsp13 ha permitido comparar su capacidad tumorigénica y metastásica, determinando que la naturaleza de la mutación puntual en el oncogén Kras afecta su capacidad metastásica. Mientras, el oncogén K12V aumenta significativamente la tasa de injerto tumoral y la tasa de metástasis linfáticas, el oncogén K13D aumenta la tasa de metástasis pulmonares.

6. La diferente eficiencia metastásica de los recombinantes K12V y K13D se asocia con un patrón de expresión molecular distinto. K12V presenta mayor activación de la vía de AKT y mayor expresión de integrina β5, serpina1 y VEGF-A en tumor primario; en cambio, K13D muestra mayor expresión de integrina β1, angiopoietina-2 y vimentina. La mayoría de los cambios moleculares asociados a la expresión de K12V o K13D están presentes en los tumores subcutáneos previos y se mantienen en los focos metastásicos generados tras la inyección ortotópica.

7. Los tumores primarios derivados de los recombinantes que expresan K12V presentan mayor expresión del receptor de citocinas CXCR4 en los émbolos tumorales, localizados en los vasos de la periferia tumoral, que los derivados de K13D, lo que se asocia con mayor eficiencia metastásica, un hallazgo acorde con una mayor capacidad de intravasación.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Lao VV, Grady WM. Epigenetics and colorectal cancer. Nat Rev Gastroenterol Hepatol;8:686-700

2. Nystrom M, Mutanen M. Diet and epigenetics in colon cancer. World J Gastroenterol. 2009;15:257-263

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

4. Cohen A, Minsky B, Schilsky R. Cancer of the colon In: Devita VT HS, Rosenberg SA (eds), ed. Cancer: principles and practice of oncology (ed 5th edn). Lippincott-Raven, Philadelphia2001:1144–1197

5. Cáncer de Cólon: Diario El Mundo; 2009

6. Kerr D. Clinical development of gene therapy for colorectal cancer. Nat Rev Cancer. 2003;3:615-622

7. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. Nat Rev Cancer. 2002;2:563-572

8. Basik M. Metastasis of Colorectal Cancer. Cancer Metastasis - Biology and Treatment. In: Huot NBJ ed. Biology and Treatmen
Vol. 14: Springer; 2010:35

9. Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. Nat Med. 1995;1:149-153

10. Folkman J. The role of angiogenesis in tumor growth. Semin Cancer Biol. 1992;3:65-71

11. Zetter BR. Angiogenesis and tumor metastasis. Annu Rev Med. 1998;49:407-424

12. Bogenrieder T, Herlyn M. Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis. Oncogene. 2003;22:6524-6536

13. Larcher F, Murillas R, Bolontrade M, Conti CJ, Jorcano JL. VEGF/VPF overexpression in skin of transgenic mice induces angiogenesis, vascular hyperpermeability and accelerated tumor development. Oncogene. 1998;17:303-311

14. Stacker SA, Baldwin ME, Achen MG. The role of tumor lymphangiogenesis in metastatic spread. FASEB J. 2002;16:922-934

15. Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. Nat Rev Cancer. 2009;9:239-252

16. Nguyen DX, Massague J. Genetic determinants of cancer metastasis. Nat Rev Genet. 2007;8:341-352

17. Miles FL, Pruitt FL, van Golen KL, Cooper CR. Stepping out of the flow: capillary extravasation in cancer metastasis. Clin Exp Metastasis. 2008;25:305-324

18. Al-Mehdi AB, Tozawa K, Fisher AB, Shientag L, Lee A, Muschel RJ. Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis. Nat Med. 2000;6:100-102

19. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. Cell. 2002;110:673-687

20. Kang Y, Siegel PM, Shu W, Drobnjak M, Kakonen SM, Cordon-Cardo C, Guise TA, Massague J. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. Cancer Cell. 2003;3:537-549

21. Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, Bos PD, Shu W, Giri DD, Viale A, Olshen AB, Gerald WL, Massague J. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. Nature. 2005;436:518-524

22. Kucia M, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Bone marrow as a source of circulating CXCR4+ tissue-committed stem cells. Biol Cell. 2005;97:133-146

23. Valenzuela-Fernandez A, Planchenault T, Baleux F, Staropoli I, Le-Barillec K, Leduc D, Delaunay T, Lazarini F, Virelizier JL, Chignard M, Pidard D, Arenzana-Seisdedos F. Leukocyte elastase negatively regulates Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCR4 binding and functions by amino-terminal processing of SDF-1 and CXCR4. J Biol Chem. 2002;277:15677-15689

24. Kaplan RN, Rafii S, Lyden D. Preparing the "soil": the premetastatic niche. Cancer Res. 2006;66:11089-11093

25. Zeelenberg IS, Ruuls-Van Stalle L, Roos E. The chemokine receptor CXCR4 is required for outgrowth of colon carcinoma micrometastases. Cancer Res. 2003;63:3833-3839

26. Castellone MD, Guarino V, De Falco V, Carlomagno F, Basolo F, Faviana P, Kruhoffer M, Orntoft T, Russell JP, Rothstein JL, Fusco A, Santoro M, Melillo RM. Functional expression of the CXCR4 chemokine receptor is induced by RET/PTC oncogenes and is a common event in human papillary thyroid carcinomas. Oncogene. 2004;23:5958-5967

27. Liang Z, Wu H, Reddy S, Zhu A, Wang S, Blevins D, Yoon Y, Zhang Y, Shim H. Blockade of invasion and metastasis of breast cancer cells via targeting CXCR4 with an artificial microRNA. Biochem Biophys Res Commun. 2007;363:542-546

28. Kim J, Mori T, Chen SL, Amersi FF, Martinez SR, Kuo C, Turner RR, Ye X, Bilchik AJ, Morton DL, Hoon DS. Chemokine receptor CXCR4 expression in patients with melanoma and colorectal cancer liver metastases and the association with disease outcome. Ann Surg. 2006;244:113-120

29. Heinrich EL, Lee W, Lu J, Lowy AM, Kim J. Chemokine CXCL12 activates dual CXCR4 and CXCR7-mediated signaling pathways in pancreatic cancer cells. J Transl Med;10:68

30. Mohle R, Kanz L. Hematopoietic growth factors for hematopoietic stem cell mobilization and expansion. Semin Hematol. 2007;44:193-202

31. Nakamae-Akahori M, Kato T, Masuda S, Sakamoto E, Kutsuna H, Hato F, Nishizawa Y, Hino M, Kitagawa S. Enhanced neutrophil motility by granulocyte colony-stimulating factor: the role of extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. Immunology. 2006;119:393-403

32. Novak U, Ward AC, Hertzog PJ, Hamilton JA, Paradiso L. Aberrant activation of JAK/STAT pathway components in response to G-CSF,

interferon-alpha/beta and interferon-gamma in NFS-60 cells. Growth Factors. 1996;13:251-260

33. Bussolino F, Mantovani A. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on endothelial cells. Blood. 1991;78:2475-2476

34. Demetri GD, Griffin JD. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. Blood. 1991;78:2791-2808

35. Avalos BR, Gasson JC, Hedvat C, Quan SG, Baldwin GC, Weisbart RH, Williams RE, Golde DW, DiPersio JF. Human granulocyte colony-stimulating factor: biologic activities and receptor characterization on hematopoietic cells and small cell lung cancer cell lines. Blood. 1990;75:851-857

36. Kikuchi T, Nakahara S, Abe T. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) production by astrocytoma cells and its effect on tumor growth. J Neurooncol. 1996;27:31-38

37. Ninci EB, Brandstetter T, Meinhold-Heerlein I, Bettendorf H, Sellin D, Bauknecht T. G-CSF receptor expression in ovarian cancer. Int J Gynecol Cancer. 2000;10:19-26

38. Tachibana M, Miyakawa A, Uchida A, Murai M, Eguchi K, Nakamura K, Kubo A, Hata JI. Granulocyte colony-stimulating factor receptor expression on human transitional cell carcinoma of the bladder. Br J Cancer. 1997;75:1489-1496

39. Tsuzuki H, Fujieda S, Sunaga H, Noda I, Saito H. Expression of granulocyte colony-stimulating factor receptor correlates with prognosis in oral and mesopharyngeal carcinoma. Cancer Res. 1998;58:794-800

40. Yang X, Liu F, Xu Z, Chen C, Wu X, Li G, Li J. Expression of granulocyte colony stimulating factor receptor in human colorectal cancer. Postgrad Med J. 2005;81:333-337

41. Natori T, Sata M, Washida M, Hirata Y, Nagai R, Makuuchi M. G-CSF stimulates angiogenesis and promotes tumor growth: potential

contribution of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. Biochem Biophys Res Commun. 2002;297:1058-1061

42. Peinado H, Lavotshkin S, Lyden D. The secreted factors responsible for pre-metastatic niche formation: old sayings and new thoughts. Semin Cancer Biol;21:139-146

43. Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. Science. 1999;285:1028-1032

44. Ginsberg MH, Loftus JC, D'Souza S, Plow EF. Ligand binding to integrins: common and ligand specific recognition mechanisms. Cell Differ Dev. 1990;32:203-213

45. Cheresh DA. Structural and biologic properties of integrin-mediated cell adhesion. Clin Lab Med. 1992;12:217-236

46. Bosman FT. Integrins: cell adhesives and modulators of cell function. Histochem J. 1993;25:469-477

47. Heino J. Integrin-type extracellular matrix receptors in cancer and inflammation. Ann Med. 1993;25:335-342

48. Fawcett J, Harris AL. Cell adhesion molecules and cancer. Curr Opin Oncol. 1992;4:142-148

49. Rudolph R, Cheresh D. Cell adhesion mechanisms and their potential impact on wound healing and tumor control. Clin Plast Surg. 1990;17:457-462

50. Klein CE, Steinmayer T, Kaufmann D, Weber L, Brocker EB. Identification of a melanoma progression antigen as integrin VLA-2. J Invest Dermatol. 1991;96:281-284

51. Ruoslahti E. The Walter Herbert Lecture. Control of cell motility and tumour invasion by extracellular matrix interactions. Br J Cancer. 1992;66:239-242

52. Brakebusch C, Bouvard D, Stanchi F, Sakai T, Fassler R. Integrins in invasive growth. J Clin Invest. 2002;109:999-1006

53. Pecheur I, Peyruchaud O, Serre CM, Guglielmi J, Voland C, Bourre F, Margue C, Cohen-Solal M, Buffet A, Kieffer N, Clezardin P. Integrin alpha(v)beta3 expression confers on tumor cells a greater propensity to metastasize to bone. FASEB J. 2002;16:1266-1268

54. Abdel-Ghany M, Cheng HC, Elble RC, Pauli BU. The breast cancer beta 4 integrin and endothelial human CLCA2 mediate lung metastasis. J Biol Chem. 2001;276:25438-25446

55. Varghese HJ, Davidson MT, MacDonald IC, Wilson SM, Nadkarni KV, Groom AC, Chambers AF. Activated ras regulates the proliferation/apoptosis balance and early survival of developing micrometastases. Cancer Res. 2002;62:887-891

56. Lothe RA, Peltomaki P, Meling GI, Aaltonen LA, Nystrom-Lahti M, Pylkkanen L, Heimdal K, Andersen TI, Moller P, Rognum TO, et al. Genomic instability in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables and family history. Cancer Res. 1993;53:5849-5852

57. de la Chapelle A. Microsatellite instability. N Engl J Med. 2003;349:209-210

58. Perucho M. Cancer of the microsatellite mutator phenotype. Biol Chem. 1996;377:675-684

59. Giehl K. Oncogenic Ras in tumour progression and metastasis. Biol Chem. 2005;386:193-205

60. Barbacid M. ras genes. Annu Rev Biochem. 1987;56:779-827

61. Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. Nat Rev Cancer. 2003;3:11-22

62. van Krieken JH, Jung A, Kirchner T, Carneiro F, Seruca R, Bosman FT, Quirke P, Flejou JF, Plato Hansen T, de Hertogh G, Jares P, Langner C, Hoefler G, Ligtenberg M, Tiniakos D, Tejpar S, Bevilacqua G, Ensari A. KRAS mutation testing for predicting response to anti-EGFR therapy for colorectal carcinoma: proposal for an European quality assurance program. Virchows Arch. 2008;453:417-431

63. Akagi K, Uchibori R, Yamaguchi K, Kurosawa K, Tanaka Y, Kozu T. Characterization of a novel oncogenic K-ras mutation in colon cancer. Biochem Biophys Res Commun. 2007;352:728-732

64. Kalady MF, Dejulius KL, Sanchez JA, Jarrar A, Liu X, Manilich E, Skacel M, Church JM. BRAF Mutations in Colorectal Cancer Are Associated With Distinct Clinical Characteristics and Worse Prognosis. Dis Colon Rectum;55:128-133

65. El-Osta H, Falchook G, Tsimberidou A, Hong D, Naing A, Kim K, Wen S, Janku F, Kurzrock R. BRAF mutations in advanced cancers: clinical characteristics and outcomes. PLoS One;6:e25806

66. Oikonomou E, Pintzas A. Cancer genetics of sporadic colorectal cancer: BRAF and PI3KCA mutations, their impact on signaling and novel targeted therapies. Anticancer Res. 2006;26:1077-1084

67. Perentesis JP, Bhatia S, Boyle E, Shao Y, Shu XO, Steinbuch M, Sather HN, Gaynon P, Kiffmeyer W, Envall-Fox J, Robison LL. RAS oncogene mutations and outcome of therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. Leukemia. 2004;18:685-692

68. Benvenuti S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Zanon C, Moroni M, Veronese S, Siena S, Bardelli A. Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. Cancer Res. 2007;67:2643-2648

69. Esteller M, Gonzalez S, Risques RA, Marcuello E, Mangues R, Germa JR, Herman JG, Capella G, Peinado MA. K-ras and p16 aberrations confer poor prognosis in human colorectal cancer. J Clin Oncol. 2001;19:299-304

70. Conlin A, Smith G, Carey FA, Wolf CR, Steele RJ. The prognostic significance of K-ras, p53, and APC mutations in colorectal carcinoma. Gut. 2005;54:1283-1286

71. De Roock W, Jonker DJ, Di Nicolantonio F, Sartore-Bianchi A, Tu D, Siena S, Lamba S, Arena S, Frattini M, Piessevaux H, Van Cutsem E, O'Callaghan CJ, Khambata-Ford S, Zalcberg JR, Simes J, Karapetis CS, Bardelli A, Tejpar S. Association of KRAS p.G13D mutation with outcome in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. JAMA;304:1812-1820

72. Pritchard CC, Grady WM. Colorectal cancer molecular biology moves into clinical practice. Gut;60:116-129

73. Muhsin M, Graham J, Kirkpatrick P. Bevacizumab. Nat Rev Drug Discov. 2004;3:995-996

74. Moerkerk P, Arends JW, van Driel M, de Bruine A, de Goeij A, ten Kate J. Type and number of Ki-ras point mutations relate to stage of human colorectal cancer. Cancer Res. 1994;54:3376-3378

75. Al-Mulla F, Going JJ, Sowden ET, Winter A, Pickford IR, Birnie GD. Heterogeneity of mutant versus wild-type Ki-ras in primary and metastatic colorectal carcinomas, and association of codon-12 valine with early mortality. J Pathol. 1998;185:130-138

76. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates JR, Clarke PA. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study. J Natl Cancer Inst. 1998;90:675-684

77. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates J, Dix BR, Iacopetta BJ, Young J, Walsh T, Ward R, Hawkins N, Beranek M, Jandik P, Benamouzig R, Jullian E, Laurent-Puig P, Olschwang S, Muller O, Hoffmann I, Rabes HM, Zietz C, Troungos C, Valavanis C, Yuen ST, Ho JW, Croke CT, O'Donoghue DP, Giaretti W, Rapallo A, Russo A, Bazan V, Tanaka M, Omura K, Azuma T, Ohkusa T, Fujimori T, Ono Y, Pauly M, Faber C, Glaesener R, de Goeij AF, Arends JW, Andersen SN, Lovig T, Breivik J, Gaudernack G, Clausen OP, De Angelis PD, Meling GI, Rognum TO, Smith R, Goh HS, Font A, Rosell R, Sun XF, Zhang H, Benhattar J, Losi L, Lee JQ, Wang ST, Clarke PA, Bell S, Quirke P, Bubb VJ, Piris J, Cruickshank NR,

Morton D, Fox JC, Al-Mulla F, Lees N, Hall CN, Snary D, Wilkinson K, Dillon D, Costa J, Pricolo VE, Finkelstein SD, Thebo JS, Senagore AJ, Halter SA, Wadler S, Malik S, Krtolica K, Urosevic N. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. Br J Cancer. 2001;85:692-696

78. Span M, Moerkerk PT, De Goeij AF, Arends JW. A detailed analysis of K-ras point mutations in relation to tumor progression and survival in colorectal cancer patients. Int J Cancer. 1996;69:241-245

79. Guerrero S, Casanova I, Farre L, Mazo A, Capella G, Mangues R. K-ras codon 12 mutation induces higher level of resistance to apoptosis and predisposition to anchorage-independent growth than codon 13 mutation or proto-oncogene overexpression. Cancer Res. 2000;60:6750-6756

80. Guerrero S, Figueras A, Casanova I, Farre L, Lloveras B, Capella G, Trias M, Mangues R. Codon 12 and codon 13 mutations at the K-ras gene induce different soft tissue sarcoma types in nude mice. FASEB J. 2002;16:1642-1644

81. Cespedes MV, Casanova I, Parreno M, Mangues R. Mouse models in oncogenesis and cancer therapy. Clin Transl Oncol. 2006;8:318-329

82. Kranenburg O, Gebbink MF, Voest EE. Stimulation of angiogenesis by Ras proteins. Biochim Biophys Acta. 2004;1654:23-37

83. Watnick RS, Cheng YN, Rangarajan A, Ince TA, Weinberg RA. Ras modulates Myc activity to repress thrombospondin-1 expression and increase tumor angiogenesis. Cancer Cell. 2003;3:219-231

84. Webb CP, Van Aelst L, Wigler MH, Woude GF. Signaling pathways in Ras-mediated tumorigenicity and metastasis. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95:8773-8778

85. Janssen KP, el-Marjou F, Pinto D, Sastre X, Rouillard D, Fouquet C, Soussi T, Louvard D, Robine S. Targeted expression of oncogenic K-ras in intestinal epithelium causes spontaneous tumorigenesis in mice. Gastroenterology. 2002;123:492-504

86. Rangarajan A, Hong SJ, Gifford A, Weinberg RA. Species- and cell type-specific requirements for cellular transformation. Cancer Cell. 2004;6:171-183

87. Hoffman RM. Orthotopic metastatic mouse models for anticancer drug discovery and evaluation: a bridge to the clinic. Invest New Drugs. 1999;17:343-359

88. Cespedes MV, Espina C, Garcia-Cabezas MA, Trias M, Boluda A, Gomez del Pulgar MT, Sancho FJ, Nistal M, Lacal JC, Mangues R. Orthotopic microinjection of human colon cancer cells in nude mice induces tumor foci in all clinically relevant metastatic sites. Am J Pathol. 2007;170:1077-1085

89. Bresalier RS, Hujanen ES, Raper SE, Roll FJ, Itzkowitz SH, Martin GR, Kim YS. An animal model for colon cancer metastasis: establishment and characterization of murine cell lines with enhanced liver-metastasizing ability. Cancer Res. 1987;47:1398-1406

90. Giavazzi R, Campbell DE, Jessup JM, Cleary K, Fidler IJ. Metastatic behavior of tumor cells isolated from primary and metastatic human colorectal carcinomas implanted into different sites in nude mice. Cancer Res. 1986;46:1928-1933

91. Garofalo A, Chirivi RG, Scanziani E, Mayo JG, Vecchi A, Giavazzi R. Comparative study on the metastatic behavior of human tumors in nude, beige/nude/xid and severe combined immunodeficient mice. Invasion Metastasis. 1993;13:82-91

92. Goldrosen MH. Murine colon adenocarcinoma: immunobiology of metastases. Cancer. 1980;45:1223-1228

93. Bos PD, Nguyen DX, Massague J. Modeling metastasis in the mouse. Curr Opin Pharmacol;10:571-577

94. Anwar S, Frayling IM, Scott NA, Carlson GL. Systematic review of genetic influences on the prognosis of colorectal cancer. Br J Surg. 2004;91:1275-1291

95. Bazan V, Migliavacca M, Zanna I, Tubiolo C, Grassi N, Latteri MA, La Farina M, Albanese I, Dardanoni G, Salerno S, Tomasino RM, Labianca R, Gebbia N, Russo A. Specific codon 13 K-ras mutations are predictive of clinical outcome in colorectal cancer patients, whereas codon 12 K-ras mutations are associated with mucinous histotype. Ann Oncol. 2002;13:1438-1446

96. Golde WT, Gollobin P, Rodriguez LL. A rapid, simple, and humane method for submandibular bleeding of mice using a lancet. Lab Anim (NY). 2005;34:39-43

97. Di Nicolantonio F, Arena S, Gallicchio M, Zecchin D, Martini M, Flonta SE, Stella GM, Lamba S, Cancelliere C, Russo M, Geuna M, Appendino G, Fantozzi R, Medico E, Bardelli A. Replacement of normal with mutant alleles in the genome of normal human cells unveils mutation-specific drug responses. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105:20864-20869

98. Arena S, Isella C, Martini M, de Marco A, Medico E, Bardelli A. Knock-in of oncogenic Kras does not transform mouse somatic cells but triggers a transcriptional response that classifies human cancers. Cancer Res. 2007;67:8468-8476

99. Andreassen K, Mortensen B, Winberg JO, Huseby NE. Increased resistance towards oxidative stress accompanies enhancement of metastatic potential obtained by repeated in vivo passage of colon carcinoma cells in syngeneic rats. Clin Exp Metastasis. 2002;19:623-629

100. Bruns CJ, Harbison MT, Kuniyasu H, Eue I, Fidler IJ. In vivo selection and characterization of metastatic variants from human pancreatic adenocarcinoma by using orthotopic implantation in nude mice. Neoplasia. 1999;1:50-62

101. Bosch R, Moreno MJ, Dieguez-Gonzalez R, Cespedes MV, Gallardo A, Nomdedeu J, Pavon MA, Espinosa I, Mangues MA, Sierra J, Casanova I, Mangues R. Subcutaneous passage increases cell aggressiveness

in a xenograft model of diffuse large B cell lymphoma. Clin Exp Metastasis;29:339-347

102. Cespedes MV, Sancho FJ, Guerrero S, Parreno M, Casanova I, Pavon MA, Marcuello E, Trias M, Cascante M, Capella G, Mangues R. K-ras Asp12 mutant neither interacts with Raf, nor signals through Erk and is less tumorigenic than K-ras Val12. Carcinogenesis. 2006;27:2190-2200

103. Tsunoda A, Iijima T, Tsunoda Y, Nakao K, Miyaki M, Kusano M. Association of K-ras mutations with liver metastases from colorectal carcinoma. Anticancer Res. 2004;24:2471-2476

104. Bardelli A, Siena S. Molecular mechanisms of resistance to cetuximab and panitumumab in colorectal cancer. J Clin Oncol;28:1254-1261

105. Shim WS, Ho IA, Wong PE. Angiopoietin: a TIE(d) balance in tumor angiogenesis. Mol Cancer Res. 2007;5:655-665

106. Lewis VBaT ed Outliers in Statistical Data In: Sons JW ed (ed 2d ed). New York; 1985

107. Li J, Karaplis AC, Huang DC, Siegel PM, Camirand A, Yang XF, Muller WJ, Kremer R. PTHrP drives breast tumor initiation, progression, and metastasis in mice and is a potential therapy target. J Clin Invest;121:4655-4669

108. Kowanetz M, Wu X, Lee J, Tan M, Hagenbeek T, Qu X, Yu L, Ross J, Korsisaari N, Cao T, Bou-Reslan H, Kallop D, Weimer R, Ludlam MJ, Kaminker JS, Modrusan Z, van Bruggen N, Peale FV, Carano R, Meng YG, Ferrara N. Granulocyte-colony stimulating factor promotes lung metastasis through mobilization of Ly6G+Ly6C+ granulocytes. Proc Natl Acad Sci U S A;107:21248-21255

109. Yan HH, Pickup M, Pang Y, Gorska AE, Li Z, Chytil A, Geng Y, Gray JW, Moses HL, Yang L. Gr-1+CD11b+ myeloid cells tip the balance of immune protection to tumor promotion in the premetastatic lung. Cancer Res;70:6139-6149

110. Pekarek LA, Starr BA, Toledano AY, Schreiber H. Inhibition of tumor growth by elimination of granulocytes. J Exp Med. 1995;181:435-440

111. Calatayud S, Warner TD, Breese EJ, Mitchell JA. Relationship between endogenous colony stimulating factors and apoptosis in human colon cancer cells: role of cyclo-oxygenase inhibitors. Br J Pharmacol. 2001;134:1237-1244

112. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. Nature. 2002;420:860-867

113. Hamlin IM. Possible host resistance in carcinoma of the breast: a histological study. Br J Cancer. 1968;22:383-401

114. Bassler R, Dittmann AM, Dittrich M. Mononuclear stromal reactions in mammary carcinoma, with special reference to medullary carcinomas with a lymphoid infiltrate. Analysis of 108 cases. Virchows Arch A Pathol Anat Histol. 1981;393:75-91

115. Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L, Worthen GS, Albelda SM. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. Cancer Cell. 2009;16:183-194

116. Granot Z, Henke E, Comen EA, King TA, Norton L, Benezra R. Tumor entrained neutrophils inhibit seeding in the premetastatic lung. Cancer Cell;20:300-314

117. Faderl S, Harris D, Van Q, Kantarjian HM, Talpaz M, Estrov Z. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) induces antiapoptotic and proapoptotic signals in acute myeloid leukemia. Blood. 2003;102:630-637

118. Kuo TH, Kubota T, Watanabe M, Furukawa T, Teramoto T, Ishibiki K, Kitajima M, Moossa AR, Penman S, Hoffman RM. Liver colonization competence governs colon cancer metastasis. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92:12085-12089

119. De Vita V HS, Rosenberg S Cancer: Principles and Practice of Oncology. In: Lippincott J ed (ed 7 ed.). Philadelphia; 2005

120. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. Nat Rev Cancer. 2002;2:489-501

121. Franke TF, Yang SI, Chan TO, Datta K, Kazlauskas A, Morrison DK, Kaplan DR, Tsichlis PN. The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. Cell. 1995;81:727-736

122. Franke TF, Hornik CP, Segev L, Shostak GA, Sugimoto C. PI3K/Akt and apoptosis: size matters. Oncogene. 2003;22:8983-8998

123. Sheng S, Qiao M, Pardee AB. Metastasis and AKT activation. J Cell Physiol. 2009;218:451-454

124. Grille SJ, Bellacosa A, Upson J, Klein-Szanto AJ, van Roy F, Lee-Kwon W, Donowitz M, Tsichlis PN, Larue L. The protein kinase Akt induces epithelial mesenchymal transition and promotes enhanced motility and invasiveness of squamous cell carcinoma lines. Cancer Res. 2003;63:2172-2178

125. Dellinger MT, Brekken RA. Phosphorylation of Akt and ERK1/2 is required for VEGF-A/VEGFR2-induced proliferation and migration of lymphatic endothelium. PLoS One;6:e28947

126. Bellacosa A, de Feo D, Godwin AK, Bell DW, Cheng JQ, Altomare DA, Wan M, Dubeau L, Scambia G, Masciullo V, Ferrandina G, Benedetti Panici P, Mancuso S, Neri G, Testa JR. Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas. Int J Cancer. 1995;64:280-285

127. Graff JR, Konicek BW, McNulty AM, Wang Z, Houck K, Allen S, Paul JD, Hbaiu A, Goode RG, Sandusky GE, Vessella RL, Neubauer BL. Increased AKT activity contributes to prostate cancer progression by dramatically accelerating prostate tumor growth and diminishing p27Kip1 expression. J Biol Chem. 2000;275:24500-24505

128. Altomare DA, Tanno S, De Rienzo A, Klein-Szanto AJ, Skele KL, Hoffman JP, Testa JR. Frequent activation of AKT2 kinase in human pancreatic carcinomas. J Cell Biochem. 2002;87:470-476

129. Roy HK, Olusola BF, Clemens DL, Karolski WJ, Ratashak A, Lynch HT, Smyrk TC. AKT proto-oncogene overexpression is an early event during sporadic colon carcinogenesis. Carcinogenesis. 2002;23:201-205

130. Zhou BP, Hu MC, Miller SA, Yu Z, Xia W, Lin SY, Hung MC. HER-2/neu blocks tumor necrosis factor-induced apoptosis via the Akt/NF-kappaB pathway. J Biol Chem. 2000;275:8027-8031

131. Fukumoto S, Hsieh CM, Maemura K, Layne MD, Yet SF, Lee KH, Matsui T, Rosenzweig A, Taylor WG, Rubin JS, Perrella MA, Lee ME. Akt participation in the Wnt signaling pathway through Dishevelled. J Biol Chem. 2001;276:17479-17483

132. Shao J, Sheng H, Inoue H, Morrow JD, DuBois RN. Regulation of constitutive cyclooxygenase-2 expression in colon carcinoma cells. J Biol Chem. 2000;275:33951-33956

133. Sheng H, Shao J, Washington MK, DuBois RN. Prostaglandin E2 increases growth and motility of colorectal carcinoma cells. J Biol Chem. 2001;276:18075-18081

134. El-Deiry WS. Akt takes centre stage in cell-cycle deregulation. Nat Cell Biol. 2001;3:E71-73

135. Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lefer DJ, Sessa WC, Walsh K. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. Nat Med. 2000;6:1004-1010

136. Rmali KA, Puntis MC, Jiang WG. Tumour-associated angiogenesis in human colorectal cancer. Colorectal Dis. 2007;9:3-14

137. Tamura M, Oda M, Tsunezuka Y, Matsumoto I, Kawakami K, Watanabe G. Vascular endothelial growth factor expression in metastatic

pulmonary tumor from colorectal carcinoma: utility as a prognostic factor. J Thorac Cardiovasc Surg. 2004;128:517-522

138. George ML, Tutton MG, Janssen F, Arnaout A, Abulafi AM, Eccles SA, Swift RI. VEGF-A, VEGF-C, and VEGF-D in colorectal cancer progression. Neoplasia. 2001;3:420-427

139. Kondo Y, Arii S, Mori A, Furutani M, Chiba T, Imamura M. Enhancement of angiogenesis, tumor growth, and metastasis by transfection of vascular endothelial growth factor into LoVo human colon cancer cell line. Clin Cancer Res. 2000;6:622-630

140. Howlett AR, Bailey N, Damsky C, Petersen OW, Bissell MJ. Cellular growth and survival are mediated by beta 1 integrins in normal human breast epithelium but not in breast carcinoma. J Cell Sci. 1995;108 (Pt 5):1945-1957

141. Fornaro M, Tallini G, Bofetiado CJ, Bosari S, Languino LR. Down-regulation of beta 1C integrin, an inhibitor of cell proliferation, in prostate carcinoma. Am J Pathol. 1996;149:765-773

142. Virtakoivu R, Pellinen T, Rantala JK, Perala M, Ivaska J. Distinct roles of AKT isoforms in regulating beta1-integrin activity, migration and invasion in prostate cancer. Mol Biol Cell

143. Ingber DE. Extracellular matrix as a solid-state regulator in angiogenesis: identification of new targets for anti-cancer therapy. Semin Cancer Biol. 1992;3:57-63

144. Varner JA, Cheresh DA. Tumor angiogenesis and the role of vascular cell integrin alphavbeta3. Important Adv Oncol. 1996:69-87

145. Kawauchi T. Cell Adhesion and Its Endocytic Regulation in Cell Migration during Neural Development and Cancer Metastasis. Int J Mol Sci;13:4564-4590

146. Friedl P. Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration. Curr Opin Cell Biol. 2004;16:14-23

147. Hegerfeldt Y, Tusch M, Brocker EB, Friedl P. Collective cell movement in primary melanoma explants: plasticity of cell-cell interaction, beta1-integrin function, and migration strategies. Cancer Res. 2002;62:2125-2130

148. Nabeshima K, Inoue T, Shimao Y, Kataoka H, Koono M. Cohort migration of carcinoma cells: differentiated colorectal carcinoma cells move as coherent cell clusters or sheets. Histol Histopathol. 1999;14:1183-1197

149. Sahai E, Garcia-Medina R, Pouyssegur J, Vial E. Smurf1 regulates tumor cell plasticity and motility through degradation of RhoA leading to localized inhibition of contractility. J Cell Biol. 2007;176:35-42

150. Wolf K, Wu YI, Liu Y, Geiger J, Tam E, Overall C, Stack MS, Friedl P. Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion. Nat Cell Biol. 2007;9:893-904

151. Yilmaz M, Christofori G. Mechanisms of motility in metastasizing cells. Mol Cancer Res;8:629-642

152. Bianchi A, Gervasi ME, Bakin A. Role of beta5-integrin in epithelial-mesenchymal transition in response to TGF-beta. Cell Cycle;9:1647-1659

153. Rodenhuis S. ras and human tumors. Semin Cancer Biol. 1992;3:241-247

154. Spandidos DA, Kerr IB. Elevated expression of the human ras oncogene family in premalignant and malignant tumours of the colorectum. Br J Cancer. 1984;49:681-688

155. Rossiter BJ, Muzny DM, Hampson I, Caskey CT, Fox M. Induced reversion of a spontaneous point mutation within the Chinese hamster HPRT gene to the wild-type sequence. Mutagenesis. 1990;5:605-608

156. Paterson H, Mbamalu G, Marshall CJ. Flat revertants of EJ human bladder carcinoma cells show two different mechanisms of reversion. Ciba Found Symp. 1989;142:134-143; discussion 143-138

157. Singh A, Greninger P, Rhodes D, Koopman L, Violette S, Bardeesy N, Settleman J. A gene expression signature associated with "K-Ras addiction" reveals regulators of EMT and tumor cell survival. Cancer Cell. 2009;15:489-500

158. Shirokawa JM, Elisei R, Knauf JA, Hara T, Wang J, Saavedra HI, Fagin JA. Conditional apoptosis induced by oncogenic ras in thyroid cells. Mol Endocrinol. 2000;14:1725-1738

159. Saavedra HI, Knauf JA, Shirokawa JM, Wang J, Ouyang B, Elisei R, Stambrook PJ, Fagin JA. The RAS oncogene induces genomic instability in thyroid PCCL3 cells via the MAPK pathway. Oncogene. 2000;19:3948-3954

160. De Vita G, Bauer L, da Costa VM, De Felice M, Baratta MG, De Menna M, Di Lauro R. Dose-dependent inhibition of thyroid differentiation by RAS oncogenes. Mol Endocrinol. 2005;19:76-89

161. Oft M, Peli J, Rudaz C, Schwarz H, Beug H, Reichmann E. TGF-beta1 and Ha-Ras collaborate in modulating the phenotypic plasticity and invasiveness of epithelial tumor cells. Genes Dev. 1996;10:2462-2477

162. Isakoff SJ, Engelman JA, Irie HY, Luo J, Brachmann SM, Pearline RV, Cantley LC, Brugge JS. Breast cancer-associated PIK3CA mutations are oncogenic in mammary epithelial cells. Cancer Res. 2005;65:10992-11000

163. Brummer T, Martin P, Herzog S, Misawa Y, Daly RJ, Reth M. Functional analysis of the regulatory requirements of B-Raf and the B-Raf(V600E) oncoprotein. Oncogene. 2006;25:6262-6276

164. Campbell PM, Groehler AL, Lee KM, Ouellette MM, Khazak V, Der CJ. K-Ras promotes growth transformation and invasion of immortalized human pancreatic cells by Raf and phosphatidylinositol 3-kinase signaling. Cancer Res. 2007;67:2098-2106

165. Defilles C, Lissitzky JC, Montero MP, Andre F, Prevot C, Delamarre E, Marrakchi N, Luis J, Rigot V. alphavbeta5/beta6 integrin

suppression leads to a stimulation of alpha2beta1 dependent cell migration resistant to PI3K/Akt inhibition. Exp Cell Res. 2009;315:1840-1849

166. Lehmann M, Rabenandrasana C, Tamura R, Lissitzky JC, Quaranta V, Pichon J, Marvaldi J. A monoclonal antibody inhibits adhesion to fibronectin and vitronectin of a colon carcinoma cell line and recognizes the integrins alpha v beta 3, alpha v beta 5, and alpha v beta 6. Cancer Res. 1994;54:2102-2107

167. Klemke RL, Yebra M, Bayna EM, Cheresh DA. Receptor tyrosine kinase signaling required for integrin alpha v beta 5-directed cell motility but not adhesion on vitronectin. J Cell Biol. 1994;127:859-866

168. Yebra M, Parry GC, Stromblad S, Mackman N, Rosenberg S, Mueller BM, Cheresh DA. Requirement of receptor-bound urokinase-type plasminogen activator for integrin alphavbeta5-directed cell migration. J Biol Chem. 1996;271:29393-29399

169. Brooks PC, Klemke RL, Schon S, Lewis JM, Schwartz MA, Cheresh DA. Insulin-like growth factor receptor cooperates with integrin alpha v beta 5 to promote tumor cell dissemination in vivo. J Clin Invest. 1997;99:1390-1398

170. Ricono JM, Huang M, Barnes LA, Lau SK, Weis SM, Schlaepfer DD, Hanks SK, Cheresh DA. Specific cross-talk between epidermal growth factor receptor and integrin alphavbeta5 promotes carcinoma cell invasion and metastasis. Cancer Res. 2009;69:1383-1391

171. Wang L, Pedroja BS, Meyers EE, Garcia AL, Twining SS, Bernstein AM. Degradation of internalized alphavbeta5 integrin is controlled by uPAR bound uPA: effect on beta1 integrin activity and alpha-SMA stress fiber assembly. PLoS One;7:e33915

172. Byzova TV, Goldman CK, Pampori N, Thomas KA, Bett A, Shattil SJ, Plow EF. A mechanism for modulation of cellular responses to VEGF: activation of the integrins. Mol Cell. 2000;6:851-860

173. Eliceiri BP, Puente XS, Hood JD, Stupack DG, Schlaepfer DD, Huang XZ, Sheppard D, Cheresh DA. Src-mediated coupling of focal adhesion kinase to integrin alpha(v)beta5 in vascular endothelial growth factor signaling. J Cell Biol. 2002;157:149-160

174. Friedlander M, Brooks PC, Shaffer RW, Kincaid CM, Varner JA, Cheresh DA. Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins. Science. 1995;270:1500-1502

175. Weis S, Cui J, Barnes L, Cheresh D. Endothelial barrier disruption by VEGF-mediated Src activity potentiates tumor cell extravasation and metastasis. J Cell Biol. 2004;167:223-229

176. Criscuoli ML, Nguyen M, Eliceiri BP. Tumor metastasis but not tumor growth is dependent on Src-mediated vascular permeability. Blood. 2005;105:1508-1514

177. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. Science. 1989;246:1306-1309

178. Toi M, Hoshina S, Takayanagi T, Tominaga T. Association of vascular endothelial growth factor expression with tumor angiogenesis and with early relapse in primary breast cancer. Jpn J Cancer Res. 1994;85:1045-1049

179. Imanishi Y, Hu B, Xiao G, Yao X, Cheng SY. Angiopoietin-2, an angiogenic regulator, promotes initial growth and survival of breast cancer metastases to the lung through the integrin-linked kinase (ILK)-AKT-B cell lymphoma 2 (Bcl-2) pathway. J Biol Chem;286:29249-29260

180. Vajkoczy P, Farhadi M, Gaumann A, Heidenreich R, Erber R, Wunder A, Tonn JC, Menger MD, Breier G. Microtumor growth initiates angiogenic sprouting with simultaneous expression of VEGF, VEGF receptor-2, and angiopoietin-2. J Clin Invest. 2002;109:777-785

181. Mendez MG, Kojima S, Goldman RD. Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. FASEB J;24:1838-1851

182. Christiansen JJ, Rajasekaran AK. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. Cancer Res. 2006;66:8319-8326

183. Pinkas J, Leder P. MEK1 signaling mediates transformation and metastasis of EpH4 mammary epithelial cells independent of an epithelial to mesenchymal transition. Cancer Res. 2002;62:4781-4790

184. Powell AA, Talasaz AH, Zhang H, Coram MA, Reddy A, Deng G, Telli ML, Advani RH, Carlson RW, Mollick JA, Sheth S, Kurian AW, Ford JM, Stockdale FE, Quake SR, Pease RF, Mindrinos MN, Bhanot G, Dairkee SH, Davis RW, Jeffrey SS. Single cell profiling of circulating tumor cells: transcriptional heterogeneity and diversity from breast cancer cell lines. PLoS One;7:e33788

185. Clovis WL, Gamble WJ, Zeidman I. Immediate passage of tumor cell emboli through the liver and kidney. Cancer Res. 1956;16:814-815

186. Fidler IJ. The relationship of embolic homogeneity, number, size and viability to the incidence of experimental metastasis. Eur J Cancer. 1973;9:223-227

187. Hou JM, Krebs M, Ward T, Sloane R, Priest L, Hughes A, Clack G, Ranson M, Blackhall F, Dive C. Circulating tumor cells as a window on metastasis biology in lung cancer. Am J Pathol;178:989-996

188. Bruick RK, McKnight SL. Building better vasculature. Genes Dev. 2001;15:2497-2502

189. Ozaki H, Yu AY, Della N, Ozaki K, Luna JD, Yamada H, Hackett SF, Okamoto N, Zack DJ, Semenza GL, Campochiaro PA. Hypoxia inducible factor-1alpha is increased in ischemic retina: temporal and spatial correlation with VEGF expression. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1999;40:182-189

190. Feldkamp MM, Lau N, Rak J, Kerbel RS, Guha A. Normoxic and hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) by astrocytoma cells is mediated by Ras. Int J Cancer. 1999;81:118-124

191. Pore N, Liu S, Shu HK, Li B, Haas-Kogan D, Stokoe D, Milanini-Mongiat J, Pages G, O'Rourke DM, Bernhard E, Maity A. Sp1 is involved in Akt-mediated induction of VEGF expression through an HIF-1-independent mechanism. Mol Biol Cell. 2004;15:4841-4853

192. Jin F, Brockmeier U, Otterbach F, Metzen E. New Insight into the SDF-1/CXCR4 Axis in a Breast Carcinoma Model: Hypoxia-Induced Endothelial SDF-1 and Tumor Cell CXCR4 Are Required for Tumor Cell Intravasation. Mol Cancer Res;10:1021-1031

193. Liang Z, Brooks J, Willard M, Liang K, Yoon Y, Kang S, Shim H. CXCR4/CXCL12 axis promotes VEGF-mediated tumor angiogenesis through Akt signaling pathway. Biochem Biophys Res Commun. 2007;359:716-722

194. Darash-Yahana M, Pikarsky E, Abramovitch R, Zeira E, Pal B, Karplus R, Beider K, Avniel S, Kasem S, Galun E, Peled A. Role of high expression levels of CXCR4 in tumor growth, vascularization, and metastasis. FASEB J. 2004;18:1240-1242

195. Kijowski J, Baj-Krzyworzeka M, Majka M, Reca R, Marquez LA, Christofidou-Solomidou M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. The SDF-1-CXCR4 axis stimulates VEGF secretion and activates integrins but does not affect proliferation and survival in lymphohematopoietic cells. Stem Cells. 2001;19:453-466

196. Kim J, Takeuchi H, Lam ST, Turner RR, Wang HJ, Kuo C, Foshag L, Bilchik AJ, Hoon DS. Chemokine receptor CXCR4 expression in colorectal cancer patients increases the risk for recurrence and for poor survival. J Clin Oncol. 2005;23:2744-2753

197. Fukunaga S, Maeda K, Noda E, Inoue T, Wada K, Hirakawa K. Association between expression of vascular endothelial growth factor C,

chemokine receptor CXCR4 and lymph node metastasis in colorectal cancer. Oncology. 2006;71:204-211

198. Ottaiano A, Franco R, Aiello Talamanca A, Liguori G, Tatangelo F, Delrio P, Nasti G, Barletta E, Facchini G, Daniele B, Di Blasi A, Napolitano M, Ierano C, Calemma R, Leonardi E, Albino V, De Angelis V, Falanga M, Boccia V, Capuozzo M, Parisi V, Botti G, Castello G, Vincenzo Iaffaioli R, Scala S. Overexpression of both CXC chemokine receptor 4 and vascular endothelial growth factor proteins predicts early distant relapse in stage II-III colorectal cancer patients. Clin Cancer Res. 2006;12:2795-2803

199. Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verastegui E, Zlotnik A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. Nature. 2001;410:50-56

200. Gassmann P, Haier J, Schluter K, Domikowsky B, Wendel C, Wiesner U, Kubitza R, Engers R, Schneider SW, Homey B, Muller A. CXCR4 regulates the early extravasation of metastatic tumor cells in vivo. Neoplasia. 2009;11:651-661

ANEXO 1

ANEXO 1

Experimento:	**Animal Nº:**						
Administraciones:				Sacrificio:			
Fecha							
Hora							
Peso							
Volumen Tumoral (m/M)							
Palpación (0-4)							
Aspecto							
Normal							
Deshidratación							
Palidez							
Pelo en mal estado (presencia)							
Secreciones oculares							
Secreciones nasales							
Postura anormal							
Lesión/es							
Ganglios afectados							
Masa tumoral							
Dificultad caminar							
Ataxia							
Espasmos/dificultad respiratoria							
Comportamiento al manipularlo							
Normal							
Pequeños cambios							
Cambios moderados							
Animal agresivo							
Animal comatoso							
Observaciones							
Experimentador/a							
Firma							