

UNIVERSIDAD DE GRANADA



VALOR PRONÓSTICO DE LA ENZIMA O6-METILGUANINA-ADN METILTRANSFERASA (MGMT) Y DE LA GLICOPROTEINA PROMININA 1 (CD133) EN PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL

Memoria presentada por D. Jaime Antonio Oliver Esteve
para optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada

Granada, 8 de Septiembre de 2014

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Jaime Antonio Oliver Esteve
D.L.: GR 2084-2014
ISBN: 978-84-9083-258-5

Dra. CONSOLACIÓN MELGUIZO ALONSO,
CATEDRÁTICA DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y EMBRIOLGÍA
HUMANA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE
GRANADA.

HACE CONSTAR:

Que D. Jaime Antonio Oliver Esteve ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral: **“VALOR PRONÓSTICO DE LA ENZIMA O6-METILGUANINA-ADN METILTRANSFERASA (MGMT) Y DE LA GLICOPROTEINA PROMININA 1 (CD133) EN PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL”**.

Una vez redactada la presente memoria, ha sido revisada por mí, se corresponde fielmente con los resultados obtenidos y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente en Granada a 8 de Septiembre de 2014.

Fdo: Dra. Dña. Consolación Melguizo Alonso
Catedrática de Universidad

Dr. JOSE CARLOS PRADOS SALAZAR,
CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y EMBRIOLGÍA
HUMANA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE
GRANADA.

HACE CONSTAR:

Que D. Jaime Antonio Oliver Esteve ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral: **“VALOR PRONÓSTICO DE LA ENZIMA O6–METILGUANINA-ADN METILTRANSFERASA (MGMT) Y DE LA GLICOPROTEINA PROMININA 1 (CD133) EN PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL”**.

Una vez redactada la presente memoria, ha sido revisada por mí, se corresponde fielmente con los resultados obtenidos y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente en Granada a 8 de Septiembre de 2014.

Fdo: Dr. D. José Carlos Prados Salazar
Catedrático de Universidad

Dr. RAÚL ORTIZ QUESADA,
PROFESOR AYUDANTE DOCTOR DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE
LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD DE JAÉN

HACE CONSTAR:

Que D. Jaime Antonio Oliver Esteve ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral: **“VALOR PRONÓSTICO DE LA ENZIMA O6-METILGUANINA-ADN METILTRANSFERASA (MGMT) Y DE LA GLICOPROTEINA PROMININA 1 (CD133) EN PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL”**.

Una vez redactada la presente memoria, ha sido revisada por mí, se corresponde fielmente con los resultados obtenidos y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente en Granada a 8 de Septiembre de 2014.

Fdo: Dr. D. Raúl Ortiz Quesada
Prof. Ayudante Doctor

Agradecimientos

Este proyecto ha sido posible gracias al soporte de la Junta de Andalucía, al Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía (SSPA), a la Universidad de Granada, a los diferentes Hospitales que han participado en los distintos proyectos, al Centro de Instrumentación Científica (CIC), a instituciones como el Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER) perteneciente al Centro de Investigación Biomédica (CIBM) y a otras Universidades que han colaborado y que me han brindado la oportunidad de poder utilizar los medios y el material necesarios para la elaboración de los distintos proyectos de investigación.

Gracias a los tutores de mi tesis, por su confianza en mi persona, por su tiempo y dedicación, por su paciencia y disponibilidad en todo momento, que me han guiado con su experiencia y sus conocimientos y que me han facilitado con su orientación, la posibilidad de ampliar mi formación y realizar este proyecto.

Agradezco a todos mis profesores anteriores, que han hecho posible que pudiera acceder a los estudios que he ido realizando y a todos los que de una forma u otra, me ayudaron y estuvieron conmigo a lo largo de estos años.

Agradezco a todos mis compañeros de equipo su apoyo y colaboración.

Gracias a mi familia que me ha animado en todo momento a seguir trabajando para conseguir mi objetivo.

A todos, muchas gracias.

SUMMARY/RESUMEN

SUMMARY

According to the World Health Organization, colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer in men and the second in women with an increase in both incidence and mortality. The main treatment is surgery combined with adjuvant therapies based on chemotherapy and/or radiotherapy. One of the reasons of the treatment failure is the presence of Cancer Stem Cells (CSC). CSCs are small subpopulations which have some shared properties with stem cells: the ability to self-renew indefinitely, the ability to differentiate to the full repertoire of cells which form the tumor and present specific markers such as CD133. This biomarker was initially described as a specific surface antigen of human hematopoietic stem cells and has recently been associated with CSC in several tumor types including CRC. Previous *in vitro* studies have suggested that one of the mechanisms responsible of the chemo/radio-resistance in this population is the O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT). The expression of this enzyme seems to depend on epigenetic processes such as methylation and its main role is the DNA repair removing alkyl groups from O6 guanine which are introduced by exogenous alkylating agents. Previous studies suggest that MGMT and CD133 may be a predictor of treatment response in some types of cancers.

The main objectives in this study are to determine the expression levels of MGMT and CD133 at different molecular levels, to establish its prognostic values and to determine the relationships between both biomarkers.

Firstly, previous *in vitro* preliminary study was realized in CRC cell lines to establish all methods and techniques before applying to patient samples and to have a first approximation of *in vivo* involved processes. The most relevant clinical variables such as the tumor differentiation grade, tumor stage, overall survival (OS) and disease free survival (DFS) among others were obtained from two patient populations. The first patient population consisted on patients

diagnosed with CRC (n= 123) which were obtained 5-fluouracil (5-FU) pretreatment biopsy and the second population included rectal cancer patients (n= 29) with biopsies before and after treatment. These last patients were treated with the same treatment regimen based on 5-FU or oral capecitabine combined with radiotherapy.

The methylation status of the MGMT promoter and CD133 was assessed by methylation-specific PCR (MSP), mRNA expression was obtained by RT-PCR and/or quantitative PCR and protein expression was established by immunohistochemistry (IHC) in paraffin sections or Tissue Micro arrays. Moreover, the analysis of cell cycle and cell proliferation inhibition under 5-FU treatment was analyzed too in the cell lines/CSC-enriched population.

CSC enriched cell populations *in vitro* studies in RKO and SW480 cell lines showed that both had a lower proliferation-rate, CD133 (not evaluable and 8.95 folds respectively) and MGMT (1.47 and 1.98 folds respectively) overexpression, absence of G2/M blocking under 5-FU treatment and a 5-FU 72 hour-IC₅₀ significant increase (64 and 2048 folds respectively).

The results observed in the CRC population (n= 123) showed that patients with low MGMT expression intensity had lower OS and it was an independent prognostic factor. Moreover, patients with high percentage of CD133 protein expression had shorter DFS not being an independent prognostic factor. Similarly, patients with high MGMT intensity and high expression of CD133 percentage showed the shortest DFS lapses-times.

The results observed in the rectal cancer population (n= 29) showed that the methylation status of MGMT promoter was associated with shorter periods of DFS, absence of lymphatic invasion after treatment and improved treatment response. Furthermore, we could appreciate a significant reduction in the percentage and intensity protein levels of MGMT after treatment. Moreover, patients with low protein expression levels of MGMT after treatment showed lower tumor regression values. Regarding CD133, patients with high protein levels of CD133 after treatment were associated with more advanced tumor

stage, absence of changes in lymphatic invasion after treatment and greater tumor regression values.

In both study populations no association between MGMT and CD133 was observed.

Overall, we could see that in patients with CRC, the absence of MGMT expression and/or MGMT promoter methylation was correlated with a better treatment response at short-term, while at long-term it was associated with reduced overall survival. Moreover, CD133 was associated to poor treatment response, shorter DFS lapse-times, and higher values of the tumor regression grade.

We can conclude that both MGMT and CD133 play an important role in the treatment response and prognosis of patients with CRC and consider that both biomarkers may be useful for selecting patients who require more aggressive therapies.

RESUMEN

Según la Organización Mundial de la Salud, el cáncer colorrectal (CCR) es el tercer cáncer más común en hombres y el segundo en mujeres estimando un aumento tanto de incidencia como mortalidad. Su principal tratamiento es la cirugía, combinándose con terapias adyuvantes basadas en quimioterapia y/o radioterapia. Una de las razones del fallo de tratamiento son las células madre cancerígenas o *Cancer Stem Cells* (CSC). Las CSCs son una pequeña subpoblación que presenta algunas propiedades compartidas con las células madre como: la capacidad de autorenovarse de forma indefinida, la capacidad de generar todo el repertorio de células que forman el tumor y presentar marcadores específicos propios, entre ellos CD133. Inicialmente, este biomarcador fue descrito como un antígeno de superficie específico de las células madre hematopoyéticas humanas y en los últimos años ha sido asociado a las CSCs en varios tipos tumorales incluyendo el CCR. Estudios previos *in vitro*, han sugerido que uno de los mecanismos responsables de la quimio y radorresistencia en esta población es la O6-metilguanina-ADN metiltransferasa (MGMT). La expresión de esta enzima parece depender de procesos epigenéticos como la metilación y su función es la reparación del ADN, eliminando los grupos alquilo del átomo O6 de la guanina, introducidos por agentes alquilantes exógenos. Estudios previos sugieren que CD133 y MGMT podrían ser un elemento predictivo de la respuesta al tratamiento en algunos tipos de cánceres.

Los principales objetivos en este estudio son la determinación de los niveles de expresión de MGMT y CD133 en los distintos niveles moleculares, establecer su valor pronóstico y las relaciones existentes entre ambos biomarcadores.

En primer lugar, se realizó un estudio preliminar en líneas celulares de CCR para poner a punto todos los métodos y técnicas antes de aplicarlos a los pacientes y tener una aproximación de lo que podría suceder *in vivo*. Se dispuso de dos poblaciones de pacientes de las cuales se obtuvieron las

variables clínicas más relevantes como el grado de diferenciación tumoral, el estadio tumoral, la supervivencia global (SG) y libre de enfermedad (SLE) entre otras. La primera población consistía en pacientes diagnosticados con CCR (n= 123) con biopsias antes del tratamiento, basado en regímenes que incluían 5-fluoracilo (5-FU) y la segunda población incluía pacientes con cáncer rectal (n= 29) con biopsias antes y después del tratamiento. Estos últimos pacientes se trataron con el mismo esquema basado en 5-FU o capecitabina oral y radioterapia.

El estado de metilación del promotor de *MGMT* y *CD133* se evaluó mediante PCR específica de metilación (MSP), la expresión de RNAm mediante RT-PCR y/o PCR cuantitativa y la expresión proteica mediante el estudio inmunohistoquímico (IHQ) de secciones en parafina o *Tissue Micro arrays*. Además en las líneas celulares enriquecidas en CSCs se analizó el ciclo celular y la inhibición de la proliferación celular frente a 5-FU.

Los estudios preliminares en las poblaciones enriquecidas en CSCs en las líneas celulares RKO y SW480 mostraron que estas presentaban una menor tasa de proliferación, sobreexpresión de CD133 no valorable y 8,95 *folds* respectivamente) y *MGMT* (1,47 y 1,98 *folds* respectivamente), ausencia de bloqueo en G2/M al tratarlas con 5-FU y un incremento significativo de la concentración inhibitoria máxima media (IC_{50}) a las 72 horas de exposición con 5-FU (64 y 2048 *folds* respectivamente).

Los resultados en la población de pacientes con CCR (n= 123) mostraron que los pacientes con baja intensidad de expresión de *MGMT* presentaban una SG menor y era un factor pronóstico independiente. Por otra parte, los pacientes con alto porcentaje de expresión de CD133 presentaron una SLE más corta no siendo un factor pronóstico independiente. Del mismo modo, los pacientes con alta intensidad de expresión de *MGMT* y alto porcentaje de expresión de CD133 presentaron los tiempos de SLE y SG más cortos.

Los resultados en la población con cáncer rectal (n= 29) mostraron que el estado de metilación de MGMT estaba asociado a periodos más cortos de SLE, ausencia de invasión linfática después del tratamiento y mejor respuesta al tratamiento. Además, pudimos apreciar una reducción significativa de los niveles de expresión proteica de MGMT tanto a nivel de porcentaje como intensidad después del tratamiento. Por otra parte, los pacientes con bajo porcentaje de expresión de MGMT después del tratamiento mostraron grados de regresión tumoral más bajos. Respecto a CD133, los pacientes con altos niveles proteicos de CD133 después del tratamiento se asociaron con estadios tumorales más avanzados, ausencia de cambios en la invasión linfática después del tratamiento y mayores grados de regresión tumoral.

En ambas poblaciones de estudio no se observó ninguna asociación entre MGMT y CD133.

Globalmente pudimos observar que en pacientes con CCR, la ausencia de expresión de MGMT y/o la metilación de su promotor se correlacionó con una respuesta favorable al tratamiento a corto plazo, mientras que a largo plazo, se asoció con una reducción de la SG. Por otra parte, CD133 lo asociamos a una pobre respuesta del tratamiento, periodos de SLE más cortos, y valores superiores del grado de regresión tumoral.

Podemos concluir que tanto MGMT como CD133 tienen un papel relevante en la respuesta al tratamiento y en el pronóstico de los pacientes con CCR y consideramos que ambos biomarcadores podrían ser útiles para la selección de pacientes que requieran de terapias más agresivas.

ABREVIATURAS

A

ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ADN, DNA	Acido desoxidoribonucleico
ADNc	Acido desoxidoribonucleico complementario
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
APC	<i>Poliposis adenomatosa coli (Adenomatous polyposis coli)</i>
AREG	Amfiregulina
ARN, RNA	Acido ribonucleico
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>

B

BD	<i>Desulfonation buffer</i>
BL	<i>Loading buffer</i>
BW	<i>Wash buffer</i>

C

CA19.9	Antígeno de carbohidrato 19.9
CCR	Cáncer colorrectal
CEA	Antígeno carcinoembrionario
CIMP	<i>CPg island methylator</i>
CIN	Inestabilidad cromosómica (<i>Chromosomal instability</i>)
CpG	<i>Cytosine phosphate guanine</i>
CPT-11	<i>Camptothecin-11</i>
CSC	<i>Cancer stem cell</i>
CTRL	Control

D

DAB	3.3'-Diaminobenzidina
DCC	Delecionado en cáncer de colon
DLL	Ligandos tipo Delta
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNMT	<i>DNA methyltransferase</i>

E

EB	<i>Elution buffer</i>
EE.UU.	Estados Unidos de América
EGF	<i>Epidermal grow factor</i>
EGFR	<i>Epidermal grow factor receptor</i>
EREG	Epiregulina

F

FACS	<i>Calibur flow cytometry system</i>
FBS	Suero fetal bovino (<i>Fetal bovin serum</i>)
FC	<i>Fold change</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>

G

GBM	Glioblastoma
GRT	Grado de regresión tumoral

H

Hh	<i>Hedgehog</i>
HPNCC	Cáncer colorrectal hereditario no polipósico (<i>Hereditary nonpolyposis colorectal cáncer</i>)
HR	<i>Hazard ratio</i>

I

IC	Intervalo de confianza
-----------	------------------------

IC₅₀ *Half maximal inhibitory concentration*

IHQ Inmunohistoquímico

L

LV Leucovorin

M

M Metilado (*Methylated*)

Mg Magnesio

MGMT O6-Metil-guanina-ADN metiltransferasa

MMLVRT *Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase*

MMR *Mismatch repair*

MSI Inestabilidad de los microsatélites
(*Microsatellite instability*)

MSP PCR específica de metilación
(*Methylation-specific PCR*)

MTT *Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide*

N

NCID Dominio intracelular de Notch
(*Notch intracellular domain*)

NV No valorable

O

OMS Organización Mundial de la Salud

P

pb Pares de bases

PCR *Polymerase chain reaction*

PET Tomografía por emisión de positrones
(*Positron emission tomography*)

PIGF *Placental grow factor*

P-pg P-glicoproteína

Q

qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>
QRT	Quimiorradioterapia

R

RIN	<i>RNA integrity number</i>
RT	Retrotranscripción

S

SG	Supervivencia global
SLE	Supervivencia libre de enfermedad

T

TAC	Tomografía Axial computarizada
TCA	Acido tricloroacético (<i>Trichloroacetic acid</i>)
TGF	<i>Transforming grow factor</i>
Tm	<i>Melting temperatura</i>
TMA	<i>Tissue micro arrays</i>
TMZ	Temozolamida

U

UFT	<i>Tegafur-uracil</i>
UM	No metilado (<i>Unmethylated</i>)

V

VEGF	<i>Vascular endotelial grow factor</i>
------	--

5

5-FU	5-Flourouracilo
5-UTR	<i>5-Untranslated region</i>

ÍNDICE

	<i>Pág.</i>
1. INTRODUCCIÓN.....	24
1.1. CANCER COLORRECTAL.....	24
1.1.1. EPIDEMIOLOGÍA.....	24
1.1.2. FACTORES DE RIESGO.....	26
1.1.2.1. <i>Factores ambientales.....</i>	27
1.1.2.2. <i>Factores genéticos.....</i>	28
1.1.3. LOCALIZACIÓN.....	31
1.1.4. ETAPAS DE CRECIMIENTO O ESTADIOS TUMORALES.....	33
1.1.5. CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER COLORRECTAL.....	33
1.1.5.1. <i>Cáncer epitelial.....</i>	35
1.1.5.1.1. <i>Adenocarcinoma.....</i>	35
1.1.5.1.2. <i>Carcinoma de células pequeñas.....</i>	36
1.1.5.1.3. <i>Carcinoma escamoso y adenoescamoso.....</i>	36
1.1.5.1.4. <i>Tumores carcinoides.....</i>	37
1.1.5.2. <i>Cáncer no epitelial.....</i>	37
1.1.5.2.1. <i>Linfomas.....</i>	37
1.1.5.2.2. <i>Sarcomas.....</i>	37
1.1.6. DETECCIÓN Y DIAGNÓSTICO.....	37
1.1.6.1. <i>Pacientes asintomáticos y screening.....</i>	37
1.1.6.2. <i>Pacientes sintomáticos y detección.....</i>	38
1.1.6.3. <i>Pruebas diagnósticas indirectas: análisis de sangre y/o heces.....</i>	38
1.1.6.4. <i>Pruebas diagnósticas directas: biopsias y pruebas de imagen.....</i>	39
1.1.6.4.1. <i>Biopsias.....</i>	39
1.1.6.4.2. <i>Pruebas de imagen.....</i>	39
1.1.7. TERAPIA CONVENCIONAL EN CÁNCER DE COLON.....	40
1.1.7.1. <i>Tratamiento quirúrgico primario.....</i>	40
1.1.7.2. <i>Quimioterapia adyuvante.....</i>	40
1.1.7.3. <i>Radioterapia adyuvante.....</i>	40

1.1.8.	CÁNCER DE COLON: TRATAMIENTO TUMORAL SEGÚN ESTADIO....	41
1.1.8.1.	<i>Estadio 0 o I.....</i>	41
1.1.8.2.	<i>Estadio II.....</i>	41
1.1.8.3.	<i>Estadio III.....</i>	41
1.1.8.4.	<i>Estadio IV o cáncer de colon recidivante.....</i>	44
1.1.9.	CÁNCER DE RECTO: TRATAMIENTO SEGÚN ESTADIO.....	49
1.1.9.1.	<i>Estadio 0 o I.....</i>	49
1.1.9.2.	<i>Estadio II o III.....</i>	49
1.1.9.3.	<i>Estadio IV.....</i>	50
1.2.	CANCER STEM CELL (CSC).....	50
1.2.1.	CANCER DE COLON Y CANCER STEM CELL.....	55
1.2.2.	CSC Y SU RELACIÓN CON LA RESISTENCIA A FÁRMACOS.....	58
1.3.	O6–METILGUANINA-ADN METILTRANSFERASA (MGMT)....	59
1.3.1.	MECANISMO DE ACCIÓN DE MGMT.....	59
1.3.2.	SILENCIAMIENTO EPIGENÉTICO: METILACIÓN DE MGMT.....	61
1.3.3.	METILACIÓN DEL ADN Y CARCINOGENESIS.....	63
1.3.4.	O6–METILGUANINA-ADN METILTRANSFERASA(MGMT) EN CÁNCER DE COLON.....	63
1.4.	GLICOPROTEÍNA PROMININA 1 (CD133).....	64
1.4.1.	CD133 Y CÁNCER DE COLON.....	66
1.4.2.	LOCALIZACIÓN DE CD133.....	66
1.4.3.	DETECCIÓN DE CD133.....	68
2.	OBJETIVOS.....	69
3.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	70
3.1.	ESTUDIOS IN VITRO.....	70
3.1.1.	MATERIAL.....	70

	<i>Pág.</i>
3.1.2. MÉTODOS.....	71
3.1.2.1. <i>Cultivo celular y criopreservación</i>	71
3.1.2.2. <i>Determinación de la metilación del promotor de MGMT</i>	71
3.1.2.2.1. Pretratamiento de ADN con bisulfito sódico.....	71
3.1.2.2.2. Protocolo de conversión del ADN mediante bisulfito sódico.....	73
3.1.2.2.3. Lavado del ADN convertido mediante bisulfito.....	74
3.1.2.2.4. PCR específica de metilación (MSP).....	77
3.1.2.3. <i>Electroforesis en gel de agarosa</i>	80
3.1.2.4. <i>Expresión de ARN en líneas celulares</i>	81
3.1.2.4.1. Extracción del ARN.....	81
3.1.2.4.2. Retrotranscripción.....	82
3.1.2.4.3. RT-PCR.....	83
3.1.2.5. <i>Exposición de cultivos celulares a tratamientos con 5- fluorouracilo..</i>	84
3.1.2.6. <i>Enriquecimiento de Cancer Stem Cells</i>	86
3.1.2.7. <i>Estudio de expresión de ARNm mediante PCR cuantitativa (qPCR)....</i>	87
3.1.2.8. Exposición de Cancer Stem Cell al agente 5-Fluorouracilo.....	88
3.1.2.9. <i>Medición de apoptosis y estado del ciclo celular</i>	90
3.2. ESTUDIOS IN VIVO (PACIENTES).....	91
3.2.1. MATERIAL.....	91
3.2.1.1. <i>Poblaciones de estudio</i>	91
3.2.1.1.1. Población de estudio con cáncer colorrectal.....	91
3.2.1.1.2. Población de estudio con cáncer rectal.....	91
3.2.1.2. <i>Pacientes: Registro de datos</i>	92
3.2.1.3. <i>Obtención de muestras de las poblaciones de estudio</i>	93
3.2.2. MÉTODOS.....	96
3.2.2.1. <i>Determinación del estado de metilación del promotor de MGMT</i>	96
3.2.2.1.1. Extracción de ADN del tejido.....	96
3.2.2.1.2. Estudio de metilación.....	96

	<i>Pág.</i>
3.2.2.2. <i>Estudio de expresión de ARNm de CD133 y MGMT</i>	96
3.2.2.2.1. Extracción de ARN del tejido.....	96
3.2.2.2.2. Retrotranscripción.....	97
3.2.2.2.3. Estudio de expresión de ARNm mediante PCR cuantitativa (qPCR)....	98
3.2.2.3. <i>Estudio inmunohistoquímico de MGMT y CD133</i>	100
3.2.2.3.1. Tissue Micro Array (muestras incluidas en parafina).....	101
3.2.2.3.2. Secciones completas (muestras incluidas en OCT).....	102
3.2.2.3.3. Tinción y revelado.....	102
3.2.2.4. <i>Estudio estadístico</i>	106
4. RESULTADOS	108
4.1. RESULTADOS EN LÍNEAS CELULARES	108
4.1.1. ESTADO DE METILACIÓN DEL PROMOTOR DE MGMT.....	108
4.1.2. ESTADO DE METILACIÓN DEL PROMOTOR DE CD133.....	109
4.1.3. EXPRESIÓN DE ARN DE MGMT EN LÍNEAS CELULARES.....	110
4.1.4. EXPRESIÓN DE ARN DE CD133 EN LÍNEAS CELULARES.....	111
4.1.5. ESTUDIO DE LA CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE MGMT Y CD133 Y EL ESTADO DE METILACIÓN DE SU PROMOTOR.....	111
4.1.6. MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MGMT POR EL AGENTE TERAPÉUTICO 5-FLUOROURACILO EN LAS LÍNEAS CELULARES....	112
4.1.7. MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CD133 POR EL AGENTE TERAPÉUTICO 5-FLUOROURACILO EN LAS LÍNEAS CELULARES....	118
4.1.8. ENRIQUECIMIENTO DE CANCER STEM CELLS A PARTIR DE LAS LÍNEAS DE CCR Y LA LÍNEA TRANSFORMADA DE COLON.....	122
4.1.9. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE CD133 EN POBLACIONES CELULARES ENRIQUECIDAS EN CANCER STEM CELLS (CSC).....	124
4.1.10. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE MGMT EN POBLACIONES CELULARES ENRIQUECIDAS EN CANCER STEM CELLS (CSC).....	129
4.1.11. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE 5-FU EN POBLACIONES CELULARES ENRIQUECIDAS EN CANCER STEM CELLS.....	131

	<i>Pág.</i>
4.1.12. MODULACIÓN DEL CICLO CELULAR POR 5-FU EN POBLACIONES CELULARES ENRIQUECIDAS EN CANCER STEM CELLS.....	133
4.2. RESULTADOS IN VIVO: PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL.....	134
4.2.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO. DATOS CLÍNICOS.....	134
4.2.2. ANÁLISIS DE METILACIÓN DEL PROMOTOR DE MGMT.....	136
4.2.3. COMPORTAMIENTO DE LA VARIABLE METILACIÓN DEL PROMOTOR DE MGMT EN RELACIÓN A LOS DATOS CLÍNICOS.....	137
4.2.4. ANÁLISIS DEL % DE EXPRESIÓN DE MGMT.....	140
4.2.5. COMPORTAMIENTO DE LA VARIABLE % EXPRESIÓN DE MGMT EN RELACIÓN A LOS DATOS CLÍNICOS.....	142
4.2.6. ANÁLISIS DE LA INTENSIDAD DE MARCAJE DE MGMT.....	143
4.2.7. COMPORTAMIENTO DE LA VARIABLE INTENSIDAD DE MARCAJE DE MGMT EN RELACIÓN A LOS DATOS CLÍNICOS.....	144
4.2.8. ANÁLISIS DEL % DE EXPRESIÓN DE CD133.....	146
4.2.9. COMPORTAMIENTO DE LA VARIABLE % DE EXPRESIÓN DE CD133 EN RELACIÓN A LOS DATOS CLÍNICOS.....	148
4.2.10. ANÁLISIS DE LA INTENSIDAD DE MARCAJE DE CD133.....	150
4.2.11. COMPORTAMIENTO DE LA VARIABLE LA INTENSIDAD DE MARCAJE DE CD133 EN RELACIÓN A LOS DATOS CLÍNICOS.....	151
4.2.12. ANÁLISIS CONJUNTO DE VARIABLES MOLECULARES ASOCIADAS A MGMT Y CD133.....	153
4.2.13. ANÁLISIS DE LA CORRELACIÓN ENTRE LAS VARIABLES CLÍNICAS.....	156
4.2.13.1. <i>Edad</i>	156
4.2.13.2. <i>Grado de diferenciación</i>	156
4.2.13.3. <i>Estadio tumoral</i>	158

4.3. RESULTADOS IN VIVO: ESTUDIO ESPECIAL EN PACIENTES CON CÁNCER RECTAL.....	159
4.3.1. ANÁLISIS DE METILACIÓN DEL PROMOTOR DE MGMT.....	161
4.3.1.1. Estado de metilación del promotor de MGMT en tejido normal, fase pretratamiento y fase postratamiento.....	161
4.3.1.2. Estudio de la asociación del estado de metilación del promotor de MGMT con las variables clínicas.....	164
4.3.2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MGMT MEDIANTE qPCR.....	171
4.3.2.1. Expresión de MGMT en tejido normal, fase pretratamiento y fase Postratamiento.....	171
4.3.2.2. Comportamiento de la expresión de MGMT en relación a los datos Clínicos.....	172
4.3.3. ANÁLISIS DEL % DE EXPRESIÓN DE MGMT MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA.....	175
4.3.3.1. % de expresión de MGMT en tejido en fase pretratamiento y fase postratamiento.....	175
4.3.3.2. Comportamiento de la variable % expresión de MGMT en relación a los datos clínicos.....	177
4.3.4. ANÁLISIS DE LA INTENSIDAD DE MARCAJE DE MGMT MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA.....	180
4.3.4.1. Intensidad de marcaje de MGMT en tejido tumoral en fase pretratamiento y fase postratamiento.....	180
4.3.4.2. Comportamiento de la variable intensidad de marcaje de MGMT en relación a los datos clínicos.....	181
4.3.5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE CD133 MEDIANTE qPCR.....	183
4.3.5.1 Expresión de CD133 en tejido normal y tumoral en fase pretratamiento y fase postratamiento.....	183
4.3.5.2. Comportamiento de la variable expresión de CD133 en relación a los datos clínicos.....	184
4.3.6. ANÁLISIS DEL % DE EXPRESIÓN DE CD133 MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA.....	187
4.3.6.1 % de expresión de CD133 en tejido en fase pretratamiento y fase postratamiento.....	187
4.3.6.2. Comportamiento de la variable % expresión de CD133 en relación a los datos clínicos.....	188

	<i>Pág.</i>
4.3.7. ANÁLISIS DE LA INTENSIDAD DE MARCAJE DE CD133 MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA.....	190
4.3.7.1. <i>Intensidad de marcaje de CD133 en tejido en fase pretratamiento y fase postratamiento</i>	190
4.3.7.2. <i>Comportamiento de la variable intensidad de marcaje de CD133 en relación a los datos clínicos</i>	191
4.3.8. CORRELACIÓN ENTRE MGMT Y CD133.....	193
5. DISCUSIÓN.....	194
6. CONCLUSIONS/CONCLUSIONES.....	209
7. BIBLIOGRAFÍA.....	213
8. ANEXO.....	235

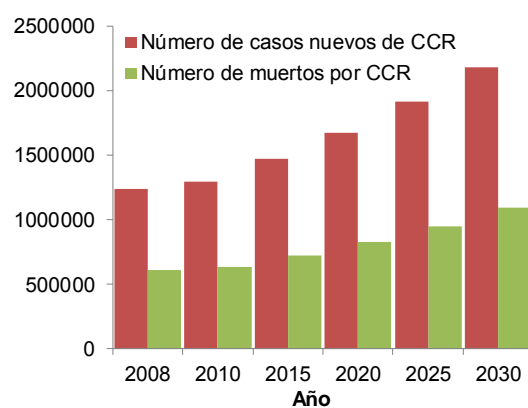
1. INTRODUCCIÓN

1.1. CÁNCER COLORRECTAL

1.1.1. EPIDEMIOLOGÍA

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer colorrectal (CCR) es el tercer cáncer más común en hombres (663.000 casos al año) y el segundo en mujeres (571.000 casos al año), siendo la cuarta causa más frecuente de muerte por cáncer con 608.000 defunciones/año. Esta ratio es más elevada en hombres que en mujeres. La previsión de la OMS indica que para 2015 aproximadamente 1.471.808 personas serán diagnosticadas de CCR, siendo esta la causa de defunción en aproximadamente la mitad de los pacientes (Figura 1) [1].

A



B

Año	Número de casos nuevos de CCR	Número de muertos por CCR
2008	1235108	609051
2010	1293629	638018
2015	1471808	726028
2020	1676442	826846
2025	1916051	951158
2030	2179711	1093700

Figura 1. Evolución global de la incidencia y mortalidad del CCR según la OMS. **A.** Representación gráfica y **B.** Representación numérica. Previsión de datos hasta el año 2030.

En España, el CCR es el tercero en frecuencia en hombres tras el cáncer de pulmón y próstata, el segundo en mujeres tras el de mama y el primero teniendo en cuenta ambos sexos (casi 28.000 nuevos casos al año). La SG es de un 54,7% y 50,2% para los pacientes con cáncer de colon y recto, respectivamente y es, en general de más de 5 años [2] aunque principalmente depende del estadio en que se detecte (Tabla 1).

Estadio	Supervivencia global a los 5 años
Estadio 0	90-92%
Estadio I-II	50-75%
Estadio III	25-55%
Estadio IV	<8%

Tabla 1. Porcentaje de la supervivencia global (SG) de pacientes con CCR en España en relación al estadio tumoral (Asociación Española Contra el Cáncer, 2013 [3]).

Estudios recientes muestran que en Granada, la SG media a los 5 años en enfermos de cáncer de colon es del 50,5% (rango: 46,0-53,8) y en cáncer de recto del 45,6% (rango: 40,3-50,7) [2].

Analizándolo globalmente, la tasa de incidencia es más elevada en países desarrollados que en países en desarrollo, tal y como muestra la Figura 2, a pesar de eso, no se observa una diferencia destacable en la mortalidad [1].

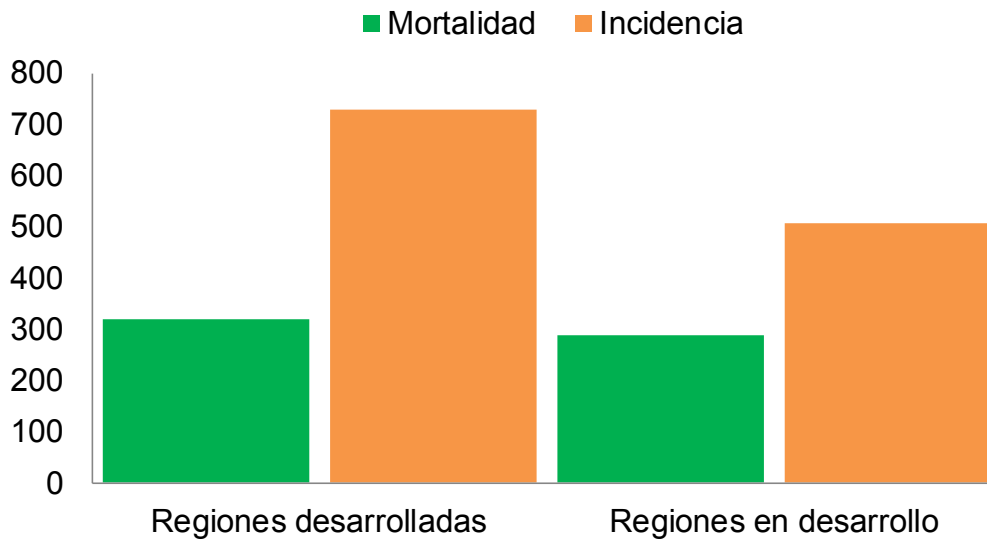


Figura 2. Análisis comparativo de incidencia y mortalidad entre países desarrollados y en desarrollo. Ratio por 100.000 habitantes.

Cabe destacar que, a mediados del siglo pasado (1960), Japón presentaba una muy baja incidencia de cáncer de colon en comparación con países europeos o EE.UU. Sin embargo, la adquisición de costumbres de alimentación occidentales ha igualado la incidencia entre estos países [4,5]. A pesar de esto, gran parte de África, Centroamérica, Sudamérica y la India presentan tasas de incidencia y mortalidad muy bajas en comparación con el resto del mundo [1]. Por último, en algunos estudios se describen ciertas diferencias de incidencia en base a la genética de las poblaciones [4].

1.1.2. FACTORES DE RIESGO

La epidemiología mostrada se atribuye a factores genéticos asociados a factores ambientales de gran influencia en esta patología.

1.1.2.1. Factores ambientales

- Consumo de alcohol

Se ha demostrado mediante experimentación animal, que el consumo de alcohol no es un carcinógeno en si, pero potencia el efecto de sustancias carcinógenas [6]. Además, el consumo de alcohol en personas con niveles inadecuados de folato y metionina incrementa el riesgo de sufrir cáncer de colon y adenomas [7]. De hecho, las dietas ricas en ácido fólico reducen el riesgo de padecer un CCR [8]. Por último, estudios amplios correlacionan un incremento del cáncer de colon en individuos que consumen altas cantidades de alcohol [9].

- Tabaquismo

Está ampliamente aceptado el papel activo que juega el tabaco en el proceso de la carcinogénesis en CCR debido a su efecto mutagénico y a que incrementa los niveles de radicales libres de oxígeno [10]. Además, existe una asociación significativa entre pacientes con CCR fumadores y periodos más cortos de supervivencia libre de enfermedad (SLE) y tiempo de recurrencia [11].

- Edad

El CCR aumenta su incidencia a partir de los 50 años [10,12], motivo por el que se está potenciando su detección precoz mediante pruebas de *screening* (sangre oculta en heces) [10].

- Dieta: grasa y fibra

La obesidad y el sobrepeso poblacional [10] adquiridos en las últimas décadas debido al sedentarismo y las dietas hipercalóricas, están asociados con un mayor riesgo de CCR [13,14].

Por otra parte, el primer autor en intuir el efecto de la fibra en el CCR fue *Burkitt* [15], quien propuso que el alto contenido de fibra en la dieta de la población africana era el causante de la baja incidencia en esta población. De este modo, se observó que la fibra de salvado de trigo, reducía la concentración de los ácidos biliares en heces, favoreciendo su eliminación [16]. Como mecanismo, se propuso que la fibra reducía los carcinógenos, procarcinógenos, el tiempo de tránsito intestinal y que producía cadenas cortas de ácidos grasos que promueven la acción anticarcinogénica [17].

- Otros componentes

Varios estudios apuntan hacia la importancia del selenio, micronutriente presente en cereales, pescado, etc, como un antioxidante que previene los procesos de carcinogénesis y que se ha asociado con una reducida prevalencia de adenomas colorrectales [18]. Por otra parte, el calcio y la vitamina D se han vinculado a la ruta de la β -catenina/E-cadherina, la cual se ve alterada en la mayoría de CCRs. Podemos destacar el posible carácter preventivo del consumo de análogos de la vitamina D que promoverían la diferenciación de las células de CCR [19]. Por otro lado, la influencia del magnesio (Mg) de la dieta en relación al riesgo de padecer CCR muestra resultados controvertidos [10]. Algunos autores afirman que el Mg inhibe la inflamación relacionada con la carcinogénesis en ratones, indicando su posible valor quimiopreventivo en CCR [20], mientras que otros rechazan esta asociación [21]. En el mismo sentido, se han obtenido resultados con la vitamina B6 y el folato [22].

1.1.2.2. Factores genéticos

La gran mayoría de los CCRs (80%) aparecen en la población por adquisición de mutaciones espontáneas como consecuencia de los factores ambientales a los cuales nos vemos sometidos a diario. Sin embargo, el 20% de los CCRs se han relacionado con factores genéticos [23] y el 5% del total con factores genéticos familiares (mutaciones en la línea germinal de genes

supresores) [24]. Entre los diferentes genes alterados en el CCR [23] podemos destacar:

- *Gen poliposis adenomatosa coli (APC)*: las mutaciones en el gen *APC* son las principales responsables de la adquisición de la poliposis adenomatosa familiar, encontrándose mutado en el 66% de los tumores esporádicos y suponiendo un riesgo de padecer CCR prácticamente en el 100% de los casos [25].

- *Gen p53*: la proteína p53 se encarga del control del ciclo celular de G1 a S mediante la inducción de la apoptosis. En condiciones de estrés o daño del ADN, aumenta la expresión de p53 a través de p21, dando lugar al bloqueo en G1. En los individuos con *p53* mutado, se acumulan más rápidamente las mutaciones, favoreciendo la transformación de adenoma a adenocarcinoma de colon [23].

- *Gen deletado en cáncer de colon (DCC)*: es un gen supresor de tumores que se encuentra alterado entre un 70 y 80% de cánceres de colon [23].

- *Genes relacionados con la reparación del ADN*: el cáncer de colon hereditario no polipósico (HNPCC) se ha asociado a la alteración del tamaño de los microsatélites, que son inestables prácticamente en todos los pacientes con HNPCC. Se ha podido observar que esta modificación es debida a alteraciones en los genes: *hMSH2*, *hMLH1*, *hPMS1*, *hPMS2* y *hMSH6*. Las mutaciones de *APC* y/o *p53* son raras en HNPCC o son adquiridas después de la inestabilidad de los microsatélites (MSI) [26,27].

- *Genes de la familia RAS*: los genes RAS (*HRAS*, *KRAS* Y *NRAS*) son protooncogenes que pueden estar mutados en CCR y otros cánceres gastrointestinales. El gen más frecuentemente alterado en CCR es *KRAS* [28], lo que suele ocurrir después de la pérdida de *APC* y antes de la inactivación de *DCC* y *p53* [23].

En la Figura 3 podemos observar un resumen de las diferentes mutaciones durante la tumorigénesis.

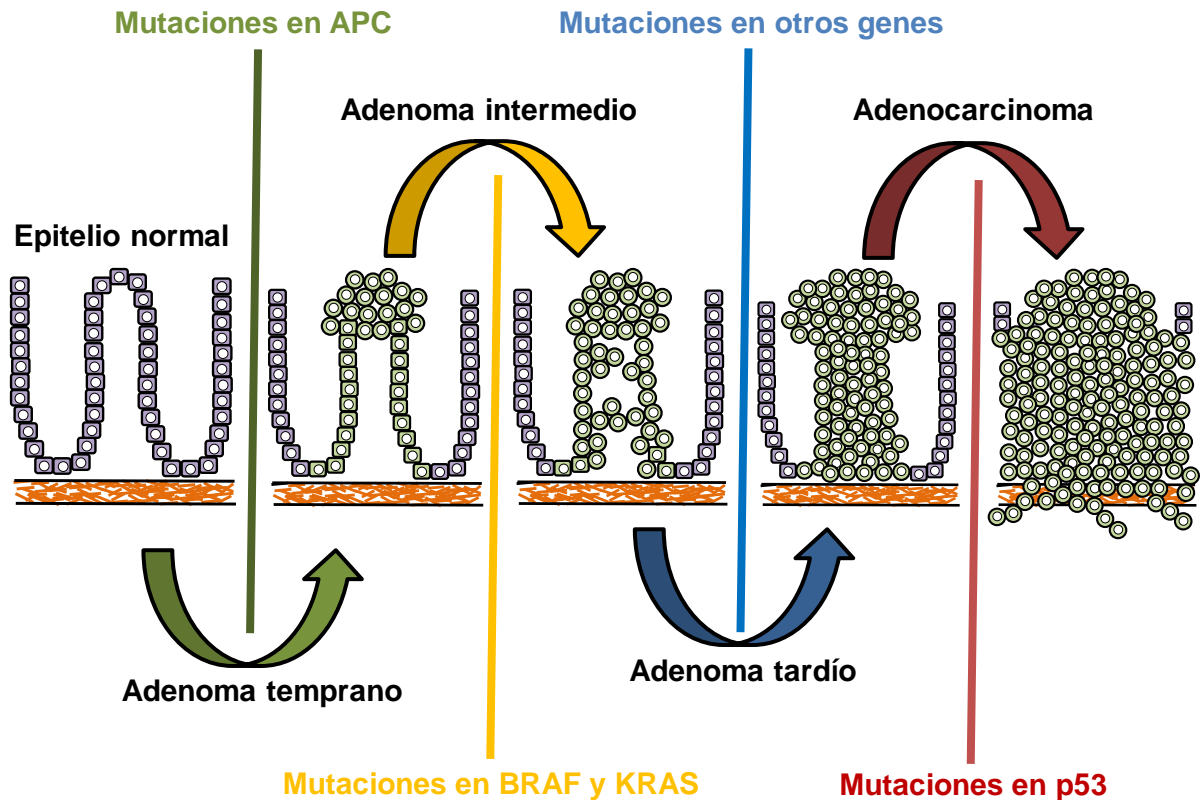


Figura 3. Tumorigénesis en CCR. La mutación APC [25] en el epitelio normal colorrectal promueve la formación del adenoma temprano. Este progresa a estadios más avanzados debido a mutaciones en protooncogenes como *KRAS*, *BRAF* [28] y *DCC* [23] entre otros. Finalmente se adquieren nuevas mutaciones como por ejemplo en *p53* [23] dando lugar al adenocarcinoma, forma ya invasiva.

Considerando estas alteraciones, la carcinogénesis en CCR se puede agrupar en dos grandes vías:

- La *vía clásica* está implicada en la inestabilidad cromosómica causada por alteraciones de los genes supresores de tumores y los protooncogenes. La mayoría de CCRs esporádicos son generados mediante mutaciones o deleciones en adenomas tempranos, seguidos de mutaciones en el protooncogén *KRAS*, pérdida de *SMAD4* [10,29] y/o deleción en *p53*.

- La *vía mutadora* depende de las alteraciones funcionales en los genes del sistema de reparación de errores como el sistema *mismatch repair* (MMR) o O6-metilguanina-ADN-Metiltransferasa (MGMT), dando lugar a la acumulación de mutaciones intragénicas y la progresión del cáncer. En este último caso, la metilación anormal del ADN es una alteración epigenética importante que está íntimamente vinculada al silenciamiento de los genes MMR, incluyendo *hML1* y *hMSH2*. La metilación y pérdida de expresión en estos dos genes ocurre frecuentemente en tumores primarios y en líneas celulares de CCR con inestabilidad de microsatélites [29].

1.1.3. LOCALIZACIÓN

El cáncer de colon puede localizarse en todas sus porciones anatómicas (colon ascendente, transverso, descendente, sigma y recto) siendo más frecuente en las regiones más distales y afectando en menor medida al colon ascendente y transverso [12,30,31]. Dependiendo de su estadio, las células cancerígenas pueden localizarse en todas las capas de su estructura (Figura 4).

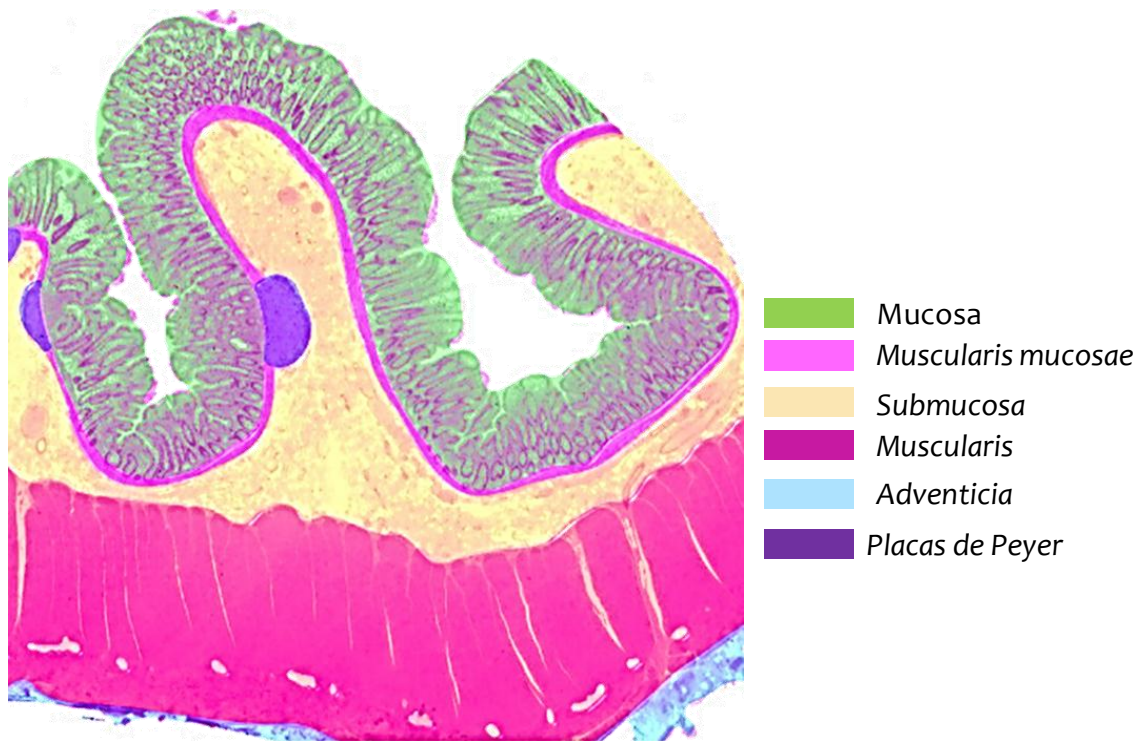


Figura 4. *Capas del colon.* La capa que contacta directamente con la luz del colon es la mucosa, por lo que sufre un continuo desgaste. La continua regeneración de esta capa, aumenta las posibilidades de que se generen mutaciones, siendo el principal punto de inicio del CCR en forma de adenoma. La acumulación de mutaciones en los adenomas promueve la infiltración de las células tumorales y la adquisición del genotipo propio del adenocarcinoma.

1.1.4. ETAPAS DE CRECIMIENTO O ESTADIOS TUMORALES

El patrón de desarrollo a nivel macroscópico del CCR es un proceso que recogen los estadios establecidos por *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), siendo el más ampliamente usado [3,10,32]:

Estadio 0, carcinoma *in situ* o extensión local: en las primeras etapas del CCR únicamente se ve afectada la región más interna, sin llegar a atravesar la *muscularis mucosa*. Esta etapa correspondería al estadio tumoral 0 y debido a su detección precoz los pacientes tienen un buen pronóstico.

Estadio I: en este estadio ya se ven afectadas la *muscularis mucosa* y submucosa sin llegar a atravesar la *muscularis*.

Estadio II: la *muscularis* se ve afectada pero no los ganglios linfáticos circundantes.

Estadio III: a diferencia del estadio anterior, existe afectación de los ganglios linfáticos circundantes siendo un estadio tumoral de peor pronóstico.

Estadio IV: finalmente se da lugar un proceso de diseminación a través del torrente sanguíneo, afectando a órganos alejados del foco cancerígeno, dándose lugar la metástasis. Los pacientes con este estadio presentan peor pronóstico debido al estado avanzado del tumor.

1.1.5. CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER COLORRECTAL

En la mayoría de los pacientes con CCR, el punto de partida es un adenoma o pólipo adenomatoso (tumor benigno de origen epitelial con estructura glandular), el cual adquiere mutaciones (Figura 3) a lo largo del tiempo hasta desarrollar malignidad (adenocarcinoma) [10,4]. De este modo, el 95% de los CCRs son adenocarcinomas por lo que se usa de forma indistinta el término CCR y adenocarcinoma [23]. No obstante, existen otros tipos de cánceres que afectan al colon y el recto (Figura 5).

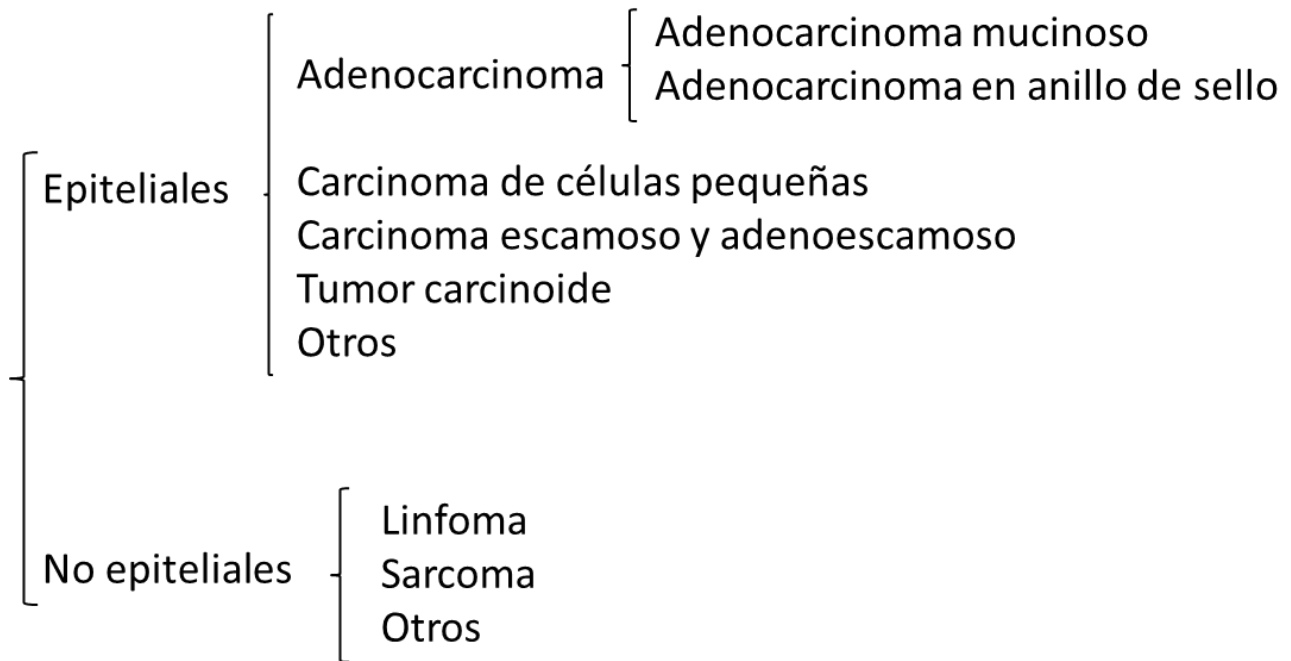


Figura 5. Clasificación de los diferentes tipos de CCRs. El 95% de los CCRs son adenocarcinomas.

1.1.5.1. Cáncer Epitelial

1.1.5.1.1. Adenocarcinoma

La principal característica de este tipo de CCR (Figura 6) es que se inicia en células glandulares que secretan *mucus* para lubricar el colon y el recto [4].

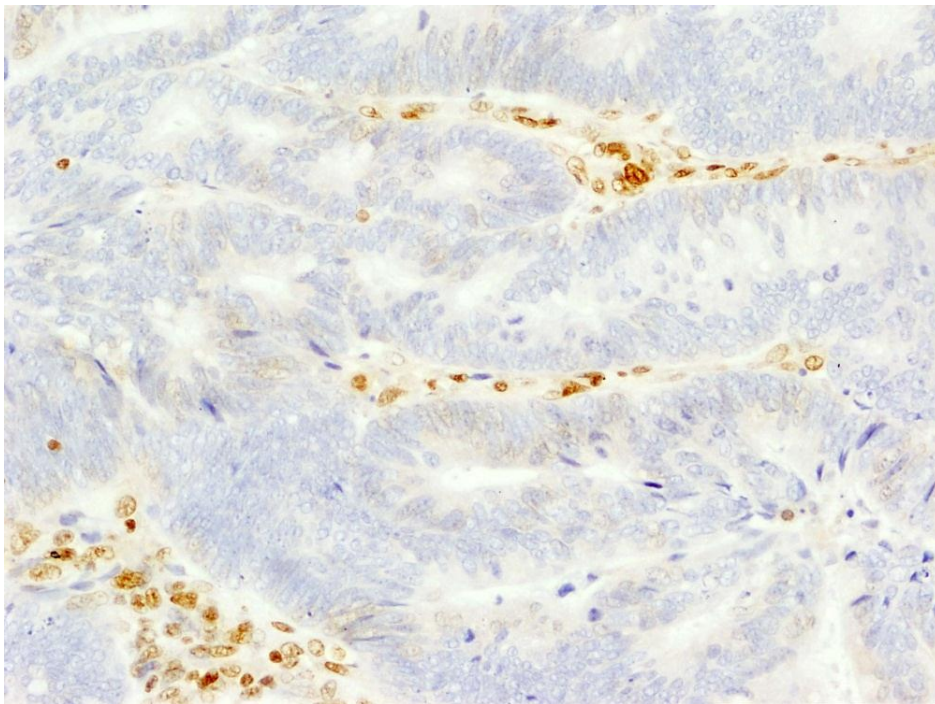


Figura 6. Adenocarcinoma de CCR. La imagen muestra la estructura típica glandular con displasia (20X). Tinción de hematoxilina.

Dentro de este grupo, en función de la cantidad y ubicación de la secreción de moco [4], distinguimos varios subtipos:

-*Adenocarcinoma en anillo de sello*, cuando posee más del 50% de las células con mucina intracitoplasmática (Figura 7A) desplazando el núcleo hacia la región periférica (morfología en “anillo de sello”).

-*Adenocarcinoma mucinoso*, en el cual más del 50% de la lesión está compuesta por mucina extracitoplasmática (Figura 7B).

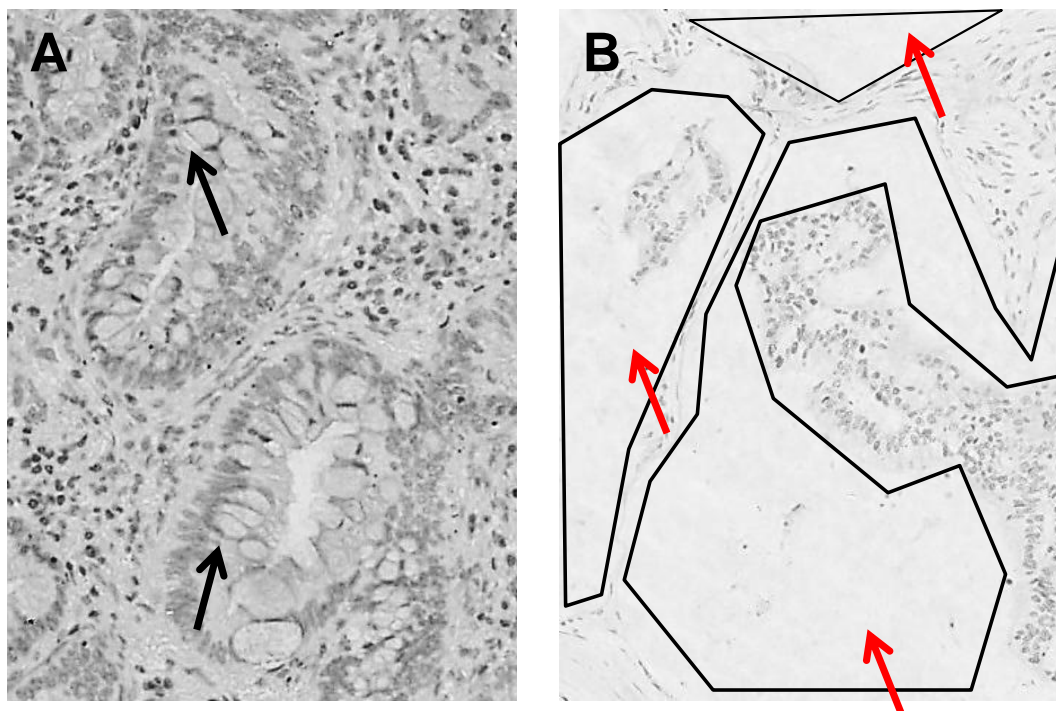


Figura 7. *Subtipos de adenocarcinoma.* **A.** Adenocarcinoma en anillo de sello. Las células indicadas con flechas negras presentan desplazamiento del núcleo hacia la periferia (20x). **B.** Adenocarcinoma mucinoso. La mayoría de la masa tumoral se ve ocupada por grandes lagunas de mucina indicadas mediante flechas rojas (10x).

1.1.5.1.2. Carcinoma de células pequeñas

Representa menos del 1% del total de CCRs, siendo un subtipo bastante agresivo e histológicamente parecido al de carcinoma de células pequeñas de pulmón [32].

1.1.5.1.3. Carcinoma escamoso y adenoescamoso

Se caracteriza por presentar núcleos de diferenciación a tejido escamoso [4], siendo extremadamente raro que la totalidad del tejido tumoral presente diferenciación a células escamosas [33]. Su incidencia es del 0,06% al 0,18% [34] de CCRs.

1.1.5.1.4. Tumores carcinoides

Este tipo de tumor neuroendocrino [35] proviene de células especializadas en la producción de hormonas [10] y presenta el peor pronóstico de todos los tumores carcinoides gastrointestinales [35,36].

1.1.5.2. Cáncer no epitelial

1.1.5.2.1. Linfomas

Los linfomas de colon pueden iniciarse en los nodos linfáticos de los distintos órganos [10] y representan de un 0,2 a un 1,2 % del total de tumores malignos de la región colorrectal. Es un tipo de tumor poco frecuente en colon y recto representando del 10 al 20 % de todos los linfomas en el tracto gastrointestinal [37].

1.1.5.2.2. Sarcomas

Este tipo de tumor, que abarca a los tumores que se inician en los vasos sanguíneos, músculo o tejido conectivo del colon y recto [10], es muy poco frecuente representando tan solo el 0,1% de los tumores colorrectales [38].

1.1.6. DETECCIÓN Y DIAGNÓSTICO

1.1.6.1. Pacientes asintomáticos y screening

Las pruebas de *screening* tienen por objetivo detectar a los pacientes asintomáticos en los primeros estadios de la enfermedad y evitar el progreso a estados más avanzados. Incluyen las técnicas endoscópicas como sigmoidoscopia, colonoscopia, técnicas de imagen como el enema de bario de doble contraste y la colonoscopia virtual (*CT colonography*) y técnicas enfocadas a la detección de sangre, ADN y biomarcadores ocultos en heces [10].

1.1.6.2. Pacientes sintomáticos y detección

La sintomatología del CCR incluye la aparición de cansancio, pérdida significativa de peso, náuseas, disminución del apetito, cambios en los hábitos intestinales y dolor abdominal. Por otra parte, el cáncer rectal incluye frecuentemente la presencia de sangrado rectal [39].

1.1.6.3. Pruebas diagnósticas indirectas: análisis de sangre y/o heces

El análisis de sangre es la primera aproximación diagnóstica para determinar procesos anémicos asociados al sangrado como consecuencia del CCR. Por lo tanto, es necesario realizar un recuento sanguíneo completo. Además, la determinación de las enzimas hepáticas nos permite valorar indirectamente la presencia de metástasis hepáticas en estadios más avanzados [10].

La determinación de biomarcadores para CCR son controvertidas, siendo de uso habitual la detección del antígeno carcinoembrionario (CEA) [40]. Este marcador se encuentra sobreexpresado en las células de adenocarcinoma, aunque también puede estar elevado en otras situaciones [41-43]. En estadios tempranos presenta una baja sensibilidad, detectando sólo un tercio de los pacientes [40]. Sin embargo, detecta el 70% de los enfermos que padecen CCR avanzado [44] y es capaz de indicar la presencia de células cancerígenas residuales tras la cirugía [40,42]. Por otra parte, el antígeno de carbohidrato 19.9 (CA19.9) [45] se ha asociado con un pronóstico adverso en CCR [46-48]. A pesar de esto no es un buen biomarcador en las etapas más tempranas de este tumor [42].

1.1.6.4. Pruebas diagnósticas directas: biopsias y pruebas de imagen

1.1.6.4.1. Biopsias

Las biopsias obtenidas durante la colonoscopia e incluidas en parafina u OCT permiten un diagnóstico directo del CCR incluyendo el grado de diferenciación del tumor, el tipo de CCR, la posibilidad de determinar el estado de *KRAS* o *BRAF*, para seleccionar qué pacientes pueden beneficiarse del tratamiento con cetuximab (Erbix®) y panitumumab (Vectibix®) y el análisis de la inestabilidad de los microsatélites, entre otros [10].

1.1.6.4.2. Pruebas de imagen

Las técnicas de imagen como la tomografía axial computarizada (TAC), ultrasonidos, resonancia magnética, técnicas asociadas a rayos X, tomografía por emisión de positrones (PET) y angiografía, permiten detectar masas tumorales o pólipos [10] (Figura 8).

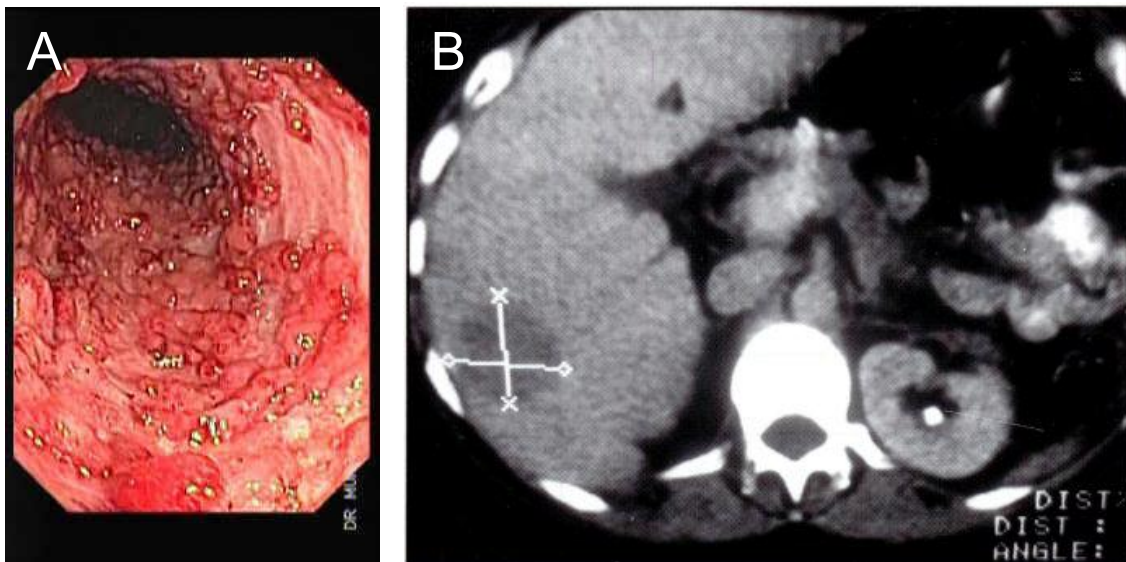


Figura 8. Técnicas de detección de CCR. **A.** Colonoscopia de paciente con poliposis adenomatosa, **B.** TAC de paciente con CCR metastatizado en hígado.

1.1.7. TERAPIA CONVENCIONAL EN CÁNCER DE COLON

Los principales tratamientos para el CCR son la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia. La elección depende de múltiples factores pero el factor más determinante es el estadio tumoral [49].

1.1.7.1. Tratamiento quirúrgico primario

El principal tratamiento utilizado para el CCR es la resección tumoral mediante técnicas de laparoscopia, que presentan múltiples ventajas respecto a la resección tumoral convencional, como son la reducción del dolor y la fatiga postoperatoria [50-53]. Además, hay que considerar la polipectomía como una medida preventiva que permite eliminar los pólipos adenomatosos antes de acumular mutaciones y dar lugar al adenocarcinoma [54-56].

1.1.7.2. Quimioterapia adyuvante

El principal fármaco utilizado como quimioterapia adyuvante hasta el año 2000 ha sido el 5-FU. Se ha observado que pueden beneficiarse los pacientes que se encuentran en el estadio III siendo controvertida la quimioterapia adyuvante en el estadio II [57-59]. A partir del 2000 aparecieron nuevas terapias que mencionaremos posteriormente.

1.1.7.3. Radioterapia adyuvante

La radioterapia, a diferencia de la cirugía y quimioterapia, no se encuentra recomendada para el tratamiento de cáncer de colon, pero sí en el cáncer de recto [60]. A pesar de esto, la radioterapia se utiliza en cáncer de colon en algunos casos, incluyendo cuando existe algún factor de riesgo como presentar una extensión tumoral T4, perforación local, obstrucción o enfermedad residual después de la resección y cuando el tumor se encuentra en una ubicación inmóvil [61-66].

1.1.8. CÁNCER DE COLON: TRATAMIENTO TUMORAL SEGÚN ESTADIO

1.1.8.1. *Estadio 0 o I*

Se realiza cirugía sin quimioterapia posquirúrgica [60].

1.1.8.2. *Estadio II*

Se consideran dos opciones que incluyen o no quimioterapia posquirúrgica. La quimioterapia adyuvante es aplicada, con las mismas pautas que en el estadio III, cuando existe algún factor de riesgo como extensión tumoral T4, obstrucción o perforación tumoral, G3 o tumor de alto grado, número de ganglios extraídos y analizados al menos 12 [67], aumento de los niveles preoperatorios de CEA, invasión venosa, linfática o perineural extratumoral y positividad de márgenes quirúrgicos [68].

1.1.8.3. *Estadio III*

Se recomienda quimioterapia adyuvante posquirúrgica durante 6 meses [69], existiendo varios tipos de tratamientos:

Combinaciones con oxaliplatino. *Régimen FOLFOX* que es el acrónimo de leucovorin (ácido *FOLínico*), Fluorouracilo y OXaliplatino, el cual se suministra mediante infusión intravenosa quincenal [70]. Hay varios regímenes dependiendo de la dosis de cada fármaco pudiendo ser FOLFOX 1-7 [70,71]. Una alternativa es el *Flox* que ha demostrado tener una eficacia superior que 5-fluorouracilo/leucovorin pero con una mayor toxicidad [60,72].

Uno de los componentes más relevantes en esta terapia es el 5-FU (Figura 9), éste ejerce su efecto antineoplásico por tres vías diferentes: en primer lugar, inhibe la timidilato sintasa evitando la síntesis de timidina, en segundo lugar, promueve la inhibición de la función del ácido ribonucleico (ARN) y síntesis proteica y en último lugar se incorpora al ADN y provoca su ruptura [73]. Al tratar distintas líneas celulares (DLD-1, SW620, Lovo) de CCR

con 5-FU se han observado mediante citometría de flujo tres comportamientos propios de un agente citostático: pérdida o acumulación de la fase celular S, bloqueo en G2/M y detención en G1-S [74]. A largo plazo, este desequilibrio desemboca en la muerte celular [73].

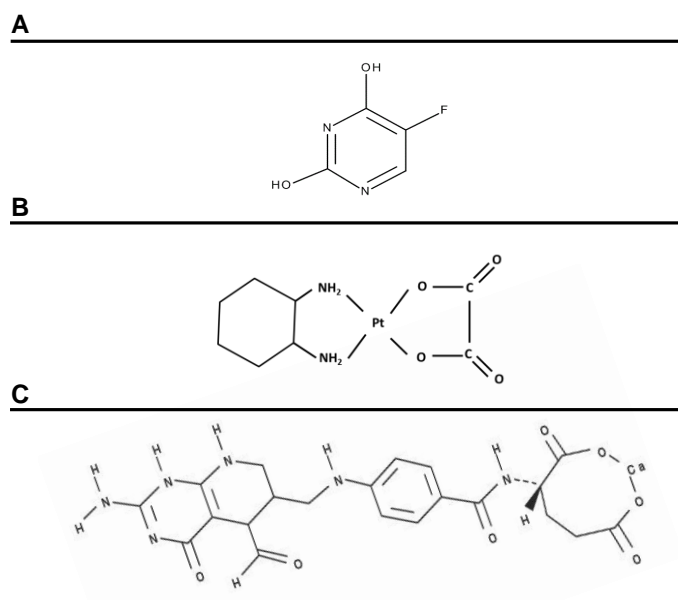


Figura 9. Estructura molecular. **A.** 5-fluorouracilo, **B.** oxaliplatino, **C.** leucovorin.

Por otra parte, el oxaliplatino (Figura 9) es un agente alquilante citotóxico que actúa, principalmente, causando entrecruzamientos en el ADN, intra e intercatenarios, mediante aductos con el N de las guaninas del ADN, inhibiendo su síntesis [75], lo que finalmente desemboca en apoptosis. El complejo proteico MMR podría evitar la alquilación por oxaliplatino debido a su efecto opuesto [76-78]. Algunos autores han analizado el estado de MMR frente a este tipo de terapias, no observándose valor predictivo frente a FOLFOX [78]. A pesar de esto, la deficiencia de este complejo se ha asociado con el CCR hereditario (HNPCC) y se sabe que tiene un papel fundamental en el desarrollo de este tipo de cáncer [79].

En último lugar, el leucovorin o ácido folínico (Figura 9) es un miembro de la familia de los folatos, abarcando entre un 10 al 20% del total de folatos de

la célula. Este compuesto es utilizado para proteger frente a la toxicidad del metotrexato [80]. Por otra parte, se ha observado que el leucovorin potencia el efecto del 5-FU mediante la estabilización de las interacciones entre el 5-FU y la timidilato sintasa [81]. En estudios recientes (>3000 pacientes), se ha demostrado que el ácido folínico mejora la respuesta y la SG cuando se combina con el 5-FU [82]. Por otra parte, se ha observado que la administración oral del leucovorin, frente a otras fluoropirimidinas como capecitabina, incrementa la toxicidad gastrointestinal o reacciones en la piel de pies y manos sin potenciar el efecto del fármaco principal del tratamiento [83].

Fluoropirimidinas orales

Capecitabina: es un profármaco del 5-FU, que requiere de tres enzimas localizados en el hígado y presentes también en el tejido tumoral (carboxilesterasa, citidina-desaminasa, timidina-fosforilasa). Se activa especialmente en el tumor reduciendo los efectos secundarios en otros tejidos [73]. Se ha observado en estudios comparativos que la capecitabina presenta una SLE mejorada y menos efectos adversos que 5-FU/LV en bolo [84].

Tegafur/Leucovorin (UFT/LV oral): UFT está formado por uracilo y tegafur en un ratio molar 4:1. En primer lugar, el tegafur actúa como profármaco del 5-FU, siendo lentamente metabolizado mediante el citocromo P540 y dando como resultado el 5-FU. Por otra parte, el uracilo inhibe competitivamente el metabolismo del 5-FU dando lugar a una concentración elevada de 5-FU en el tumor y en el plasma [85]. Algunos estudios han observado que la terapia basada en UFT/LV conduce a una SLE y SG similar a la basada en 5-FU/LV en bolo. Además, apreciaron que los tratamientos eran equitoxicos y bien tolerados [86]. Por otra parte, otros autores indican que esta terapia es más segura que la terapia mediante bolo de 5-FU/LV en CCR metastásico [87].

5-FU/LV en infusión quincenal de 48 h: La principal diferencia de esta terapia con el resto es el método de administración, ya que se administra mediante infusión intravenosa. En ensayos clínicos se observa una SG y SLE parecida, pero inferior toxicidad que la terapia de 5-FU/LV en bolo [88-90].

Raltitrexed (Tomudex®). Este fármaco es un inhibidor de la timidilato sintasa que actúa como un citostático promoviendo la fragmentación del ADN y la muerte celular [91]. No obstante, los ensayos clínicos realizados no indican ventajas significativas frente a 5-FU/LV en bolo [92-94] y sólo en algunos estudios se ha observado una reducción de los efectos secundarios (diarrea, leucopenia, etc) [93]. Además en algunos ensayos clínicos se ha observado que produce toxicidad hematológica y gastrointestinal [94].

Radioterapia: La radioterapia es una de las terapias no recomendadas para CCR en el estadio III [61]. Estudios en fase III, de pacientes en estadio III indican que el uso de radioterapia no presenta diferencias en la SG o SLE respecto al tratamiento sin radioterapia, presentando una mayor toxicidad los pacientes tratados mediante quimioradioterapia (QRT) [95].

Otras terapias descartadas: Del mismo modo que la radioterapia, el irinotecán (CPT-11), metotrexato, el interferón, la inmunoterapia, 5-FU administrado en dosis altas e infusiones de 5-FU en vena porta o intraperitoneales han sido descartadas para tratar el cáncer de colon en estadio III [61].

1.1.8.4. Estadio IV o cáncer de colon recidivante

El tratamiento de este estadio presenta múltiples opciones tal y como refleja el Instituto Nacional del Cáncer [49].

La cirugía es especialmente aplicada cuando se detecta presencia de metástasis hepáticas, lo que ocurre en un 50% de estos pacientes [96]. La

resección de dichas metástasis aumenta de forma significativa la supervivencia de los pacientes [97]. La selección de los pacientes para la resección se basa en los siguientes criterios [49]:

- Número limitado de lesiones.
- Lesiones con ubicación intrahepática.
- Ausencia de compromiso vascular importante.
- Enfermedad extrahepática limitada o ausente.
- Reserva hepática funcional suficiente.

Además, un tratamiento quimioadyuvante mediante infusión hepática cuando la metástasis es irresecable aumenta las posibilidades de éxito y de aplicabilidad de la cirugía [98]. Cuando no es posible realizar la resección quirúrgica, las alternativas son la ablación mediante criocirugía [99], radiofrecuencia [100] y quimioembolización [101]. La quimioterapia adyuvante después de la resección o ablación tumoral mediante infusión arterial de fluorodesoxiuridina [102,103] o 5-FU [104] previene la recidiva, aunque los resultados son contradictorios respecto a la supervivencia [49,105].

Por otra parte, aunque la única terapia potencialmente curativa para estos pacientes es la cirugía, el desarrollo de regímenes quimioterapéuticos complejos, que incluyen fármacos que comentamos a continuación, han mejorado los resultados clínicos (Tabla 2) [49].

Régimen	Fármacos utilizados
FOLFIRI, Douillard	Ácido fólico, 5-FU e irinotecán
XELOX y CAPOX	Capecitabina y oxaliplatino
FOLFOX y FUFOX	Oxaliplatino, leucovorin y 5-FU
FUOX	5-FU y oxaliplatino
IFL	Irinotecán, 5-FU y leucovorin
XELIRI y CAPIRI	Capecitabina e irinotecán

Tabla 2. Resumen de la composición farmacológica de los distintos regímenes para el tratamiento de los pacientes con cáncer de colon en estadio IV.

Irinotecán: El irinotecán o CPT-11 (presente en varios regímenes como FOLFIRI) ejerce su efecto citotóxico mediante la inhibición del enzima nuclear topoisomerasa I [106]. La función principal de esta enzima es resolver problemas estructurales asociados a la replicación, recombinación, transcripción del ADN y remodelación de la cromatina mediante la realización de cortes o *nicks* en el ADN [107]. En condiciones normales, los cortes realizados al ADN son rápidamente reparados. Sin embargo, en presencia de irinotecán la topoisomerasa forma un complejo covalente que ralentiza la religación de los huecos generados. De este modo, la enzima bloqueada choca con la horquilla de replicación produciendo roturas letales en la doble cadena de ADN e induciendo la muerte celular [108]. Varios estudios en pacientes con CCR en estadio tumoral III no muestran ventajas significativas de esta terapia frente a otras [109]. Sin embargo, en estadios más avanzados (estadio IV) [106,110], CCR recurrente [111] o en cáncer de colon quimiorresistente irresecable [112], FOLFIRI o combinaciones con irinotecán arrojan resultados satisfactorios. Cabe destacar que en este estadio también se usa FOLFOX como terapia combinada con FOLFIRI [113].

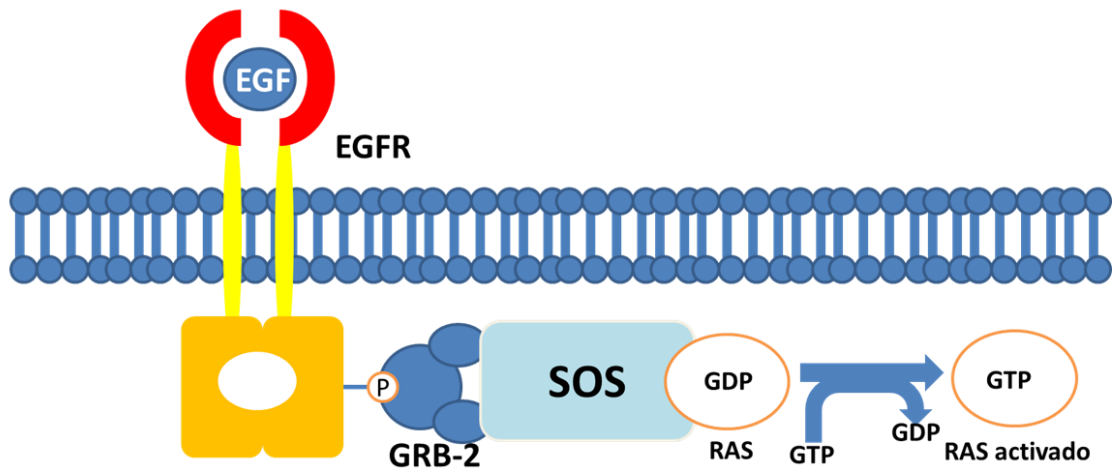
Bevacizumab: Este anticuerpo tiene como principal función la inhibición de la angiogénesis mediante unión al *vascular endothelial growth factor* (VEGF) [114]. VEGF es un elemento clave de la angiogénesis durante la embriogénesis, pero también en el crecimiento de tumores [115]. VEGF interactúa con dos receptores con actividad tirosina quinasa, VEGFR-1 y 2. Este anticuerpo se ha añadido a múltiples regímenes como IFL [116], FOLFOX [117], FOLFIRI [118], XELIRI [119] mejorando los resultados.

Ziv-aflibercept y regorafenib: Ambos fármacos han sido aprobados recientemente por la *Food and Drug Administration* (FDA) para el tratamiento de CCR avanzado [49]. El Ziv-aflibercept actúa uniéndose a VEGF-A, VEGF-B y *placental growth factor* (PlGF) [120] y se ha añadido a regímenes como FOLFIRI, lo que ha mejorado la respuesta al tratamiento [121]. Por otro lado, regorafenib es un inhibidor de múltiples tirosinas quinasas incluyendo entre ellas los receptores de VEGF [120]. Es el primer inhibidor de tirosinas quinasas

que presenta un beneficio para los pacientes con CCR metastásico abriendo las puertas a una nueva línea terapéutica [122].

Cetuximab: Cetuximab es un anticuerpo monoclonal quimérico tipo IgG1 que se une al *epidermal growth factor receptor* (EGFR) [123]. Existen evidencias de que mejora el efecto de terapias como FOLFOX [124] y FOLFIRI [125] en CCR metastásico. Del mismo modo, se ha observado que una parte de la población con CCR metastásico no responde como cabría esperar a este fármaco. La búsqueda de nuevos biomarcadores ha demostrado que mutaciones en *KRAS*, *BRAF*, *NRAS* y *PIK3CA* afectan directamente la respuesta al tratamiento [126]. Esto es debido a que *KRAS* es una proteína citoplasmática que se une a GTP. Esta unión promueve el retraso de la señalización celular de proliferación e inhibe la apoptosis actuando como un oncogén. Las mutaciones en *KRAS* bloquean la actividad GTPasa y promueven la conformación *KRAS*-GTP. De este modo, está activada de forma constitutiva la ruta RAS/RAF/MAPK que se encuentra por debajo de EGFR, dejando de depender de su ligando como muestra la Figura 10. Por esta razón, las terapias con cetuximab, que bloquean el EGFR, pasan a ser inocuas para el tumor [127].

A) Ruta RAS salvaje



B) Ruta RAS mutado

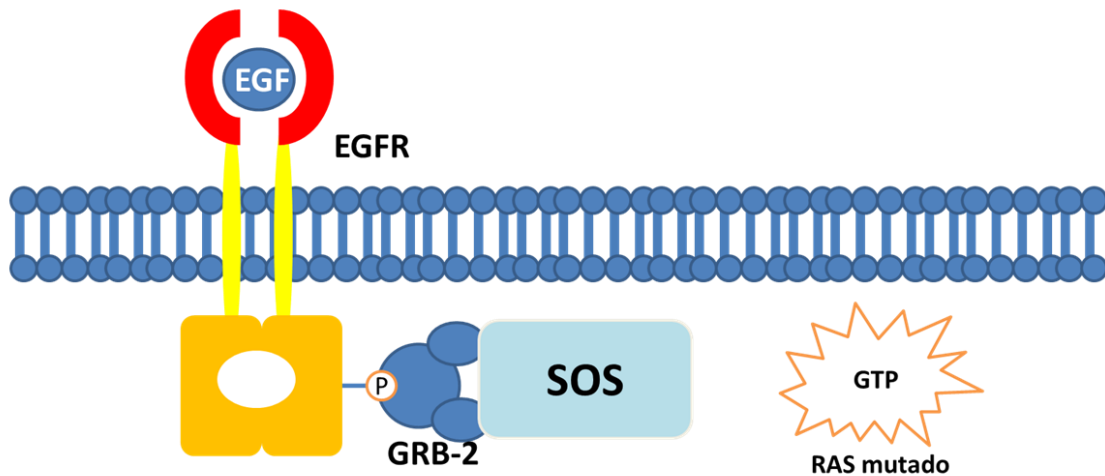


Figura 10. Ruta **A.** Con RAS salvaje, **B.** Con RAS mutado. Las mutaciones en KRAS bloquean la actividad GTPasa y promueven la conformación KRAS-GTP. De este modo, está activada de forma constitutiva la ruta RAS/RAF/MAPK que se encuentra por debajo de EGFR, dejando de depender de su ligando epidermal grow factor (EGF).

El primer biomarcador analizado fue KRAS observándose que parte de los pacientes con KRAS *wild type*, no respondían al tratamiento, por esta razón se están analizando nuevos marcadores y mutaciones que puedan actuar en la ruta, tales como NRAS, BRAF, PIK3CA, EGFR y sus ligandos, *Transforming Growth Factor-A* (TGFA), Amfiregulina (AREG) y Epiregulina (EREG) [128].

Panitumumab: Este es un anticuerpo monoclonal recombinante humano tipo IgG2 frente a EGFR. Al igual que cetuximab, este anticuerpo está indicado para el tratamiento de pacientes con cáncer de colon metastásico que no presentan el gen *KRAS* mutado. Del mismo modo, se ha combinado con FOLFIRI, FOLFOX y otros fármacos observándose mejoras en la respuesta al tratamiento [129].

1.1.9. CÁNCER DE RECTO: TRATAMIENTO SEGÚN ESTADIO

El elemento esencial que determina el tratamiento del cáncer de recto, al igual que en el cáncer de colon, es el estadio de la enfermedad [130], que puede ser:

1.1.9.1. Estadio 0 o I

Dada la poca profundidad de la infiltración tumoral se recomienda la microcirugía endoscópica transanal [49] en el caso de que haya riesgo de recurrencia (T2) la QRT y exéresis total del mesorrecto con resección anterior baja o resección abdominoperineal [130].

1.1.9.2. Estadio II o III

El tratamiento convencional es la QRT preoperatoria, con 5-FU [49, 60,130] o capecitabina [131], con escisión mesorrectal total con resección anterior baja o abdominoperineal. También existe la opción de realizar quimiorradiación posoperatoria en pacientes que no la recibieron en la fase preoperatoria. Finalmente, es recomendable de 4 a 6 meses de quimioterapia posoperatoria con 5-FU [49,60,130].

1.1.9.3. Estadío IV

El tratamiento es equivalente al de cáncer de colon (se considera como CCR de forma indistinta) a excepción de la parte de cirugía que es la propia de la topología de la región [49,60].

1.2. CANCER STEM CELL (CSC)

Los tejidos del organismo precisan de una continua regeneración que es llevada a cabo por las células madre [132,133]. La continua división de estas células aumenta las probabilidades de acumular mutaciones que alteren los mecanismos normales de división y proliferación celular [134]. Estas alteraciones implican cambios genéticos y epigenéticos que afectan a genes de reparación, genes supresores de tumores y factores de crecimiento (modelo de *Vogelstein*) [135]. Este modelo explica la transformación tumoral pero no la complejidad y heterogeneidad del tumor [136]. Durante mucho tiempo, dos modelos han intentado interpretar esta complejidad: el modelo estocástico y el modelo jerárquico.

El modelo estocástico hipotetiza que todas las células que constituyen el tumor son capaces de formarlo y que la heterogeneidad que se observa en la población tumoral depende de factores externos generados por el microambiente y alteraciones genéticas aleatorias. De este modo, el tumor estaría conformado por células genéticamente idénticas o clones [137], las cuales podrían acumular mutaciones o se podrían ver afectadas por factores extrínsecos y dar lugar a subclones que presenten distintas propiedades, como la capacidad de metastatizar, la quimiorresistencia y/o radorresistencia y la mayor capacidad de proliferación, obteniendo finalmente una población conformada por varios subclones (Figura 11) [138].

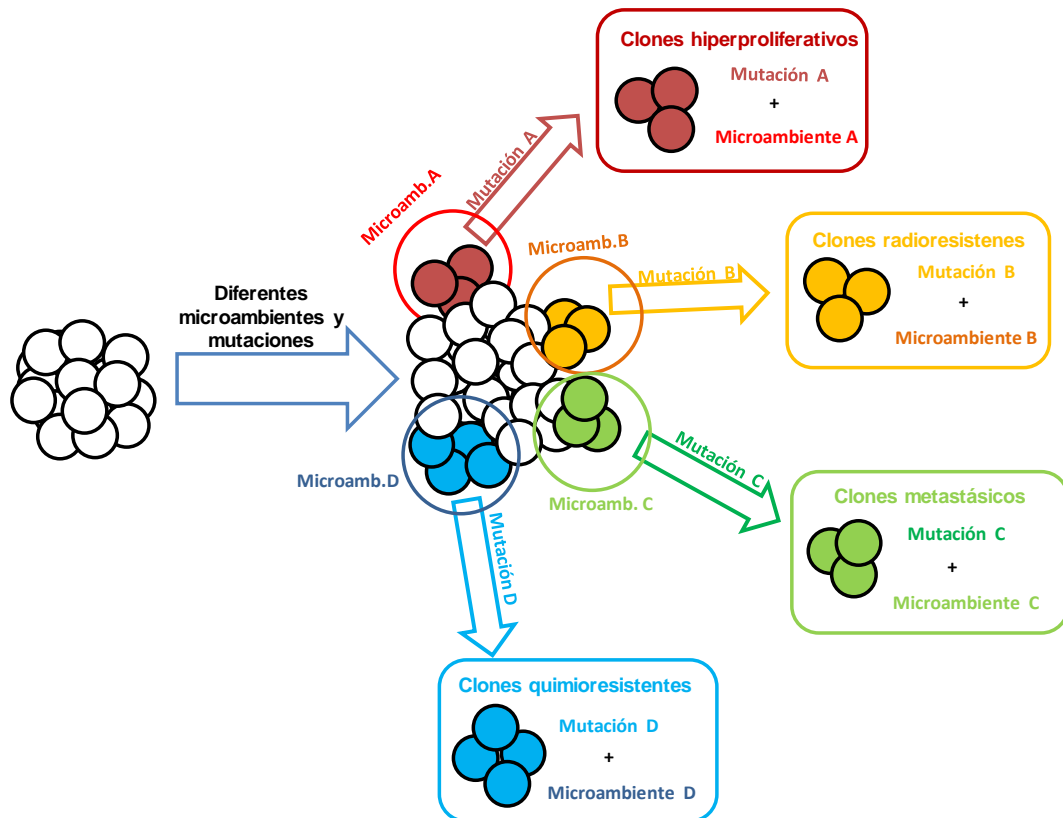


Figura 11. Modelo estocástico. Las condiciones ambientales, al igual que las mutaciones aleatorias y la selección clonal, promueven la obtención de distintos subclones con diferentes propiedades.

El modelo jerárquico aplica el concepto de células madre cancerígenas considerando éstas como una pequeña subpoblación que presenta propiedades compartidas con las células madre, entre las que están la capacidad de diferenciación y autorrenovación. Algunos autores han llegado a considerar la carcinogénesis como una organogénesis aberrante [136]. En este modelo, una parte de las células que forman el tumor tienen capacidad tumorigénica en ratones inmunodeficientes, presentan marcadores de membrana específicos y pueden desarrollar los diferentes tipos celulares que se encuentran en un tumor (Figura 12) [138].

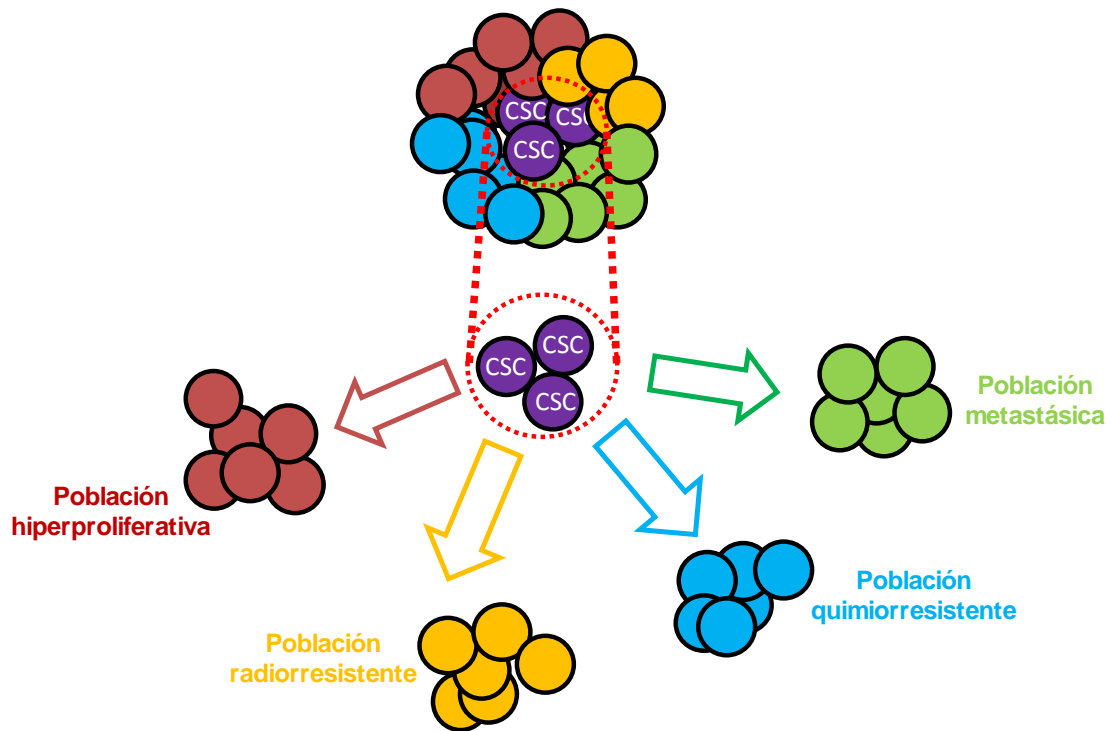


Figura 12. Modelo jerárquico. Según este modelo, únicamente las CSC son capaces de diferenciarse y dar lugar a los distintos tipos celulares que conforman el tumor y mantener al mismo tiempo la capacidad de autorrenovarse.

De este modo, las CSC presentarían tres características básicas que las definen [139]:

1. Capacidad de autorrenovarse de forma indefinida.
2. Capacidad de generar todos los tipos celulares que forman el tumor.
3. Presencia de marcadores específicos propios.

La primera característica asociada a la autorrenovación es la división asimétrica. Se ha observado que en las CSCs coexisten la división asimétrica, en la cual a partir de una CSC se obtiene una célula CSC y otra célula no CSC (fenómeno propio de las células madre de tejido normal) y la división simétrica por la cual se obtienen dos CSCs a partir de una célula CSC. De este modo, en los tumores se observa un mayor número de células CSCs que el que cabría esperar de células madre no tumorales en tejido normal [140]. Por otra parte, se piensa que las CSCs tienen un ciclo celular mucho más pausado (parecido al de las células madre), presumiblemente debido a que se encuentran en una fase tipo G_0 . Todo indica que las CSCs son una población celular quiescente [141]. Por último, las CSCs presentan alteraciones en los mecanismos de reparación del ADN, como las telomerasas y los factores antiapoptóticos, evitando de este modo la inducción de la apoptosis. Además, se ha observado la sobreexpresión de un conjunto de transportadores tipo *ATP-binding cassette* (ABC) que actúan frente a los fármacos utilizados en la terapia contra el cáncer, lo que favorece su quimiorresistencia [142] y se ha asociado a la radiorresistencia, observándose marcadores sobreexpresados del tipo de ALDH1, BMI1 y TGF- β [143]. Además, las CSCs se han correlacionado con la presencia de células tumorales circulantes que promueven la metástasis [144,145]. Este conjunto de propiedades sugieren que las CSCs son una población que favorece la reaparición de la enfermedad y metástasis (Figura 13).

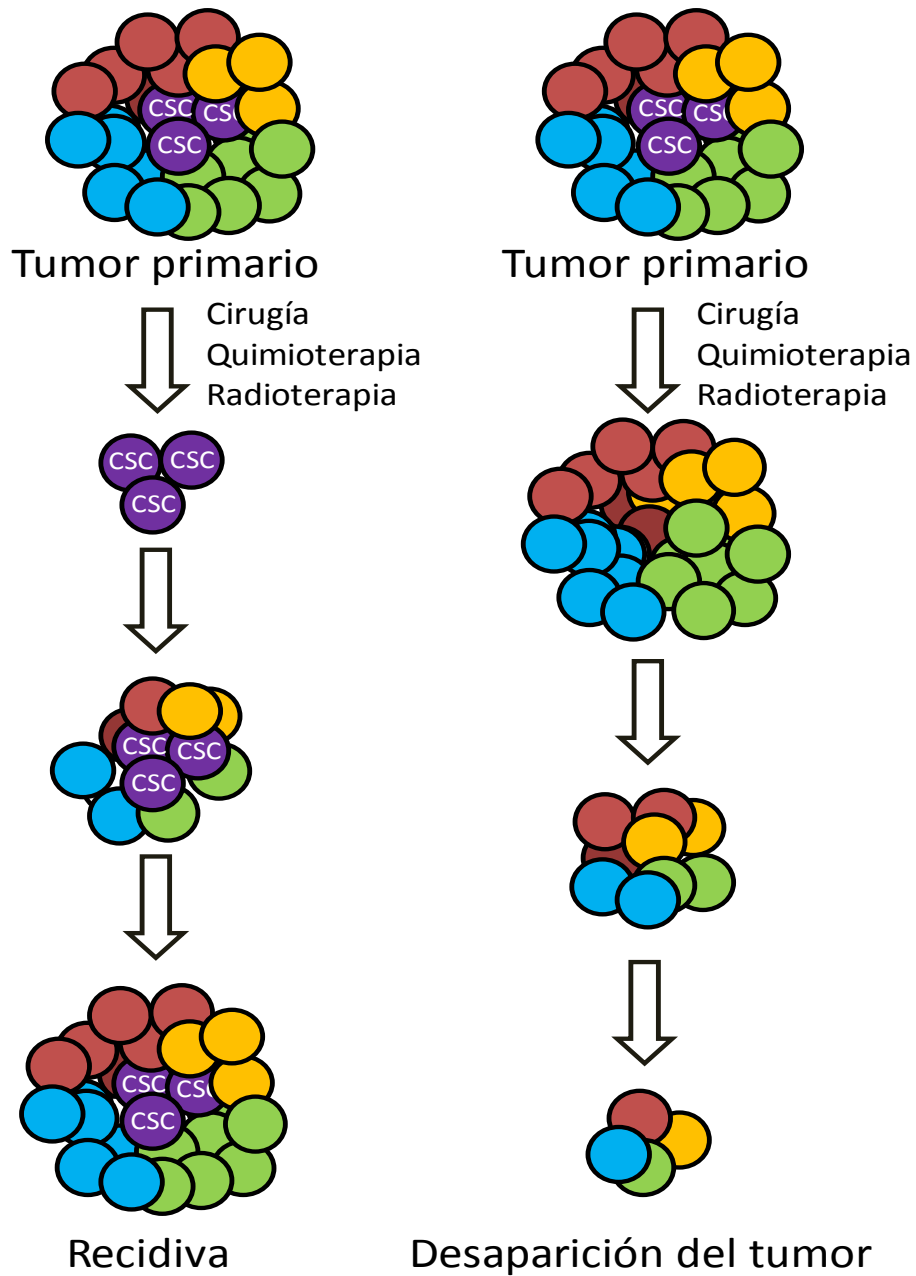


Figura 13. CSC y recidiva. Al realizar el tratamiento, si no se eliminan las CSCs se promueve la reaparición de la enfermedad o recidiva. Si fuésemos capaces de diseñar una terapia que eliminase las CSCs se promovería la desaparición del tumor.

1.2.1. CÁNCER DE COLON Y CANCER STEM CELL

La mucosa del colon está en continuo desgaste y regeneración, reemplazándose completamente en humanos a los 5 días [146]. Para el mantenimiento de la homeostasis del epitelio es necesaria la presencia de las células madre intestinales, que se encargan de sustituir las células que van desapareciendo mediante la proliferación y diferenciación [147]. Las células madre colónicas se encuentran en el fondo de las criptas de Lieberkuhn. Las células madre proliferan y se diferencian, a medida que avanzan hacia el exterior de la cripta, en las distintas células precursoras que darán lugar a los distintos tipos celulares maduros: enterocitos, células caliciformes, células enteroendocrinas y células de Paneth [148].

El proceso de diferenciación (Figura 14) se ve afectado por el microambiente intestinal a distintas alturas de la cripta mediante citoquinas, factores de crecimiento e interacciones celulares [149] tales como Wnt, Notch y Hedgehog, que controlan el equilibrio entre la proliferación, la diferenciación, la migración y la renovación celular [150].

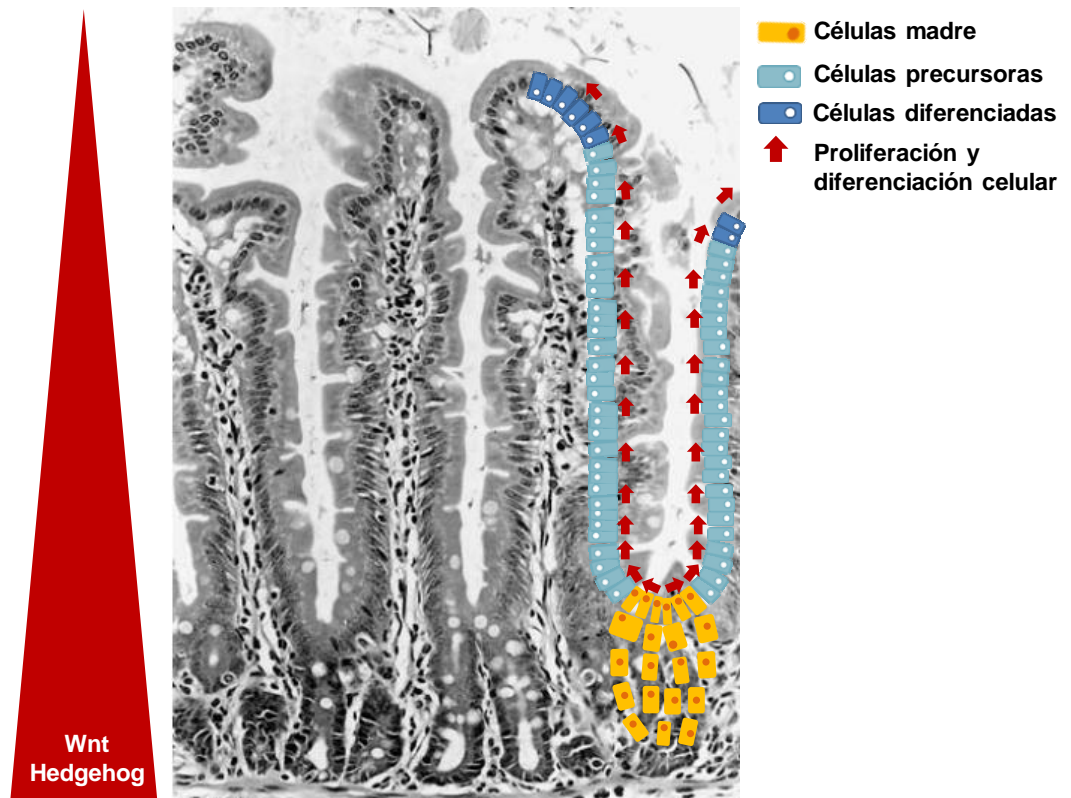


Figura 14. *Proceso de diferenciación en criptas Lieberkuhn en tejido de colon normal.* Las células madre dan lugar a los distintos tipos de células que forman la cripta y a medida que avanzan a lo largo de ella se van diferenciando a los distintos tipos hasta dar los colonocitos maduros. Wnt y Hedgehog promueven el mantenimiento de la proliferación.

Se ha observado que para mantener la proliferación e indiferenciación de las células de las criptas se requiere de la activación de las cascadas Notch, Wnt [133] y Hedgehog [136] (Figura 14). En primer lugar, Notch tiene un papel crítico regulando la comunicación célula-célula durante la embriogénesis, la proliferación, diferenciación y apoptosis [151], actuando en la maduración del epitelio colorrectal. El receptor Notch interactúa con ligandos anclados a membrana, como los ligandos tipo delta (DLL) y Jagged. Esta interacción entre el ligando y el receptor promueve un proceso catalítico en el receptor, lo que libera el dominio intracelular de Notch (NICD) al citoplasma dando lugar a la transcripción de genes como *MYC* y *p21*, entre otros [152]. Por otra parte, Wnt tiene un papel fundamental en la autorrenovación de las células madre que se encuentran en las criptas del colon, interaccionando con la proteína de membrana Frizzled (Fz) y pudiendo actuar mediante la ruta canónica o no canónica [153]. En la ruta canónica actúan elementos como APC o axina entre otros; la interacción Wnt-Fz promueve la no fosforilación de APC y β -catenina, lo que finaliza con la translocación de la β -catenina del citoplasma al núcleo, interactuando con TCF y promoviendo la transcripción de genes de adhesión o migración como *MYC*, *Ciclina D1*, *TCF-1*, *PPAR- δ* , *MMP-7*, *Axina-2*, *CD44*, *COX2*, etc... [152]. Se ha observado que las CSCs requieren la señalización de β -catenina para mantener el fenotipo tumorigénico [154]. En último lugar, Hedgehog (Hh) está involucrado en la embriogénesis. Su mutación promueve procesos de tumorigénesis. Hh es liberado por la célula mediante Dispatched. Hh se une a Ptch1 activando Smo que induce una cascada de elementos de la familia Gli que finalizan en la transcripción de los genes activados por la ruta [152]. La alteración de las rutas Wnt, Notch y Hedgehog está íntimamente relacionada con el mantenimiento y proliferación de las CSCs, permitiendo la progresión del tumor [155].

En los últimos años han aparecido teorías que relacionan la organogénesis con las CSCs. La teoría *bottom-up* defiende que la primera célula en transformarse es una célula madre intestinal o colónica que sufre una diferenciación anómala y una alteración de alguna de las rutas mencionadas. A partir de esta se genera el resto del tumor, que se considera como una “organogénesis aberrante”; por el contrario, la teoría *top-down* indica que el

origen del tumor es una célula ya diferenciada, la cual se vuelve indiferenciada y adquiere el *role* de célula madre cancerígena [136].

1.2.2. CSC Y SU RELACIÓN CON LA RESISTENCIA A FÁRMACOS

Las CSCs se han asociado a múltiples mecanismos de resistencia incluyendo quimio [156] y radiorresistencia [143], lo que las convierte en una población que promueve la reaparición de la enfermedad, progresión y metástasis. Considerando la carcinogénesis como una organogénesis aberrante, las CSCs conservarían propiedades de las células madre, aumentando las posibilidades de autoconservación del material genético [157-159]. De este modo, los principales mecanismos de resistencia asociados a esta población son:

- Resistencia a la apoptosis mediante inhibidores de las caspasas o moléculas antiapoptóticas como la survivina [160] y livina [161].
- MDR o *multidrug resistance* [162] asociada con las proteínas como P-glicoproteína (P-gp), BCRP, MRP1 y MRP3 [163], entre otras, que pertenecen a la familia ABC [156]. Estas actúan expulsando el fármaco hacia el exterior celular mediante el gasto de ATP.
- Alteración de los procesos de reparación del ADN por enzimas como la MGMT [164] o el sistema MMR [165].

1.3. O⁶-METILGUANINA-ADN METILTRANSFERASA (MGMT)

1.3.1. MECANISMO DE ACCIÓN DE MGMT

El ADN, a lo largo de los años, tiende a acumular grupos metilo debido a agentes alquilantes exógenos, lo que promueve el silenciamiento de los genes evitando el proceso de transcripción [166]. El principal mecanismo de reparación de este proceso es el enzima MGMT. Esta enzima elimina los grupos metilo que se encuentran en la posición O⁶ de la guanina. MGMT transfiere estos radicales a una cisterna interna inactivándola irreversiblemente. De este modo, la capacidad de reparación de lesiones en el ADN de una célula, depende del número de moléculas de MGMT y de la tasa de su síntesis *de novo* [167,168] (Figura 15).

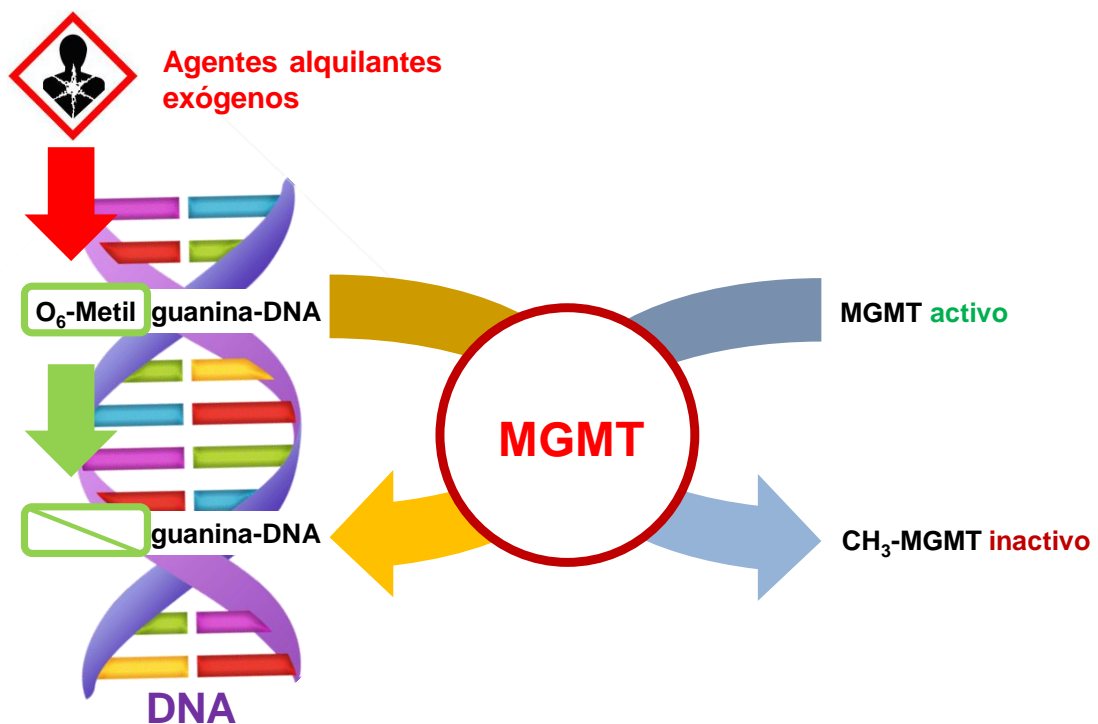


Figura 15. Mecanismo de reparación del ADN mediante el enzima MGMT. MGMT elimina los grupos metilo introducidos por agentes alquilantes exógenos.

Como consecuencia, la introducción de grupos metilo en las guaninas del ADN (O⁶-metilguanina) promueven las transiciones de G:C a A:T en genes como *p53* [169], *KRAS* [170,171], *PIK3CA* [170,172] y *hMLH1* [173] entre otros, cuando no existe un mecanismo de reparación como MGMT. Además, la O⁶-metilguanina favorece el emparejamiento erróneo de la metil-guanina con la timina durante la replicación del ADN, promoviendo roturas en la doble hélice e induciendo la muerte celular por apoptosis (Figura 16).

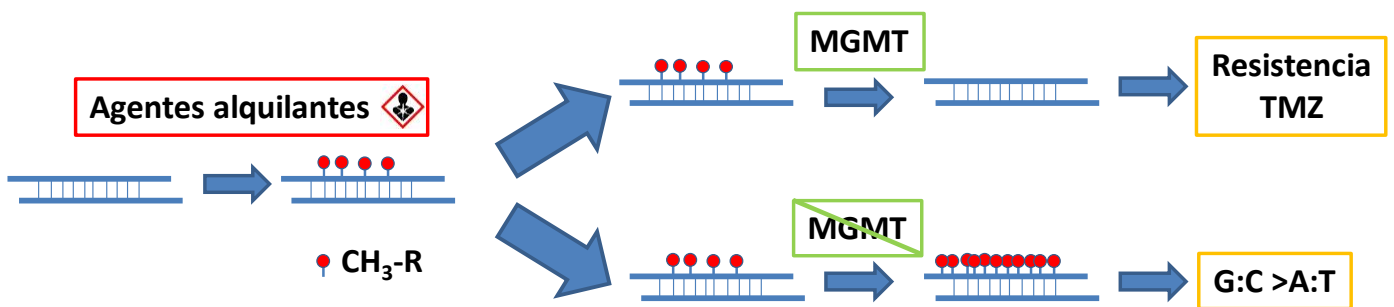


Figura 16. Esquema de funcionamiento de MGMT. Cuando MGMT no está presente se acumulan grupos metilo, lo que favorece la generación de nuevas mutaciones como las transiciones de G:C a A:T. Se ha observado que MGMT es un mecanismo de resistencia frente a agentes alquilantes, como la temozolamida (TMZ) debido a que este elimina los grupos alquilo introducidos por el fármaco.

1.3.2. SILENCIAMIENTO EPIGENÉTICO: METILACIÓN DE MGMT

La metilación de las islas CpG que se encuentran en los promotores de muchos genes es uno de los mecanismos asociados al silenciamiento epigenético. Las islas CpG son regiones ricas en dinucleótidos formados por citosina y guanina. La acumulación de grupos metilo en estas regiones puede dar lugar a la inactivación de la expresión del gen o silenciamiento. Los genes pueden encontrarse hipometilados e hipermetilados. Cuando se encuentran hipometilados, los factores de transcripción y las polimerasas pueden identificar los puntos de inicio de transcripción génica. Sin embargo, cuando se encuentran hipermetilados no los reconocen e inducen la represión transcripcional (Figura 17) [166].

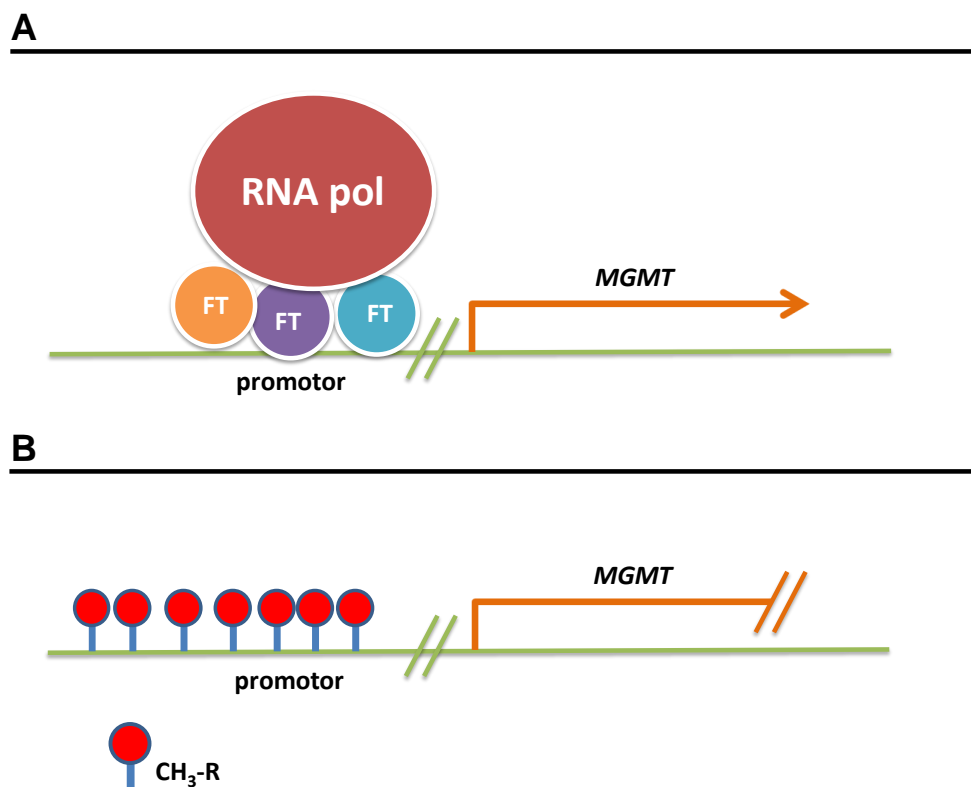


Figura 17. Silenciamiento epigenético de MGMT. **A.** Promotor no metilado: Cuando el promotor de MGMT se encuentra no metilado los distintos factores de transcripción se pueden unir, por lo que la ARN polimerasa puede transcribir MGMT. **B.** Promotor metilado: Sin embargo cuando el promotor de MGMT se encuentra metilado los factores de transcripción no se pueden unir al promotor, por lo que no se une la ARN polimerasa y no se transcribe MGMT.

Uno de los genes asociados a este proceso codifica para la proteína MGMT. Cuando este gen se encuentra hipermetilado se reduce la expresión de MGMT [166]. En estudios previos, se ha observado que el silenciamiento de *MGMT* puede favorecer una mejor respuesta frente al tratamiento con agentes alquilantes, como la TMZ, en pacientes con glioblastoma (GBM) [167,174-176]. Esto se explica debido al efecto opuesto entre la TMZ y MGMT (Figura 18). Del mismo modo, se ha observado que la expresión de MGMT genera radorresistencia en pacientes con GBM, teniendo mejor pronóstico aquellos pacientes con el gen silenciado [167,168].

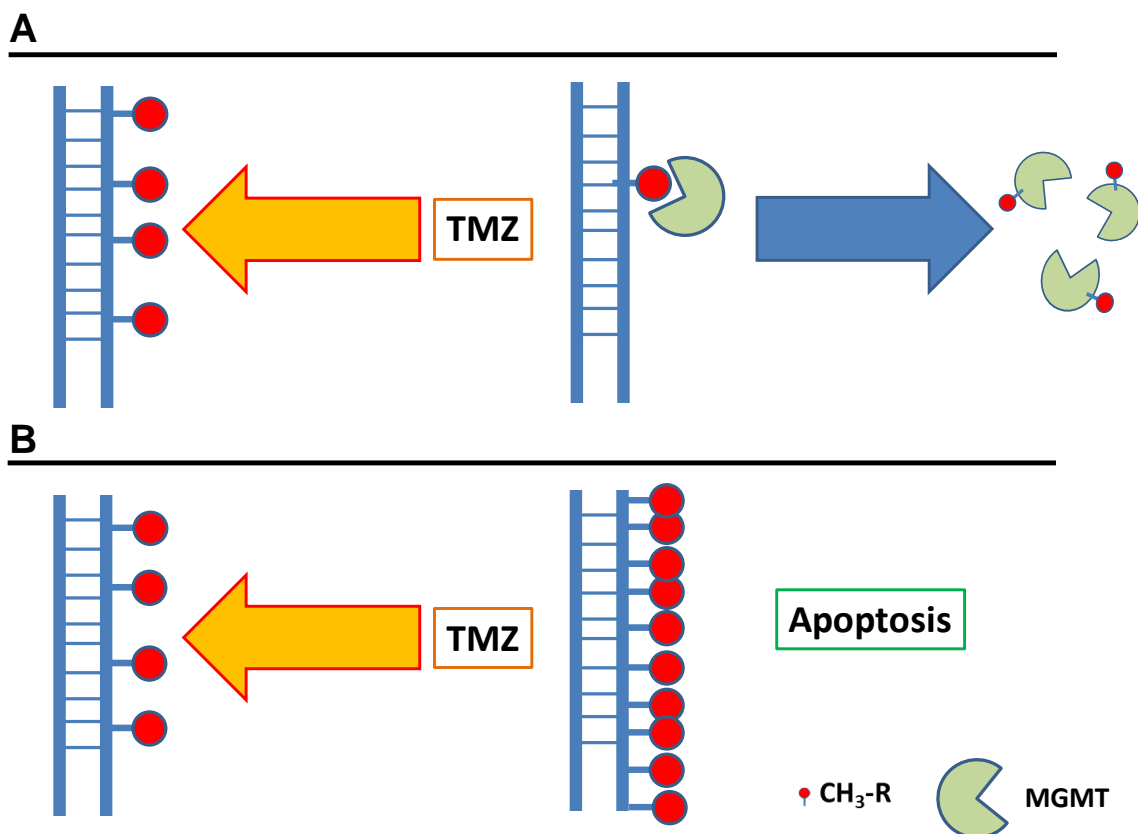


Figura 18. MGMT como mecanismo de resistencia frente a agentes alquilantes. **A.** Cuando se expresa MGMT en la muestra tumoral ésta elimina los grupos metilo introducidos por la TMZ. **B.** Sin embargo, cuando MGMT no se encuentra en el tumor se acumulan los grupos metilo induciendo la apoptosis.

1.3.3. METILACIÓN DEL ADN Y CARCINOGENESIS

El proceso de metilación puede afectar directamente a la transcripción del gen o indirectamente modificar la estructura de la cromatina. La incorporación de los grupos metilo en las islas CpG puede ser un fenómeno estable el cual se hereda mediante la selección clonal [179]. Por otra parte, la hipometilación primaria se ha asociado al proceso neoplásico [180].

De este modo, en la carcinogénesis parece haber una secuencia de procesos asociados a la metilación del promotor.

- Hipometilación de la heterocromatina.
- Hipermetilación de las islas CpG de genes específicos.

La transferencia y mantenimiento de los grupos metilo a lo largo de las divisiones celulares se lleva a cabo mediante las enzimas ADN metiltransferasa (DNMT) *de novo* y de mantenimiento [181].

1.3.4. O6-METILGUANINA-ADN METILTRANSFERASA (MGMT) EN CÁNCER DE COLON

El papel de MGMT en la tumorigénesis del CCR es complejo y aún no está bien caracterizado. La metilación de *MGMT* se ha detectado en las criptas aberrantes [182] y en estadios avanzados de la enfermedad [183], no pudiéndose establecer claramente en qué etapa de la carcinogénesis sucede. A pesar de ello, muchos autores han observado que el proceso de metilación del promotor de *MGMT* está asociado al cáncer, no apreciándose este proceso en el tejido normal circundante del tumor o en pacientes sanos [184-187]. Lo que parece demostrado es que la metilación y la ausencia de la proteína MGMT predisponen al desarrollo del cáncer de colon [188]. MGMT podría estar asociado a la ruta de inestabilidad cromosómica (CIN) o al fenotipo metilador de las islas CpG (CIMP). De este modo, la pérdida de expresión de MGMT por metilación se podría asociar al CIMP, el cual a su vez está relacionado con mutaciones en *BRAF* y a la MSI [189,190]. Por otra parte, la pérdida de

expresión de MGMT se asocia a la acumulación de transiciones de G:C a A:T en genes como *p53* [169], *KRAS* [170,171], *PIK3CA* [170,172] y *hMLH1* [173] lo que implica una actuación sobre la ruta CIN. A pesar de todas las evidencias de que MGMT juega un papel importante en la carcinogénesis, ninguno de los estudios anteriores ha mostrado una relación determinante con el pronóstico, tanto a nivel de expresión de proteína como de estado de metilación del promotor [170, 191,192].

Por otra parte, está bien establecido que en pacientes tratados con agentes alquilantes, MGMT tiene un papel relevante en la predicción de la respuesta al tratamiento. Sin embargo, 5-FU no actúa como agente alquilante. Estudios previos *in vitro* en líneas celulares de CCR (LoVo y RPMI-4788) han demostrado una reducción de la expresión proteica después del tratamiento con 5-FU. Su mecanismo de acción es desconocido. No obstante, la reducción de la expresión proteica de MGMT en estas líneas mediante O6-benzilguanina aumenta su sensibilidad al fármaco, lo que indica su papel relevante en el tratamiento [193].

1.4. GLICOPROTEÍNA PROMININA 1 (CD133)

CD133 (PROM 1) es un polipéptido de una sola cadena de 865 aminoácidos, con un peso molecular de 92 a 97 kD dependiendo de la isoforma [194,195]. El gen *CD133* codifica para una glicoproteína con 5 dominios transmembrana que presenta un extremo N-terminal extracelular y un extremo C-terminal citoplasmático y dos grandes bucles extracelulares con ocho sitios de N-glicosilación [194,195] (Figura 19). Inicialmente, esta proteína de membrana se asoció a las células madre hematopoyéticas humanas [194,196], y más adelante a células madre neuronales [197-199]. En los últimos años se ha asociado este biomarcador a las *cancer stem cells* en tumores del sistema nervioso central [200], pulmón [201], hígado [202], páncreas [203] y colon [204] entre otros. Su relevancia ha llevado a la síntesis de anticuerpos contra diferentes regiones, incluyendo la región E3 del dominio extracelular (CD133/1 de Miltenyi) y el dominio C3 en la región citoplasmática (ab19898 de Abcam).

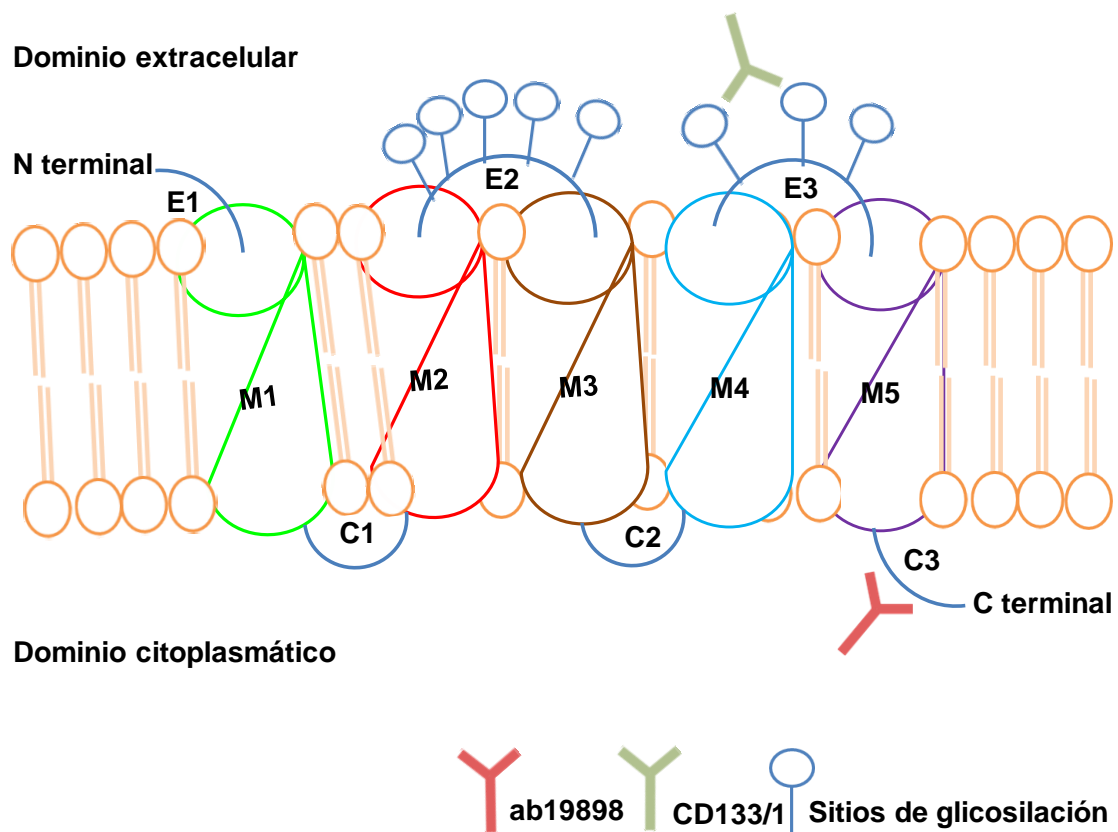


Figura 19. Estructura molecular de CD133. La proteína CD133 dispone de 5 pasos transmembrana y varios sitios de glicosilación. Los anticuerpos pueden reconocer estos sitios de glicosilación, como el anticuerpo CD133/1, o pueden reconocer la región C-terminal en el dominio citoplasmático como el anticuerpo ab19898.

Por otra parte, a nivel transcripcional se ha observado que CD133 es bastante complejo. En un estudio sobre la regulación transcripcional del gen *CD133* se observó la presencia de 9 exones en la región sin traducir (5-UTR) lo que permitía la aparición de 7 isoformas producidas por *splicing* alternativo del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y cuya expresión es dependiente del tejido y regulada por el estado de metilación [205]. Además se apreció que las diferentes isoformas se expresan en múltiples regiones y tejidos, existiendo variación en los niveles de expresión en las distintas líneas celulares, lo cual podría depender, entre otras cosas, del nivel de diferenciación celular [206].

1.4.1. CD133 Y CÁNCER DE COLON

O'Brien y cols. [204] y Ricci y cols. [207] fueron los primeros en analizar las CSCs en tumores colorrectales. En los dos estudios se apreció que la población CD133+ era capaz de originar *de novo* el tumor una vez inyectada en ratones inmunodeficientes. La población CD133+ presentaba una morfología esferoide y mostraba marcadores asociados a la quimiorresistencia [208]. Otros estudios, sin embargo, demostraron que tanto la población CD133+ como la población CD133- era capaz de formar tumores en ratones inmunodeprimidos [209]. Se ha observado expresión de este marcador en CCR, tanto en líneas celulares como en pacientes, asociándose a procesos como la SG en pacientes [210]. Además de CD133, existen otros biomarcadores como CD44, CD24, CD29, Lgr5 y CD166 usados en los últimos años para aislar las CSCs, a pesar de lo cual, CD133 sigue siendo el biomarcador más utilizado para la detección y aislamiento de este tipo celular [211].

1.4.2. LOCALIZACIÓN DE CD133

CD133 se localiza en la membrana, no apreciándose tinción del citoplasma o núcleo [212]. Esta distribución restringida en las estructuras de membrana ha hecho que se asocie al colesterol [213]. Todo esto hace pensar que podría jugar un papel importante en el mantenimiento de la organización topológica de la membrana plasmática [214]. No obstante, el papel funcional en cáncer es aún desconocido [215].

En el tejido tumoral se ha observado expresión de CD133 en la región endoluminal/apical de las glándulas de la región tumoral, tiñendo en muchas ocasiones los restos celulares en su interior (Figura 20). La tinción está pues completamente polarizada [210,216-218]. Algunos autores aprecian tinción de la base de las criptas colónicas en tejido normal, pudiéndolo asociar a las *stem cell* del intestino en tejido normal [216,219].

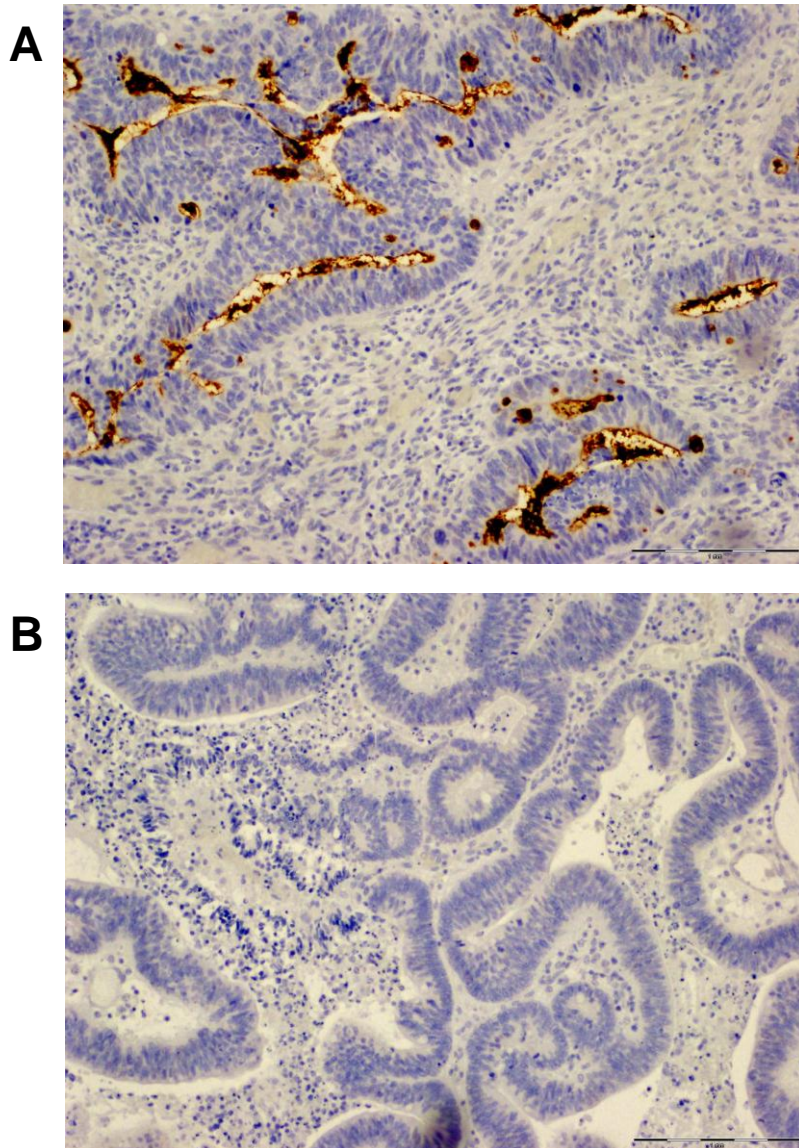


Figura 20. Tinción de CD133 en tejido tumoral colónico. **A.** Tinción positiva: se puede apreciar una clara tinción de la región endoluminal de las glándulas tumorales. **B.** Tinción negativa.

1.4.3. DETECCIÓN DE CD133

Los anticuerpos utilizados para la detección de CD133 se dirigen frente a los epítomos 1 (CD133/1) y 2 (CD133/2), siendo el más usado el epítomo 1 (CD133/1) [220]. Los principales anticuerpos frente a este epítomo son C24B9 de *Cell Signaling*, AC133 de Miltenyi Biotech y anti-CD133 de *Santa Cruz Biotechnology*. Estudios previos muestran que no existen diferencias significativas entre el marcaje logrado a través del uso de los distintos anticuerpos [210]. A pesar de que se ha observado que CD133 no es un marcador exclusivo de las CSCs expresándose en células ya diferenciadas, es necesario mencionar que el proceso de diferenciación de las CSCs se ha asociado a una reducción del reconocimiento de CD133 como consecuencia de procesos de enmascaramiento del epítomo. Este enmascaramiento podría ser debido a la glicosilación diferencial entre las CSCs y las células ya diferenciadas, lo que favorece la formación de estructuras terciarias o la unión de otras proteínas impidiendo la formación del complejo antígeno-anticuerpo [220]. En condiciones ideales sería bueno acompañar este biomarcador de otros como CD24, CD29, CD44 [211, 220], a pesar de lo cual es aceptado su uso para la detección de las CSCs en CCR.

2. OBJETIVOS

Los objetivos principales de este estudio son:

1. Determinar el estado de metilación del promotor del gen *MGMT* en pacientes con CCR y establecer su posible valor como factor pronóstico.
2. Determinar los niveles de expresión de ARNm y de expresión proteica de *MGMT* en pacientes con CCR, establecer la correlación entre ellos, la correlación con el estado de metilación del promotor del gen *MGMT* y su posible valor como marcador pronóstico
3. Determinar los niveles de expresión de ARNm y de expresión proteica de CD133 en pacientes con CCR, establecer la correlación entre ellos y su posible valor como marcador pronóstico
4. Determinar la posible correlación entre *MGMT* y CD133 en pacientes con CCR y establecer su valor pronóstico.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. ESTUDIOS *IN VITRO*

3.1.1. MATERIAL

Los estudios *in vitro* se llevaron a cabo utilizando líneas celulares derivadas de CCR: HCT116, HCT15, HT29, T84, SW480 y RKO y la línea celular transformada de colon CCD18co. Dichas líneas fueron obtenidas del Centro de instrumentación Científica de la Universidad de Granada y de la *American Type Culture Collection (ATCC)* (Tabla 3).

Línea celular	Organismo	Morfología	Tipo de crecimiento	Patología
CCD18co	<i>Homo sapiens</i>	fibroblasto	adherente	Tejido normal
HT29	<i>Homo sapiens</i>	epitelial	adherente	Adenocarcinoma
SW480	<i>Homo sapiens</i>	epitelial	adherente	Adenocarcinoma, estadio II
HCT15	<i>Homo sapiens</i>	epitelial	adherente	Adenocarcinoma, estadio III
T84	<i>Homo sapiens</i>	epitelial	adherente	Carcinoma (metástasis pulmonar)
HCT116	<i>Homo sapiens</i>	epitelial	adherente	Carcinoma
RKO	<i>Homo sapiens</i>	epitelial	adherente	Carcinoma

Tabla 3. Características de las líneas celulares derivadas de CCR y la línea celular transformada de colon.

3.1.2. MÉTODOS

3.1.2.1. Cultivo celular y criopreservación

Todas las líneas celulares se cultivaron en medio de Dulbecco modificado de Eagle (DMEM) (*Sigma-Aldrich Chemical Co.*, EE.UU.) suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 10 %, 40 mg/ml de gentamicina y 500 mg/ml de ampicilina (*Antibióticos SA*, España). Todas las células se sembraron en frascos de cultivo para su mantenimiento y en placas de 96 pocillos para las diferentes experiencias llevadas a cabo (ver después) y se mantuvieron a $37,0 \pm 0,5$ ° C en una atmósfera humidificada de 5 % de CO₂ en aire. Para su conservación a largo plazo, las células fueron congeladas en criotubos utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% en medio de cultivo.

3.1.2.2. Determinación de la metilación del promotor de MGMT

3.1.2.2.1. Pretratamiento de ADN con bisulfito sódico

El estado de metilación del promotor de un gen o una secuencia de ADN se puede determinar mediante el pretratamiento con bisulfito sódico y una PCR específica de metilación (MSP). La incubación del ADN diana con bisulfito sódico da lugar a la conversión de los residuos no metilados de citosina en uracilo, dejando las citosinas metiladas sin cambios (Figura 21A). La reacción se lleva a cabo cuando la citosina no metilada reacciona con el bisulfito para formar un producto intermedio de la reacción, la citosina sulfonada, la cual es susceptible de experimentar una desaminación dando como resultado un uracilo sulfonado. En el proceso de desulfonación, el uracilo es desulfonado bajo condiciones alcalinas mediante el *desulfonation buffer (BD)* dando lugar finalmente a un uracilo (Figura 21B).

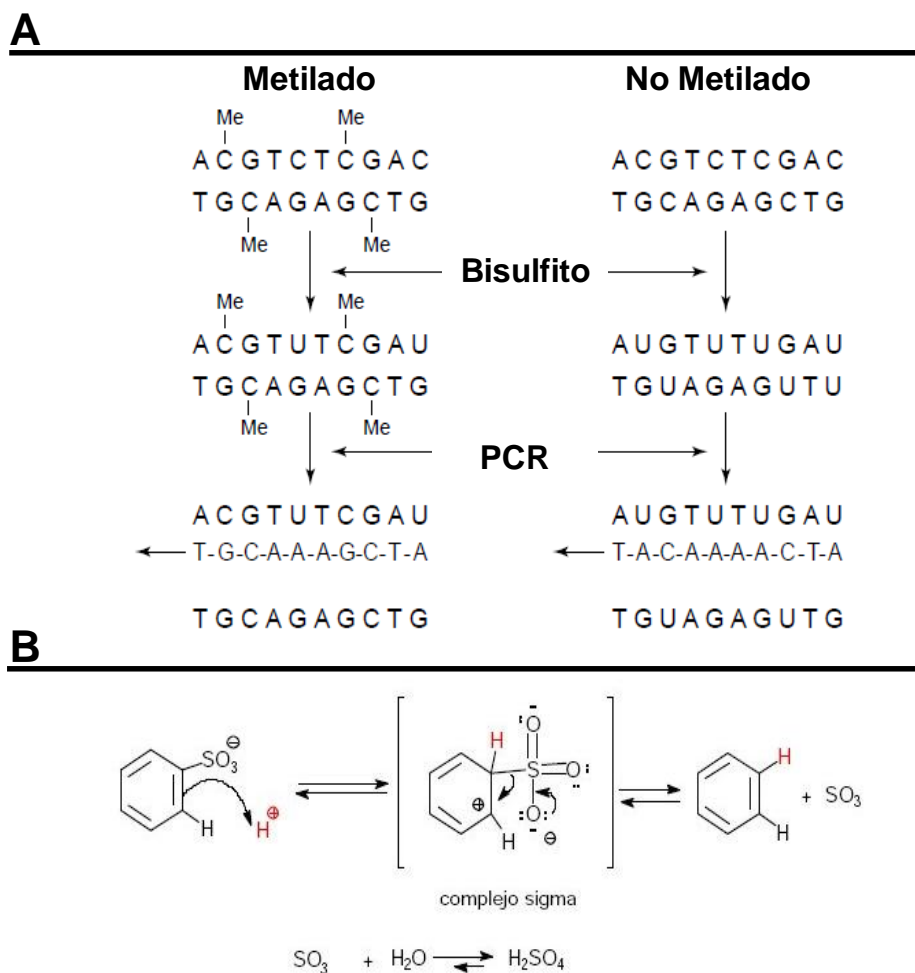


Figura 21. Pretratamiento de ADN con bisulfito sódico. **A.** Mecanismo de acción del bisulfito sódico dependiendo del estado de metilación de la secuencia de ADN. Cuando se encuentra el ADN metilado no sufre cambios, sin embargo cuando está no metilado se sustituyen las citosinas (C) por uracilos (U) lo que modifica el *primer* necesario para su amplificación mediante MSP. **B.** Mecanismo de desulfonación de los uracilos.

Para el análisis del estado de metilación del promotor de *MGMT* se utilizaron *QIAamp DNA Mini Kit* para el aislamiento del ADN, y *Qiagen bisulfite epitect kit* para el pretratamiento con el bisulfito, siguiendo el protocolo del fabricante. Para la MSP, en el proceso del diseño de los *primers* hay que considerar que este uracilo tendría el comportamiento de apareamiento de la timina, sin embargo la 5-metil-citosina, al no sufrir cambios, tendría el comportamiento de apareamiento propio de la citosina (C). De este modo, el tratamiento con bisulfito permite diferenciar las secuencias metiladas y las no metiladas. Este proceso se llevó a cabo partiendo de 2 µg de ADN de cada muestra. Aplicamos el protocolo *Sodium Bisulfite Conversion of Unmethylated Cytosines in DNA Isolated from FFPE Tissue Samples* según las instrucciones del fabricante (*Epitect® Bisulfite Handbook September 2009*).

3.1.2.2.2. Protocolo de conversión del ADN mediante bisulfito sódico

Descongelar el ADN en hielo.

- Disolver las alícuotas necesarias del *mix* de bisulfito para procesar las muestras añadiendo 800 µl de agua libre de RNasas en cada alícuota.
- Vortear el bisulfito hasta que la mezcla esté completamente disuelta (hasta 5 min).
- Preparar la reacción con bisulfito en tubos de PCR de 200 µl de acuerdo con la Tabla 4:

Componente	Volumen/reacción
Solución de ADN (1 ng-2 ug)	Variable (máximo 20 µl)
Agua libre de RNasas	Variable
<i>Mix</i> de bisulfito	85 µl
<i>DNA protect buffer</i>	35 µl
Volumen total	140 µl

Tabla 4. Componentes de la reacción del bisulfito.

- Vortear la mezcla durante 15 segundos. Almacenar los tubos a temperatura ambiente (15-25°C). Al añadir el *DNA Protect Buffer* se produce un viraje de color azul a verde, indicando que el pH es el adecuado para la reacción.
- Realizar la conversión del ADN mediante bisulfito aplicando los ciclos de temperatura que muestra la Tabla 5.

Pasos	Tiempo	Temperatura
Desnaturalización	5 min	95°C
Incubación	25 min	60°C
Desnaturalización	5 min	95°C
Incubación	85 min	60°C
Desnaturalización	5 min	95°C
Incubación	175 min	60°C
Conservar	∞	20°C

Tabla 5. Ciclos aplicados al producto de bisulfito.

3.1.2.2.3. Lavado del ADN convertido mediante bisulfito

- Una vez que la conversión de bisulfito se ha completado, centrifugar brevemente los tubos de PCR que contienen las reacciones de bisulfito y transferir el volumen completo a tubos de 1,5 ml. La transferencia de precipitados en la solución no afecta al rendimiento de la reacción.
- Añadir 310 µl de *Loading buffer (BD)*. Mezclar las soluciones mediante vórtex y realizar un centrifugado rápido durante unos segundos (sin *carrier ARM*).
- Añadir 250 µl de etanol 100% y mezclar las soluciones mediante vórtex durante 15 segundos y dar un breve golpe de centrífuga para eliminar las gotas del interior de la tapa.

- Pasar las soluciones obtenidas en el paso anterior a columnas *spin* de Epiject.
- Dejar durante un minuto la columna a temperatura ambiente para que penetre bien la disolución y centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto. Descartar el eluido y recuperar el tubo colector.
- Añadir 500 µl de wash buffer (*BW*) a cada columna y centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto. Desechar el eluido y recuperar el tubo colector.
- Añadir 500 µl de buffer *BD* a las columnas e incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente (15-25°C). Si el buffer *BD* forma precipitados no se debe utilizar para la columna. La botella que contiene tampón *BD* y las columnas deben cerrarse inmediatamente después de su uso para evitar la acidificación por dióxido de carbono del aire.
- Centrifugar las columnas a máxima velocidad durante 1 minuto. Desechar el eluido y recuperar el tubo colector.
- Añadir 500 µl de buffer *BW* para cada columna y centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto. Desechar el eluido y recuperar el tubo colector.
- Repetir el paso anterior de lavado.
- Colocar las columnas con el ADN en tubos de 2 ml sin tapa que se van a utilizar a modo de tubos colectores y centrifugar las columnas a máxima velocidad durante 1 minuto para eliminar cualquier líquido residual.
- Añadir 40 µl de elution buffer (*EB*) en el centro de cada membrana. Eluir el ADN purificado por centrifugación durante 1 minuto a 12.000 rpm.

El resumen del protocolo se encuentra ilustrado en la Figura 22.

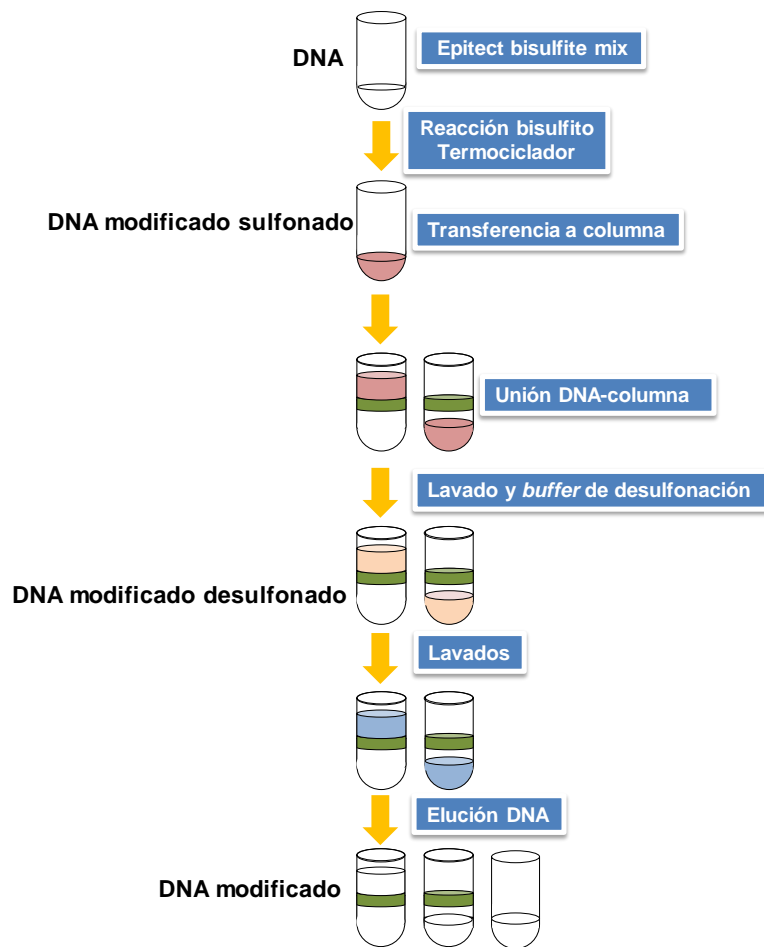


Figura 22. Conversión del ADN mediante bisulfito sódico.

3.1.2.2.4. PCR específica de metilación (MSP)

La alteración del estado de metilación de las islas CpG es uno de los procesos que ocurre en los promotores de los genes implicados en los mecanismos de reparación o división celular. La MSP es la técnica más utilizada para determinar el estado de metilación de estas islas CpG. Mediante esta técnica se amplifican las regiones del promotor de ADN pretratadas con bisulfito, visualizándolas mediante el uso de geles de agarosa.

Los *primers* diseñados para analizar el promotor del gen *MGMT* amplifican el promotor de *MGMT* metilado (M) y no metilado (UM) (Figura 23A) pudiendo observar, a nivel molecular, tres posibles resultados: muestras no metiladas (con una banda en UM), muestras parcialmente metiladas (con banda en UM y M) y muestras hipermetiladas (con banda únicamente en M). Por otra parte, para la amplificación del promotor de *CD133* se utilizaron los *primers* descritos en la Figura 23B.

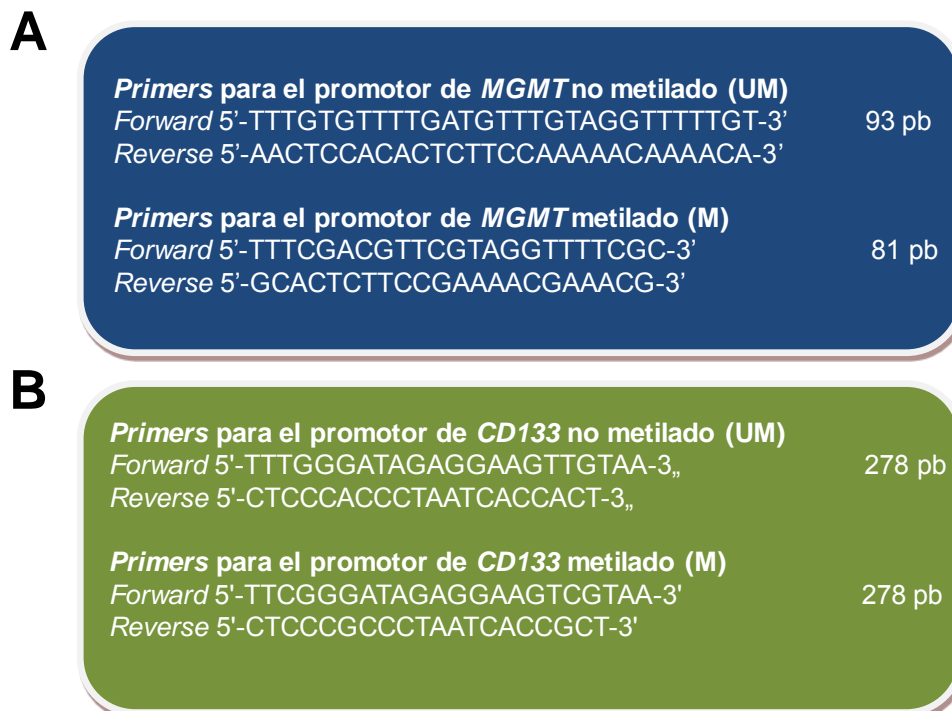


Figura 23. *Primers* diseñados para MSP de los genes *MGMT* y *CD133*. **A.** *Primers* para el promotor de *MGMT* metilado (M) y no metilado (UM). **B.** *Primers* para el promotor de *CD133* metilado (M) y no metilado (UM) [5].

La PCR se realizó para cada muestra utilizando 5 µl de ADN pretratado con bisulfito, al cual se le añadió un volumen final de 20 µl de *Master mix* formada por: 14,25 µl de agua libre de RNasas, 1 µl de *mix* de desoxinucleótidos 200 µM, 1,25 µl de *REDTaq® DNA Polymerase*, 2,5 µl *REDTaq PCR Reaction Buffer* y 1 µl de la mezcla de 1) *primers forward* y *reverse* para *MGMT* metilado; 2) *primers forward* y *reverse* para *MGMT* no metilado 3) *primers forward* y *reverse* para *CD133* metilado o 4) *primers forward* y *reverse* para *CD133* no metilado.

Las condiciones de la MSP para la amplificación de *MGMT* y *CD133*, tanto para metilado como no metilado fueron las que muestran la Figura 24:

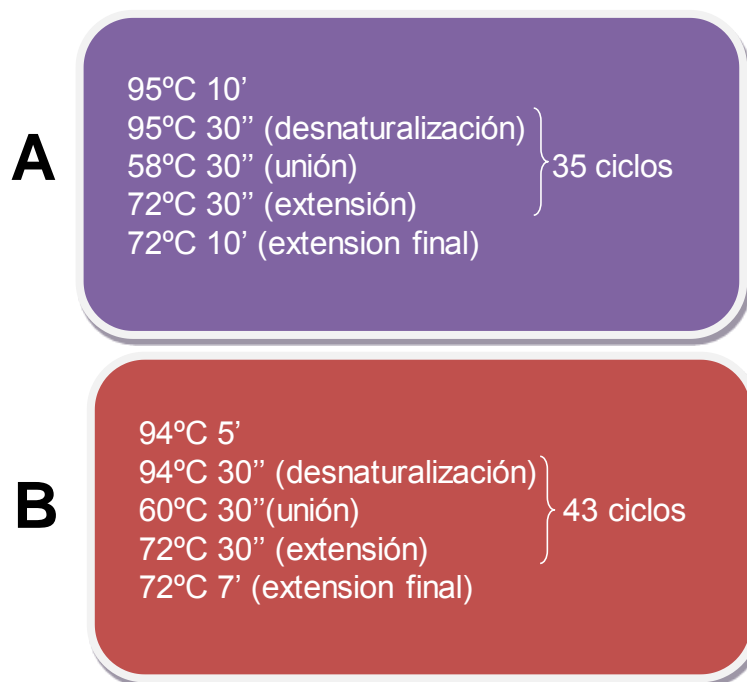


Figura 24. Programa aplicado en el termociclador para la amplificación del promotor de *MGMT* y *CD133* mediante MSP. **A.** Ciclos aplicados para la amplificación de secuencia metilada o no metilada de *MGMT*: Se aplicaron 95°C durante 10', y después 35 ciclos de 95°C durante 30", 58°C durante 30" y 72°C durante 30" y finalmente se realizó la extensión final aplicando 72°C durante 10'. **B.** Ciclos aplicados para la amplificación de secuencia metilada o no metilada de *CD133*: Se aplicaron 94°C durante 5', y después 43 ciclos de 94°C durante 30", 60°C durante 30" y 72°C durante 30" y finalmente se realizó la extensión final aplicando 72°C durante 7'.

Para testar lo observado en bibliografía [5] se realizó previamente una PCR de gradiente para determinar la temperatura de fusión o *melting temperature* (T_m) óptima para la amplificación. De este modo, se obtuvo que la T_m óptima para la determinación del estado de metilación de *CD133*, tanto metilado como no metilado, es 60°C (Figura 25).

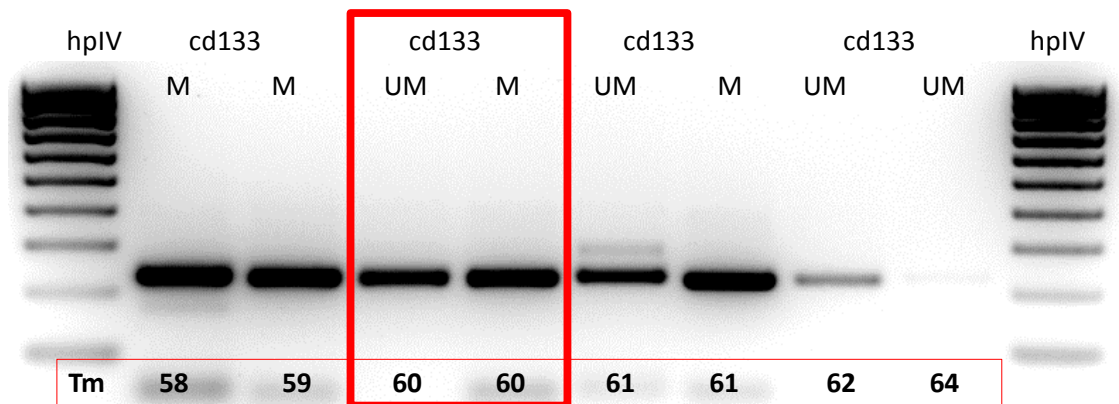


Figura 25. Determinación de la T_m para MSP de *CD133*. Como se aprecia en la figura, podemos ver que la única muestra que amplifica con ambos *primers* sin presentar bandas inespecíficas o *smear* de la banda es la expuesta a una T_m de 60°C.

3.1.2.3. Electroforesis en gel de agarosa

El producto final de la MSP, tanto de *MGMT* como de *CD133*, se cargó en un gel de agarosa al 2,5% con bromuro de etidio y se realizó la electroforesis con una corriente de 75 V durante 1 hora y 15 minutos, observándose: 1) en el caso de *MGMT* amplificados de 93 pares de bases (pb) en las muestras UM y de 81 pb en las muestras M y 2) en el caso de *CD133* se observaron amplificados de 278 pb tanto para M como UM. Esto se verificó cargando en un carril el marcador de peso molecular *HyperLadder V* o *IV* (*Bioline*) dependiendo del tamaño molecular del amplificado a analizar.

Finalmente, se visualizaron y fotografiaron los geles mediante el transiluminador de BloRAD y el programa informático *Quantityone* (Figura 26).

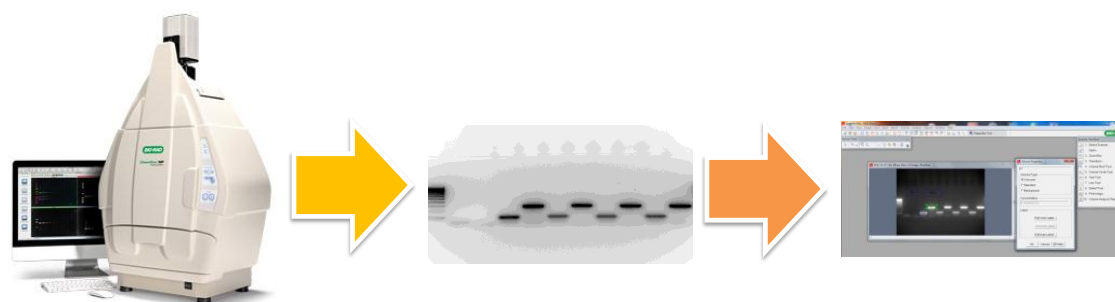


Figura 26. Esquema del proceso de visualización de geles. El sistema de documentación de geles BloRAD y el software *Quantityone* nos permitió la visualización, lectura y cuantificación de la luz emitida por las bandas de ADN.

3.1.2.4. Expresión de ARN en líneas celulares

3.1.2.4.1. Extracción del ARN

Para la determinación del nivel de expresión del ARNm se realizó la extracción del ARN de las líneas celulares mediante el *RNeasy Mini Kit de Qiagen* según las recomendaciones del fabricante (Figura 27).

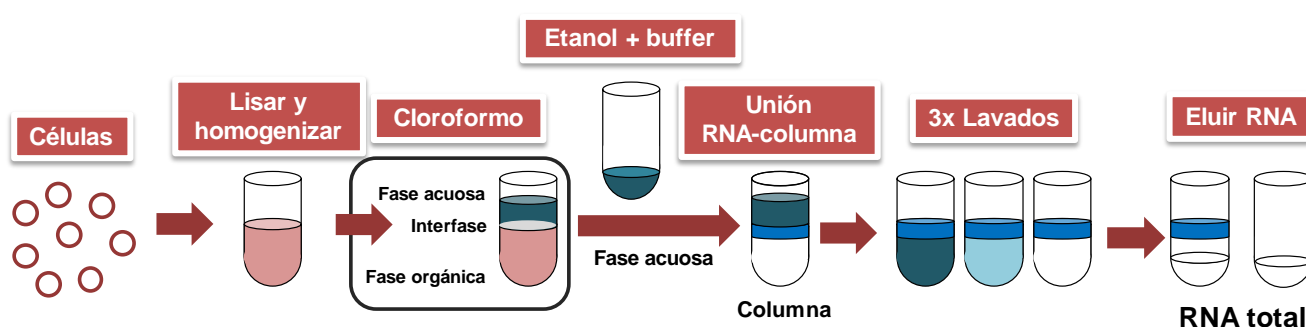


Figura 27. Resumen del protocolo de extracción de ARN. En primer lugar se homogenizaron mecánicamente las células y se les añadió Trizol[®]. A continuación se eluyó con cloroformo formando tres fases: fase acuosa, interfase y fase orgánica. Se aspiró la fase acuosa añadiéndole etanol y *buffer* y se pasó a la columna, facilitándose la interacción ARN-columna. Finalmente, se sometió la columna a varios lavados mediante distintos *buffers*. Una vez limpio el ARN, se eluyó mediante agua libre de RNasas.

Para la determinación de la calidad se analizó la integridad del ARN mediante la medición del *RNA integrity number (RIN)*, usando el bionalizador 2100 de *Agilent* a través del *RNA 6000 Nano assay kit (Agilent Technologies, España, Las Rozas)*. Todos los valores obtenidos fueron superiores a 7. El *NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, EE.UU., Wilmington)* fue utilizado para la cuantificación del ARN.

3.1.2.4.2. Retrotranscripción

El proceso de retrotranscripción (RT) se realizó mediante *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (MMLVRT)* a partir de 1,5 µg de ARN.

El protocolo de RT que se siguió fue:

- Añadir solución de retrotranscripción 1

1 µl *dNTP mix* (10 mM)

1 µl *primer oligodT* ([final] 1-5 µM)

X µl ARN (1,5 µg)

X µl agua libre de RNasas (hasta 10 µl)

10 µl

- Incubar a 70°C durante 10 minutos.
- Retirar del termociclador y poner en hielo durante 5 minutos.

- Añadir solución de retrotranscripción 2

2 µl de *Buffer MMLV RT* 10x

1 µl *M-MLVRT* (enzima)

0,5 µl *RNA inhibitor*

6,5 µl Agua libre de RNasas

10 µl+ 10 µl = 20 µl finales

- Incubar a 37°C durante 50 minutos y durante 10 minutos a temperatura ambiente, obteniendo el producto final ADNc.
- Al volumen final se le añadieron 30 µl (50 µl finales) de agua libre de RNasas. Para la realización de la PCR se cogieron 5 µl del producto final para cada PCR. De este modo utilizamos 150 ng por PCR.

3.1.2.4.3. RT-PCR

Finalmente, el producto de la RT (ADNc) se utilizó para llevar a cabo la PCR. Para cada 5 μl de ADNc de muestra se añadió la *master mix* que se muestra a continuación:

12,5 μl de *REDTaqReadyMix* (Taq polimerasa, MgCl_2 y *buffer* de reacción)

1 μl de *primer* (*mix* de *reverse* y *forward*)

5 μl de ADNc (producto de la RT)

6,5 μl de agua libre de nucleasas

25 μl finales

Las condiciones en la PCR para *MGMT* consistieron en: 5 minutos a 94°C para la desnaturalización inicial, seguido de 35 ciclos a 94°C (30 segundos), 60°C (30 segundos) y 72°C (30 segundos) y finalmente, elongación durante 7 minutos a 72°C. Del mismo modo, las condiciones en la PCR para *CD133* establecidas en el termociclador consistieron en: 5 minutos a 94°C para la desnaturalización inicial, seguido de 35 ciclos: 94°C (30 segundos), 55°C (30 segundos) y 72°C. (60 segundos) y finalmente, elongación durante 7 minutos a 72°C. Los *primers* utilizados se muestran en la Figura 28.



Figura 28. Primers para la RT-PCR de **A.** MGMT y GADPH y **B.** CD133 y β -actina [5]. Para cada muestra se realizó la PCR para la β -actina o GADPH como control de carga.

3.1.2.5. Exposición de cultivos celulares a tratamientos con 5-fluorouracilo

Medición de viabilidad celular: obtención de IC₅₀

Para la obtención de la IC₅₀ de todas las líneas celulares se sembraron de 6.000 a 8.000 células/pocillo en placas de 24 pocillos y se expusieron a concentraciones crecientes de fármaco, realizando los ensayos por triplicado y dejando espacio para controles negativos y controles de citotoxicidad de la solución vehicular del fármaco. Los rangos de concentración del fármaco utilizados para la determinación de la IC₅₀ basal variaban dependiendo de la sensibilidad observada en bibliografía o experiencias previas abarcando desde 1 a 250 μ M.

Células en monocapa: después de 72 horas de exposición se eliminó el medio por inversión, descartando las células muertas. Se fijaron las células adheridas mediante ácido tricloroacético (TCA) (*Sigma Aldrich*) frío al 10%. Para eliminar los restos de TCA se realizaron 3 lavados y se dejaron secar las placas. Para la tinción de las células adheridas se utilizó una solución de sulforrodamina B al 0,4% en ácido acético al 1% y se eliminó el excedente mediante 3 lavados con ácido acético al 1%, dejándose secar durante 24 horas. Finalmente, para liberar el colorante y cuantificarlo se añadió TrisBase a pH 10,5 y se resuspendió energicamente. La lectura de la absorbancia se realizó a 492 nm mediante el *Ascen Software Multiskan* EX Microplate Photometer* (*Thermo Scientific*, España).

Células en suspensión: en el caso de los ensayos con CSCs (células en suspensión) (ver posteriormente) a las 72 horas se añadió 20 µl de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (10 mg/ml) por pocillo y se incubó durante 4 horas. Para eliminar el excedente de MTT en suspensión se centrifugó a máxima velocidad durante 20-30', eliminando el sobrenadante y dejando secar a temperatura ambiente o en estufa. Una vez eliminados los restos de MTT en suspensión se añadieron 200 µl de DMSO por pocillo resuspendiendo bien las sales. En último lugar, se realizó la lectura de las placas a 570 nm mediante *Thermo Scientific Multiskan EX*.

Obtención de ARN después de exposición a dosis IC₅₀ durante 72 horas

Los cultivos celulares fueron expuestos a la dosis de fármaco correspondiente a su IC₅₀ durante 72 horas y a dosis superiores. Tras el tratamiento se obtuvieron muestras de ARNm (ver previamente) y fueron sometidas a RT-PCR (tal y como se ha descrito anteriormente) para analizar los cambios en los niveles de expresión de *MGMT* y *CD133*.

3.1.2.6. Enriquecimiento de Cancer Stem Cells

Para realizar el enriquecimiento de las CSCs, se probaron varios medios representados en la Tabla 6, utilizando finalmente el medio RPMI-1640 suplementado (SIGMA). Las diferentes líneas celulares se mantuvieron en el medio de enriquecimiento de CSCs durante 8 días.

Tabla 6. Composición medios para CSC

1. NSC medium (neural stem cell medium) (GIBCO)
EGF (5 ng/ml)
FGF (5 ng/ml)
Antibiótico (1%)
2. HAM F12 mixture (SIGMA)
EGF(5 ng/ml)
FGF(5 ng/ml)
B27
Antibiótico (1%)
3. NSC medium (neural stem cell medium) (GIBCO)
EGF(5 ng/ml)
FGF(5 ng/ml)
B27
Antibiótico (1%)
4. Medio Knockout (GIBCO)
EGF(4 ng/ml)
FGF(6 ng/ml)
Suplemento neuronal
Glutamina (2 mM)
Antibiótico (1%)
5. Medio RPMI-1640 suplementado (SIGMA)*
HEPES (25 mM)
Glutamina (2 mM)
EGF(4 ng/ml)
FGF(10 ng/ml)
Insulin (10 µg/ml)
Transferrin (5.5 µg/mL)
Sodium selenite (5 ng/ml)
Antibiótico (1%)

*Medio utilizado

Se procedió a la extracción del ARN total de las líneas celulares (ver previamente) bajo condiciones de medio de enriquecimiento de CSCs a los 4 y 8 días. Debido a las características propias de las CSCs se consideró como CSCs la fracción en suspensión. Como control se utilizó la misma línea celular mantenida en DMEM suplementado con FBS. Para poder comparar la población en suspensión respecto a la que se mantenía en monocapa, también se analizaron las células que permanecían en monocapa a los 8 días. Se pudieron obtener las siguientes muestras:

- ARN de línea celular en DMEM enriquecido con FBS.
- ARN en medio de selección de CSCs a los 4 días en suspensión.
- ARN en medio de selección de CSCs a los 8 días en suspensión.
- ARN en medio de selección de CSCs a los 8 días en monocapa.

3.1.2.7. Estudio de expresión de ARNm mediante PCR cuantitativa (qPCR)

Los niveles de expresión de *MGMT* y *CD133* fueron determinados mediante qPCR, la cual fue realizada utilizando el producto de RT previamente obtenido y el sistema *Applied real time pcr biosystem*. Se usó como *house-keeping* o control de carga el *GADPH* y como gen diana *CD133* o *MGMT*, aplicándose por cuadruplicado en placas de 96 pocillos. La mezcla de reactivos para llevar a cabo la reacción fue:

- 9 μ l de ADNc diluido.
- 1 μ l de *taqman primer* de *GADPH* o *CD133* de *Applied biosystem*.
- 10 μ l de *Master mix* de *Applied biosystem*.

Se utilizó el *software StepOne™ Real-Time PCR Systems de Applied Biosystems* para el análisis de los resultados que fueron expresados en forma de $\Delta\Delta Ct$ (doble diferencial: $\Delta\Delta$, de *cycle threshold*: *Ct*, que corresponde al número de ciclos necesarios para cruzar un umbral de fluorescencia específico generado por el amplificado de la PCR). Este valor se obtiene en primer lugar, normalizando los valores *Ct* obtenidos de un amplificado problema respecto al *Ct* del control de carga: *GADPH*, dando el ΔCt y en segundo lugar

normalizando esta ΔCt usando una ΔCt de una muestra referencia obteniendo la $\Delta\Delta Ct$ (Figura 29). Hay que tener en cuenta que en esta parte del estudio siempre se usó como ΔCt de referencia la línea basal siendo así considerada con un valor estándar de 1 *fold*.

ΔCt : *Ct del gen problema/ Ct del control de carga*
 $\Delta\Delta Ct$: *ΔCt muestra problema/ ΔCt muestra de referencia*

Figura 29. Resumen cálculo ΔCt y $\Delta\Delta Ct$

Para la realización del estudio de qPCR, cada pocillo contenía aproximadamente 20 ng de ADNc retrotranscrito en 20 μl de *TaqMan Universal PCR Mastermix* y *TaqMan Gene Expression Assay* (Applied Biosystems, Life Technologies). Cada muestra fue analizada mediante *TaqMan® Gene Expression Assays* para *MGMT* (Hs01037698_m1) y *CD133* (Hs01009250_m1).

3.1.2.8. Exposición de Cancer Stem Cell al agente 5-Fluorouracilo

Se determinó la IC_{50} del 5-FU en las CSCs de la forma descrita previamente en las líneas celulares SW480 y RKO, considerando que presentan crecimiento en suspensión.

Las poblaciones enriquecidas en CSCs fueron sembradas en placas de 96 pocillos en un volumen final de 190 μl /pocillo. En paralelo, se sembraron las líneas celulares basales sin medio de inducción, realizándose el estudio de viabilidad siguiendo la misma metodología. El número de células que se sembraron se muestra en la Figura 30.

1. RKO en medio de enriquecimiento de CSC: 17.000 células/pocillo
2. RKO en medio DMEM completo: 17.000 células/pocillo
3. SW480 en medio de enriquecimiento de CSC: 8.000 células/pocillo
4. SW480 en medio DMEM completo: 8.000 células/pocillo

Figura 30. Número de células sembradas por pocillo dependiendo de la línea celular.

Las células fueron tratadas con 5-FU según el diseño de la Figura 31. Se testó la toxicidad del DMSO, disolvente del 5-FU. Se calculó el % de inhibición del crecimiento celular respecto al control (línea celular sin fármaco) siguiendo la metodología descrita previamente.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	5 μ M						1280 μ M					
B	10 μ M						2560 μ M					
C	20 μ M						5120 μ M					
D	40 μ M						10240 μ M					
E	80 μ M						Control					
F	160 μ M						Control					
G	320 μ M						DMSO toxicidad					
H	640 μ M						DMSO toxicidad					

Figura 31. Diseño de distribución de dosis de fármaco en placas de 96 pocillos para el análisis de inhibición de crecimiento de 5-FU en CSCs frente a la línea basal.

3.1.2.9. Medición de apoptosis y estado del ciclo celular

Las CSCs y las células basales fueron sometidas a un estudio de apoptosis tras el tratamiento con 5-FU (IC_{50} a las 72 horas). Se utilizaron 5×10^5 células y se centrifugaron a 3.500 rpm durante 2 minutos. A continuación, se lavaron con PBS frío y se resuspendieron con 100 μ l de PBS. Para el proceso de fijación, se añadieron 900 μ l de etanol al 70% (frío $\approx -20^{\circ}C$) en agitación con vórtex para evitar la formación de coágulos. Las células se incubaron durante 10 minutos a $4^{\circ}C$ para fijarlas, se centrifugaron para eliminar el etanol (3.500 rpm durante 2 minutos) y fueron lavadas con PBS resuspendiéndolas con 250 μ l de solución de extracción de ADN compuesta por 192 ml de $NaHPO_4$ 0,2M (pH: 7,8) y 8 ml de ácido cítrico 0,1M. A continuación, se incubó durante 10 minutos a $37^{\circ}C$ en esta solución y se centrifugó para eliminarla. Finalmente, se añadieron 250 μ l de solución con ioduro de propidio formada por: PBS + 100 μ g/ml RNasa + 40 μ g/ml de ioduro de propidio, incubándose durante 30 minutos a $37^{\circ}C$ y se realizó la lectura en el citómetro de flujo *Calibur Flow Cytometry System (FACS) (Becton Dickinson)* (Figura 32).



Figura 32. *Calibur Flow Cytometry System de Becton Dickinson (FACS)*

Finalmente las muestras utilizadas para el ensayo fueron:

1. Línea celular basal en DMEM sin 5-FU (control negativo).
2. Línea celular basal en DMEM con 5-FU (control positivo).
3. CSC en medio de selección de CSCs con 5-FU.

3.2. ESTUDIOS *IN VIVO* (PACIENTES)

3.2.1. MATERIAL

3.2.1.1. *Poblaciones de estudio*

3.2.1.1.1. Población de estudio con cáncer colorrectal

Nuestro estudio ha sido realizado en una población de 123 muestras procedentes de la resección del tumor de pacientes afectos de CCR. Las muestras fueron solicitadas al Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía, lo que ha permitido, a través de la aplicación informática *online Bio-e-bank*, obtener muestras de pacientes de los Hospitales Universitario Puerta del Mar (33 pacientes), Universitario Puerto Real (13 pacientes) y Universitario San Cecilio (77 pacientes). Todos los pacientes fueron tratados mediante cirugía. Tras la cirugía se administró quimioterapia adyuvante utilizando 5-FU, irinotecán, oxaliplatino y/o radioquimioterapia concomitante.

3.2.1.1.2. Población de estudio con cáncer rectal

Esta parte del estudio incluye un grupo de 29 pacientes diagnosticados y tratados de cáncer rectal. Las muestras fueron obtenidas del Hospital Clínico de Málaga, gracias a la colaboración del Dr. Jaime Gómez Millán del que se obtuvo permiso para utilizarlas, a través del Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía. Todos los pacientes siguieron el mismo esquema de tratamiento: tratamiento de inducción previo a la cirugía, consistente en radioterapia (una dosis de 46 Gy en 23 fracciones, 1 fracción al día de lunes a viernes) y 5-FU (infusión continua a dosis de 225 mg/m²) o capecitabina oral durante el tiempo de radioterapia. Tras 6 semanas después de finalizar el tratamiento, los pacientes fueron sometidos a cirugía rectal, mediante resección anterior y anastomosis termino-terminal o bien amputación abdomino-perineal, a criterio del cirujano. Finalmente, se aplicaron 4 ciclos de 5-FU intravenoso (500 mg/m², desde el día 1 al 5, cada 21 días).

3.2.1.2. Pacientes: Registro de datos

De los pacientes afectos de CCR y a través de la colaboración del Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía, pudimos obtener las siguientes variables de los historiales clínicos:

- Edad (años)
- Sexo: Hombre o Mujer
- Grado de diferenciación tumoral: bien, moderadamente o pobremente diferenciado
- Estadio tumoral (pTNM): I, II, III o IV
- Metástasis: localización cercana o lejana
 - Cercana: pancreática o hepática
 - Lejana: pulmonar o cerebral
- Fecha de diagnóstico, *exitus* y reaparición de enfermedad
 - Supervivencia global (fecha de diagnóstico hasta fecha de *exitus*)
 - Supervivencia libre de enfermedad (fecha de diagnóstico hasta fecha de reaparición de enfermedad)
- Quimioterapia: Si o No
- Radioterapia: Si o No
- Estado última revisión
 - Vive libre de enfermedad en última revisión
 - Vive con enfermedad
 - Progresión y muerte por enfermedad
- Respuesta al tratamiento:
 - Respuesta completa
 - Respuesta incompleta

Para el análisis estadístico los pacientes se agruparon en: 1) bien y moderadamente diferenciados (pacientes de mejor pronóstico); 2) pacientes pobremente diferenciados (de peor pronóstico). Por otro lado, se agruparon los estadios I y II (pacientes con buen pronóstico) y los estadios III y IV (pacientes con mal pronóstico).

De los pacientes afectados de cáncer rectal, además de las variables mencionadas anteriormente, se obtuvieron otras variables tanto en la fase de pretratamiento como en la de postratamiento:

- Grado de regresión tumoral
 - GRT1: no se encuentra adenocarcinoma
 - GRT2: se encuentran algunas células o glándulas neoplásicas residuales
 - GRT3: predominio de fibrosis sobre el tumor
 - GRT4: regresión parcial con predominio de tumor sobre fibrosis
 - GRT5: tumor sin cambios
- Evolución de la TNM desde pretratamiento a postratamiento
 - Progresión: aumento de la T o N
 - Respuesta incompleta: no se modifica ni T ni N
 - Respuesta parcial: reducción de N o T
 - Respuesta completa: desaparece el tumor

3.2.1.3. Obtención de muestras de las poblaciones de estudio

Se obtuvieron muestras de tejido de las dos poblaciones objeto de estudio:

Población de estudio con CCR: Las muestras de tejido fueron obtenidas en el momento quirúrgico (biopsia) (Figura 33), fueron incluidas en parafina y usadas posteriormente para la evaluación de variables histopatológicas como el grado de diferenciación y el estadio tumoral según los criterios estándar [144]. Además, parte de estas muestras fueron usadas para la obtención de ADN y la realización de estudios inmunohistoquímicos.



Figura 33. Esquema del procedimiento de obtención de muestras. Las muestras de tejido fueron obtenidas mediante la resección tumoral. Estas se incluyeron en parafina para su conservación. Finalmente se obtuvo el ADN y secciones en parafina con las cuales se realizaron las inmunohistoquímicas.

Población de estudio con cáncer rectal: en esta selección de pacientes, las muestras de tejido para la realización del estudio fueron obtenidas: 1) en la fase de pretratamiento, durante la endoscopia diagnóstica y 2) en la fase de postratamiento, durante la cirugía rectal tras haberse completado el tratamiento radioquimioterápico (Figura 34). Dichas muestras fueron incluidas en OCT o parafina y utilizadas para posteriores estudios (obtención de ADN, ARN y tinciones inmunohistoquímicas).

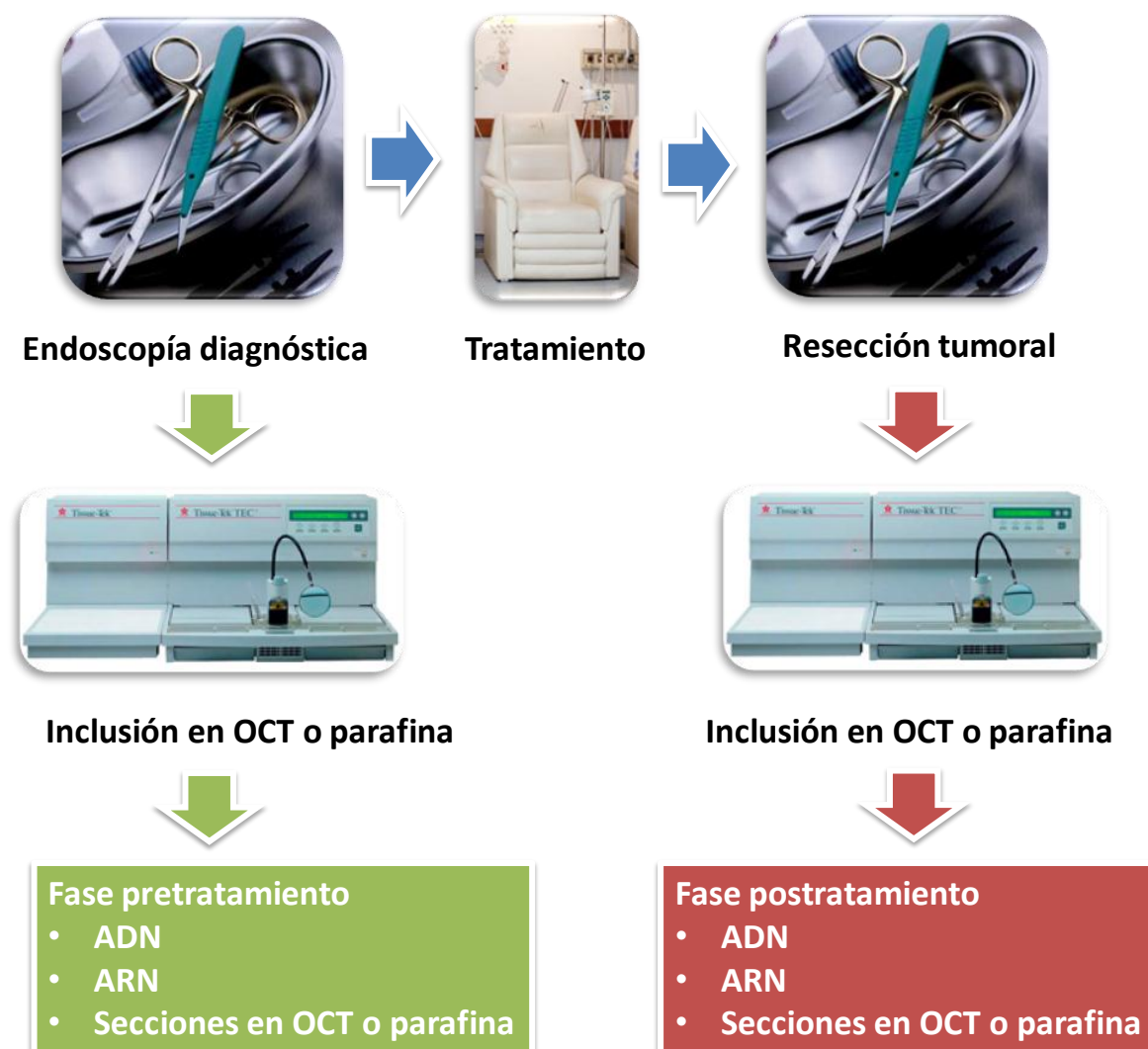


Figura 34. Esquema del procedimiento de obtención de muestras de la selección de pacientes diagnosticados con cáncer rectal. En esta población de estudio se obtuvieron dos biopsias de cada paciente: una en la fase de pretratamiento, durante la endoscopia diagnóstica y otra en la fase de postratamiento. De ambas biopsias se extrajo el ADN, ARN y se obtuvieron secciones en parafina para la inmunohistoquímica.

3.2.2. MÉTODOS

El tejido de los pacientes de las dos poblaciones de estudio (tanto incluido en OCT como en parafina) fue utilizado para la obtención de ADN y ARNm y la realización de estudios de metilación y de expresión.

3.2.2.1. Determinación del estado de metilación del promotor de *MGMT*

3.2.2.1.1. Extracción de ADN del tejido

Para la determinación del estado de metilación del promotor de *MGMT* se realizó extracción de ADN a partir de 7 a 10 cortes (10 μm) obtenidos mediante micrótopo o criostato de los bloques de parafina o tejido incluido en OCT respectivamente de las muestras tumorales de cada paciente. La extracción se llevó a cabo utilizando el *Robot Chemagic MSM I*. La concentración promedio de ADN obtenida fue de 1,087 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ con una ratio 260/280 media de 1,98.

3.2.2.1.2. Estudio de metilación

El estudio de metilación del promotor de *MGMT* se llevó a cabo de forma similar al realizado en líneas celulares (ver sección 3.1.2.2) siguiendo el protocolo del *EpiTec bisulfite kit*.

3.2.2.2. Estudio de expresión de ARNm de *CD133* y *MGMT*

3.2.2.2.1. Extracción de ARN del tejido

Las muestras de ARN sólo fueron obtenidas de la selección de pacientes con cáncer rectal. La extracción se realizó a partir de las muestras incluidas en OCT utilizando 20 a 30 secciones (20 μm) obtenidas mediante el criostato. Posteriormente se procedió a la homogenización mecánica y solubilización mediante TRIzol®. El proceso de lavado y purificación se llevó a cabo mediante el *RNAeasy Mini kit (Qiagen, EE.UU. Maryland)*. Finalmente, se determinó la

integridad del ARN y se obtuvo su concentración de forma similar a la descrita previamente (ver sección 3.1.2.4.1).

3.2.2.2.2. Retrotranscripción

En los pacientes con cáncer rectal, la RT se realizó mediante el *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Life Technologies)* con RNAsa de *Applied Biosystems* a partir de 200 ng de cada muestra en un volumen de 10 μ l, a la que se añadieron 5 μ l de la *Master mix* con la composición que se muestra a continuación:

10X RT Buffer	1.0 μ l
25X dNTP Mix (100 mM)	0.4 μ l
10X RT Random Primers	1.0 μ l
Multi Scribe™ Reverse Transcriptase	0.5 μ l
RNase Inhibitor	0.5 μ l
<u>Nuclease-free H₂O</u>	<u>1.6 μl</u>
	5 μ l finales

A este volumen se le añadieron 10 μ l de agua libre de RNAsas, obteniendo un volumen final de 25 μ l. Finalmente, se le aplicó el programa de temperaturas que muestra la Figura 35 en el termociclador conservando el ADNc a -20°C.

	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
Temperatura (°C)	25	37	85	4
Tiempo	10'	120'	5'	∞

Figura 35. Programa aplicado para retrotranscripción del ARN.

3.2.2.2.3. Estudio de expresión de ARNm mediante PCR cuantitativa (qPCR)

Antes de realizar los estudios de qPCR y con el objetivo de establecer un valor constante de expresión en todas las placas, se realizó un *pool* de ARN del tejido normal circundante de todos los pacientes, estableciéndose siempre éste como valor de referencia para el análisis de los datos.

El estudio de qPCR se llevó a cabo como está descrito previamente (sección 3.1.2.7). En este estudio de expresión de ARNm mediante PCR cuantitativa (qPCR), *GADPH* (*catalog number: 4333764F*) y el *pool* de ADNc de los tejidos normales circundantes fueron utilizados como control endógeno y muestra de calibración, respectivamente. Considerando que necesitamos 9 μ l de ADNc por pocillo para la qPCR, que tenemos que realizar tres réplicas de cada muestra y que se analizan tres genes (*CD133*, *MGMT* y *GADPH*), se utilizó un volumen final de 81 μ l. Por esta razón, se cogieron 20 μ l de ADNc y se añadieron 80 μ l de agua libre de RNAsas (100 μ l finales).

A partir de estos 100 μ l se repartieron del siguiente modo:

- 30 μ l de ADNc para *MGMT* + 33,3 μ l de *mix* + 3,33 μ l *primer* = 66,63 μ l
- 30 μ l de ADNc para *CD133* + 33,3 μ l de *mix* + 3,33 μ l *primer* = 66,63 μ l
- 30 μ l de ADNc para *GADPH* + 33,3 μ l de *mix* + 3,33 μ l *primer* = 66,63 μ l

De este modo, se realizó el análisis por triplicado de las tres muestras de cada paciente (pretratamiento, postratamiento y tejido normal circundante) para cada gen (*GADPH*, *MGMT* y *CD133*).

En cada placa se pusieron muestras de 3 pacientes con su ADNc de la fase pretratamiento, postratamiento y del tejido normal circundante y el *pool* de tejido normal como referencia.

De este modo, para cada gen se preparó la *master mix* incluyendo:

- 366,3 μ l de *Master Mix* + 36,63 μ l de *primer* *GADPH*= $402,93/11= 36,63\mu$ l a cada tubo
- 366,3 μ l de *Master Mix* + 36,63 μ l de *primer* *CD133*= $402,93/11= 36,63\mu$ l a cada tubo
- 366,3 μ l de *Master Mix* + 36,63 μ l de *primer* *MGMT*= $402,93/11=36,63 \mu$ l a cada tubo

Finalmente, para cada 30 μ l de ADNc se añadieron 36,3 μ l de *Master Mix*, obteniendo un volumen final de 66,3 μ l. Este volumen se repartió en tres pocillos para realizar el triplicado. El diseño final se puede observar en la Figura 36.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1 NORMAL GADPH			1 NORMAL MGMT			1 NORMAL CD133			1 PRE GADPH		
B	1 PRE MGMT			1 PRE CD133			1 POST GADPH			1 POST MGMT		
C	1 POST CD133			2 NORMAL GADPH			2 NORMAL MGMT			2 NORMAL CD133		
D	2 PRE GADPH			2 PRE MGMT			2 PRE CD133			2 POST GADPH		
E	2 POST MGMT			2 POST CD133			3 NORMAL GADPH			3 NORMAL MGMT		
F	3 NORMAL CD133			3 PRE GADPH			3 PRE MGMT			3 PRE CD133		
G	2 POST GADPH			2 POST MGMT			2 POST CD133			Pool GADPH		
H	Pool MGMT			Pool CD133								

Figura 36. Ejemplo de diseño de placa de 96 pocillos para qPCR. Podemos apreciar que para cada paciente (paciente 1, 2 ,3) se analizó la expresión de GADPH, MGMT y CD133 en el tejido normal, pre y postratamiento. Además en todas las placas siempre se puso el pool de ADNc como control.

El valor medio de Ct fue utilizado para obtener la ΔCt gracias al 7500 software v2.0.6, usando como referencia siempre el *pool* de tejido normal y GADPH. Para el análisis de correlación de las $\Delta\Delta Ct$ con las variables clínicas se consideraron 2 *folds* como punto de corte, separando los pacientes en dos grupos (<2 *folds* y ≥ 2 *folds*). Además, se analizó el cambio de la $\Delta\Delta Ct$ o *fold change* (FC) desde el tejido normal a tejido tumoral en las fases pretratamiento, postratamiento y entre ambas fases. Se midió la magnitud del cambio fold change (FC) y se consideró como cambio significativo modificaciones del $\pm 100\%$ (± 1 *fold*) entre biopsias. De este modo, se obtuvo la evolución de $\Delta\Delta Ct$ o FC entre las distintas muestras evaluándose como aumento, reducción o estable los niveles de expresión.

3.2.2.3. Estudio inmunohistoquímico de MGMT y CD133

Para el estudio inmunohistoquímico (IHQ) se tuvo en cuenta el proceso de inclusión al cual se había sometido la muestra. Para las muestras incluidas en parafina se fabricó el *Tissue Micro Arrays* (TMA) y para las muestras incluidas en OCT se usaron cortes de secciones completas.

3.2.2.3.1. Tissue Micro Array (muestras incluidas en parafina)

De cada muestra de tejido incluida en parafina se seleccionaron tres regiones representativas a partir de una sección previamente teñida con hematoxilina-eosina. Se confeccionaron núcleos con diámetro de 0.6 mm que fueron separados por 0.8 mm usando el *Manual Tissue Microarrayer* (Beecher Instruments, Silver Spring, MD). Los bloques resultantes se cortaron con un grosor de 5 μm mediante micrótomo y se transfirieron al portaobjetos. Los procesos de desparafinación, rehidratación, recuperación del epítipo y marcaje fueron llevados a cabo mediante el *Dako Autostainer EnVision™ FLEX kit* (Agilent Technologies, Dako, España) (Figura 37).

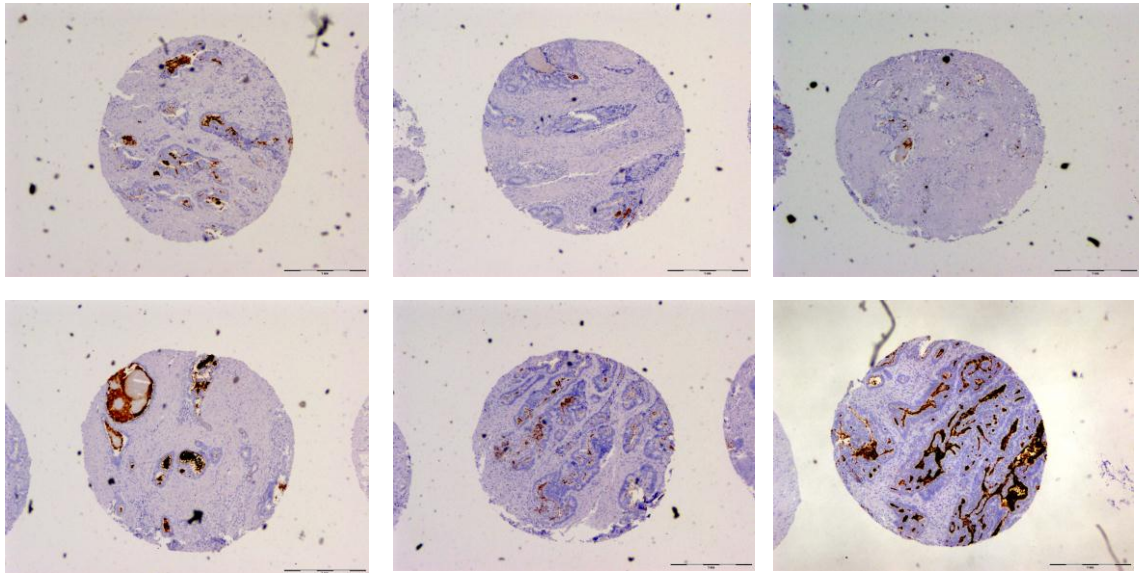


Figura 37. Ejemplo de punches de TMA.

3.2.2.3.2. Secciones completas (muestras incluidas en OCT)

Las muestras incluidas en OCT se cortaron mediante criostato en secciones de 4 µm de grosor y se fijaron mediante acetona fría a 4°C. El marcaje fue llevado a cabo mediante *el Dako Autostainer EnVision™ FLEX kit*.

3.2.2.3.3. Tinción y revelado

Las secciones incluidas en parafina se montaron en portaobjetos y se dejaron secar en estufa a 37°C durante toda la noche. Se aplicaron los procesos de desparafinación, hidratación y desenmascaramiento antigénico mediante el *PT Link* y el *Dako Autostainer EnVision*. A continuación, se realizaron con el sistema automatizado *Dako Autostainer EnVision*, las incubaciones con el anticuerpo primario específico, el anticuerpo secundario marcado con peroxidasa y la 3,3'-diaminobenzidina (DAB), permitiendo la visualización del producto de reacción mediante un precipitado color marrón. Para marcar los núcleos se utilizó una contratinción mediante hematoxilina (azul). Los procesos de deshidratación (alcohol 95°, alcohol 100° y Xilol) y montaje con DPX se realizaron manualmente. Cabe destacar que en las muestras incluidas en OCT se prescindió de las etapas de desparafinación y desenmascaramiento antigénico.

Se establecieron controles tanto positivos como negativos. La lectura fue realizada por dos patólogos independientes no observando diferencias entre ambas valoraciones.

Los anticuerpos utilizados fueron frente a MGMT (1:50, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Germany, Heidelberg) y CD133 (1:50, Miltenyi biotec., Germany, Bergisch Gladbach). Con respecto a CD133, se valoró como positiva la tinción de la superficie endoluminal y de los restos celulares en el interior de la glándula tumoral (Figura 38A). Para este marcador, se consideraron positivos ambos patrones de tinción, no observándose marcaje en el tejido tumoral circundante (Figura 38C) [210]. MGMT presentó marcaje nuclear (Figura 38B), observándose tinción en la región tumoral circundante (Figura 38D).

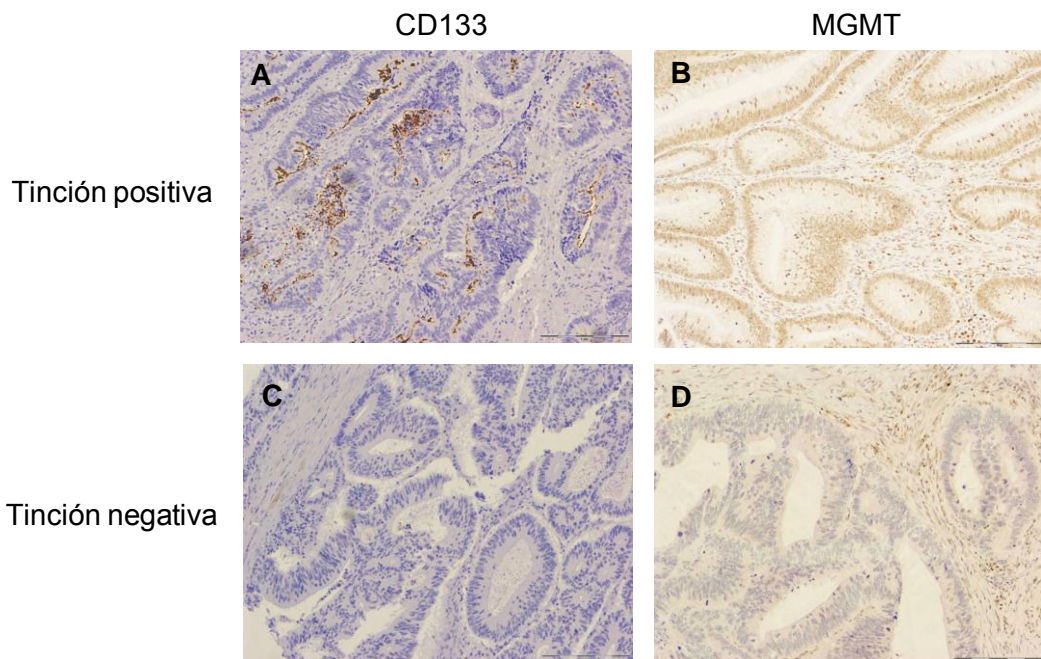


Figura 38. Marcaje de MGMT y CD133. **A.** Para CD133 se consideró positiva la tinción de la superficie endoluminal y de los restos celulares en el interior de la glándula tumoral, **B.** MGMT presentó marcaje nuclear, **C y D.** Tinción negativa para ambos biomarcadores.

La lectura del % de expresión e intensidad de marcaje de CD133 y MGMT se realizó mediante dos evaluadores independientes. Se determinaron la intensidad y % de marcaje de la región tumoral siguiendo los criterios mostrados en las Tablas 7 y 8.

Marcaje IHQ de MGMT	
Porcentaje	Características
0	No hay células tumorales que expresen MGMT
+	Entre el 1 y el 24% de las células expresan MGMT
++	Entre el 25% y el 50% de las células expresan MGMT
+++	Entre el 50 y el 75% de las células expresan MGMT
++++	Entre el 76% y el 100% de las células expresan MGMT
Porcentaje (dicotómico)	Agrupamos
<50%	0,+ y ++
≥50%	+++ y ++++
Intensidad	Características
0	Nula
+	Intensidad débil
++	Intensidad moderada
+++	Intensidad elevada
Intensidad (dicotómica)	Agrupamos
Baja intensidad	0 y +
Alta intensidad	++ y +++

Tabla 7. Clasificación del marcaje con MGMT.

Marcaje IHQ de CD133	
Porcentaje (parafina)	Características
0	No hay glándulas que expresen CD133
<50%	<50% de las glándulas expresan CD133
≥50%	≥50% de las glándulas expresan CD133
Porcentaje dicotómico (parafina)	Agrupamos
<50%:	0 y <50%
≥50%	≥50%
Porcentaje (OCT)	Características
0	No hay glándulas que expresen CD133
<5%	<5% de las glándulas expresan CD133
≥5%	≥5% de las glándulas expresan CD133
Porcentaje dicotómico (OCT)	Agrupamos
<5%	0 y <5%
≥5%	≥5%
Intensidad	Características
0	Nula
+	Intensidad débil
++	Intensidad moderada
+++	Intensidad elevada
Intensidad dicotómica	Agrupamos
Baja intensidad	0 y +
Alta intensidad	++ y +++

Tabla 8. Clasificación del marcaje con CD133.

Además, en los pacientes con biopsias pre y postratamiento (selección de pacientes con cáncer rectal) se evaluó la evolución entre las biopsias, considerándose tres grupos: aumento, estable o reducción de la expresión.

3.2.2.4. Estudio estadístico

Una vez determinados el estado de metilación del promotor de *MGMT*, los $\Delta\Delta\text{Ct}$ de ARNm de *CD133* y *MGMT* y la expresión inmunohistoquímica de *MGMT* y *CD133*, se introdujeron los datos, junto a las variables clínicas, en el *software* estadístico SPSS 17.0.

En primer lugar, se realizó un análisis descriptivo, calculándose las medidas de tendencia central y dispersión para las variables cuantitativas (clínicas: edad, SG y SLE o moleculares: $\Delta\Delta\text{Ct}$ expresión de ARNm) y frecuencias relativas y absolutas para las variables cualitativas (clínicas: sexo, edad como factor de riesgo, estadio tumoral, etc. o moleculares).

En segundo lugar, se analizaron las interacciones entre los distintos grupos de variables y dentro de las mismas:

- Las correlaciones entre las variables ordinales se llevaron a cabo mediante el coeficiente de correlación de Rho de *Spearman* (ρ) y el coeficiente de correlación de *Pearson* para las variables cuantitativas.
- La evolución de las variables moleculares entre las muestras pre y post de la selección de pacientes con cáncer rectal se realizó mediante los tests de *McNemar* y de rango de signos de *Wilcoxon*.
- Para las asociaciones entre variables dicotómicas se utilizaron tablas de contingencia con el estadístico χ^2 o el estadístico exacto de *Fisher* en los casos en los que el porcentaje de frecuencias esperadas inferior a 5 fue mayor del 20% para realizar análisis de asociación.
- Para determinar si existían diferencias significativas entre las medias de las variables se aplicaron las pruebas T de *Student* y de *Levene* para igualdad de varianzas. A las variables que no cumplían los requisitos para la

aplicación de pruebas paramétricas se les aplicó la prueba de U de *Mann-Whitney*.

- Para los estudios de supervivencia se usó el test no paramétrico de *Kaplan Meier*, por el método de *Long-Rank*.
- Para identificar las variables más relevantes asociadas a la supervivencia se realizó un análisis multivariable: regresión de Cox o modelo de los riesgos proporcionales.

Para todas las pruebas y tests estadísticos se consideró significativo un valor $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. RESULTADOS EN LÍNEAS CELULARES

4.1.1. ESTADO DE METILACIÓN DEL PROMOTOR DE *MGMT*

El análisis del estado de metilación del promotor de *MGMT*, en las líneas usadas en nuestro estudio, demostró que sólo dos de las líneas tumorales no presentaron metilación (UM) (RKO y HT29) mientras que las cuatro restantes se encontraron parcialmente metiladas (UM/M) (HCT116, SW480, T84 y HCT15). La línea transformada CCD18co presentó el promotor de *MGMT* hipermetilado (M) (Figura 39).

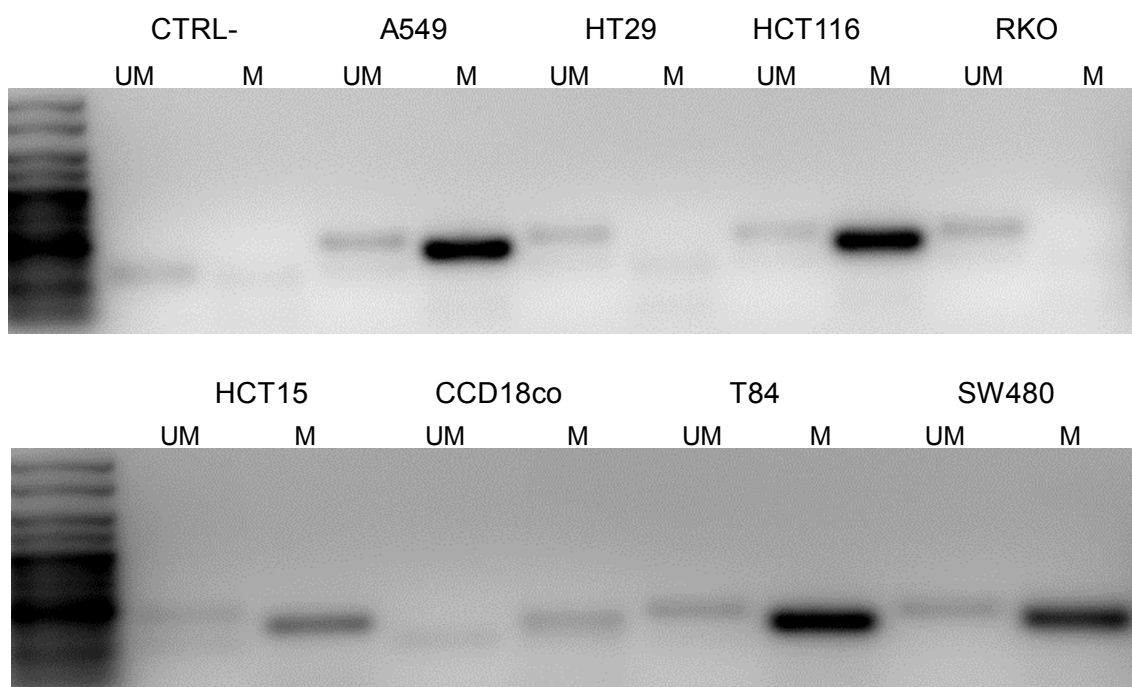


Figura 39. Estado de metilación del promotor de *MGMT* en líneas celulares derivadas de CCR y en la línea transformada CCD18co. Como control positivo se utilizó la línea A549. Se incluyó un control negativo (CTRL-) sin muestra, para determinar posibles contaminaciones. Se usó *HyperLadder V* como marcador de peso molecular. UM, no metilado; M, metilado

4.1.2. ESTADO DE METILACIÓN DEL PROMOTOR DE *CD133*

Las mismas líneas fueron utilizadas para el estudio del estado de metilación del promotor de *CD133*, pudiéndose comprobar que todas las líneas tumorales presentaban el promotor parcialmente metilado (UM/M). Como ocurrió para el promotor de *MGMT*, la línea transformada CCD18co presentó el promotor de *CD133* hipermetilado (M) (Figura 40).

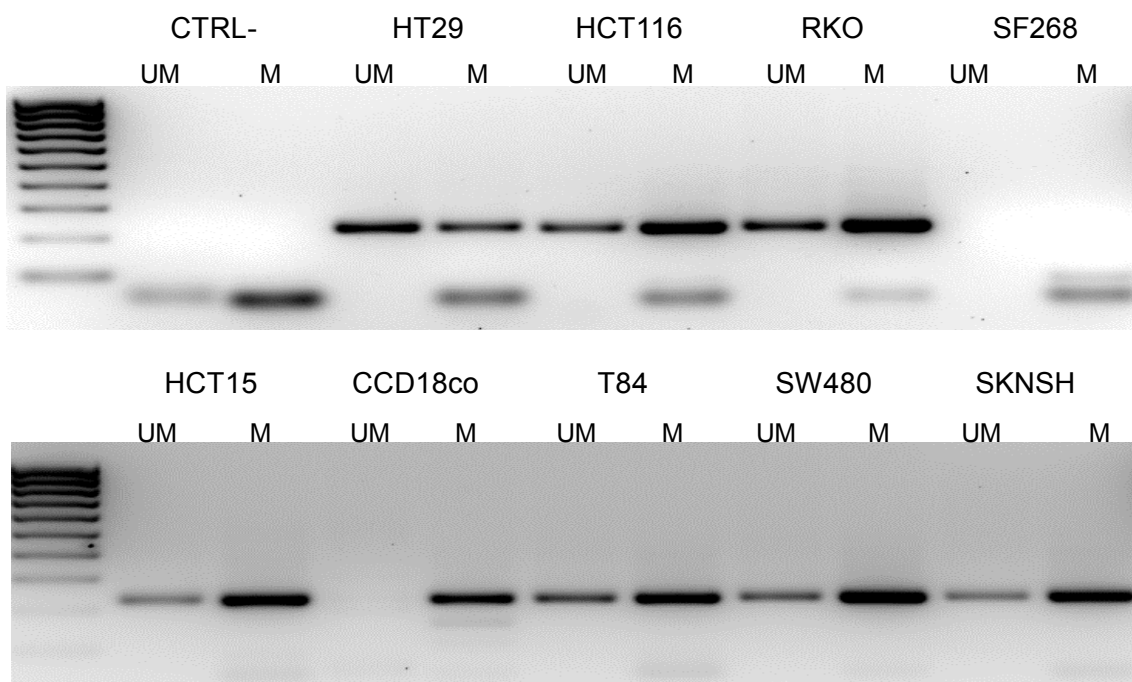


Figura 40. Estado de metilación del promotor de *CD133* en líneas celulares derivadas de CCR y en la línea transformada CCD18co. Como control positivo se utilizó la línea SKNSH. Se incluyó un control negativo (CTRL-) sin muestra para determinar posibles contaminaciones. Se usó *HyperLadder V* como marcador de peso molecular. UM, no metilado; M, metilado.

4.1.3. EXPRESIÓN DE ARN DE *MGMT* EN LÍNEAS CELULARES

El estudio de la expresión de ARNm de *MGMT* en las 7 líneas celulares utilizadas fue llevado a cabo mediante PCR semicuantitativa. Como se observa en la Figura 41, todas las líneas mostraron niveles similares de expresión de la enzima a excepción de la línea CCD18co en la que la expresión fue muy baja.

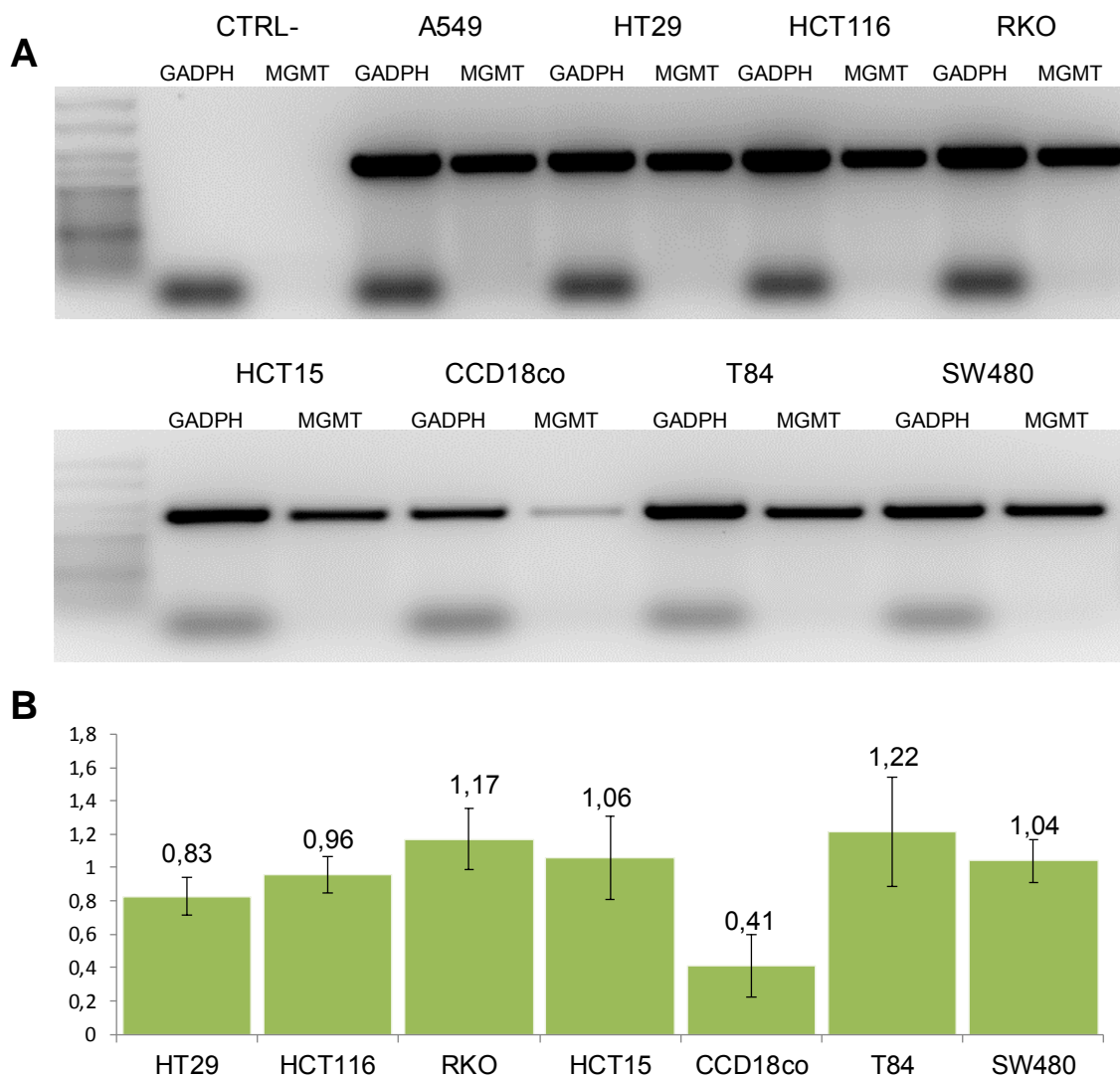


Figura 41. Expresión de ARNm de *MGMT* en líneas celulares. **A.** Gel de agarosa, **B.** Representación gráfica del ratio *MGMT*/*GADPH* en las distintas líneas celulares. El marcador de peso molecular utilizado fue el *HyperLadder V*. Se incluyó un control negativo (CTRL-) sin muestra, para determinar posibles contaminaciones.

4.1.4. EXPRESIÓN DE ARN DE *CD133* EN LÍNEAS CELULARES

La expresión de ARNm de *CD133* también fue estudiada mediante PCR semicuantitativa. Todas las líneas, a excepción de la línea tumoral RKO, presentaron expresión de *CD133* (Figura 42). No obstante, los niveles de expresión de ARNm variaron entre las diferentes líneas, como pudimos comprobar mediante el análisis densitométrico de las bandas.

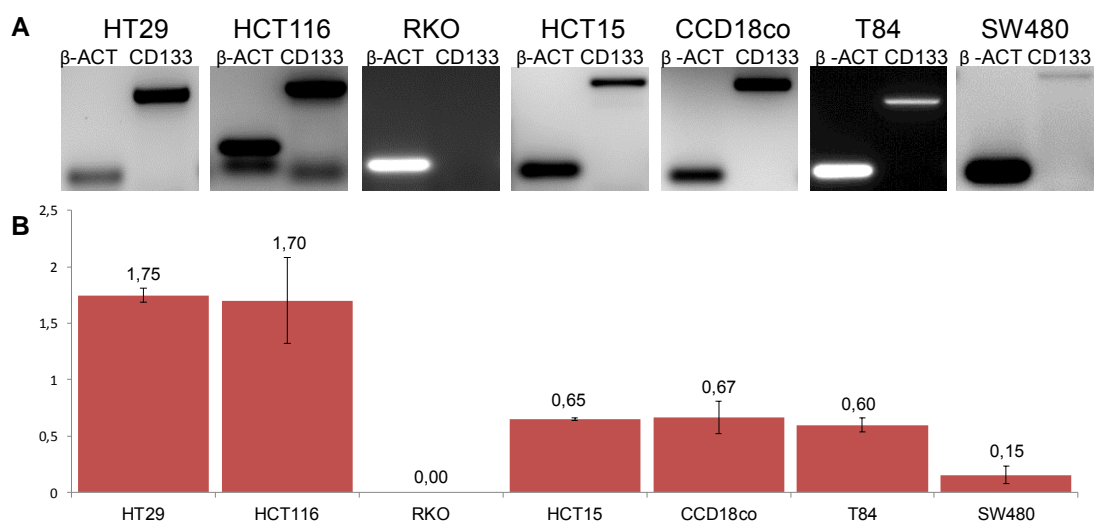


Figura 42. Expresión de ARNm de *CD133* en líneas celulares. **A.** Gel de agarosa, **B.** Representación gráfica del ratio *CD133*/ β -Actina (β -Act) en las distintas líneas celulares.

4.1.5. ESTUDIO DE LA CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE *MGMT* Y *CD133* Y EL ESTADO DE METILACIÓN DE SU PROMOTOR

Los resultados previamente obtenidos nos permitieron analizar la posible correlación entre la metilación del promotor de *MGMT* y *CD133* y la expresión del ARNm en ambos. Pudimos observar que en 6 de las 7 líneas celulares (todas excepto T84) se apreciaba cierta relación entre la expresión de ARN y el estado de metilación de *MGMT*. De este modo, pudimos observar que RKO presentaba una elevada expresión de ARNm (ratio *GADPH*/*MGMT*: $1,1705 \pm 0,184$) y tenía el promotor de *MGMT* no metilado (UM). En el lado

opuesto, CCD18co presentaba los niveles de expresión más bajos (ratio GADPH/MGMT: $0,412 \pm 0,185$) y tenía su promotor hipermetilado (M). El resto de líneas celulares, con el promotor de *MGMT* parcialmente metilado (UM/M), presentaron valores intermedios, a excepción de T84. Por otra parte, no pudimos apreciar ninguna relación entre el estado de metilación del promotor de *CD133* y su nivel de expresión de ARNm.

4.1.6. MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE *MGMT* POR EL AGENTE TERAPÉUTICO 5-FLUOROURACILO EN LAS LÍNEAS CELULARES

Para determinar el posible cambio de expresión de *MGMT* por el agente 5-FU, las líneas celulares fueron expuestas al agente terapéutico en dos experiencias distintas: a) por una parte se utilizó la exposición a la IC_{50} específica de cada línea y b) por otra, se realizó una exposición a concentraciones de 5-FU superiores a la IC_{50} .

En primer lugar, se determinó la IC_{50} del agente terapéutico para todas las líneas celulares utilizadas (Tabla 9).

Línea celular	μM (5-FU)
HT29	2
HCT116	16
RKO	23
HCT15	8
CCD18co	8
T84	3
SW480	5

Tabla 9. Determinación de la IC_{50} del agente 5-FU para líneas celulares derivadas de CCR y en la línea transformada CCD18co tras 72 horas de exposición.

La Figura 43 muestra la modificación en la expresión de *MGMT* de las líneas utilizadas tras la exposición de las mismas a 5-FU (dosis

correspondiente a su IC_{50}). Como podemos observar, no apreciamos modificaciones de la expresión de la enzima MGMT en las líneas tumorales analizadas tras la exposición al fármaco. No obstante, cabe destacar que la línea transformada CCD18co, la única que presenta el promotor de *MGMT* hipermetilado, mostró una pérdida completa de la expresión de *MGMT*.

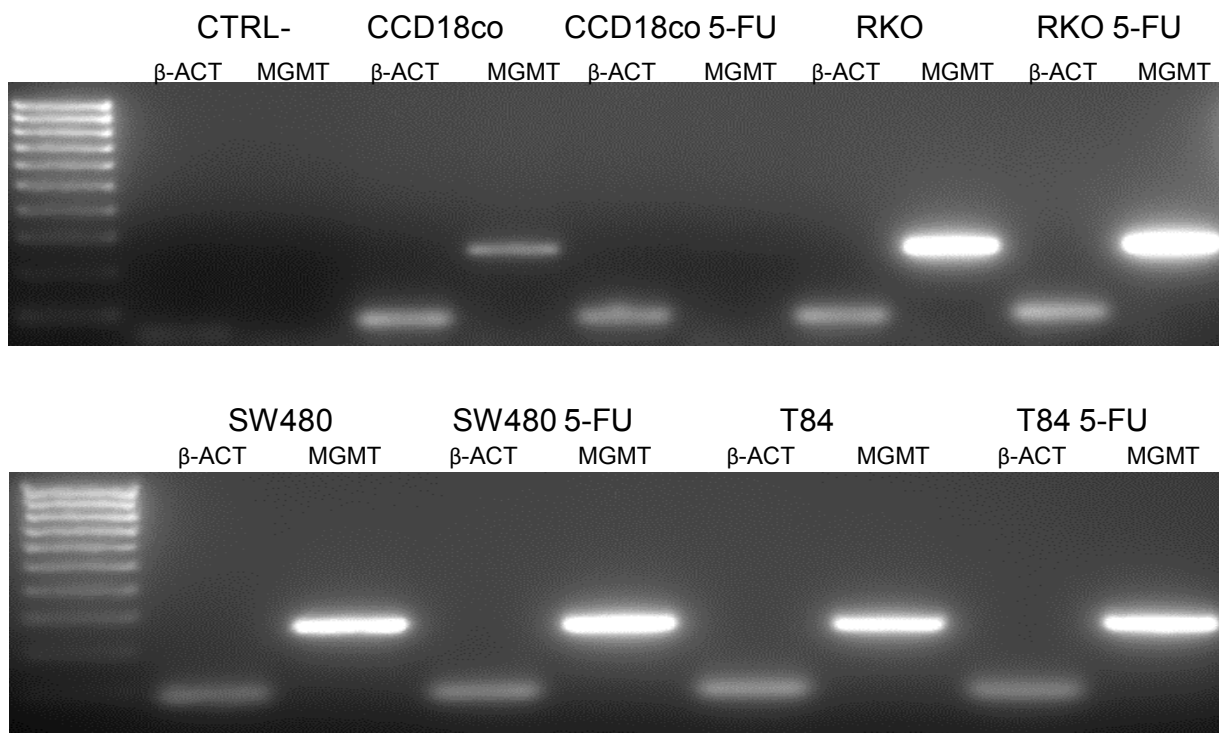
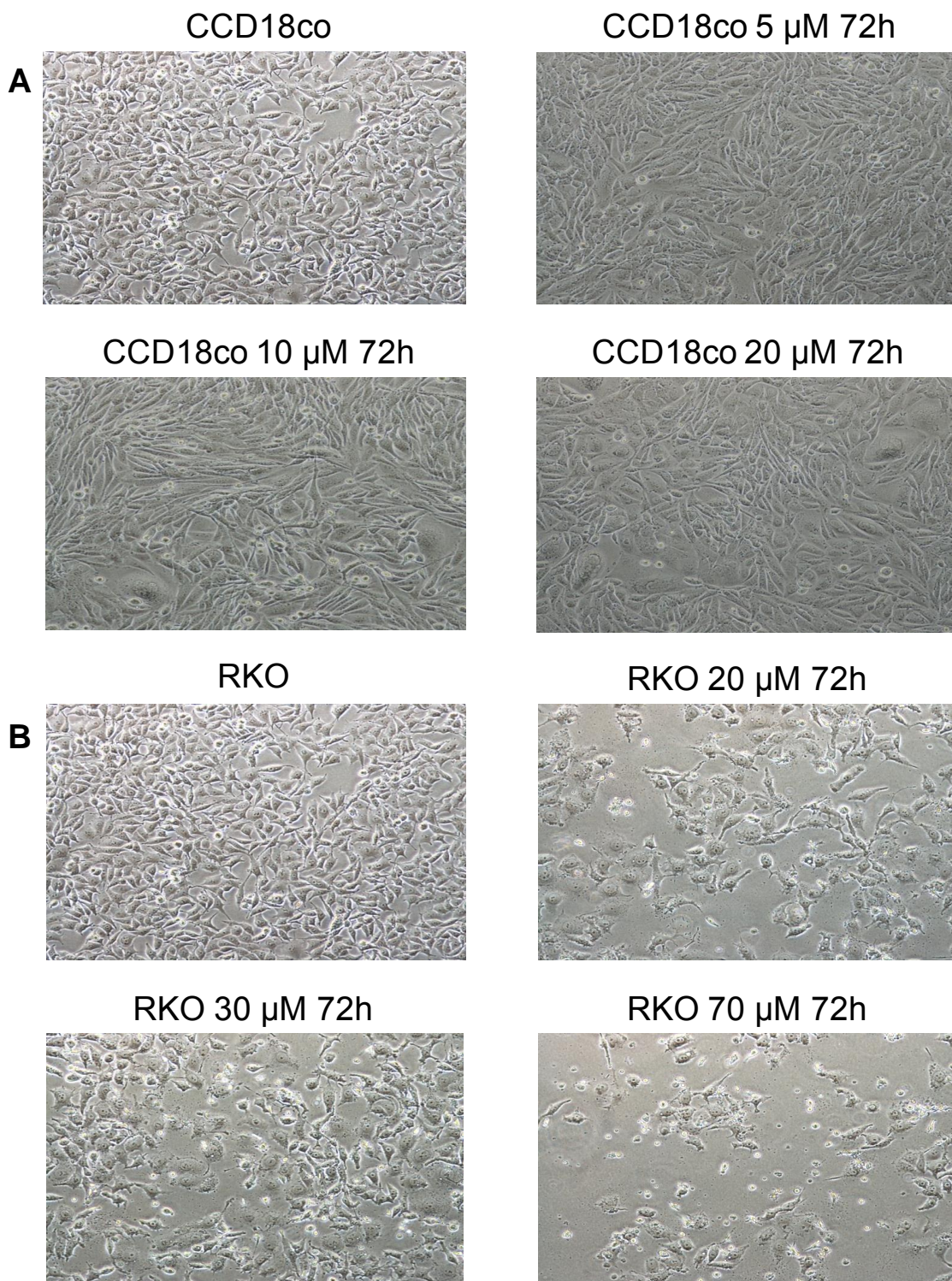


Figura 43. Modulación de la expresión de *MGMT* por 5-FU (IC_{50}) en las líneas CCD18co (CCD18co/5-FU), RKO (RKO/5-FU), SW480 (SW480/5-FU) y T84 (T84/5-FU). Las líneas basales y sin tratamiento (CCD18co, RKO, SW480 y T84) fueron usadas como control. Se incluyó un control negativo (CTRL-) sin muestra, para determinar posibles contaminaciones. El marcador de peso molecular utilizado fue el *HyperLadder IV*.

En segundo lugar y para determinar si concentraciones más elevadas de 5-FU eran capaces de modificar la expresión de *MGMT*, todas las líneas celulares fueron expuestas a niveles superiores a la IC_{50} del agente (Figura 44), obteniéndose los siguientes resultados:



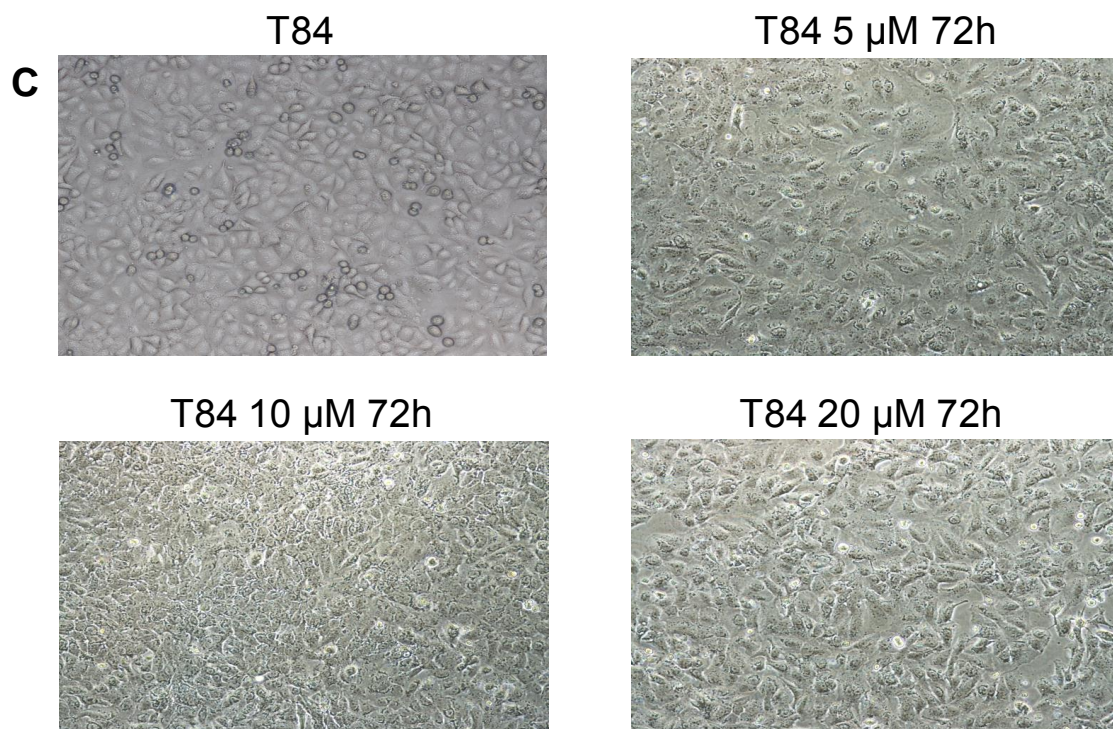
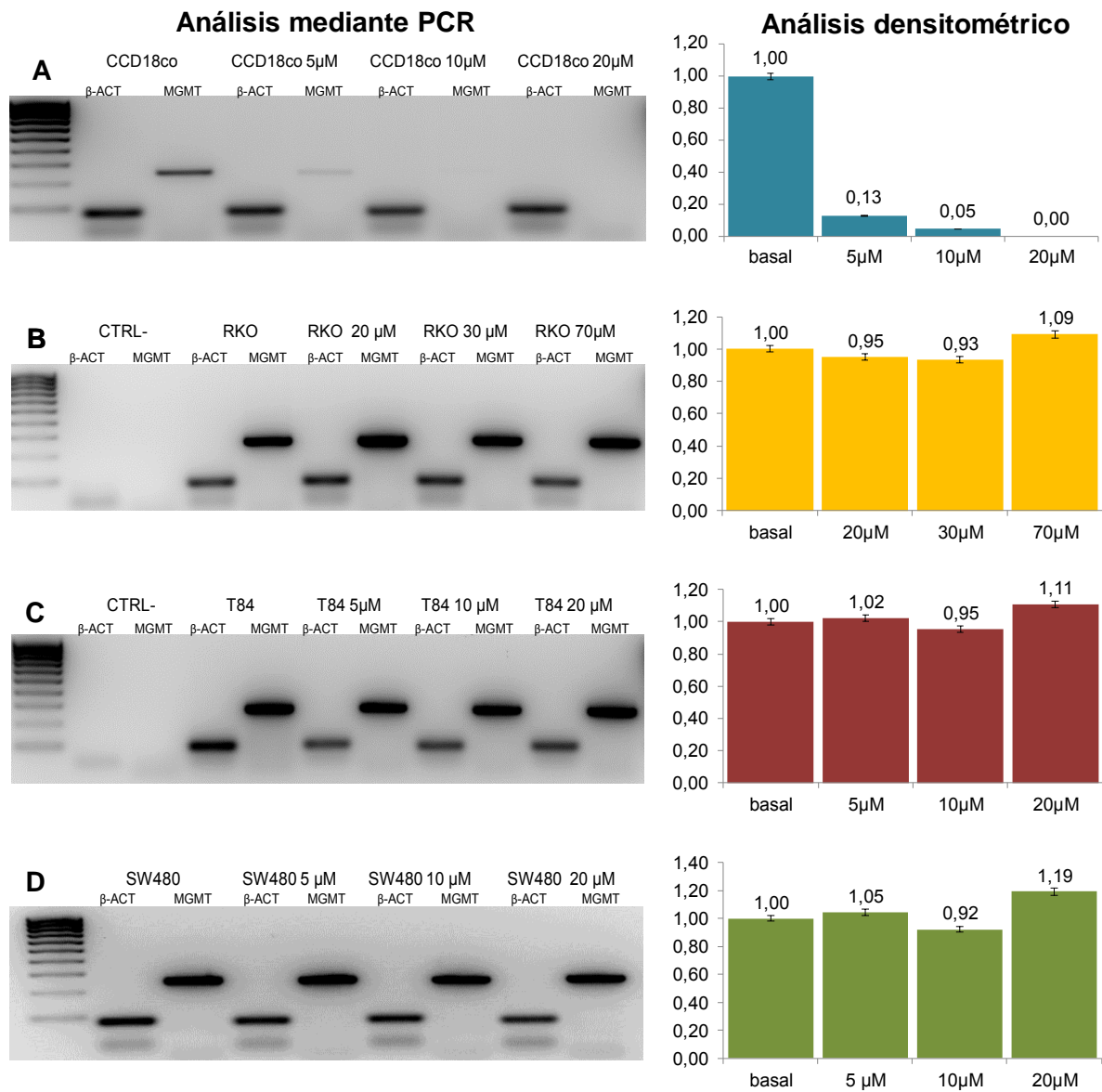


Figura 44. Imágenes de las diferentes líneas celulares expuestas a distintas dosis de 5-FU (10x). La imagen es representativa del cambio morfológico celular tras la exposición a 5-FU en las líneas celulares: **A.** CCD18co, **B.** RKO y **C.** T84.

Las líneas tumorales utilizadas no modificaron de una forma significativa la expresión de *MGMT* a pesar del incremento en la concentración de 5-FU en el medio por encima de la IC_{50} . No obstante, en todas las líneas de CCR pudimos observar un incremento de la expresión de *MGMT* desde la situación basal hasta la exposición a las dosis más altas ($1,26 \pm 0,15$ folds). En contraste, en la línea CCD18co si se pudo demostrar una disminución significativa de dicha expresión (Figura 45 y 46).



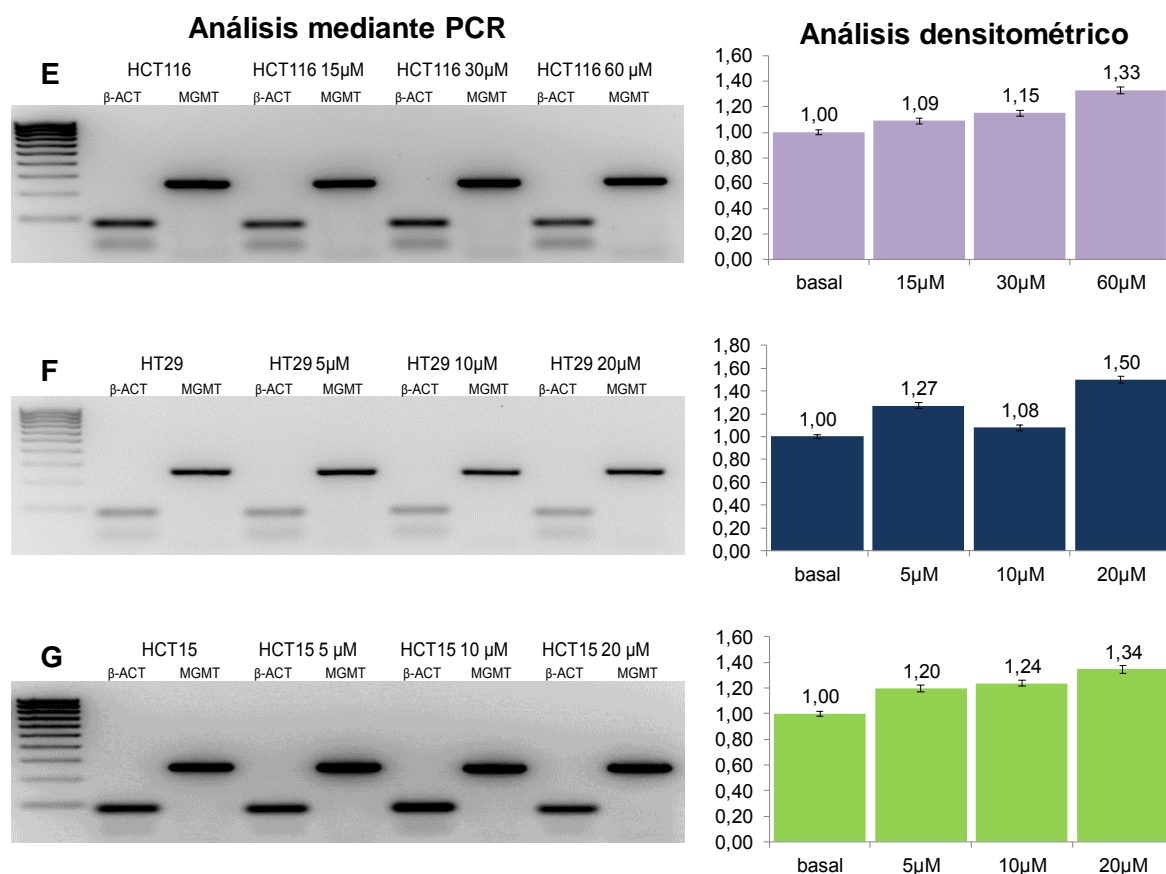


Figura 45. Modulación de la expresión de MGMT por exposición a 5-FU (72 h) a concentraciones superiores a la IC_{50} en líneas tumorales y transformadas de colon. Se observa el estudio mediante PCR (geles de agarosa) y la representación gráfica del análisis densitométrico utilizando como referencia la expresión de β -actina (β -ACT) en las líneas celulares: **A.** CCD18co, **B.** RKO, **C.** T84, **D.** SW480, **E.** HCT116, **F.** HT29 y **G.** HCT15. Se incluyó un control negativo (CTRL-) sin muestra, para determinar posibles contaminaciones. El marcador de peso molecular utilizado fue el *HyperLadder IV*.

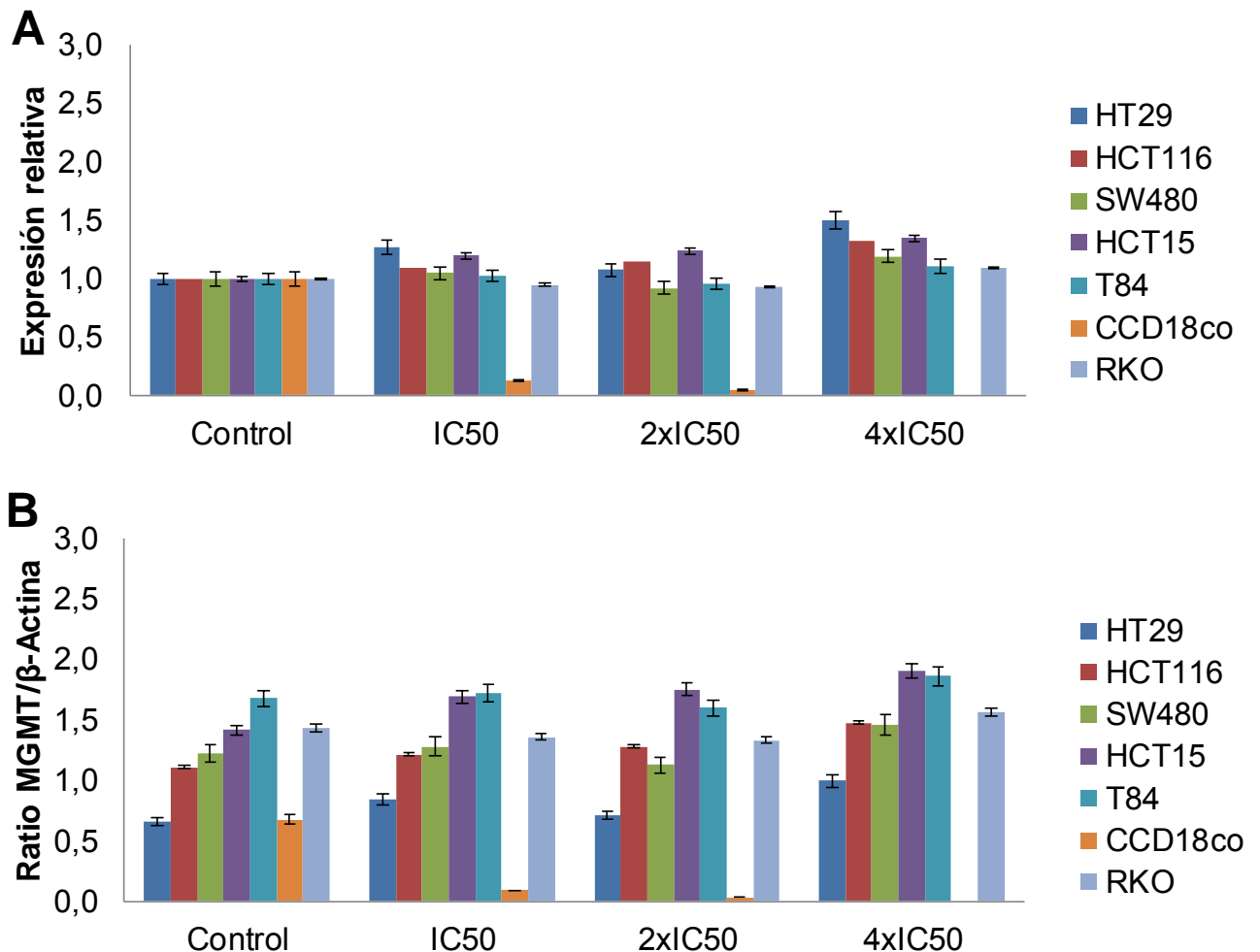


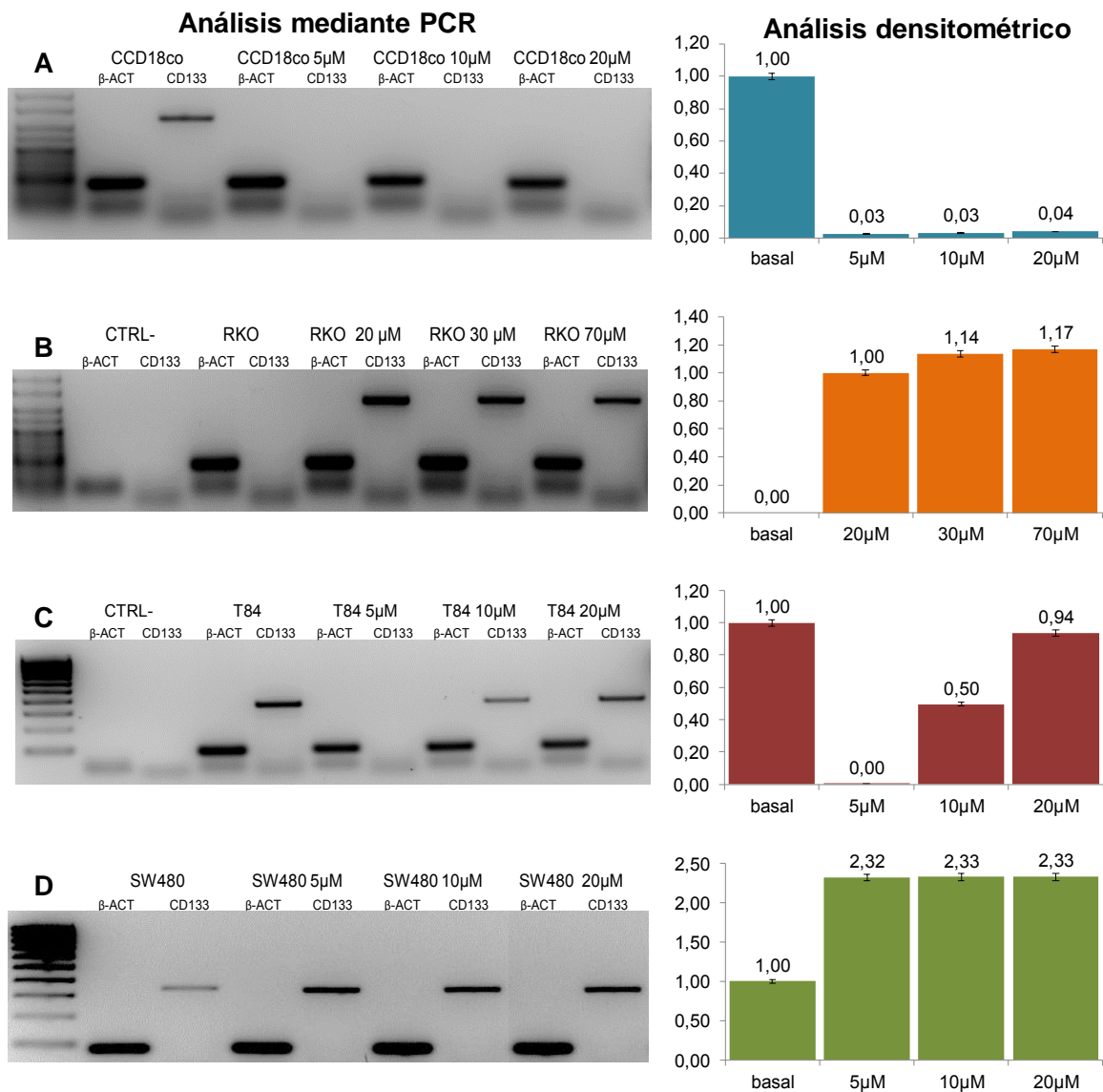
Figura 46. Resumen de modulación por 5-FU, de expresión de MGMT en las distintas líneas y dosis de fármaco. **A.** Representación de la expresión relativa (fold change), **B.** Representación de Ratio MGMT/ β -Actina.

4.1.7. MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE *CD133* POR EL AGENTE TERAPÉUTICO 5-FLUOROURACILO EN LAS LÍNEAS CELULARES

De forma paralela al estudio de *MGMT*, las líneas fueron analizadas para determinar la modulación de la expresión de *CD133* por 5-FU (Figura 47 y 48). El análisis de la expresión de *CD133* en las líneas celulares expuestas a diferentes concentraciones de 5-FU, muestran tres comportamientos distintos:

1. Líneas celulares en las que aumenta de forma significativa su expresión: RKO y SW480. En estas líneas no hay expresión de *CD133* o es baja (ratio

CD133/B-actina: $0,0215 \pm 0,030$); 2. Líneas celulares en las que se observa un aumento no significativo ($1,118 \pm 0,271$ folds): HCT116, HCT15, HT29 y T84. En estas líneas la expresión de *CD133* es intermedia o elevada (ratio CD133/B-actina: $1,0405 \pm 0,596$). 3. Líneas celulares en las que se reduce la expresión ($0,033 \pm 0,007$ folds): CCD18co. En esta línea existe una expresión intermedia de *CD133*.



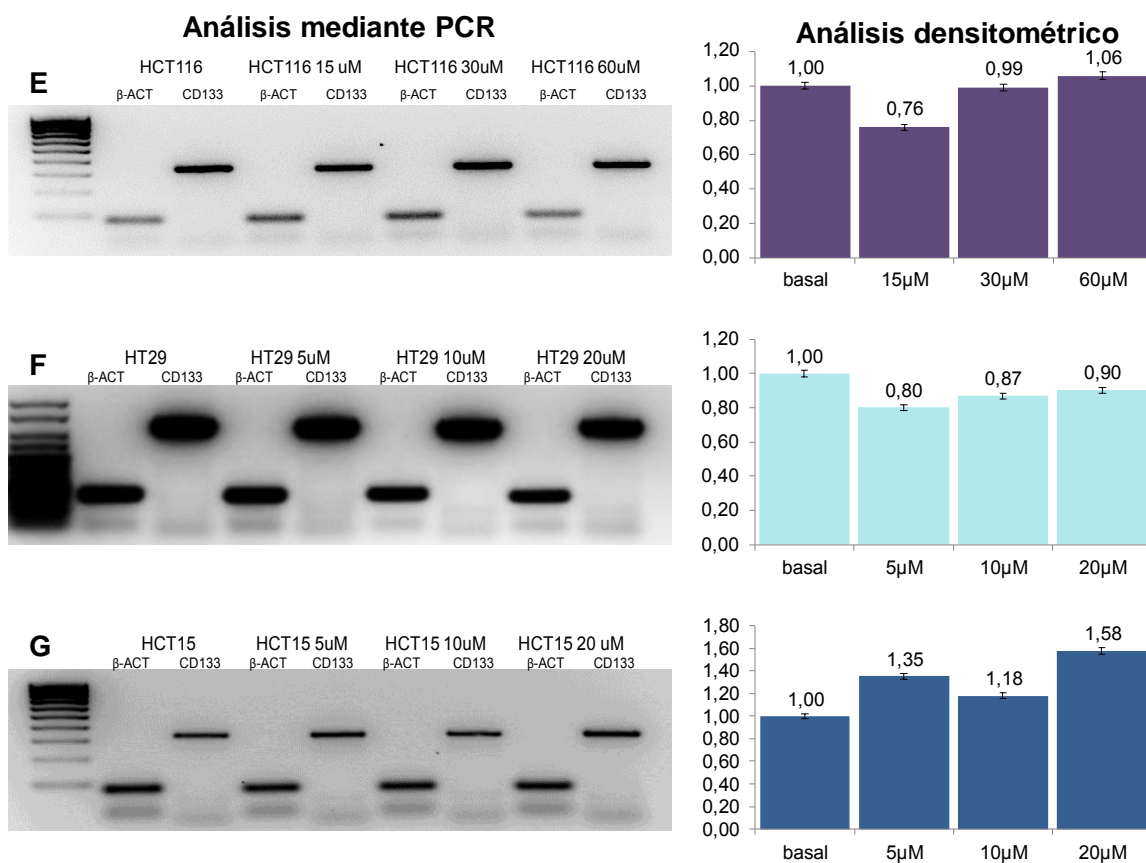


Figura 47. Modulación de la expresión de CD133 por exposición a 5-FU (72 h) a concentraciones superiores a la IC_{50} en líneas tumorales y transformadas de colon. Se observa el estudio mediante PCR (geles de agarosa) y la representación gráfica del análisis densitométrico utilizando como referencia la expresión de β -actina (β -ACT) en las líneas celulares: **A.** CCD18co, **B.** RKO, **C.** T84, **D.** SW480, **E.** HCT116, **F.** HT29 y **G.** HCT15. Se incluyó un control negativo (CTRL-) sin muestra, para determinar posibles contaminaciones. El marcador de peso molecular utilizado fue el *HyperLadder* IV y V.

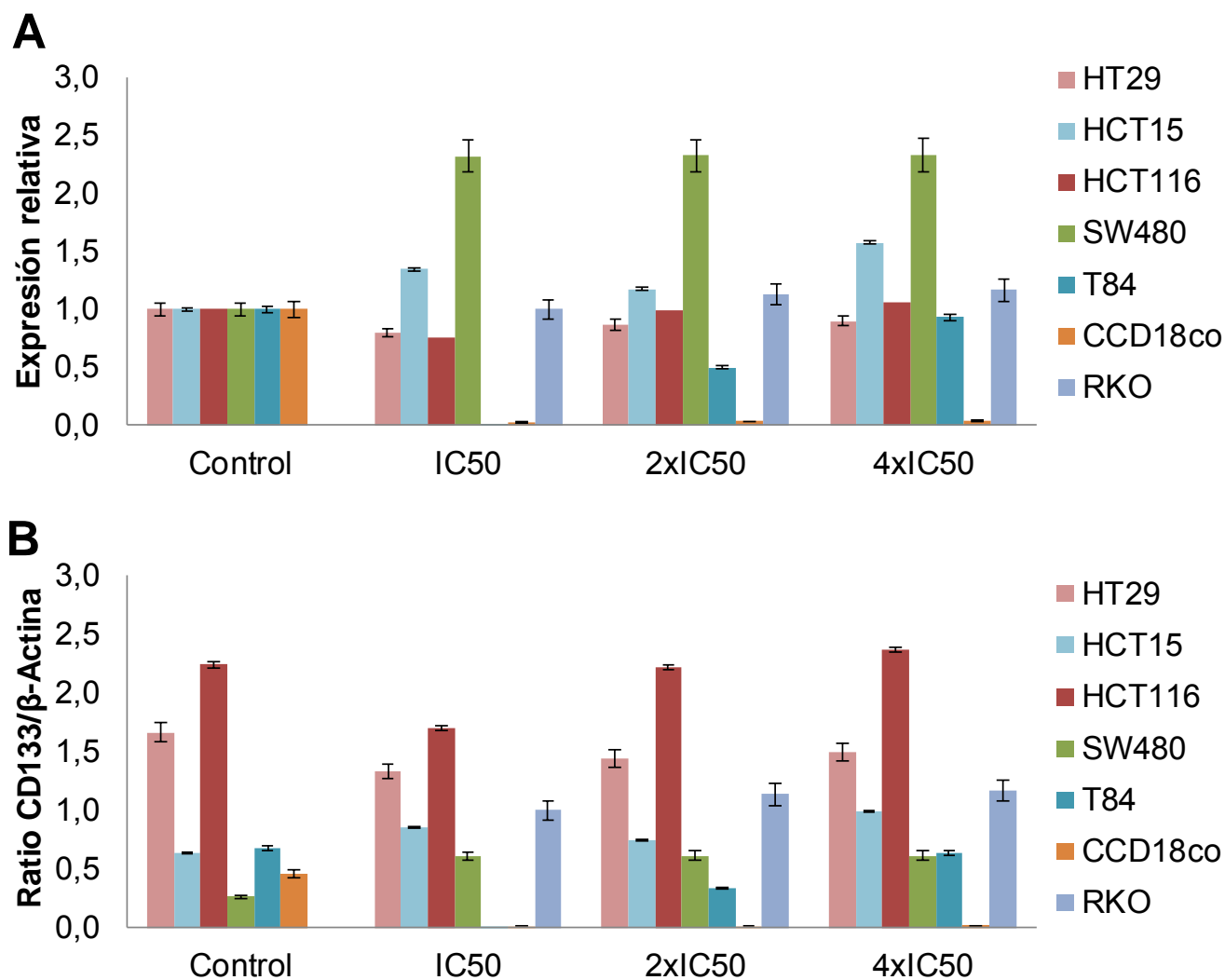


Figura 48. Resumen de modulación, por 5-FU, de expresión de CD133 en las distintas líneas y dosis de fármaco. **A.** Representación de la expresión relativa (fold change), **B.** Representación de Ratio CD133/ β -Actina.

4.1.8. ENRIQUECIMIENTO DE *CANCER STEM CELLS* A PARTIR DE LAS LÍNEAS DE CCR Y LA LÍNEA TRANSFORMADA DE COLON

Con el objeto de analizar las modificaciones en la expresión de *CD133* y posteriormente *MGMT* en las células madre de CCR, se procedió al aislamiento de las CSCs mediante cultivo en medio de enriquecimiento, tal y como se describe en el apartado “Material y Métodos”. Los estudios de morfología y expresión fueron realizados a los 4 y 8 días de la inducción, usando como control la línea en condiciones normales.

Las líneas de CCR se comportaron en general de una forma similar durante el proceso de enriquecimiento de las CSCs. Los cultivos mostraron un paso progresivo de un crecimiento en monocapa a un crecimiento en suspensión (Figura 49). A los 4 días pudimos observar claramente la formación de agregados celulares en suspensión, que serían el origen de las futuras colonosferas. Los estudios a los 8 días nos permitieron observar con claridad las colonosferas, aún existiendo un gran volumen de células adheridas en el frasco de cultivo creciendo en monocapa. La línea CCD18co se comportó de una forma similar al resto de las líneas tumorales. La Figura 49 muestra una imagen representativa de la formación de las colonosferas en las líneas utilizadas. Debemos destacar la pérdida de adhesión al frasco de cultivo de la línea SW480 y RKO tras la exposición al medio de enriquecimiento.

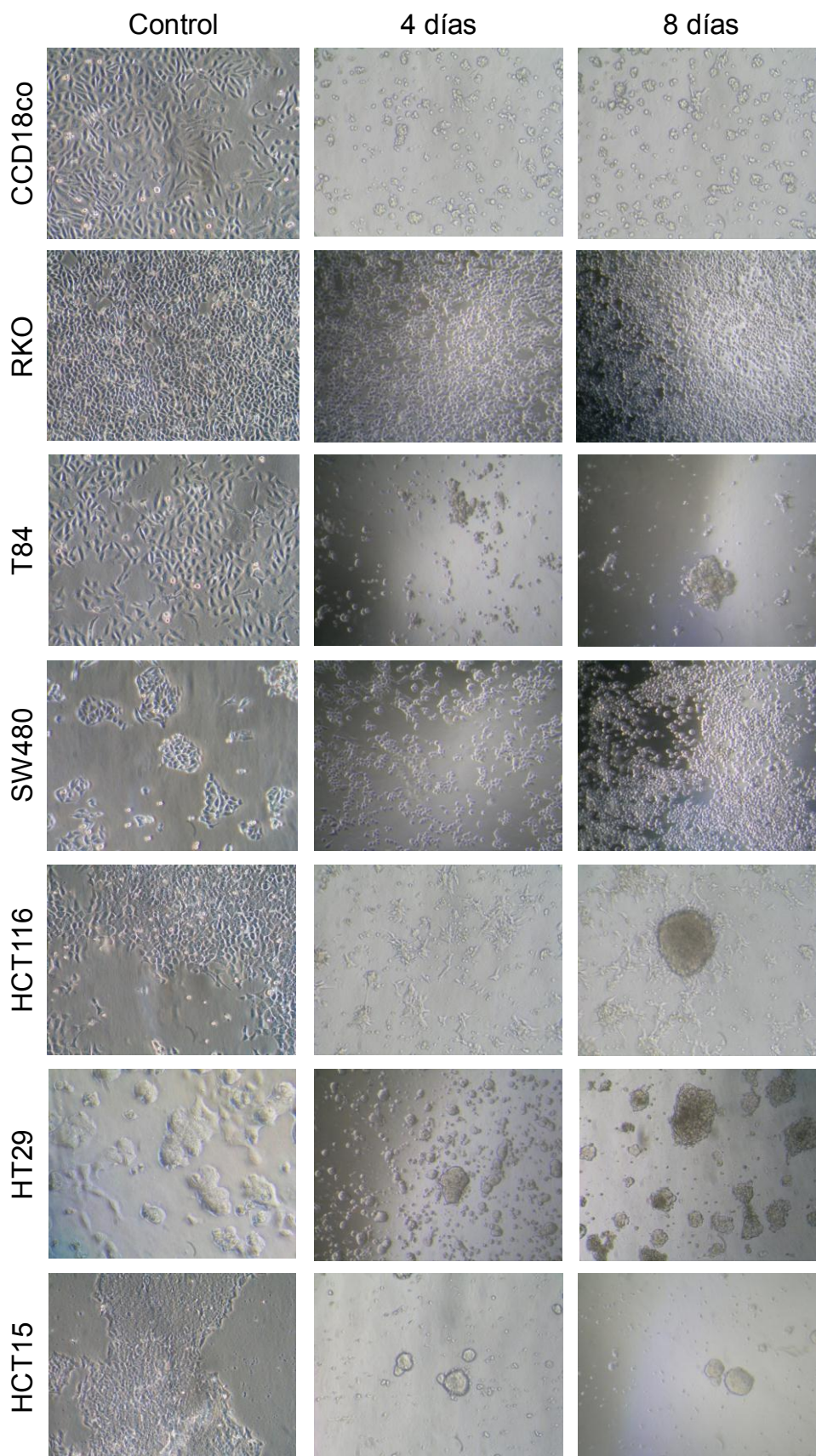
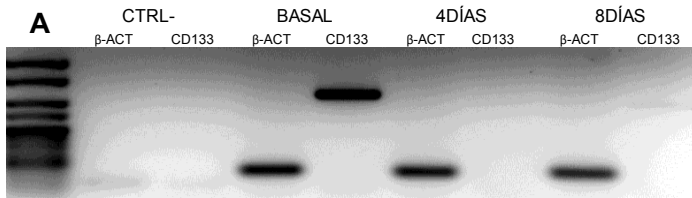


Figura 49. Imágenes de microscopía óptica de las distintas líneas celulares. La situación control supone el uso del medio convencional de mantenimiento. Se capturaron imágenes de las distintas líneas celulares a los 4 y 8 días de exposición al medio de enriquecimiento de CSCs.

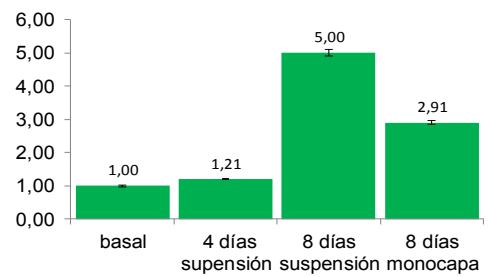
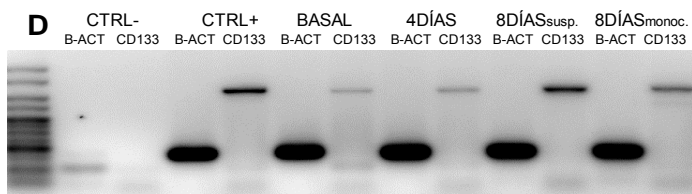
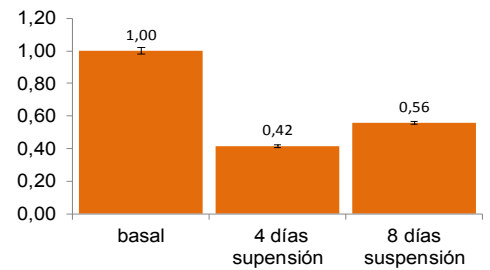
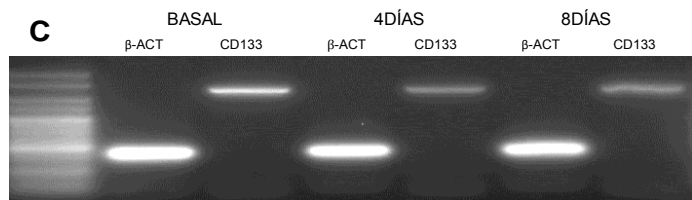
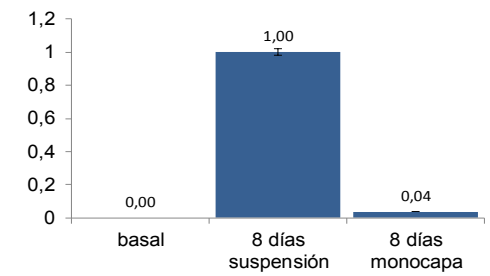
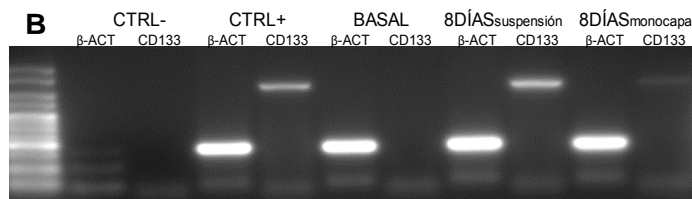
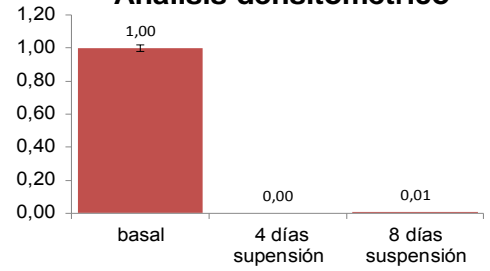
4.1.9. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE CD133 EN POBLACIONES CELULARES ENRIQUECIDAS EN *CANCER STEM CELLS* (CSC)

En cuanto a la modulación de la expresión de CD133 en las poblaciones enriquecidas en CSC observamos tres comportamientos distintos: **1.** Un primer grupo de líneas celulares en las que aumenta la expresión como RKO y SW480. En ellas la línea basal no expresa (Ratio β -actina/CD133 RKO: 0 ± 0) o tiene expresión baja de CD133 (ratio β -actina/CD133 SW480: $0,153\pm 0,078$); **2.** Un segundo grupo de líneas celulares en que se mantiene la expresión de CD133 como HCT116, HCT15 y HT29 (*fold*s a los 8 días: $0,985\pm 0,0099$). En ellas la línea basal tiene una expresión elevada o intermedia de CD133 (Ratio β -actina/CD133: HCT116: $1,701\pm 0,382$, HT29: $1,748\pm 0,059$, HCT15: $0,646\pm 0,010$) y **3.** Un tercer grupo en que las líneas en las que reduce la expresión de CD133 como CCD18co y T84 ($0,283\pm 0,389$ *fold*s). En ellas la expresión basal fue intermedia. Todos los resultados relacionados con esta sección se encuentran resumidos en la Figura 50 y 51. Cabe destacar que en RKO no se pudo calcular el FC debido a que la condición basal no expresaba CD133. Únicamente se consideraron como CSC aquellas líneas que formaban colonosferas y se incrementaba la expresión de CD133. De este modo, únicamente se utilizaron SW480 Y RKO para estudios posteriores.

Análisis mediante PCR



Análisis densitométrico



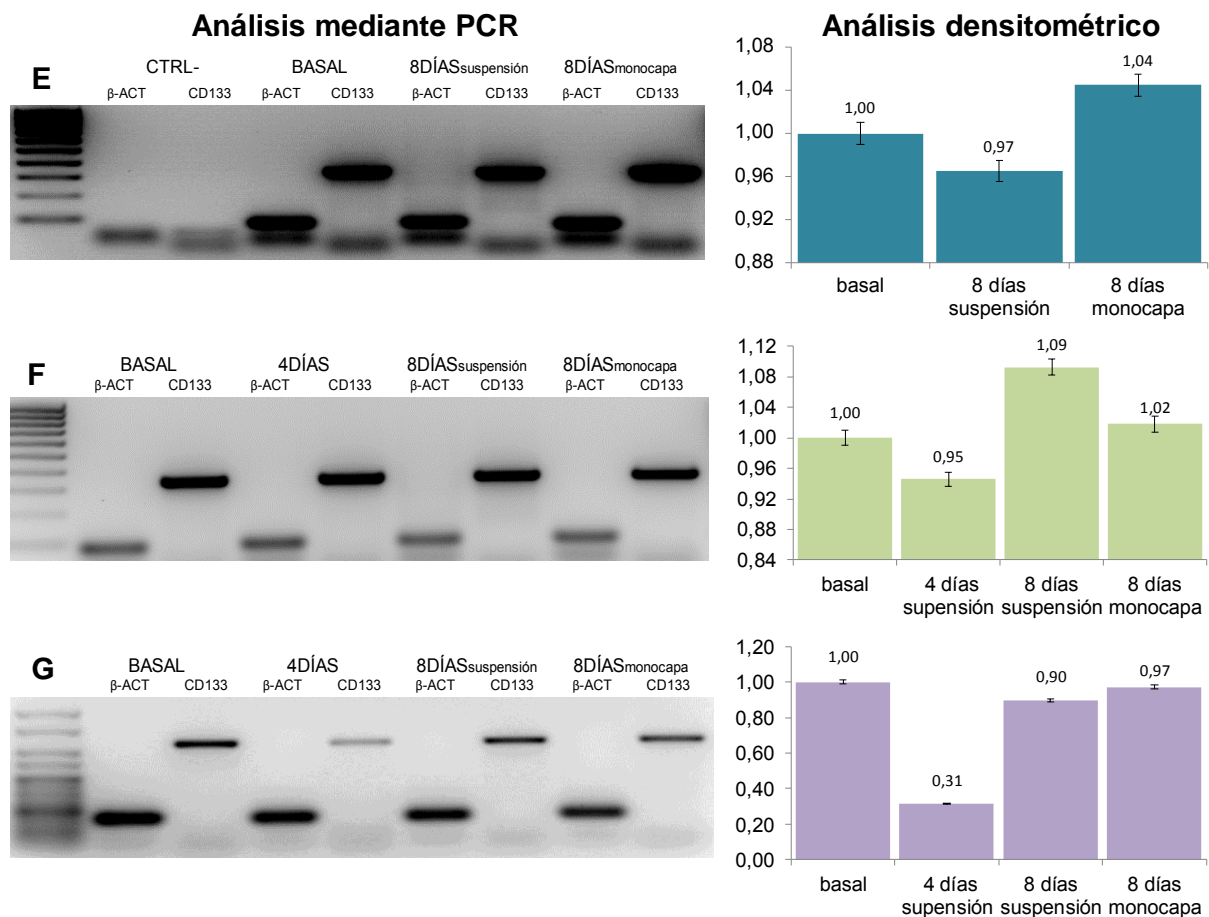


Figura 50. Modificación de la expresión de CD133 en poblaciones enriquecidas en CSC. A los 8 días se analizaron las dos poblaciones: la población no adherida (suspensión) y la población adherida (monocapa). Se observa el estudio mediante PCR (geles de agarosa) y la representación gráfica del análisis densitométrico utilizando como referencia la expresión de β-actina (β-ACT) en las líneas celulares: **A.** CCD18co, **B.** RKO, **C.** T84, **D.** SW480, **E.** HCT116, **F.** HT29, y **G.** HCT15. El control positivo (CTRL+) utilizado fue ARN de A549. Se incluyó un control negativo (CTRL-) sin muestra, para determinar posibles contaminaciones. El marcador de peso molecular utilizado fue el *HyperLadder IV y V*.

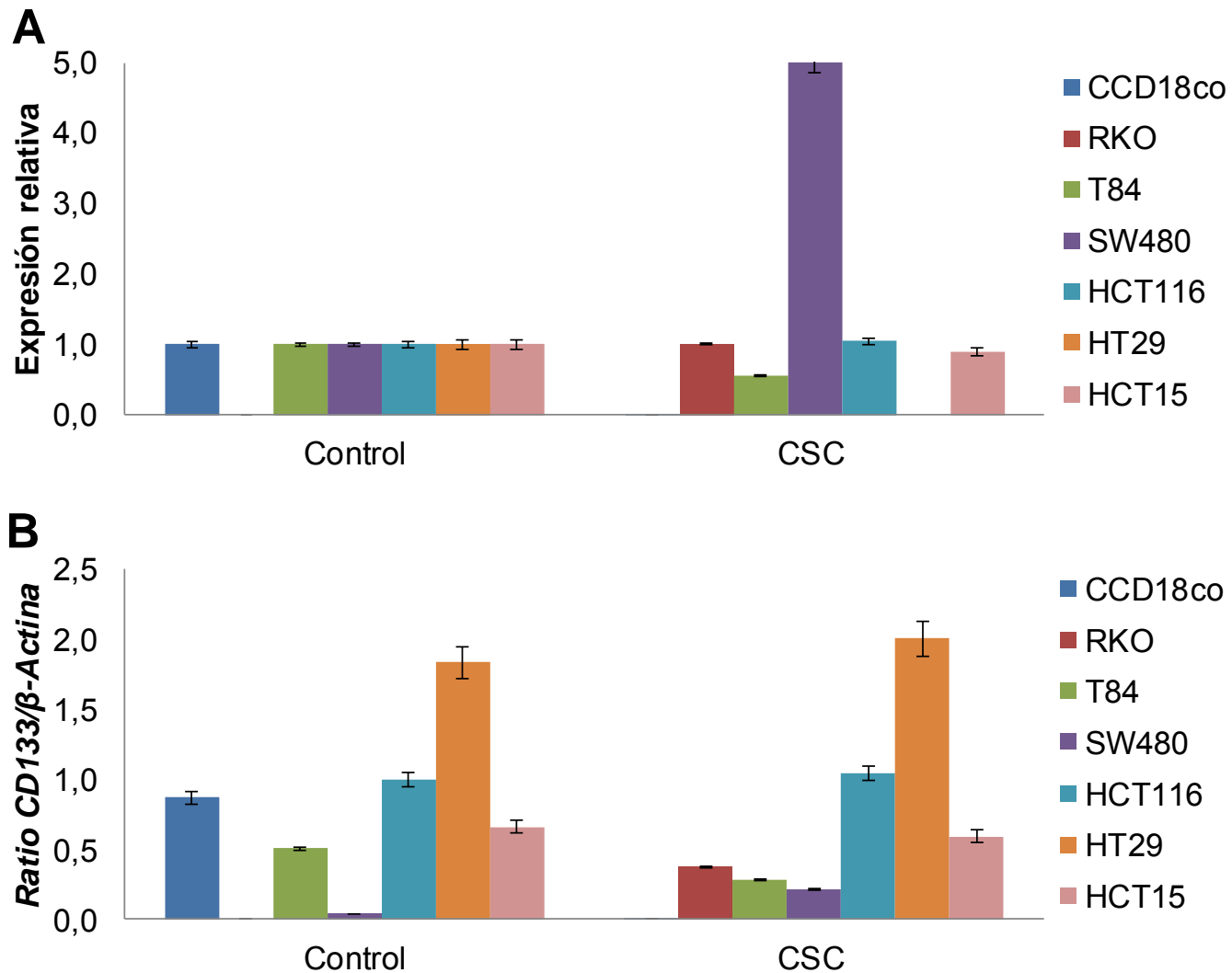


Figura 51. Resumen de expresión de CD133 en las distintas líneas comparando la expresión basal respecto a la expresión a los 8 días en medio de enriquecimiento. **A.** Representación de la expresión relativa (*fold change*). **B.** Representación de Ratio CD133/ β -Actina.

Para confirmar los datos obtenidos por RT-PCR las muestras de ARN más relevantes fueron sometidas a un nuevo estudio de expresión de CD133 utilizando PCR a tiempo real. Como podemos observar en la Figura 52, la línea SW480 mostró un incremento de 8,95 *folds* de expresión del ARN en relación a la expresión basal pudiendo confirmar el aumento previamente observado (Figura 52A). Por otra parte, la línea RKO mostró un incremento de expresión

de CD133 que no se pudo cuantificar debido a que no se observaba expresión a nivel basal (Figura 52B). Finalmente, también se analizó como control la modulación en la expresión de T84 (Figura 52C) en la que se pudo observar una disminución de la expresión tal y como se ha descrito previamente.

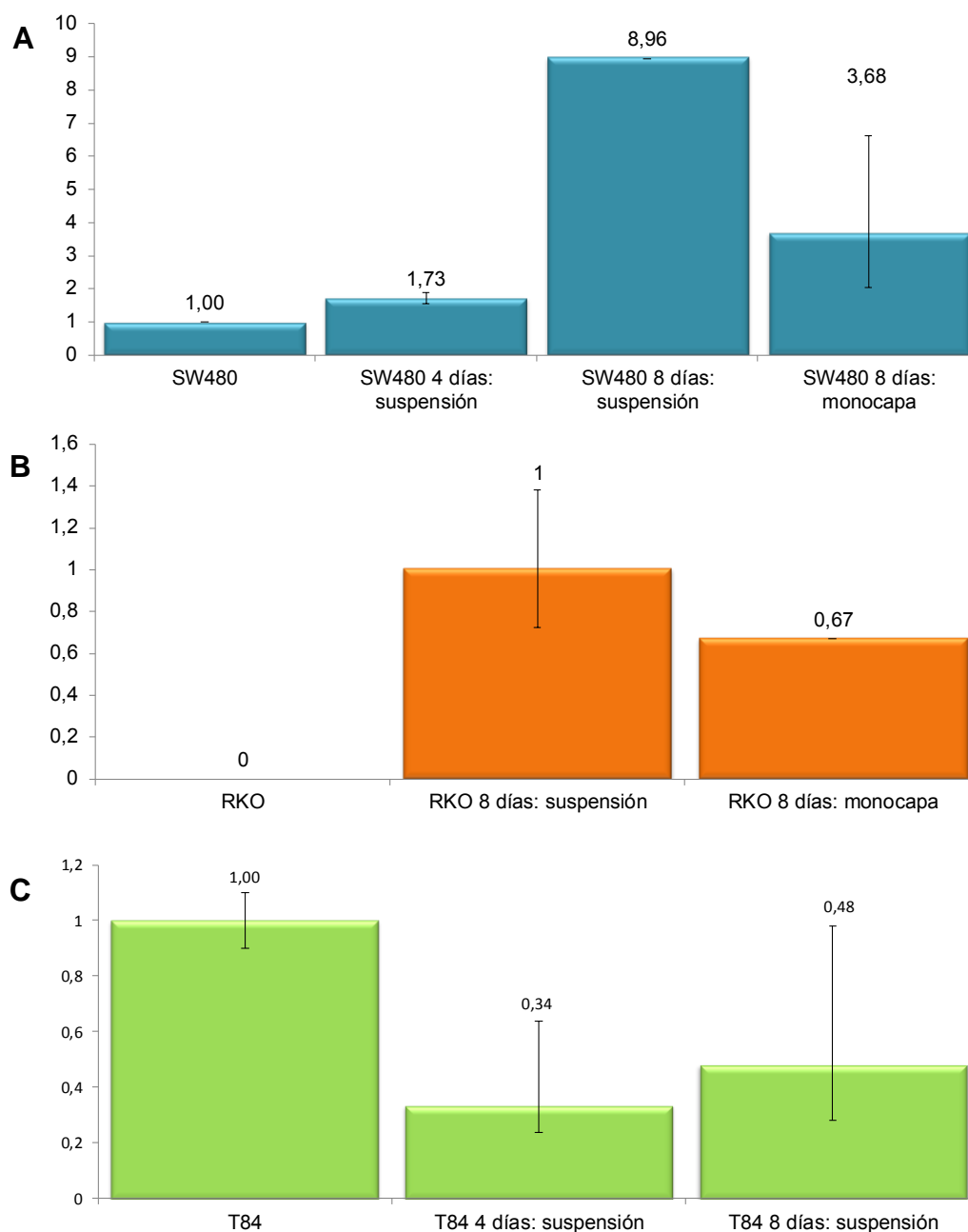


Figura 52. Estudio de la expresión de CD133 mediante qPCR. Se midió el fold change mediante qPCR de las líneas celulares: **A.** SW480, **B.** RKO y **C.** T84 en las condiciones previamente descritas.

4.1.10. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE MGMT EN POBLACIONES CELULARES ENRIQUECIDAS EN *CANCER STEM CELLS* (CSC)

Una vez determinada la expresión de CD133, se procedió al estudio de la expresión de MGMT mediante RT-PCR. Como se puede observar en la Figura 53 no pudimos apreciar ningún cambio en la expresión de MGMT entre las dos poblaciones analizadas (*folds*: SW480: $1,040 \pm 0,141$, RKO: $0,950 \pm 0,042$) mediante RT-PCR. Para poder realizar una cuantificación del cambio de expresión de MGMT de forma más precisa se realizó una qPCR de las CSCs obteniendo los siguientes resultados: en la línea RKO se pudo apreciar un incremento de $1,47$ *folds* de la expresión de MGMT a los 8 días en medio de selección de CSC en la fracción en suspensión. En la línea SW480 se apreció un incremento de la expresión de $1,98$ *folds* a los 8 días de exposición al medio de selección en la fracción en suspensión. En esta misma línea, cabe destacar que en la fracción en monocapa a los 8 días de exposición, se apreció un incremento de $3,18$ *folds*.

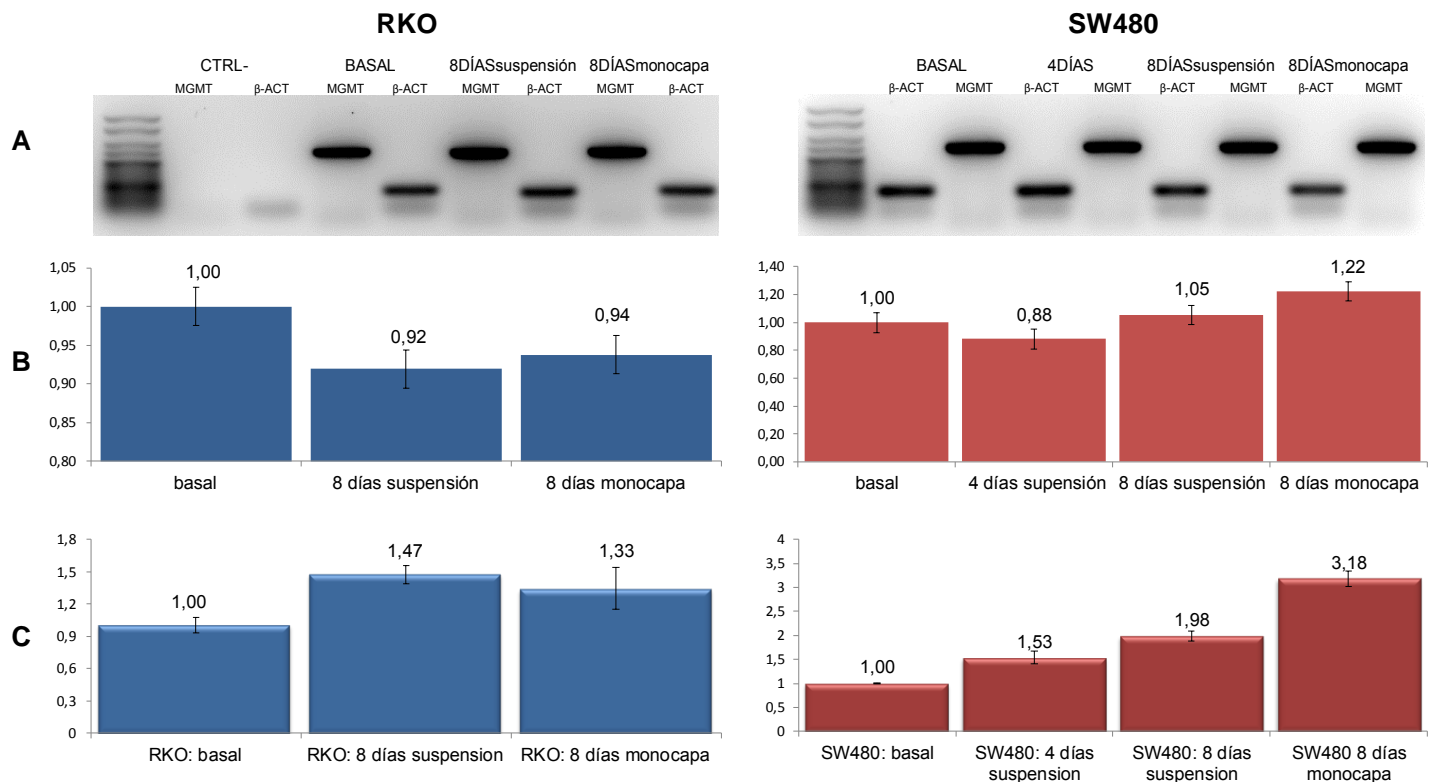


Figura 53. Modificación de la expresión de MGMT en poblaciones enriquecidas en CSC. **A.** Geles de electroforesis. A los 8 días se analizaron las dos poblaciones: la población no adherida (suspensión) y la población adherida (monocapa) mediante RT-PCR. **B.** Representación gráfica del *fold change* a distintos días de exposición al medio de enriquecimiento de CSC. Se incluyó un control negativo (CTRL-) sin muestra, para determinar posibles contaminaciones. El marcador de peso molecular utilizado en la RT-PCR fue el *HyperLadder V*. **C.** Resultados obtenidos mediante qPCR en las líneas celulares: RKO y SW480.

4.1.11. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE 5-FU EN POBLACIONES CELULARES ENRIQUECIDAS EN *CANCER STEM CELLS*

Para determinar la actividad de 5-FU en las poblaciones celulares enriquecidas en CSCs, se realizaron estudios de proliferación (ver Material y Métodos) utilizando la IC_{50} del fármaco. Como se puede observar en la Figura 54A, el % de inhibición de la proliferación celular originado por 5-FU fue mucho menor en las CSC derivadas de la línea RKO que en las células basales, lo que sugiere un incremento estadísticamente significativo ($p < 0,05$) de la resistencia a dicho fármaco. Así, tras 72 horas de exposición al fármaco, la IC_{50} en las CSC se incrementó 64 veces (1280 μM) en relación a la línea basal (20 μM).

Por otra parte, también se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) al comparar el % de inhibición de la proliferación de la línea SW480 basal y las CSC obtenidas de la línea celular SW480 con un incremento de la IC_{50} en las CSC de 2048 veces (10240 μM) respecto a la basal (5 μM) (Figura 54B).

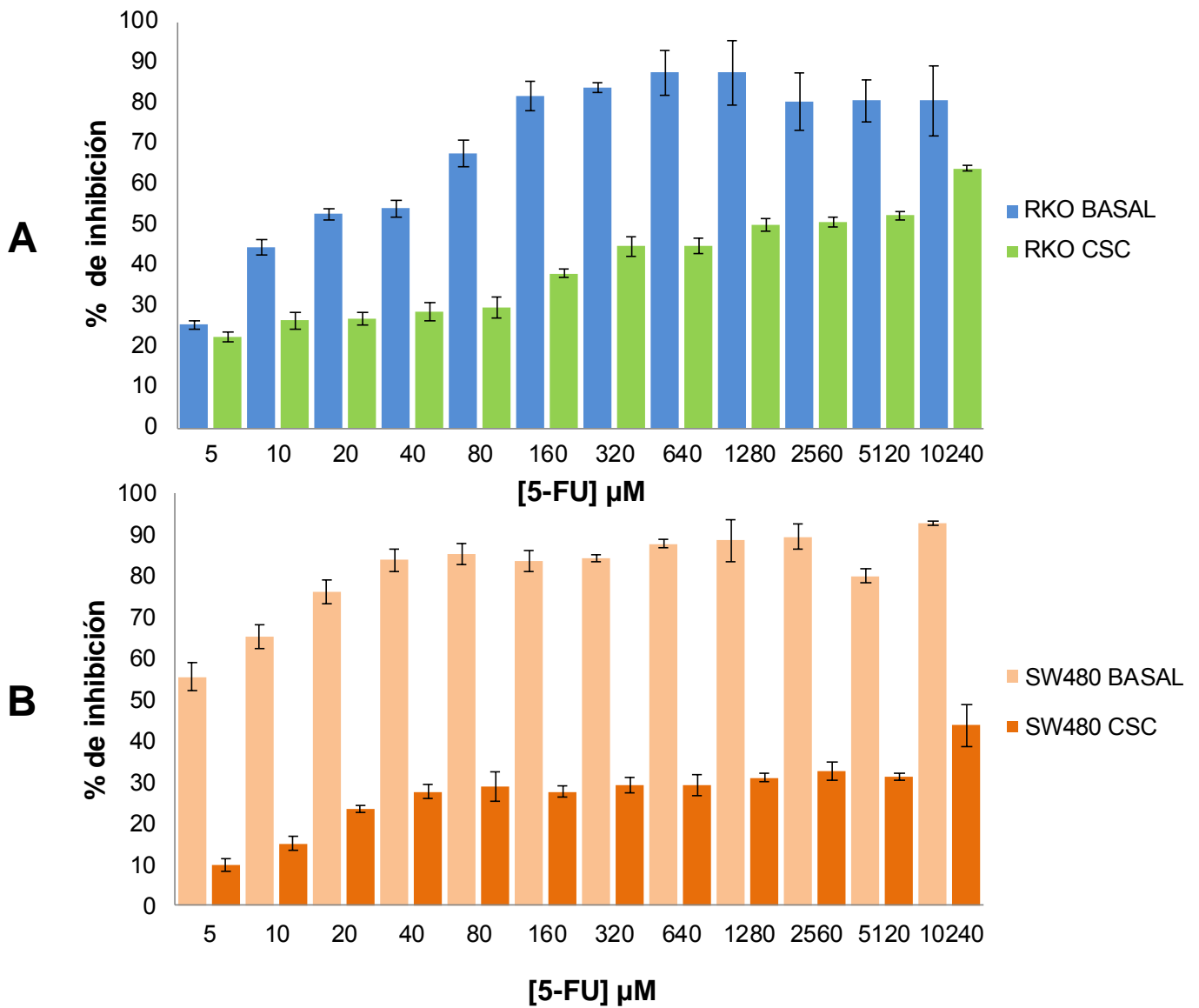


Figura 54. % de inhibición del crecimiento celular tras la exposición de 5-FU (72 horas) comparando población basal frente a población enriquecida en CSCs en las líneas celulares: **A.** RKO y **B.** SW480.

4.1.12. MODULACIÓN DEL CICLO CELULAR POR 5-FU EN POBLACIONES CELULARES ENRIQUECIDAS EN *CANCER STEM CELLS*

El estudio del ciclo celular en las CSCs nos permitió determinar el comportamiento de estas células frente al tratamiento con 5-FU en relación a la población basal. El estudio fue realizado en las líneas RKO y SW480. Así, la línea RKO tratada con su IC_{50} de 5-FU (20 μ M) mostró un bloqueo del ciclo celular en la fase G1/S. Sin embargo, las CSC de RKO no mostraron bloqueo en G1/S comportándose igual que las células control no sometidas a la exposición del fármaco. Los resultados en la línea SW480 utilizando su IC_{50} (5 μ M) fueron similares (Figura 55).

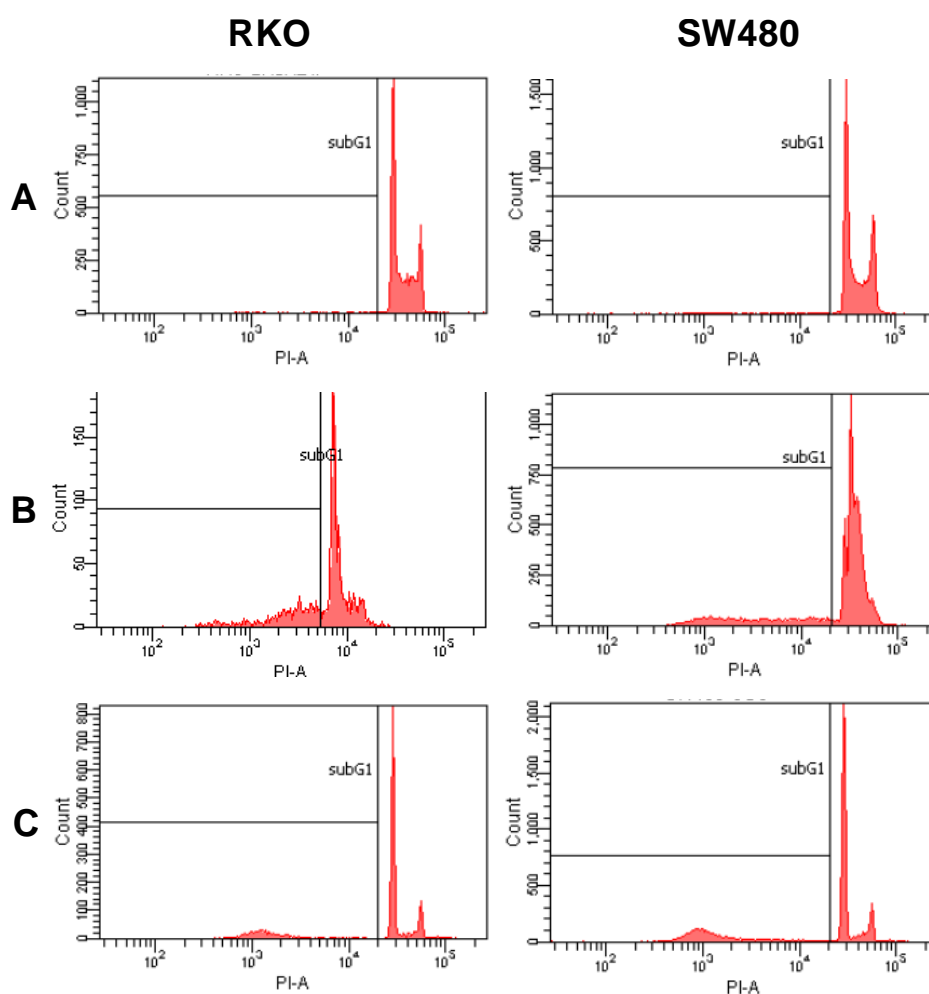


Figura 55. Estudio del ciclo celular de la línea RKO y SW80 tras la exposición a su IC_{50} de 5-FU. **A.** línea basal sin tratamiento, **B.** línea basal tratadas con 5-FU (IC_{50}) durante 72 horas y **C.** Población enriquecida en CSCs tratadas con las mismas concentraciones de 5-FU (72 horas).

4.2. RESULTADOS IN VIVO: PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL

4.2.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO. DATOS CLÍNICOS

Las características de la población con adenocarcinoma colorrectal (n=123) analizada a continuación se encuentran reflejadas en la Tabla 10. Esta población de estudio presentó una edad media de $71,1 \pm 10,5$ años. En estos pacientes se mantuvo un seguimiento medio durante $37,34 \pm 23,12$ meses siendo 9 meses el seguimiento mínimo. La SG media en los pacientes fue de $40,20 \pm 22,09$ meses. Los valores se encontraron comprendidos entre 2 a 93 meses. En la última revisión: 18 pacientes fallecieron debido a la patología. En 22 pacientes, no se pudo obtener el estado en la última revisión. Observamos diferencias significativas ($p=0,0001$) entre las medias de los pacientes fallecidos ($21,33 \pm 14,32$ meses) y los vivos ($44,81 \pm 21,914$ meses).

Por otra parte, la SLE media en los pacientes fue de $35,98 \pm 24,75$ meses. Para analizar esta variable se consideró la reaparición local o distal de la enfermedad, observando que un 41,9% (44/105) no respondieron completamente al tratamiento reapareciendo la patología local o distalmente y un 58,1% (61/105) mostraron una buena respuesta al tratamiento. En 18 pacientes no se pudo obtener esta variable clínica. La distribución de los datos mostró diferencias significativas de las medias de la SLE ($p=0,0001$) entre los pacientes que no respondieron al tratamiento ($19,19 \pm 16,89$ meses) y los pacientes que respondieron al tratamiento ($49,41 \pm 22,017$ meses).

Tabla 10. Características generales de la población de CCR

Variables	Características	n= 123
Sexo	Hombre	65% (80)
	Mujer	35% (43)
Edad	>50 años	94,3% (116)
	<50 años	5,7% (7)
Grado de diferenciación tumoral	Bien diferenciado	31,6% (37)
	Moderadamente diferenciado	50,4% (59)
	Pobremente diferenciado	17,9% (21)
	Desconocido	n=6
Estadio tumoral	I	11,4% (14)
	II	35,8% (44)
	III	39,8% (49)
	IV	12,2% (15)
	Desconocido	n=1
Tratamiento: quimioterapia y radioterapia	Quimioterapia adyuvante	46,3% (57)
	Radioquimioterapia concomitante	10,6% (13)
	Ningún tratamiento	32,5%(40)
	Desconocido	n=13
Metástasis	Cercana: pancreática o Hepática	66,7% (26)
	Lejana: pulmonar o cerebral	33,33% (13)
Recidiva	Si	41,9% (44)
	No	58,1% (61)
	Desconocido	n=18
Estado en la última revisión	Vivo sin enfermedad	53,7% (66)
	Vivo con enfermedad	13,8% (17)
	Progresión y muerte por enfermedad	14,6% (18)
	Desconocido	n=22

4.2.2. ANÁLISIS DE METILACIÓN DEL PROMOTOR DE *MGMT*

Los resultados del estado de metilación del promotor de *MGMT* en pacientes demostró que el 21,8% (24/110) de los pacientes no presentaron metilación del promotor (UM), un 59,1% (65/110) presentaron metilación parcial (UM/M) y en un 19,1% (21/110) estuvo hipermetilado (M). Podemos considerar, por tanto, que cualitativamente un 21,8% (24/110) de los pacientes estuvieron no metilados (UM) y un 78,2% (86/110) metilados (UM/M o M) (Tabla 11). 13 pacientes no pudieron ser valorados. La Figura 56 muestra una imagen representativa del resultado de las PCRs del promotor de *MGMT* en los pacientes analizados.

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido
UM	24	19,5	21,8
UM/M	65	52,8	59,1
M	21	17,1	19,1
Subtotal	110	89,4	100
NV	13	10,6	
Total	123	100	

Tabla 11. Estado de metilación de *MGMT* en pacientes con CCR. El 21,8% de los pacientes no presentaron metilación del promotor, un 59,1% presentaron metilación parcial y en un 19,1% estuvo hipermetilado. NV, no valorable.

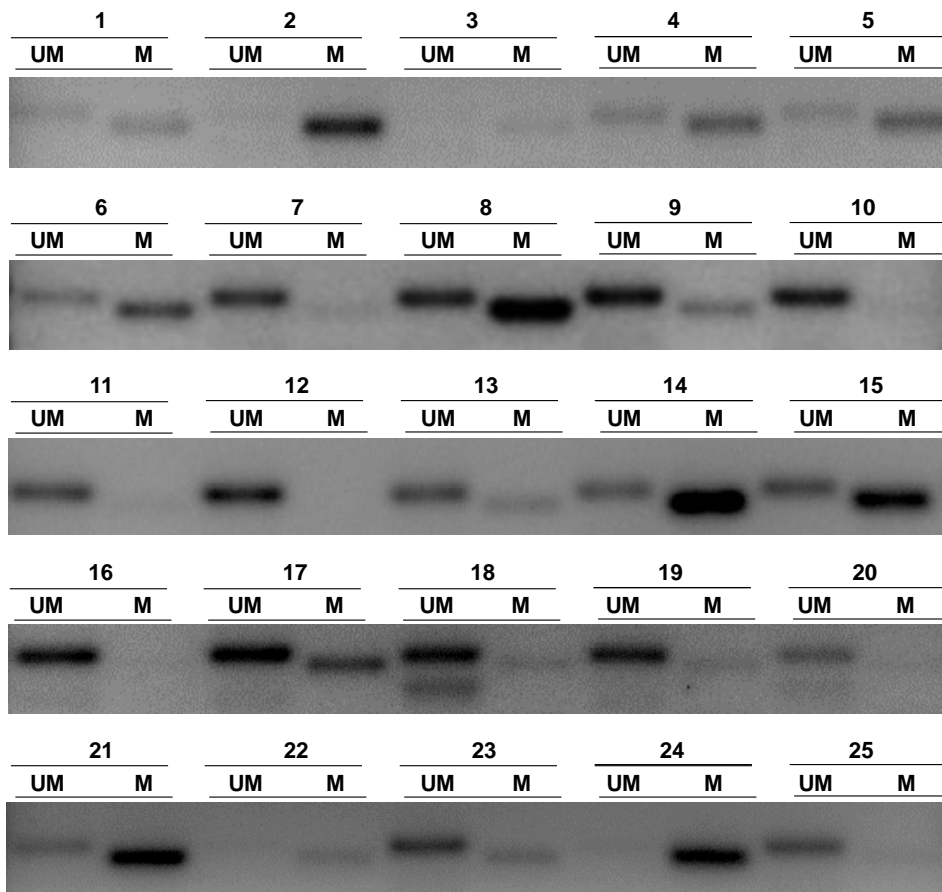


Figura 56. Imagen representativa del estado de metilación del promotor de *MGMT*. Ejemplos de pacientes no metilados (UM) fueron el 7, 10, 11 y 12 destacando la ausencia de amplificado en el carril M. Los pacientes 4, 5, 6 y 8 fueron ejemplos del patrón de metilación parcial observando amplificación en los carriles UM y M. Finalmente, los pacientes 2, 3, 22 y 24 mostraron amplificado únicamente en el carril M considerándose pacientes hipermetilados.

4.2.3. COMPORTAMIENTO DE LA VARIABLE METILACIÓN DEL PROMOTOR DE *MGMT* EN RELACIÓN A LOS DATOS CLÍNICOS

Sólo se pudo demostrar una asociación significativa ($p < 0,05$) entre el grado de diferenciación tumoral y el estado de metilación del promotor de *MGMT* (Tabla 12).

	Pruebas de χ^2	
	Sig. Asintótica(bilateral)	Sig. exacta (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	0,014	
Estadístico exacto de Fisher		0,011

Tabla 12. Asociación entre el estado de metilación del promotor MGMT y el grado de diferenciación tumoral. Pudimos confirmar la asociación entre el grado de diferenciación tumoral y el estado de metilación del promotor de MGMT mediante la prueba de χ^2 .

Cabe destacar que todos los pacientes con el tumor no metilado (UM) estaban bien o moderadamente diferenciados (23/106). Además, todos los pacientes pobremente diferenciados presentaron el promotor de MGMT metilado (UM/M o M únicamente) (18/106). En la misma dirección, no se observaron pacientes no metilados con el nivel de diferenciación pobre (0/106). Los pacientes restantes mostraron el estado del promotor metilado y presentaron un grado de diferenciación pobre o moderado (65/106).

La variable metilación del promotor MGMT en pacientes con CCR no se correlacionó con el resto de las variables clínicas analizadas. Fue especialmente interesante la ausencia de correlación entre esta variable, la SG (Figura 57A) y la SLE (Figura 57B).

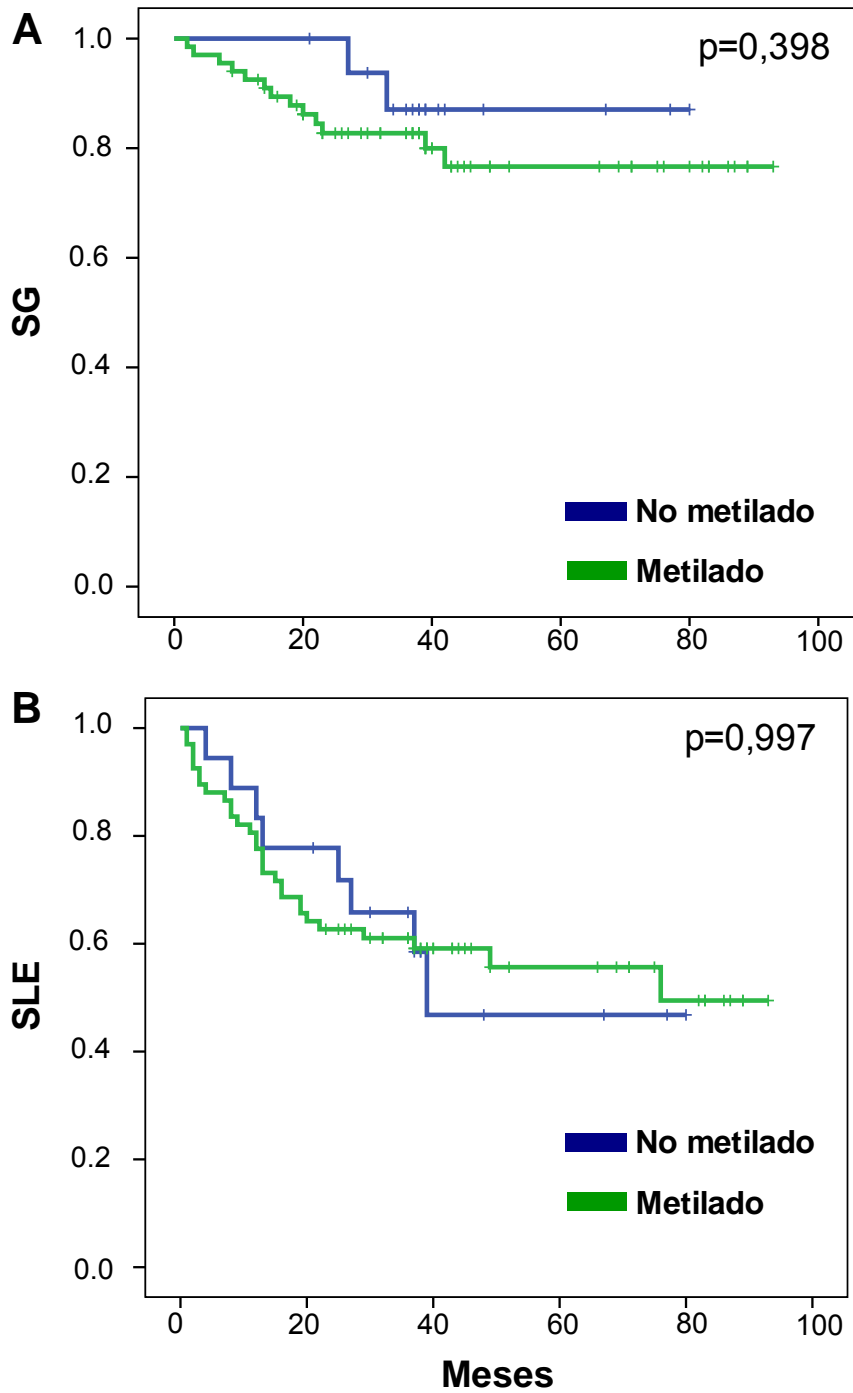


Figura 57. Curvas de Kaplan-Meier entre el estado de metilación de MGMT y **A.** Supervivencia global (SG) y **B.** Supervivencia libre de enfermedad (SLE).

4.2.4. ANÁLISIS DEL % DE EXPRESIÓN DE MGMT

Los pacientes fueron sometidos a un análisis de expresión de MGMT mediante el análisis inmunohistoquímico (ver Material y Métodos) (Figura 58). Pudieron ser valorados 114 de los 123 pacientes. En el 15,8% (18/114) de los pacientes la expresión de MGMT fue del 0%, un 2,6% (3/114) presentaron una expresión inferior al 25%, un 29,8% (34/114) entre el 25 y el 50%, un 43,9% (50/114) entre el 50 y el 75% y finalmente un 7,9% (9/114) mostró una expresión entre el 75 y 100%. En base a estos datos y para la posterior realización del estudio estadístico, se realizó una agrupación del % de expresión en dos grupos: a) <50% de expresión y b) ≥50% de expresión. De este modo, un 48,2% (55/114) de los pacientes expresaron menos del 50% y el 51,8% (59/114) expresaron más del 50% (Tabla 13).

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido
<50%	55	44,7	48,2
≥50%	59	48	51,8
Subtotal	114	92,7	100
NV	9	7,3	
Total	123	100	

Tabla 13. % de expresión de MGMT en pacientes de CCR. El 48,2% de los pacientes expresaron menos del 50% y el 51,8% expresaron más del 50%. NV, no valorable.

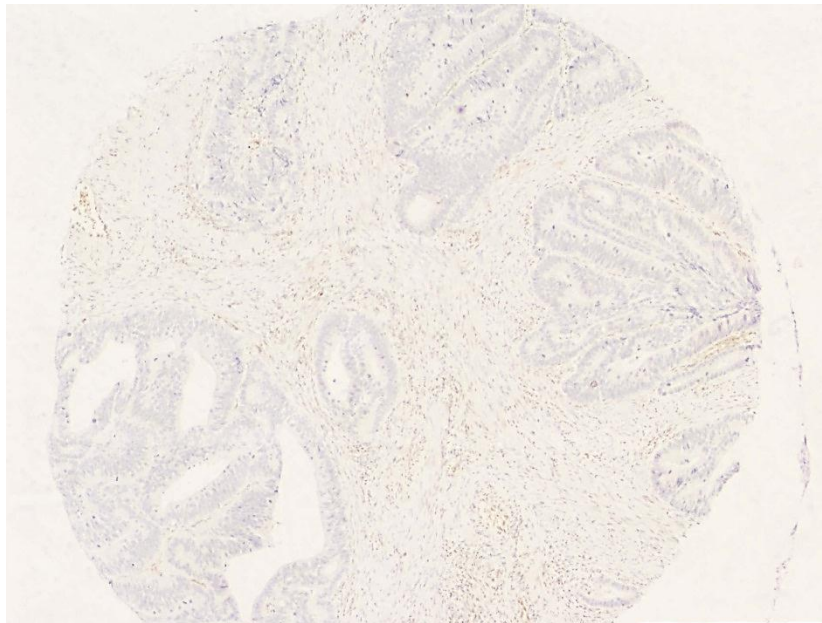
A**B**

Figura 58. Imagen representativa del % de marcaje de MGMT en CCR. **A.** 0% de expresión de MGMT. Observamos un *punch* de un paciente en el cual no se aprecia expresión de MGMT en la región tumoral, predominando en ésta la hematoxilina. **B.** 75% al 100% de expresión de MGMT, predominando la tinción marrón causada por la diaminobencidina (DAB). Podemos destacar que la tinción es de tipo nuclear observando también marcaje nuclear en la región tumoral circundante.

4.2.5. COMPORTAMIENTO DE LA VARIABLE % EXPRESIÓN DE MGMT EN RELACIÓN A LOS DATOS CLÍNICOS

El % de expresión de MGMT no mostró correlación con ninguna variable incluyendo la supervivencia global, la supervivencia libre de enfermedad, el grado de diferenciación tumoral o el estadio tumoral (Figura 59).

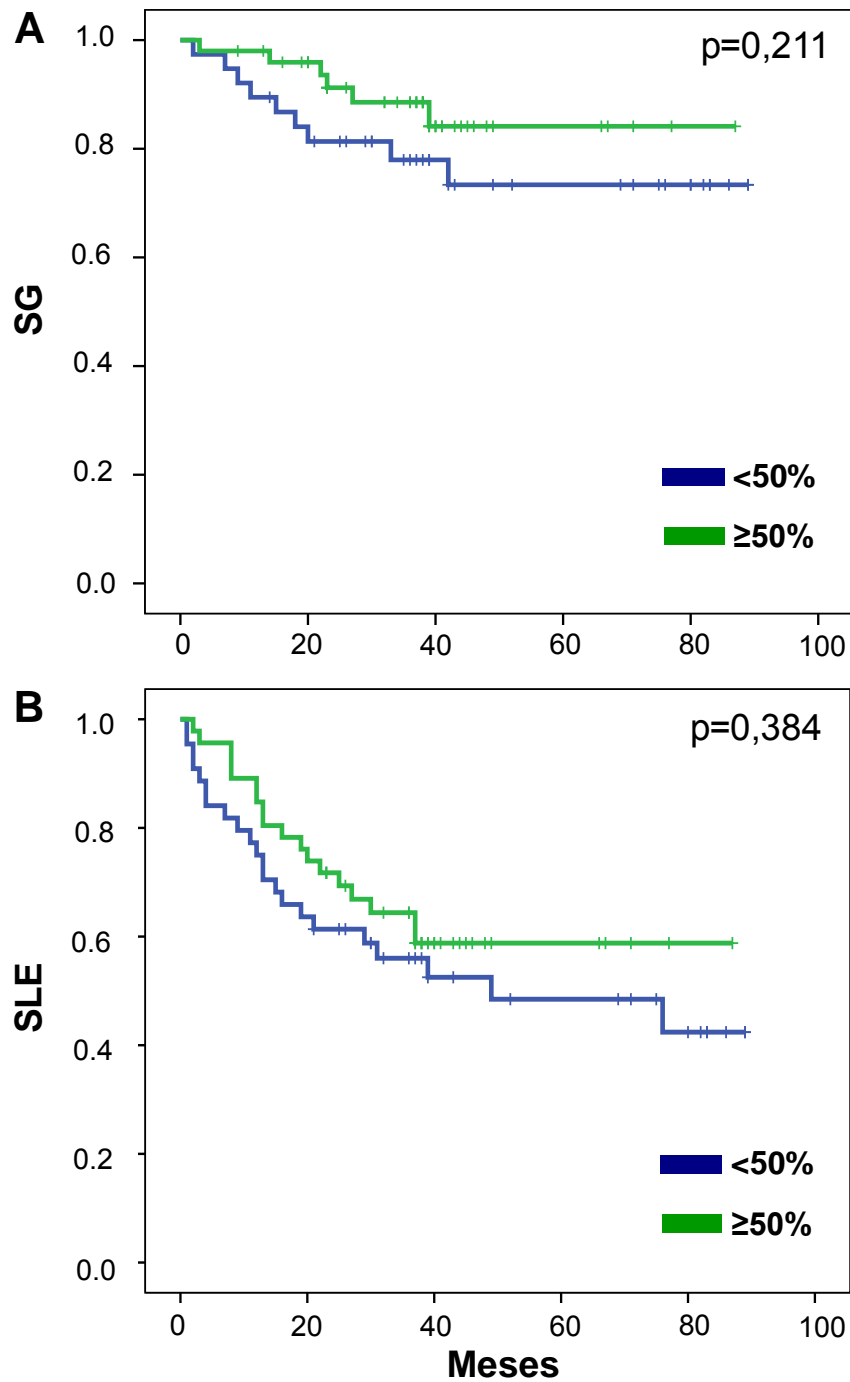


Figura 59. Curvas de Kaplan-Meier entre el % de expresión de MGMT y **A.** supervivencia global (SG) y **B.** supervivencia libre de enfermedad (SLE).

Por último, se realizó un estudio entre la expresión de MGMT y el estado de metilación de su promotor, no observándose ninguna asociación significativa. Entre los 23 tumores no metilados, sólo el 7,5% (8/107) mostraron <50% de expresión de MGMT y el 14,02% (15/107) mostraron \geq 50%, mientras que entre los 84 tumores metilados, el 41,12% (44/107) mostraron <50% de expresión de MGMT y el 37,38% (40/107) \geq 50% de expresión de MGMT.

4.2.6. ANÁLISIS DE LA INTENSIDAD DE MARCAJE DE MGMT

El estudio de la intensidad de marcaje de MGMT determinó que en un 15,8% (18/114) de las muestras la intensidad fue nula, en un 10,5% (12/114) débil, en un 22,8% (26/114) moderada y finalmente, en un 50,9% (58/114) intensa; no se pudieron valorar en 9 pacientes (Tabla 14). Con el objeto de hacer el estudio estadístico, se consideraron dos grupos de muestras, uno de baja intensidad (26,3%; 30/114) que incluía las muestras de intensidad débil o nula y otro de alta intensidad con las de intensidad, moderada o intensa (73,7%; 84/114).

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido
Nula	18	14,6	15,8
Débil	12	9,8	10,5
Moderada	26	21,1	22,8
Intensa	58	47,2	50,9
Subtotal	114	92,7	100
NV	9	7,3	
Total	123	100	

Tabla 14. *Intensidad de MGMT en pacientes con CCR.* El 15,8% de muestras presentaron una intensidad nula, en un 10,5% débil, en un 22,8% moderada y finalmente, en un 50,9% intensa. NV, no valorable.

4.2.7. COMPORTAMIENTO DE LA VARIABLE INTENSIDAD DE MARCAJE DE MGMT EN RELACIÓN A LOS DATOS CLÍNICOS

La variable intensidad de marcaje de MGMT en pacientes con CCR presentó una correlación significativa con la SG ($p < 0,01$) (Figura 60). Así, la SG media de los pacientes con baja intensidad de MGMT fue de 61,36 meses (95% IC, 45,99–76,72 meses) y de 77,48 meses en pacientes con alta intensidad de MGMT (95% IC, 70,75–84,214 meses). No obstante, no se observó correlación significativa con la SLE ni con ninguna otra variable.

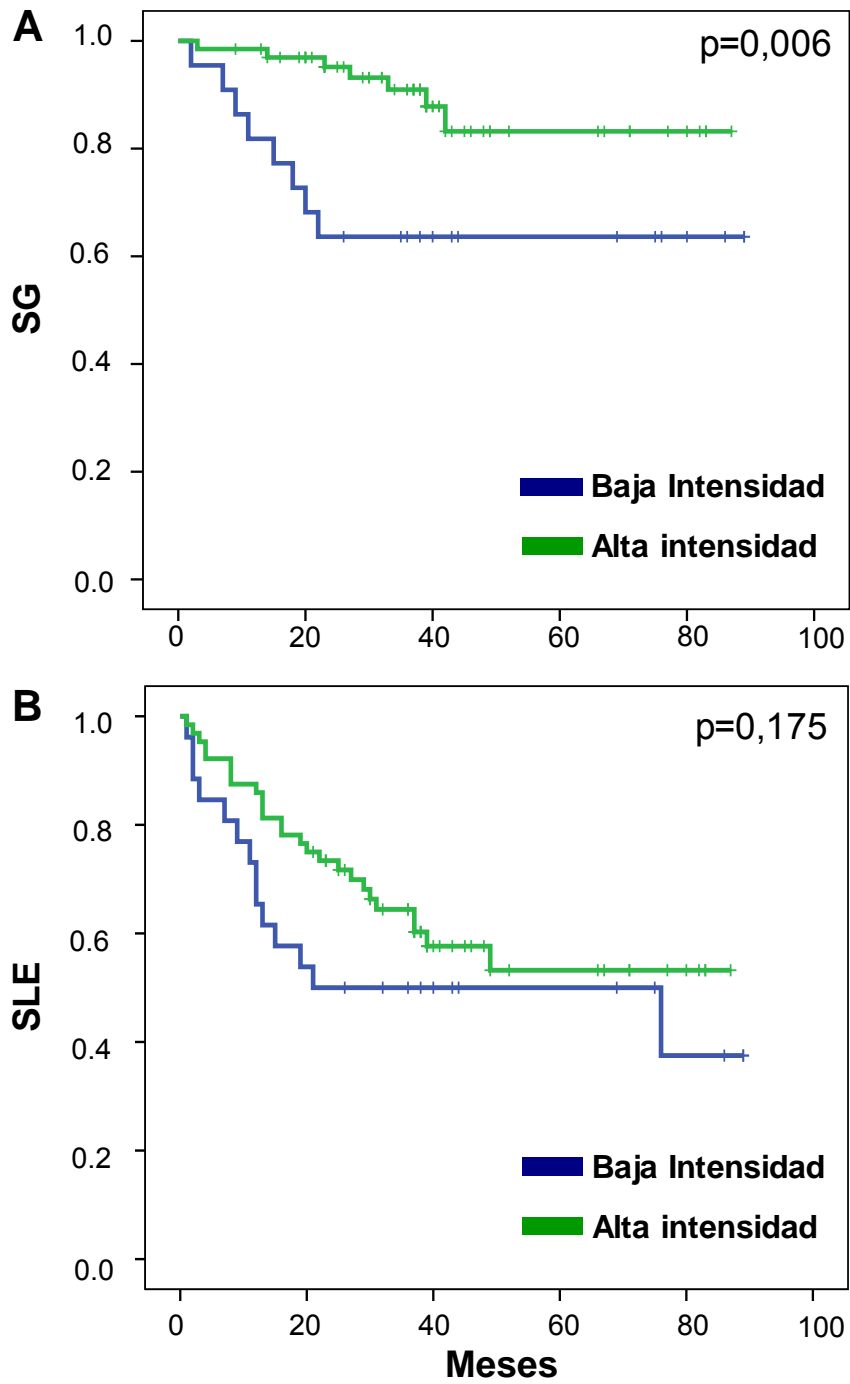


Figura 60. Curvas de Kaplan-Meier entre intensidad de marcaje de MGMT y **A.** Supervivencia global (SG) y **B.** Supervivencia libre de enfermedad (SLE).

Por otra parte, sí pudimos demostrar una asociación significativa entre la intensidad de marcaje y el estado de metilación del promotor MGMT ($p=0,001$). De este modo, pudimos apreciar que todos los tumores no metilados (23/107) presentaban alta intensidad de expresión de MGMT mientras que el 26,17% (28/107) de los pacientes que mostraban baja intensidad de expresión presentaban el promotor de MGMT metilado (Tabla 15).

	No metilado	Metilado	Total
Baja intensidad	0	28	28
Alta intensidad	23	56	79
Total	23	84	107

Tabla 15. Tabla de contingencia entre estado de metilación del promotor de MGMT e intensidad de marcaje de MGMT.

4.2.8. ANÁLISIS DEL % DE EXPRESIÓN DE CD133

Nuestros resultados demostraron que un 34,5% (38/110) de los pacientes con CCR de nuestro estudio presentaron <50% de expresión, un 52,7% (58/110) presentaron $\geq 50\%$ de expresión y finalmente un 12,7% (14/110) no presentaron marcaje. No pudieron ser valorados 13 pacientes. Con el objeto de hacer el estudio estadístico, se consideraron sólo dos grupos: <50% o baja expresión de CD133 (47,3 %; 52/110) y $\geq 50\%$ o alta expresión de CD133 (47,3%; 52/110) (Tabla 16). La Figura 61 muestra una imagen representativa del marcaje de CD133 en muestras de CCR.

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido
0%	14	11,4	12,7
<50%	38	30,9	34,5
$\geq 50\%$	58	47,2	52,7
Subtotal	110	89,4	100
NV	13	10,6	
Total	123	100	

Tabla 16. Estudio del % de expresión de CD133 en pacientes diagnosticados con CCR. El 34,5% de los pacientes presentaron <50% de expresión, un 52,7% presentaron $\geq 50\%$ de expresión y finalmente un 12,7% no presentaron marcaje. NV, no valorable.

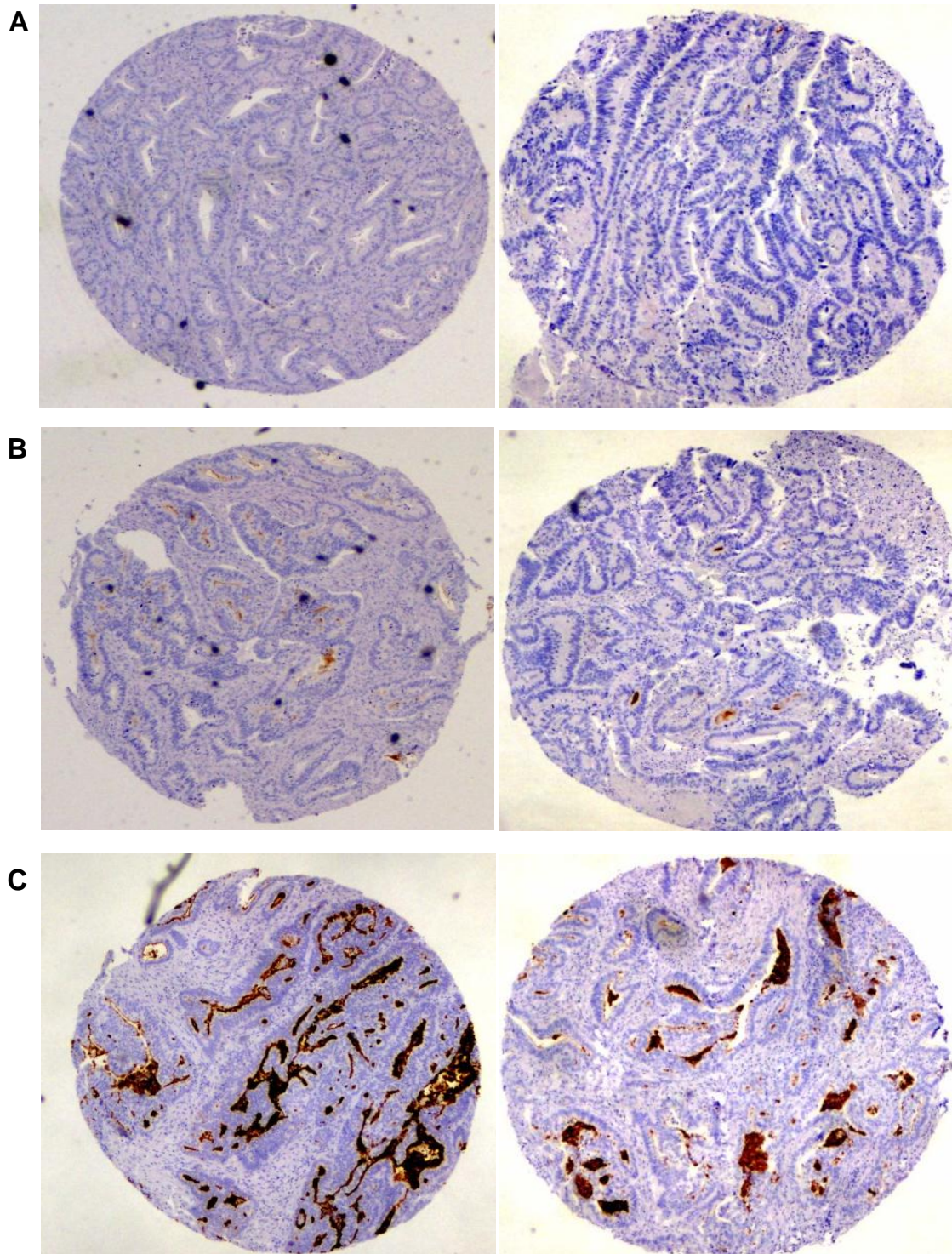


Figura 61. Imagen representativa del % de expresión de CD133 en punches de tejido de CCR. **A.** 0% de expresión de CD133 **B.** <50% de expresión de CD133 **C.** ≥50% de expresión de CD133. Para obtener el % de expresión se consideraron el número de glándulas tumorales que expresaban CD133 en la región endoluminal. No se apreció expresión de CD133 en la región tumoral circundante en ningún paciente de CCR.

4.2.9. COMPORTAMIENTO DE LA VARIABLE % DE EXPRESIÓN DE CD133 EN RELACIÓN A LOS DATOS CLÍNICOS

La Figura 62 muestra una imagen representativa del marcaje de CD133 y MGMT en muestras de CCR. Nuestros resultados demostraron una correlación significativa entre el % de expresión de CD133 y la SLE ($p < 0,05$) (Figura 63). Así, la SLE de los pacientes con una expresión $< 50\%$ fue de 67,9 meses (95% IC, 56,68–79,14 meses) y de 46,01 meses en pacientes con una expresión de $\geq 50\%$ (95% IC, 35,06–56,9 meses). No obstante, no se observó correlación con la SG que fue de 82,03 meses (95% IC, 72,9–91,1 meses) para los pacientes con $< 50\%$ de expresión de CD133 y de 70,4 meses para aquellos con $\geq 50\%$ de expresión (95% IC, 61,3–79,5 meses). Además, la variable % de expresión de CD133 no se correlacionó con el estadio tumoral ni el estado de diferenciación en nuestro grupo de pacientes.

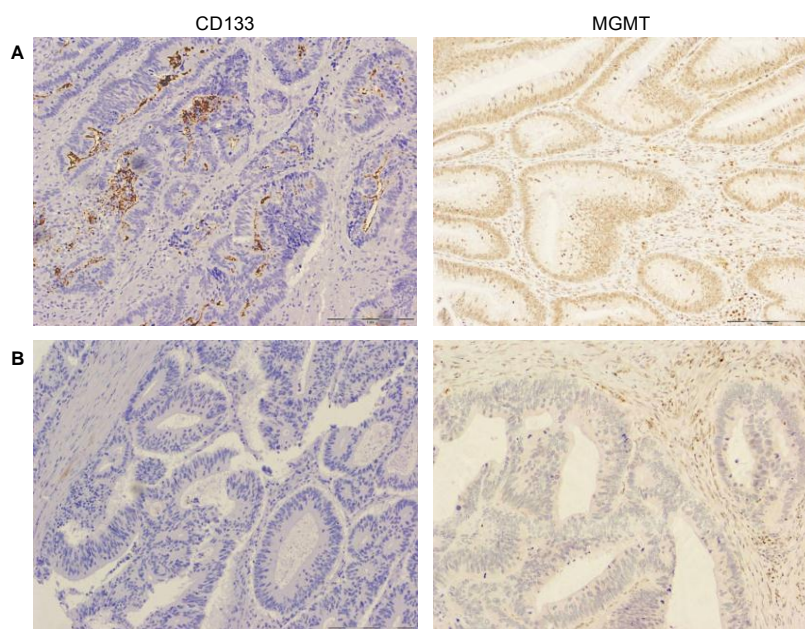


Figura 62. Detalle de la inmunotinción de los biomarcadores. **A.** CD133 se localizó en la superficie endoluminal de las glándulas tumorales y en los restos celulares localizados dentro del lumen de la glándula. MGMT presentó una tinción nuclear de las células glandulares del tumor, **B.** No se observó tinción en el tejido tumoral circundante ni en el tejido no tumoral al usar el anticuerpo frente a CD133, sin embargo, con MGMT se observó tinción en la región circundante.

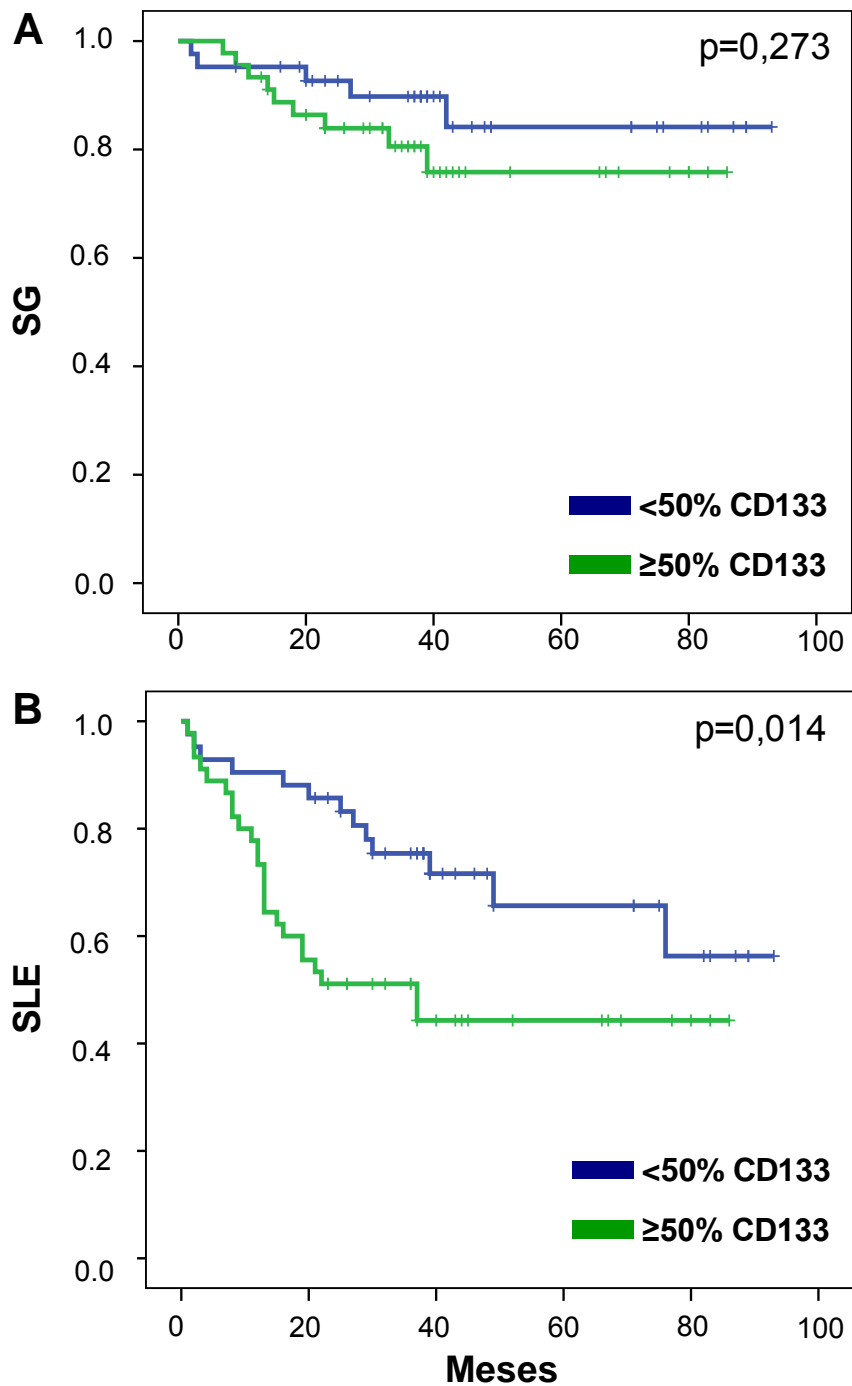


Figura 63. Curvas de Kaplan-Meier entre % de expresión de CD133 y **A.** Supervivencia global (SG) y **B.** Supervivencia libre enfermedad (SLE).

4.2.10. ANÁLISIS DE LA INTENSIDAD DE MARCAJE DE CD133

Las muestras de CCR fueron procesadas para la valoración de la intensidad de marcaje del antígeno CD133, encontrando que en el 63,6% (70/110) de los pacientes la intensidad fue alta mientras que en el 36,4% (40/110) fue baja (Figura 64). Trece pacientes no pudieron ser valorados.

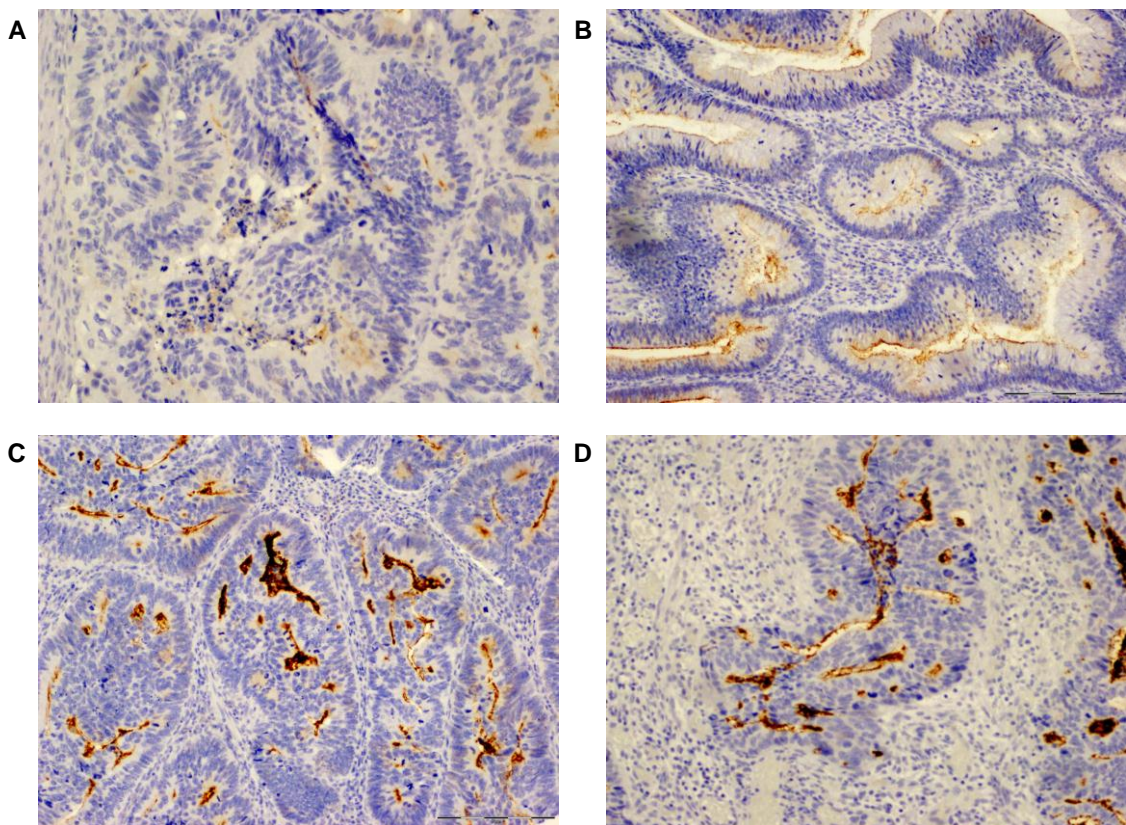


Figura 64. Imagen representativa de la intensidad de expresión de CD133 en diferentes punches. **A, B.** Baja intensidad de expresión; **C, D.** Alta intensidad de expresión.

4.2.11. COMPORTAMIENTO DE LA VARIABLE LA INTENSIDAD DE MARCAJE DE CD133 EN RELACIÓN A LOS DATOS CLÍNICOS

La intensidad de marcaje de CD133 en pacientes con CCR no se correlacionó con ninguna de las variables clínicas analizadas tales como el estadio tumoral y el grado de diferenciación. Tampoco se correlacionó con la SG (Figura 65A) ni con la SLE (Figura 65B). De hecho, la SG media de los pacientes con alta intensidad de expresión de CD133 fue de 77,9 meses (95% IC, 69,3–86,4 meses) y de 78 meses en pacientes con baja intensidad de marcaje (95% IC, 67,9–88 meses). Por otra parte, la SLE en pacientes con alta intensidad de expresión de CD133 fue de 59,7 meses (95% IC, 49,6–69,8 meses) y de 53,7 meses en pacientes con baja intensidad de expresión (95% IC, 39,44–68 meses).

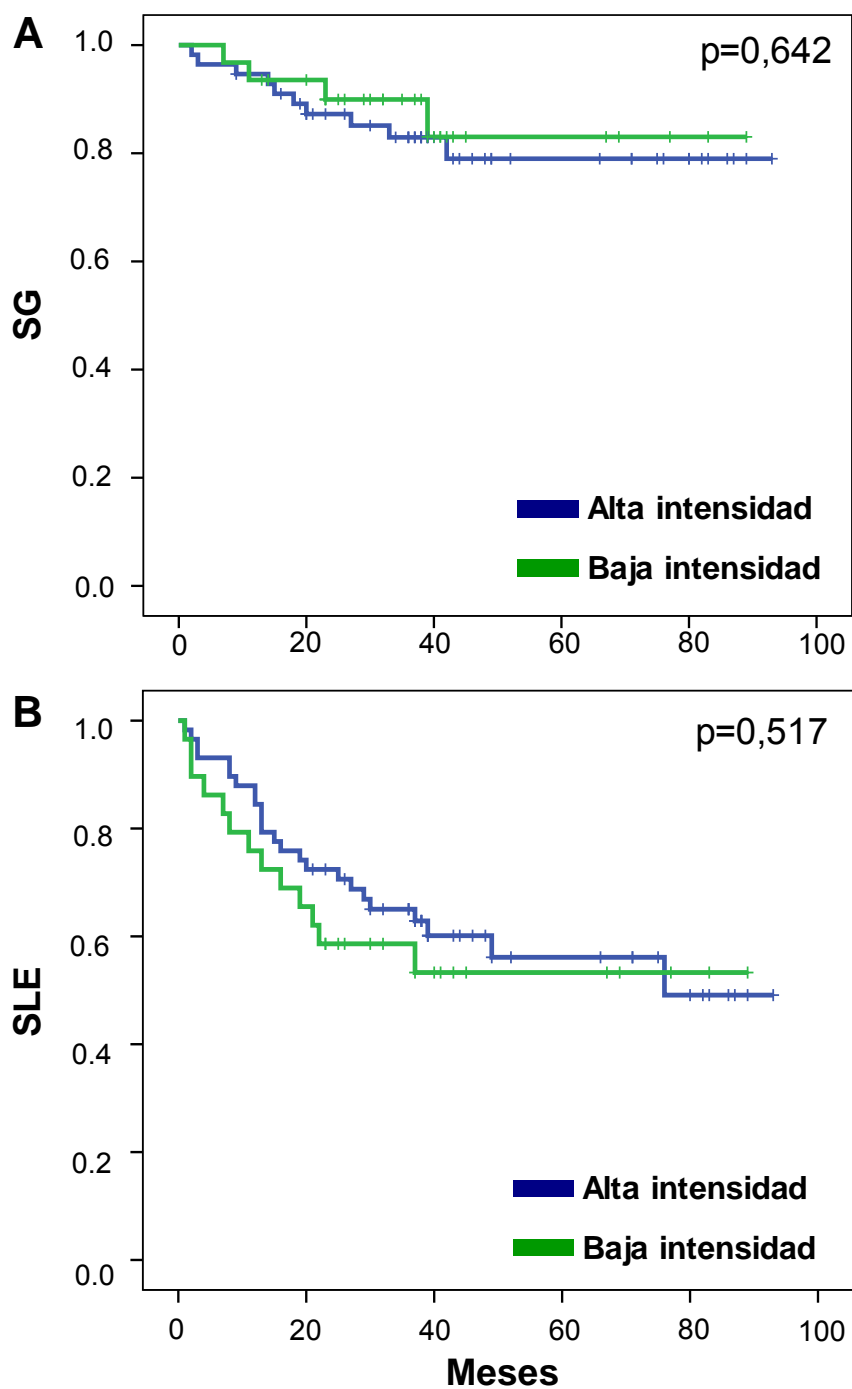


Figura 65. Curvas de Kaplan-Meier entre intensidad de marcaje de CD133 y **A.** Supervivencia Global (SG) y **B.** Supervivencia libre de enfermedad (SLE).

4.2.12. ANÁLISIS CONJUNTO DE VARIABLES MOLECULARES ASOCIADAS A MGMT Y CD133

No se apreció ninguna asociación entre las variables moleculares de MGMT (estado de metilación del promotor de MGMT, intensidad y porcentaje de expresión de MGMT) y CD133 (intensidad y porcentaje de expresión de CD133). A pesar de esto, se analizaron conjuntamente las dos variables más relevantes con resultados significativos: el porcentaje de expresión de CD133 y la intensidad de marcaje de MGMT. Su análisis permitió observar que el 10,6% de los pacientes (11/104) presentaron un % de expresión de CD133 bajo (<50%) y una baja intensidad de MGMT, el 35,6% (37/104) un % de expresión de CD133 bajo (<50%) pero con una alta intensidad de MGMT, el 15,4% (16/104) un % de expresión alto de CD133 ($\geq 50\%$) pero con baja intensidad de MGMT y finalmente, el 38,5% (40/104) un % de expresión alto de CD133 ($\geq 50\%$) acompañado de una alta intensidad de MGMT. Diecinueve pacientes no pudieron ser valorados.

Por otra parte, también se analizó la implicación clínica de ambas variables asociadas. Así, pudimos demostrar una correlación significativa ($p > 0,05$) entre la SG y la variable resumen del % de expresión de CD133 y la intensidad de marcaje de MGMT (Figura 66). Sin embargo, no se apreciaron diferencias significativas respecto a la SLE. Es importante destacar que los pacientes con baja intensidad de MGMT y $> 50\%$ de expresión de CD133 mostraron una SG y una SLE media menor (52,36 y 37,85 meses respectivamente) (Tabla 17).

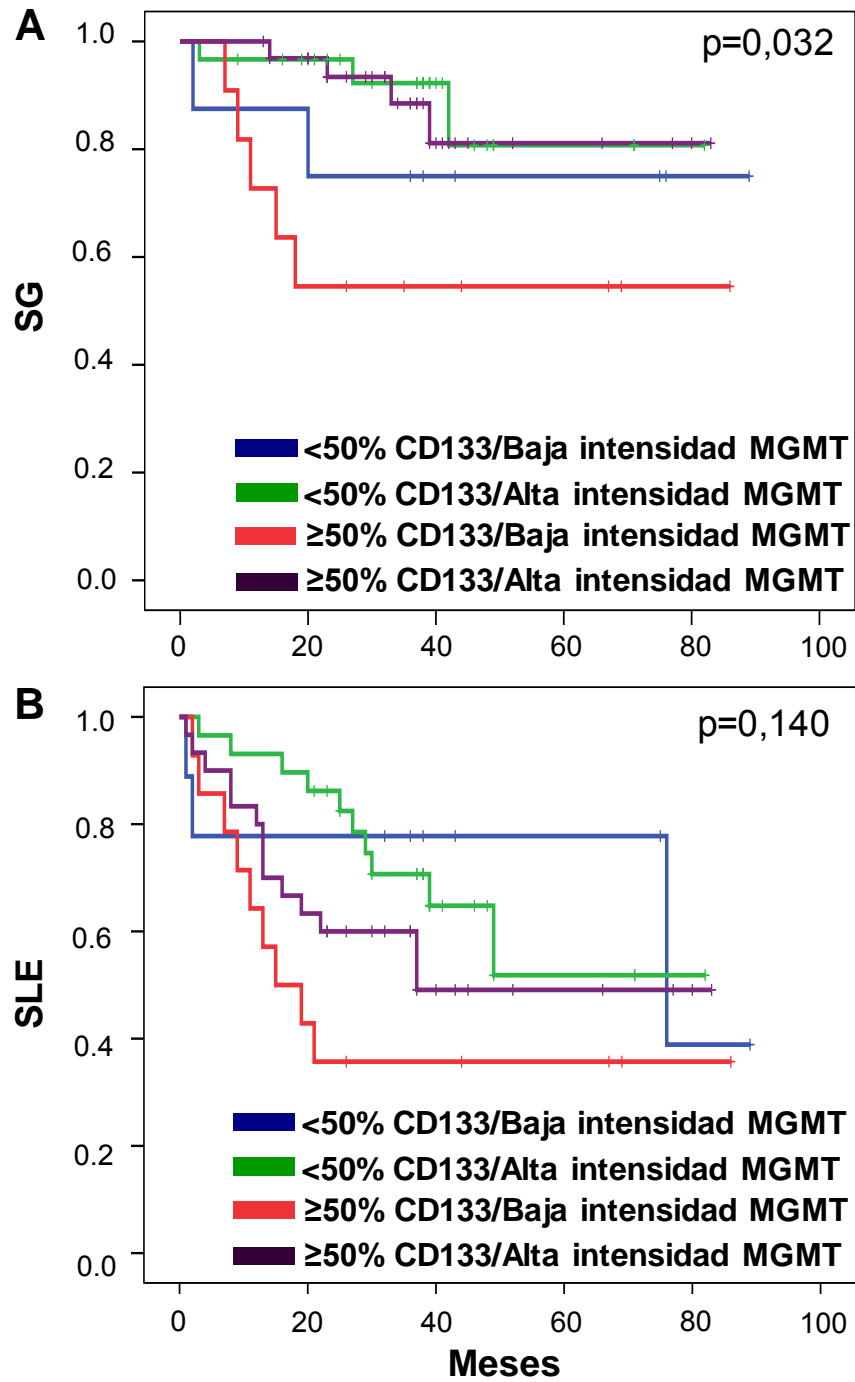


Figura 66. Curvas de Kaplan-Meier entre intensidad de MGMT/porcentaje de CD133 y **A.** Supervivencia global (SG) y **B.** Supervivencia libre de enfermedad (SLE).

Variables	SG		SLE	
	Media (95% IC)	p valor	Media (95% IC)	p valor
Alta intensidad MGMT	CD133 ≥50%	73,06 (63,99-82,14)	49,14 (36,25-62,04)	0,140
Baja intensidad MGMT	CD133 <50%	72,33 (61,82-82,84)	57,08 (44,64-69,51)	
Alta intensidad MGMT	CD133 ≥50%	52,36 (30,53-74,19)	37,85 (18,87-56,83)	
Baja intensidad MGMT	CD133 <50%	69,50 (45,88-93,11)	64,50 (41,41-87,59)	

Tabla 17. Medias de supervivencia global y libre de enfermedad respecto a intensidad de MGMT y % de expresión de CD133 analizados conjuntamente. IC: intervalo de confianza. (*p<0,05; **p>0,001).

En último lugar, se realizó un análisis multivariable mediante la regresión de Cox con las variables moleculares, histopatológicas y de tratamiento más relevantes para identificar las variables asociadas a SLE y SG (Tabla 18). Pudimos observar que únicamente la intensidad de expresión de MGMT se asociaba a la SG observando que los pacientes con alta intensidad desarrollaban la enfermedad 3,73 veces más rápido que los de baja intensidad. Por otra parte, pudimos apreciar que la SLE se asoció al estadio tumoral, a la variable quimioterapia y al porcentaje de expresión de CD133.

Variables	SG HR (IC)	p	SLE HR (IC)	p
Sexo (Hombre /Mujer)	2,69 (0,77-9,34)	0,118	1,56 (0,80-3,05)	0,186
Grado diferenciación (Bien-Moderado/pobre)	0,62 (0,20-1,93)	0,412	1,24 (0,48-3,17)	0,652
Estadio tumoral (I-II / III-VI)	0,50 (0,18-1,35)	0,175	0,38 (0,19-0,73)	0,004**
Radioterapia (No / Si)	0,41 (0,13-1,27)	0,123	0,64 (0,29-1,41)	0,276
Quimioterapia (No / Si)	0,48 (0,16-1,49)	0,21	0,50 (0,25-0,99)	0,049*
Intensidad de expresión de MGMT (Baja / Alta)	3,73 (1,35-10,33)	0,011*	1,55 (0,81-2,99)	0,182
Porcentaje de expresión de CD133 (Bajo / Alto)	0,54 (0,18-1,65)	0,28	0,44 (0,22-0,86)	0,018*

Tabla 18. Estudio multivariable: regresión de Cox entre SG, SLE y variables moleculares y clínicas más relevantes. HR: Hazard ratio, IC: intervalo de confianza. (*p<0,05; **p>0,001). p, p valor.

4.2.13. ANÁLISIS DE LA CORRELACIÓN ENTRE LAS VARIABLES CLÍNICAS

Finalmente, se realizó el estudio de la interacción entre las variables clínicas en el grupo de pacientes con CCR, siendo los resultados más relevantes los siguientes:

4.2.13.1. Edad

Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,027$) entre la media de la edad de los pacientes bien-moderadamente diferenciados ($72,22\pm 10,04$) y los pobremente diferenciados ($66,57\pm 12,32$). Del mismo modo, la media de edad de los pacientes con baja intensidad ($74,97\pm 8,48$) y los pacientes con alta intensidad ($70,17\pm 11,12$) de expresión de MGMT presentó diferencias significativas ($p=0,034$).

No obstante, el estadio tumoral, la respuesta al tratamiento, la presencia/ausencia de metástasis, el % de expresión de MGMT, el estado de metilación del promotor de MGMT, la intensidad de marcaje de CD133 y el % de expresión de CD133, no presentaron diferencias significativas relacionadas con la edad de los pacientes.

4.2.13.2. Grado de diferenciación

No se apreciaron diferencias significativas en la SG (Figura 67A) ni en la SLE (Figura 67B) respecto al grado de diferenciación tumoral. No obstante, la SG de los pacientes bien o moderadamente diferenciados fue de 77,62 meses (95% IC, 70,03–85,21 meses) y de 64,14 meses en los pacientes pobremente diferenciados (95% IC, 48,53–79,75 meses). Además, la SLE media de los pacientes bien o moderadamente diferenciados fue de 56,25 meses (95% IC, 47,45–65,06 meses) mientras que la de los pacientes pobremente diferenciados fue de 56,60 meses (95% IC, 38,35–74,64 meses).

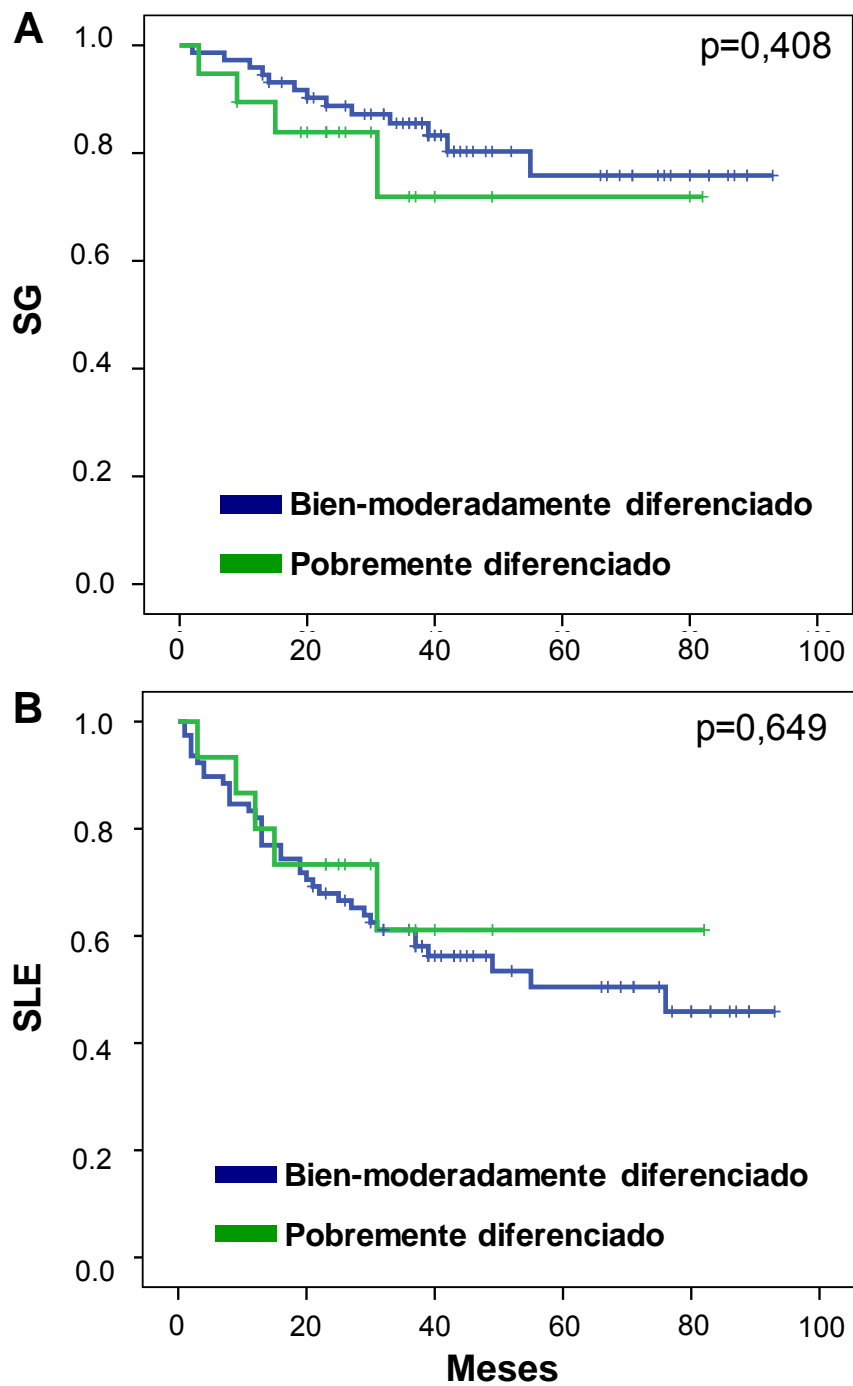


Figura 66. Curvas de Kaplan-Meier entre el grado de diferenciación tumoral y **A.** Supervivencia global (SG) y **B.** Supervivencia libre de enfermedad (SLE).

4.2.13.3. Estadío tumoral

Se comprobó que, como era lógico, la SLE se correlacionó con el estadio tumoral de la enfermedad (figura 68) de forma que la media de SLE fue de 70,31 meses (95% IC, 59,84–80,78 meses) en los estadio I-II y de 42,44 meses en los estadio III-IV (95% IC, 32,30–52,58 meses).

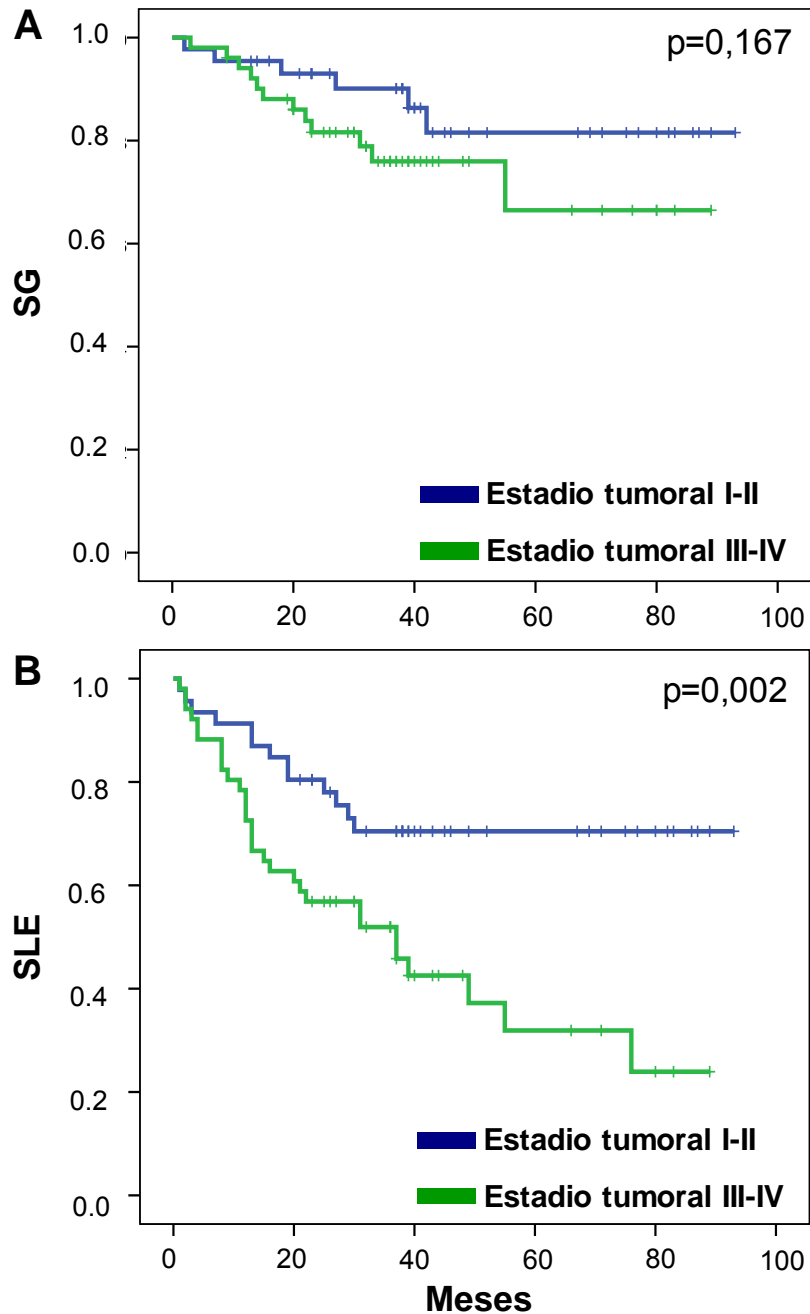


Figura 68. Curvas de Kaplan-Meier entre estadio tumoral y **A.** Supervivencia global (SG) y **B.** Supervivencia libre de enfermedad (SLE).

4.3. RESULTADOS *IN VIVO*: ESTUDIO ESPECIAL EN PACIENTES CON CÁNCER RECTAL

Se analizó un grupo de 29 pacientes con cáncer rectal del que se pudo obtener muestras pre y postratamiento (ver Material y Métodos). Las características clínicas de dicho grupo quedan reflejadas en la Tabla 19. Los 29 pacientes en este sub-estudio presentaron una edad media de 64.43 ± 12.24 años (rango: 33 a 83 años) siendo el 75,9% (22/29) hombres y el 24,1% (7/29) mujeres. La gran mayoría de tumores estaban bien o moderadamente diferenciados (93,1%, 27/29). Tan sólo un 37,9% (11/29) de los pacientes presentaron una buena respuesta al tratamiento (GRT1,2) mientras que el 62,1% (18/29) presentaron una respuesta pobre (GRT3,4,5). A pesar de esto, al finalizar todo el tratamiento, ningún paciente falleció debido al cáncer pero el 13.8% (4/29) mostraron reaparición de la patología. El seguimiento medio fue de $20,53 \pm 9,07$ meses y la SLE media fue de $18,62 \pm 9,11$ meses (rango entre 5 a 37 meses).

Tabla 19. Características de la población con cáncer rectal.

Variables	Características	% (n)
Sexo	Hombre	75.9 (22)
	Mujer	24.1 (7)
Edad	≥50 años	93.1 (27)
	<50 años	6.9 (2)
Grado de diferenciación tumoral	Bien-moderado	93.1 (27)
	Pobre	6.9 (2)
Estadio tumoral	Muestra PreQRT	
	II	34.5 (10)
	III	65.5 (19)
	Muestra PostQRT	
	0-I	37.9 (11)
	II-III	62.1 (18)
Respuesta al tratamiento (TNM)	Respuesta estable/progresión	31.0 (9)
	Respuesta parcial/completa	69.0 (20)
Invasión de nodos linfáticos (N)	Muestra PreQRT	
	Si	65.5 (19)
	No	34.5 (10)
	Muestra PostQRT	
	Si	37.9 (11)
	No	62.1 (18)
Cambios en invasión de nodos linfáticos	Reducción de N	34.5 (10)
	N estable/aumenta	65.5 (19)
Grado infiltración tumoral (T)	Muestra PreQRT	
	T3	96.6 (28)
	T4	3.4 (1)
	Muestra PostQRT	
	T0-T1	17.2 (5)
	T2-T3	82.8 (24)
Cambios en infiltración tumoral	Reducción de T	41.4 (12)
	T estable	58.6 (17)
Grado de regresión tumoral	GRT 1 o 2	37.9 (11)
	GRT 3, 4 o 5	62.1 (18)
Recidiva	Si	13.8 (4)
	No	86.2 (25)
Estado última revisión	Vive sin enfermedad	72.4 (21)
	Vive con enfermedad	10.3 (3)
	Muerto sin enfermedad	17.2 (5)

4.3.1. ANÁLISIS DE METILACIÓN DEL PROMOTOR DE MGMT

4.3.1.1. Estado de metilación del promotor de MGMT en tejido normal, fase pretratamiento y fase postratamiento

Los resultados observados en el estudio de metilación del promotor de MGMT en las distintas muestras se encuentran resumidos en la Figura 69. El estudio de metilación del promotor de MGMT en el tejido normal circundante mostró que el promotor de MGMT estaba no metilado (UM) en el 16% (4/25) de los pacientes y metilado en el 84% (21/25) de los cuales, el 48% (12/25) mostraron el promotor parcialmente metilado (UM/M) y el 36% (9/25) hipermetilado (M). No pudieron ser valorados 4 pacientes (Tabla 20).

Por otra parte, cuando el mismo estudio fue realizado en tejido obtenido durante la fase de pretratamiento pudimos observar no metilación del promotor de MGMT en el 16% (4/25) de los pacientes y metilación en el 84% (21/25) de los cuales el 56% (14/25) estaba parcialmente metilado y en 7 pacientes (28%) hipermetilado. No se pudo valorar en 4 pacientes (Tabla 20).

En la biopsia obtenida después del tratamiento detectamos que el 18,5% (5/27) presentaban el promotor de MGMT no metilado y el 81,5% (22/27) metilado. Dentro de estos últimos, el 63% (17/27) lo presentaron parcialmente metilado y el 18,5% (5/27) hipermetilado. Dos pacientes no pudieron ser valorados (Tabla 20).

Variable	Biopsias	Clasificación: n (%)		
		No metilado	Metilado	NV
Estado de metilación del promotor MGMT	Normal	4 (16.0)	21 (84.0)	4
	PreQRT	4 (16.0)	21 (84.0)	4
	PostQRT	5 (18.5)	22 (81.5)	2

Tabla 20. Estado de metilación del promotor de MGMT en tejido no tumoral circundante. NV, no valorable.

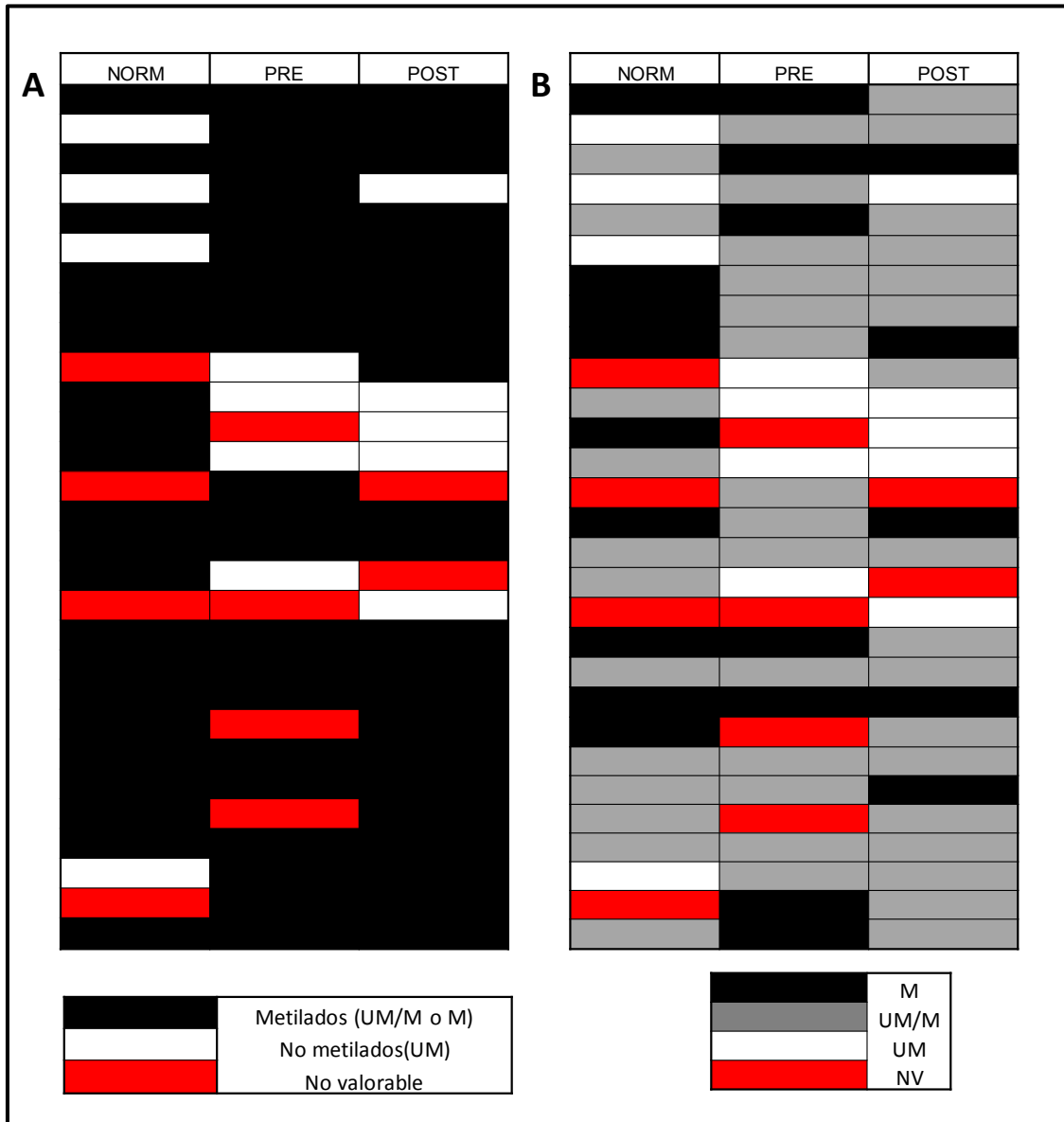


Figura 69. Tabla resumen del estado de metilación del promotor de MGMT en tejido normal (NORM), en fase pretratamiento (PRE) y postratamiento (POST). **A.** Estado de metilación del promotor de MGMT a nivel cualitativo y **B.** A nivel molecular.

En base a los resultados obtenidos, realizamos un estudio de las modificaciones en la metilación del promotor de *MGMT* entre los diferentes tejidos obtenidos de un mismo paciente, incluyendo el tejido normal y tumoral, tanto pre como postratamiento.

- **Tejido normal y tumoral en fase pretratamiento.** La clasificación molecular permitió observar que en un 31,8% (7/22) de los pacientes se producía desmetilación del promotor de *MGMT*, en un 36,4% (8/22) no existía modificación (metilación estable) y en un 31,8% (7/22) se produjo metilación (Tabla 21).

- **Tejido normal y tumoral en fase postratamiento.** Del mismo modo, a partir de la clasificación molecular se observó que en un 33,3% (8/24) de los pacientes se producía la desmetilación del promotor de *MGMT*, en un 45,8% (11/24) se mantuvo estable y en un 20,8% (5/24) se dio lugar la metilación del promotor de *MGMT*. No se pudieron valorar en un 17,2% (5/29) de los pacientes (Tabla 21).

- **Tejido tumoral en fase pre y postratamiento.** Por último, analizando a nivel molecular la evolución desde el estado de pretratamiento al postratamiento se observó en un 26,1% (6/23) de los pacientes la desmetilación del promotor de *MGMT*, en un 56,5% (13/23) el mantenimiento del estado de metilación y en un 17,4% (4/23) se dio lugar la metilación del promotor de *MGMT*. No se pudieron valorar en el 20,7% (6/29) (Tabla 21).

A pesar de que el estudio descriptivo nos permitió observar modificaciones en el patrón de metilación de *MGMT* entre los diferentes tejidos obtenidos (normal y tumoral), no pudimos observar diferencias estadísticamente significativas entre ellos (Tabla 21).

Variable	Biopsias	Evolución entre muestras: n (%)			NV	p valor
		Desmetilación	Estable	Metilación		
Estado de metilación de MGMT	Normal-PreQRT	3 (13,6)	15 (68,2)	4 (18,2)	7	1
	Normal-PostQRT	3 (12,5)	18 (75,0)	3 (12,5)	5	1
	PreQRT-PostQRT	1 (4,3)	21 (91,3)	1 (4,3)	6	1

Tabla 21. Evolución del estado de metilación del promotor de MGMT entre las distintas biopsias. NV, no valorable.

4.3.1.2. Estudio de la asociación del estado de metilación del promotor de MGMT con las variables clínicas

En primer lugar, se transformaron todas las variables clínicas e histopatológicas en variables dicotómicas para poder realizar el estudio de asociación con las variables moleculares. Los resultados obtenidos se encuentran resumidos en la Tabla 22. Los resultados más relevantes fueron la asociación entre el estado de metilación obtenido después del tratamiento (postQRT) y las variables: respuesta al tratamiento e invasión linfática después del tratamiento (postQRT N).

Tabla 22. Asociaciones entre estado de metilación de MGMT y variables clínicas.

Variables	Biopsias	Características	Normal			PreQRT			PostQRT		
			UM	M	p	UM	M	p	UM	M	p
Estadio tumoral (TNM)	preQRT	II	2 (20)	8 (80)	1	0 (0)	9 (100)	0,26	1 (10)	9 (90)	0,621
		III	2 (13,3)	13 (86,7)		4 (25)	12 (75)		4 (23,5)	13 (76,5)	
	postQRT	0-I	3 (30)	7 (70)	0,27	0 (0)	10 (100)	0,13	1 (10)	9 (90)	0,621
		II-III	1 (6,7)	14 (93,3)		4 (26,7)	11 (73,3)		4 (23,5)	13 (76,5)	
Respuesta tratamiento	pre-post QRT	Progresión/estable	0 (0)	8 (100)	0,27	3 (42,9)	4 (57,1)	0,05	4 (50)	4 (50)	0,017*
		Parcial/completa	4 (23,5)	13 (76,5)		1 (5,6)	17 (94,4)		1 (5,3)	18 (94,7)	
Invasión nodos linfáticos (N)	preQRT	Si	2 (13,5)	13 (86,7)	1	4 (25)	12 (75)	0,26	4 (23,5)	13 (76,5)	0,621
		No	2 (20)	8 (80)		0 (0)	9 (100)		1 (10)	9 (90)	
	postQRT	Si	0 (0)	10 (100)	0,13	3 (37,5)	5 (62,5)	0,08	4 (40)	6 (60)	0,047*
		No	4 (26,7)	11 (73,3)		1 (5,9)	16 (94,1)		1 (5,9)	16 (94,1)	
	pre-post QRT	Reducción	2 (28,6)	5 (71,4)	0,55	1 (11,1)	8 (88,9)	1	0 (0)	9 (100)	0,136
		Aumenta/ Estable	2 (11,1)	16 (88,9)		3 (18,8)	13 (81,3)		5 (27,8)	13 (72,2)	
Infiltración tumoral (T)	preQRT	T3	4 (16,7)	20 (83,3)	1	4 (16,7)	20 (83,3)	1	5 (19,2)	21 (80,8)	1
		T4	0 (0)	1 (100)		0 (0)	1 (100)		0 (0)	1 (100)	
	postQRT	T0-T1	2 (50)	2 (50)	0,11	0 (0)	4 (100)	1	0 (0)	4 (100)	0,561
		T2-T3	2 (9,5)	19 (90,5)		4 (19,0)	17 (81,0)		5 (21,7)	18 (78,3)	
	pre-post QRT	Reducción	3 (27,3)	8 (72,7)	0,29	0 (0)	11 (100)	0,11	1 (9,1)	10 (90,9)	0,618
		Estable	1 (7,1)	13 (92,9)		4 (28,6)	10 (71,4)		4 (25)	12 (75)	
GRT	pre-post QRT	GRT 1 o 2	2 (22,2)	7 (77,8)	0,6	0 (0)	9 (100)	0,26	1 (10)	9 (90)	0,621
		GRT 3, 4 o 5	2 (12,5)	14 (87,5)		4 (25)	12 (75)		4 (23,5)	22 (81,5)	

(*p<0,05; **p>0,001). p, valor p. Normal: tejido normal circundante.

En segundo lugar, se analizaron las correlaciones entre variables ordinales apreciando:

- Una correlación inversa entre el estadio tumoral después del tratamiento y la evolución del estado de metilación del promotor de MGMT desde el tejido normal al tumoral en fase de pretratamiento (ρ :-0,570, p =0,005) (Figura 70).

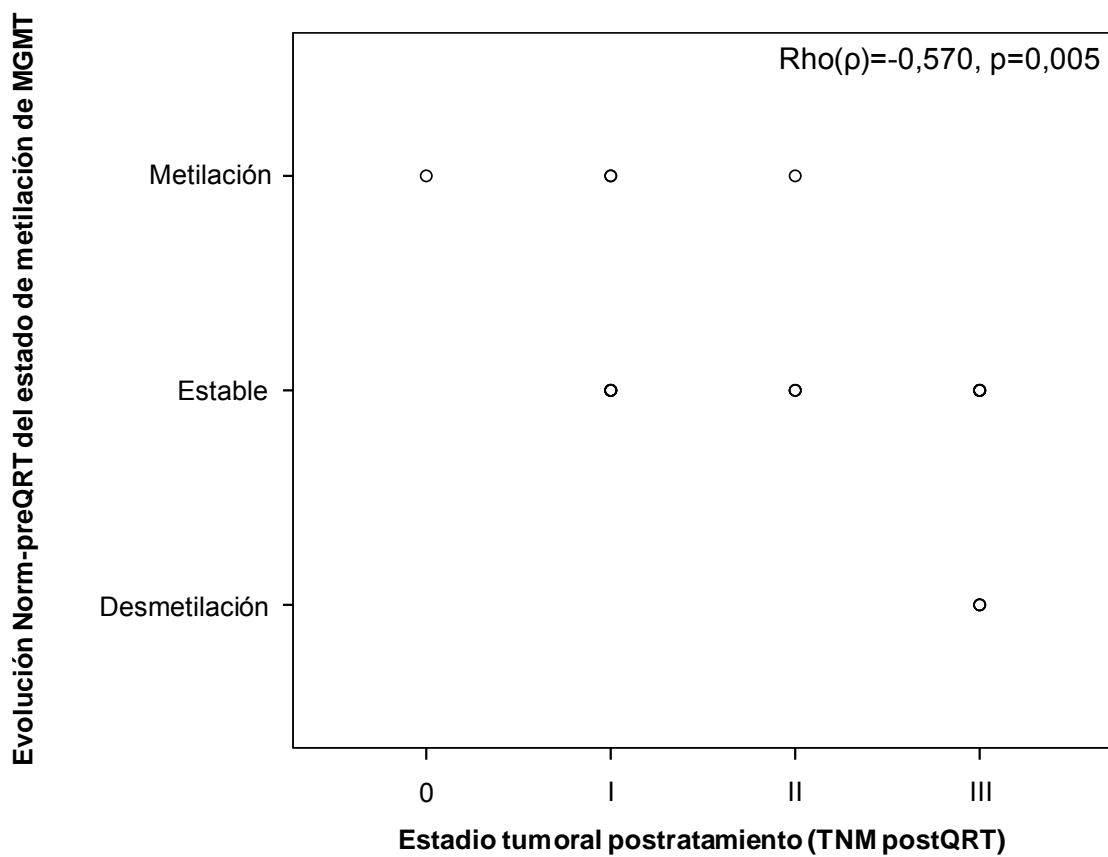


Figura 70. Correlación entre el estadio tumoral después del tratamiento y la evolución del estado de metilación del promotor de MGMT desde tejido normal al tejido tumoral durante la fase de pretratamiento.

- Una correlación entre la respuesta al tratamiento y la evolución del estado de metilación del promotor de MGMT desde el tejido normal al tumoral en fase de pretratamiento ($\rho:0,640$, $p= 0,002$) (Figura 71).

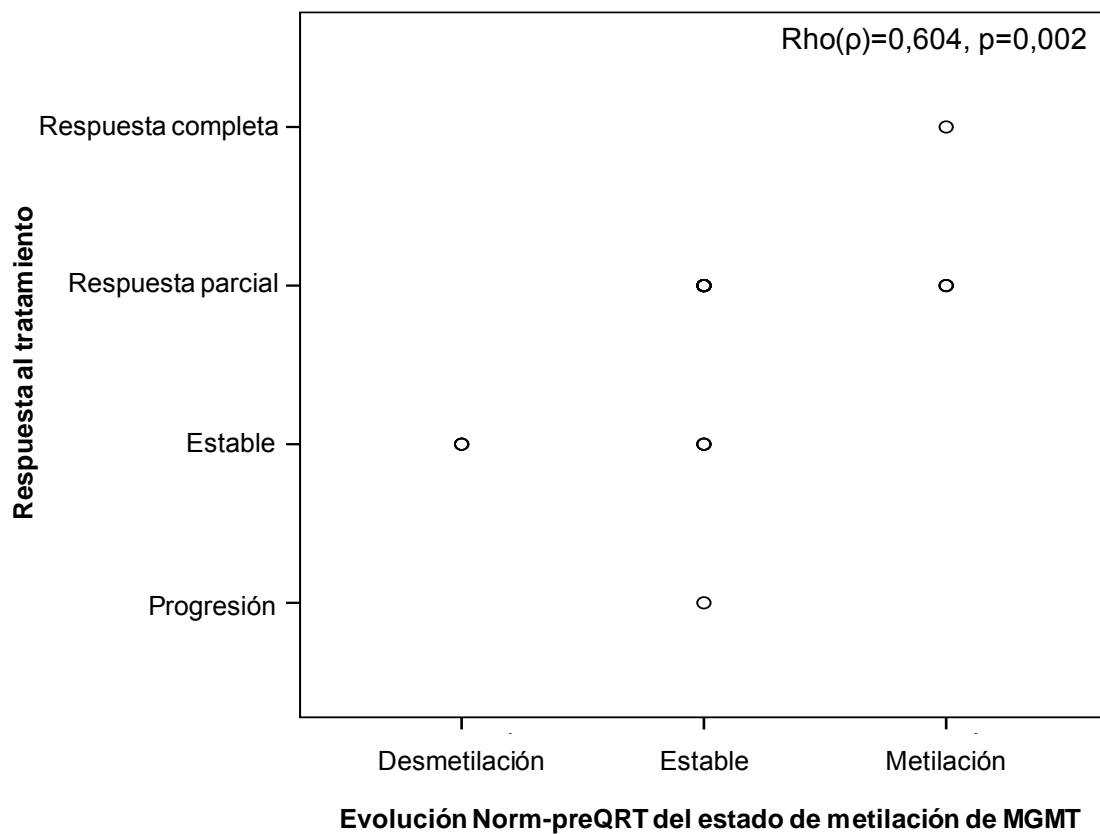


Figura 71. Correlación entre la respuesta al tratamiento y la evolución del estado de metilación del promotor de MGMT desde tejido normal al tejido tumoral durante la fase de pretratamiento.

- Una correlación entre la respuesta al tratamiento y la evolución del estado de metilación del promotor de MGMT desde el tejido normal al tumoral en fase de postratamiento (R:0,559, p=0,004) (Figura 72).

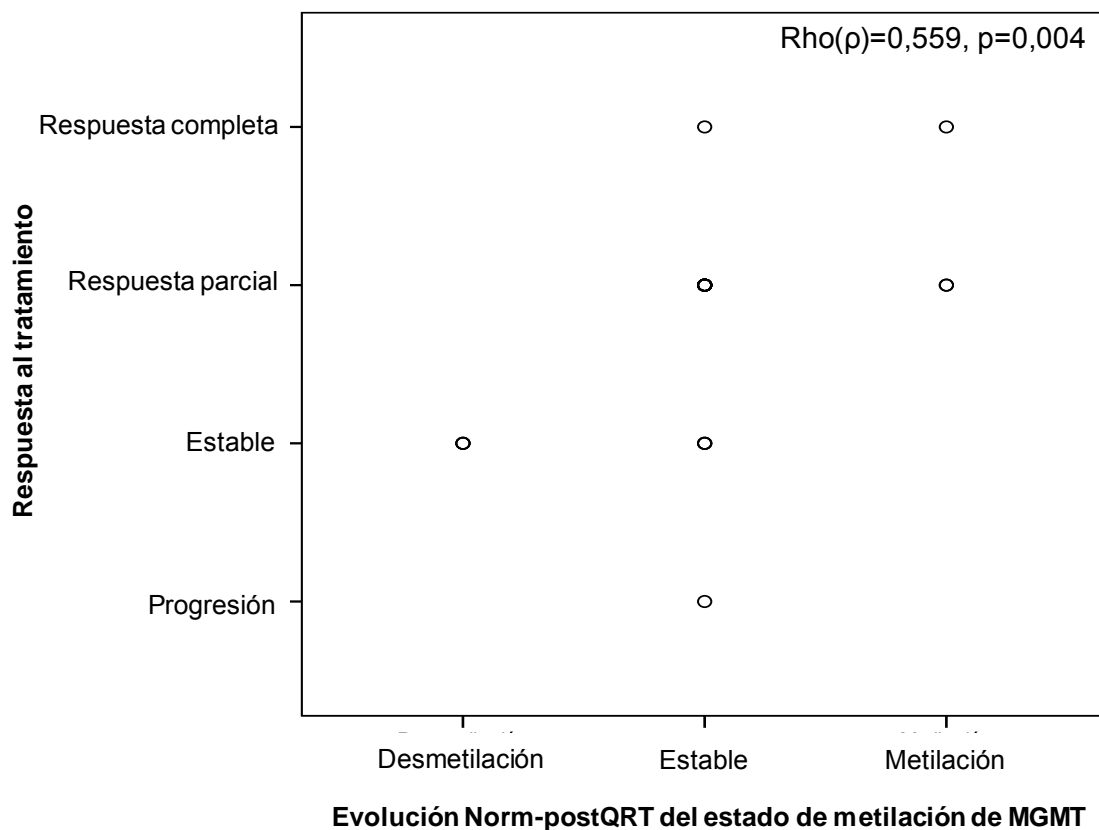


Figura 72. Correlación entre la respuesta al tratamiento y la evolución del estado de metilación del promotor de MGMT, desde tejido normal al tejido tumoral durante la fase postratamiento.

En la Tabla 23 se puede apreciar un resumen de las correlaciones más relevantes entre la progresión del estado de metilación y las variables clínicas.

Tabla 23. Correlaciones más significativas entre progresión del estado de metilación y variables clínicas.

Características (orden)	Normal-preQRT (desmetilación, estable, metilación) ρ (p valor)	Normal-postQRT (desmetilación, estable, metilación) ρ (p valor)
Estadio tumoral postQRT (0, I, II, III)	-0,570 (0,005)**	-0,486 (0,016)*
Infiltración tumoral postQRT (T0, T1, T2, T3)	-0,483 (0,022)*	-0,413 (0,044)*
Respuesta al tratamiento (progresión, estable, respuesta parcial y completa)	0,604 (0,002)**	0,559 (0,004)**
GRT (GRT1, GRT2-3, GRT4-5)	-0,459 (0,031)*	-0,399 (0,052)

(*p<0,05; **p>0,001), ρ : rho de spearman.

Por último, se pudo analizar la SLE mediante las curvas de *Kaplan-Meier* comparándolas en todas las variables moleculares. Únicamente se pudieron apreciar diferencias significativas dentro del estado de metilación de *MGMT* durante la fase previa a la QRT ($p=0,0001$) (Figura 73). De este modo, los pacientes con el promotor de *MGMT* no metilado durante la fase preQRT mostraron una supervivencia media de 12,5 meses (95% IC: 8,89-16,10) mientras que en los pacientes con el promotor metilado la supervivencia fue de 37 meses (95% IC: 37,0-37,0). Cabe destacar que ésta fue la única variable que se correlacionó con la SLE no observándose ninguna otra correlación significativa.

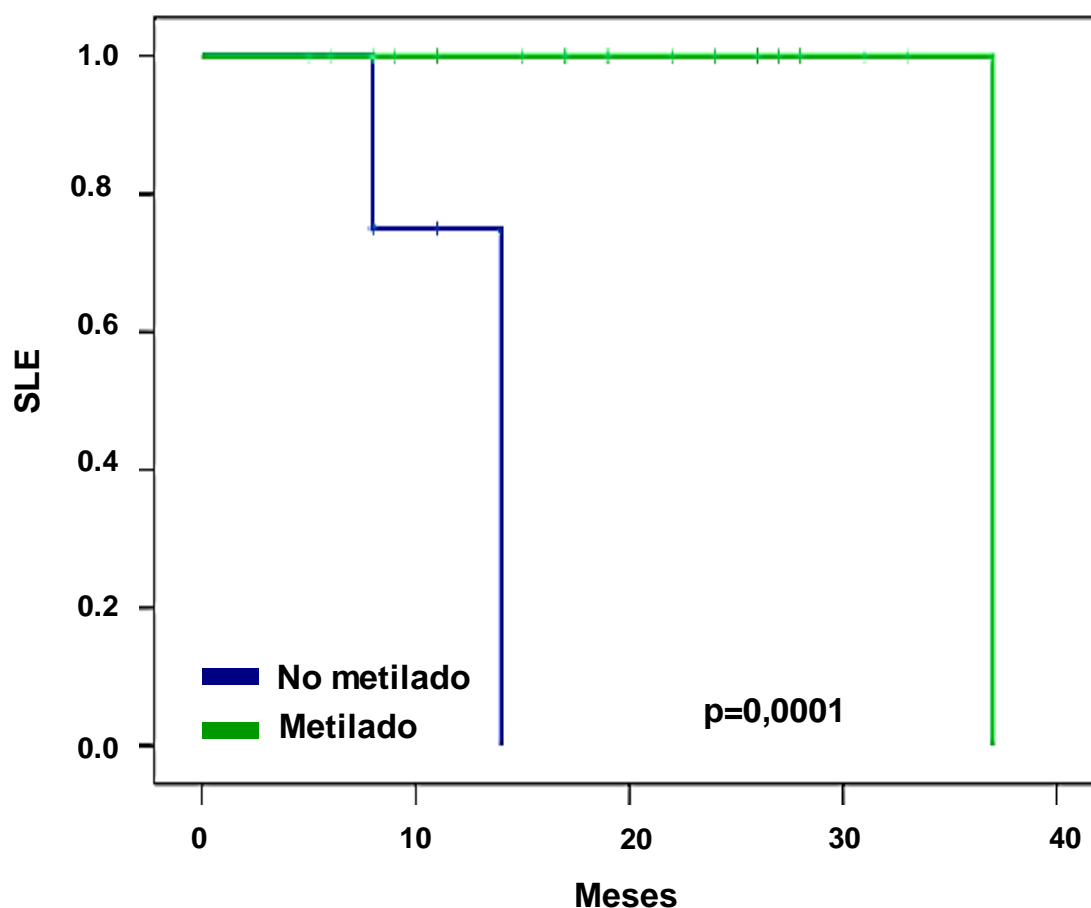


Figura 73. Curvas de *Kaplan-Meier* entre SLE y estado de metilación del promotor de *MGMT* antes de la QRT (preQRT) en selección de pacientes con cáncer rectal.

4.3.2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MGMT MEDIANTE qPCR

4.3.2.1. Expresión de MGMT en tejido normal y tumoral en fase pretratamiento y fase postratamiento

Todos los resultados obtenidos mediante qPCR se referenciaron a los datos obtenidos del pool de ARN control dando lugar al $\Delta\Delta C_t$ (*fold*s) (ver Material y Métodos). Así, se observó una expresión de MGMT por encima de 2 *fold*s en el 65,2% (15/23) de las muestras de tejido normal circundante, en el 65,2% (15/23) de las muestras tumorales preQRT y en el 60,9% (14/23) de las muestras tumorales postQRT (Tabla 24).

Variable	Biopsias	Clasificación: n (%)		
		<2 <i>fold</i> s	≥2 <i>fold</i> s	NV
Expresión MGMT ARN	Normal	8 (34,8)	15 (65,2)	6
	PreQRT	8 (34,8)	15 (65,2)	6
	PostQRT	9 (39,1)	14 (60,9)	6

Tabla 24. Expresión de ARNm del gen MGMT en las biopsias. Pudimos apreciar una expresión media de $2,01\pm 1,03$ *fold*s en tejido normal, de $2,00\pm 1,56$ *fold*s en tejido tumoral pretratamiento y de $2,54\pm 2,03$ *fold*s en tejido tumoral postratamiento.

Analizando la evolución de la expresión (FC) de MGMT considerando como punto de corte ± 1 *fold*, entre las biopsias del tejido normal circundante y *preQRT*, el 91,3% (21/23) de pacientes mantuvieron estable la expresión de ARN en relación al tejido normal y sólo en un 8,7% (2/23) presentaron un aumento de la expresión. Resultados idénticos se observaron para la diferencia de expresión entre las biopsias tejido normal circundante y *postQRT*. En último lugar, considerando como referencia el tejido tumoral obtenido durante la fase pretratamiento, en un 78,3% (18/23) de muestras postratamiento se mantuvo estable la expresión de MGMT y sólo en el 21,7% (5/23) se produjo un

aumento de dicha expresión. Nuestros resultados no mostraron diferencias significativas en la evolución de expresión del ARNm de MGMT entre las distintas biopsias analizadas (Tabla 25). Cabe destacar que ningún paciente mostró reducción de la expresión del ARNm de MGMT.

Variable	Biopsias	Evolución entre muestras: n (%)			NV	p valor
		Reducción	Estable	Aumento		
Expresión de ARNm de MGMT	Normal-PreQRT	0 (0,0)	21 (91,3)	2 (8,7)	6	0,868
	Normal-PostQRT	0 (0,0)	21 (91,3)	2 (8,7)	6	0,959
	PreQRT-PostQRT	0 (0,0)	18 (78,3)	5 (21,7)	6	0,438

Tabla 25. Evolución de la expresión de ARNm de MGMT entre las distintas fases. NV, no valorable.

4.3.2.2. Comportamiento de la expresión de MGMT en relación a los datos clínicos.

Los resultados no mostraron ninguna correlación o asociación estadísticamente significativa entre los valores de MGMT obtenidos y las variables clínicas (Tabla 26 y la Tabla 27). No obstante, sí pudimos demostrar diferencias significativas en las biopsias de los pacientes obtenidas durante la fase preQRT entre la $\Delta\Delta Ct$ de la expresión de MGMT de pacientes con invasión linfática ($1,40 \pm 1,12$ folds) y pacientes sin invasión linfática ($3,10 \pm 1,74$ folds) ($p=0,027$) (Figura 74).

Tabla 26. Asociaciones entre expresión de ARN de MGMT y variables clínicas.

Variables	Biopsias	Características	Normal			PreQRT			PostQRT		
			<2folds	≥2folds	p	<2folds	≥2folds	p	<2folds	≥2folds	p
Estadio tumoral (TNM)	preQRT	II	2 (22,2)	7 (77,8)	0,4	1 (11,1)	8 (88,9)	0,09	3 (33,3)	6 (66,7)	1
		III	6 (42,9)	8 (57,1)		7 (50)	7 (50)		6 (42,9)	8 (57,1)	
	postQRT	0-I	3 (27,3)	8 (72,7)	0,67	3 (27,3)	8 (72,7)	0,67	4 (36,4)	7 (63,6)	1
		II-III	5 (41,7)	7 (58,3)		5 (41,7)	7 (58,3)		5 (41,7)	7 (58,3)	
Respuesta tratamiento	pre-post QRT	Progresión/estable	2 (33,3)	4 (66,7)	1	3 (50)	3 (50)	0,62	3 (50)	3 (50)	0,64
		Parcial/completa	6 (35,3)	11 (64,7)		5 (29,4)	12 (70,6)		6 (35,3)	11 (64,7)	
Invasión nodos linfáticos (N)	preQRT	Si	6 (42,9)	8 (57,1)	0,4	7 (50)	7 (50)	0,09	6 (42,9)	8 (57,1)	1
		No	2 (22,2)	7 (77,8)		1 (11,1)	8 (88,9)		3 (33,3)	6 (66,7)	
	postQRT	Si	3 (37,5)	5 (62,5)	1	4 (50)	4 (50)	0,37	3 (37,5)	5 (62,5)	1
		No	5 (33,3)	10 (66,7)		4 (26,7)	11 (73,3)		6 (40)	9 (60)	
	pre-post QRT	Reducción	3 (42,9)	4 (57,1)	0,66	3 (42,9)	4 (57,1)	0,66	3 (42,9)	4 (57,1)	1
		Aumenta/ Estable	5 (31,3)	11 (68,8)		5 (31,3)	11 (68,8)		6 (37,5)	10 (62,5)	
Infiltración tumoral (T)	preQRT	T3	8 (36,4)	14 (63,6)	1	8 (36,4)	14 (63,6)	1	9 (40,9)	13 (59,1)	1
		T4	0 (0)	1 (100)		0 (0)	1 (100)		0 (0)	1 (100)	
	postQRT	T0-T1	1 (20)	4 (80)	0,62	1 (20)	4 (80)	0,62	2 (40)	3 (60)	1
		T2-T3	7 (38,9)	11 (61,1)		7 (38,9)	11 (61,1)		7 (38,9)	11 (61,1)	
	pre-post QRT	Reducción	4 (33,3)	8 (66,7)	1	3 (25)	9 (75)	0,4	5 (41,7)	7 (58,3)	1
		Estable	4 (36,4)	7 (63,6)		5 (45,5)	8 (54,5)		4 (36,4)	7 (63,6)	
GRT	pre-post QRT	GRT 1 o 2	3 (27,3)	8 (72,7)	0,67	4 (36,4)	7 (63,6)	1	6 (54,5)	5 (45,5)	0,21
		GRT 3, 4 o 5	5 (41,7)	7 (58,3)		4 (33,3)	8 (66,7)		3 (25,0)	9 (75,0)	

(*p<0,05; **p>0,001). p, valor p. Normal: tejido normal circundante.

Tabla 27. Asociaciones entre la evolución de la expresión del ARN de MGMT y variables clínicas.

Variables	Biopsias	Características	Normal-preQRT			Normal-postQ			Pre-postQRT		
			Estable	Aumenta	p	Estable	Aumenta	p	Estable	Aumenta	p
Estadio tumoral (TNM)	preQRT	II	8 (88,9)	1 (11,1)	1	8 (88,9)	1 (11,1)	1	8 (88,9)	1 (11,1)	0,61
		III	13 (92,9)	1 (7,1)		13 (92,9)	1 (7,1)		10 (71,4)	4 (28,6)	
	postQRT	0-I	10 (90,9)	1 (9,1)	1	10 (90,9)	1 (9,1)	1	9 (81,8)	2 (18,2)	1
		II-III	11 (91,7)	1 (8,3)		11 (91,7)	1 (8,3)		9 (75)	3 (21,7)	
Respuesta tratamiento	pre-post QRT	Progresión/estable	6 (100)	0 (0)	1	6 (100)	0 (0)	1	5 (83,3)	1 (16,7)	1
		Parcial/completa	15 (88,2)	2 (11,8)		15 (88,2)	2 (11,8)		13 (76,5)	4 (23,5)	
Invasión nodos linfáticos (N)	preQRT	Si	13 (92,2)	1 (7,1)	1	13 (92,2)	1 (7,1)	1	10 (71,4)	4 (28,6)	0,61
		No	8 (88,9)	1 (11,1)		8 (88,9)	1 (11,1)		8 (88,9)	1 (11,1)	
	postQRT	Si	7 (87,5)	1 (12,5)	1	8 (100)	0 (0)	0,53	6 (75)	2 (25)	1
		No	14 (93,3)	1 (6,7)		13 (86,7)	3 (13,3)		12 (80)	3 (21,7)	
	pre-post QRT	Reducción	7 (100)	0 (0)	1	6 (85,7)	1 (14,3)	0,53	5 (71,4)	2 (28,6)	0,62
		Aumenta/ Estable	14 (87,5)	2 (12,5)		15 (93,8)	1 (6,3)		13 (81,3)	3 (18,8)	
Infiltración tumoral (T)	preQRT	T3	20 (90,9)	2 (9,1)	1	20 (90,9)	2 (9,1)	1	17 (77,3)	5 (22,7)	1
		T4	1 (100)	0 (0)		1 (100)	0 (0)		1 (100)	0 (0)	
	postQRT	T0-T1	4 (80)	1 (20)	0,4	4 (80)	1 (20)	0,4	4 (80)	1 (20)	1
		T2-T3	17 (94,4)	1 (5,6)		17 (94,4)	1 (5,6)		14 (77,8)	4 (22,2)	
	pre-post QRT	Reducción	10 (83,3)	2 (16,7)	0,48	11 (91,7)	1 (8,3)	1	10 (83,3)	2 (16,7)	0,64
		Estable	11 (100)	0 (0)		10 (90,9)	1 (9,1)		8 (72,7)	3 (27,3)	
GRT	pre-post QRT	GRT 1 o 2	10 (90,9)	1 (9,1)	1	10 (90,9)	1 (9,1)	1	9 (81,8)	2 (18,2)	1
		GRT 3, 4 o 5	11 (91,7)	1 (8,3)		11 (91,7)	1 (8,3)		9 (75)	3 (25)	

(*p<0,05; **p>0,001). p, valor p. Normal: tejido normal circundante.

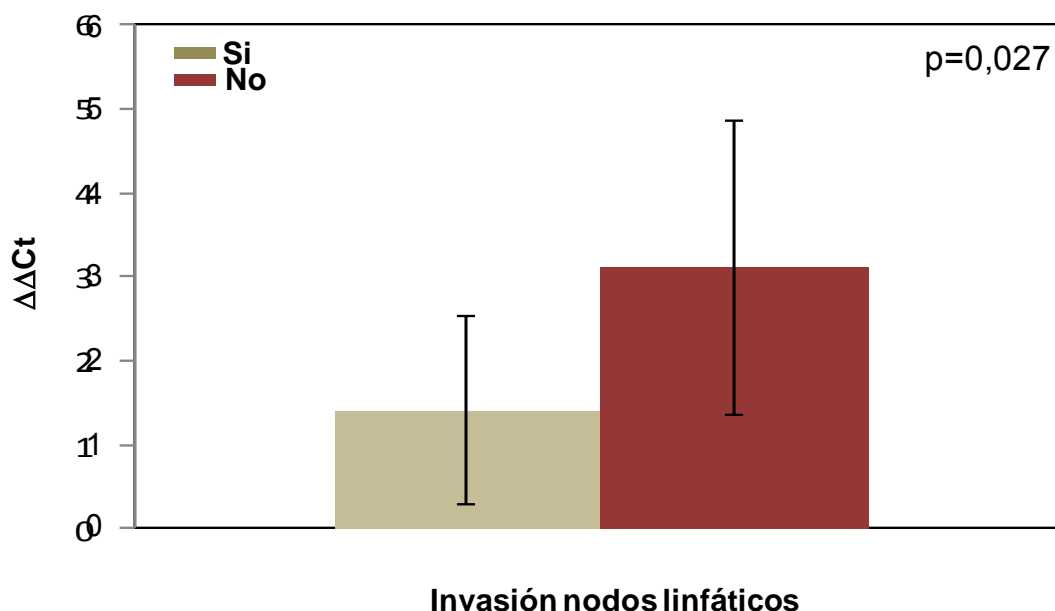


Figura 74. Diferencias de la $\Delta\Delta Ct$ de MGMT durante la fase antes del tratamiento (preQRT) entre pacientes con o sin invasión linfática durante la fase de pretratamiento (preQRT).

4.3.3. ANÁLISIS DEL % DE EXPRESIÓN DE MGMT MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA

4.3.3.1. % de expresión de MGMT en tejido en fase pretratamiento y fase postratamiento

El estudio del % de expresión de MGMT sólo se realizó en el tejido tumoral en la fase de pretratamiento y postratamiento.

En la fase pretratamiento, los resultados inmunohistoquímicos mostraron una expresión nula en el 7,7% (2/26) de los pacientes, de menos del 25% en el 23,1% (6/26), entre el 25 y 50% en el 26,9% (7/26), entre el 50 y 75% en el 19,2% (5/26) y de más del 75% en el 23,1% (6/26) de los pacientes. Tres pacientes no pudieron ser valorados. Para el estudio estadístico fueron agrupados en pacientes con <50% (57,7%, 15 pacientes) y \geq 50% (42,3%, 11 pacientes) de expresión (Tabla 28). Por otra parte, en las muestras

postratamiento observamos que el 66,7% (18/27) de los pacientes presentaban una expresión nula, el 11,1% (3/27) una expresión inferior al 25%, otros 11,1% (3/27) una expresión entre 25 y 50% y el restante 11,1% (3/27) una expresión entre el 50% y 75%. No se observaron pacientes con expresión entre en 75 y 100%. Para el estudio estadístico fueron agrupados en pacientes con <50% (88,9%, 24 pacientes) y \geq 50% (11,1%, 3 pacientes) de expresión (Tabla 28).

Variable	Biopsias	Clasificación: n (%)		
		\geq 50%	<50%	NV
Porcentaje de expresión de MGMT	PreQRT	11 (42,3)	15 (57,7)	3
	PostQRT	3 (11,1)	24 (88,9)	2

Tabla 28. Porcentaje de expresión de MGMT en biopsias pre y postQRT. NV, no valorable.

Al analizar las diferencias entre la fase de pretratamiento y postratamiento mediante las variables no dicotómicas se observó la tendencia significativa ($p=0,0001$) de reducción de la expresión entre biopsias observada en un 70,8% (17/24) de los pacientes. El 20,8% (5/24) de los pacientes no mostraron alteración de la expresión y se observó un aumento en tan sólo un 8,3% (2/24). Cinco pacientes no pudieron ser valorados. Cuando se aplicaron las variables dicotómicas a este tipo de análisis también se alcanzó el nivel de significación ($p=0,039$) (Tabla 29).

Variable	Biopsias	Evolución entre muestras: n (%)			NV	p valor
		Reducción	Estable	Aumento		
Porcentaje de expresión de MGMT	PreQRT-PostQRT	10 (41,7)	12 (50,0)	2 (8,3)	5	0,039

Tabla 29. Evolución de la expresión proteica de MGMT entre las distintas biopsias. NV, no valorable.

4.3.3.2. Comportamiento de la variable % de expresión de MGMT en relación a los datos clínicos

No se observó ninguna asociación significativa entre el % de expresión de MGMT o su evolución entre muestras y las variables clínicas como se puede apreciar en la Tabla 30. El único resultado a destacar fue la correlación entre el grado de regresión tumoral y el % de expresión de MGMT durante la fase de postratamiento ($p=0,0001$ y $p=0,628$) (Figura 75).

Tabla 30. Asociaciones entre la expresión proteica de MGMT, su evolución y variables clínicas.

Variables	Biopsias	Características	PreQRT			PostQRT			Pre-postQRT		
			<50%	≥50%	p	<50%	≥50%	p	Reduce	Aumenta /Estable	p
Estadio tumoral (TNM)	preQRT	II	5 (50)	5 (50)	0,689	9 (90)	1 (10)	1	5 (50)	5 (50)	0,678
		III	10 (62,5)	6 (37,5)		15 (88,2)	2 (11,8)		5 (35,7)	9 (64,3)	
	postQRT	0-I	7 (63,6)	4 (36,4)	0,701	8 (88,9)	1 (11,1)	1	4 (44,4)	5 (55,6)	1
		II-III	8 (53,3)	7 (46,7)		16 (88,9)	2 (11,1)		6 (40)	9 (60)	
Respuesta tratamiento	pre-post QRT	Progresión/estable	6 (75)	2 (25)	0,395	8 (88,9)	1 (11,1)	1	2 (25)	6 (75)	0,388
		Parcial/completa	9 (50)	9 (50)		16 (88,9)	2 (11,1)		8 (50)	8 (50)	
Invasión nodos linfáticos (N)	preQRT	Si	10 (62,5)	6 (37,5)	0,689	15 (88,2)	2 (11,8)	1	5 (35,7)	9 (64,3)	0,678
		No	5 (50)	5 (50)		9 (90)	1 (10)		5 (50)	5 (50)	
	postQRT	Si	6 (66,7)	3 (33,3)	0,683	10 (90,9)	1 (9,1)	1	3 (33,3)	6 (66,7)	0,678
		No	9 (52,9)	8 (47,1)		14 (87,5)	2 (12,5)		7 (46,7)	8 (53,3)	
	pre-post QRT	Reducción	4 (50)	4 (50)	0,683	7 (87,5)	1 (12,5)	1	3 (50)	3 (50)	0,665
		Aumenta/ Estable	11 (61,1)	7 (38,9)		17 (89,5)	2 (10,5)		7 (38,9)	11 (61,1)	
Infiltración tumoral (T)	preQRT	T3	15 (60)	10 (40)	0,423	23 (88,5)	3 (11,5)	1	9 (39,19)	14 (60,9)	0,417
		T4	0 (0)	1 (100)		1 (100)	0 (0)		1 (100)	0 (0)	
	postQRT	T0-T1	2 (40)	3 (60)	0,62	4 (100)	0 (0)	1	3 (75)	1 (25)	0,272
		T2-T3	13 (61,9)	8 (38,1)		20 (87,0)	3 (13,0)		7 (35)	13 (65)	
	pre-post QRT	Reducción	7 (58,3)	5 (41,7)	1	9 (90)	1 (10)	1	5 (50)	5 (50)	0,678
		Estable	8 (57,1)	6 (42,9)		15 (88,2)	2 (11,8)		5 (35,7)	9 (64,3)	
GRT	pre-post QRT	GRT 1 o 2	5 (50)	5 (50)	0,689	9 (100)	0 (0)	0,529	5 (62,5)	3 (37,5)	0,204
		GRT 3, 4 o 5	10 (62,5)	6 (37,5)		15 (83,3)	3 (16,7)		5 (31,3)	11 (68,8)	

(*p<0,05; **p>0,001). p, valor p. Normal: tejido normal circundante.

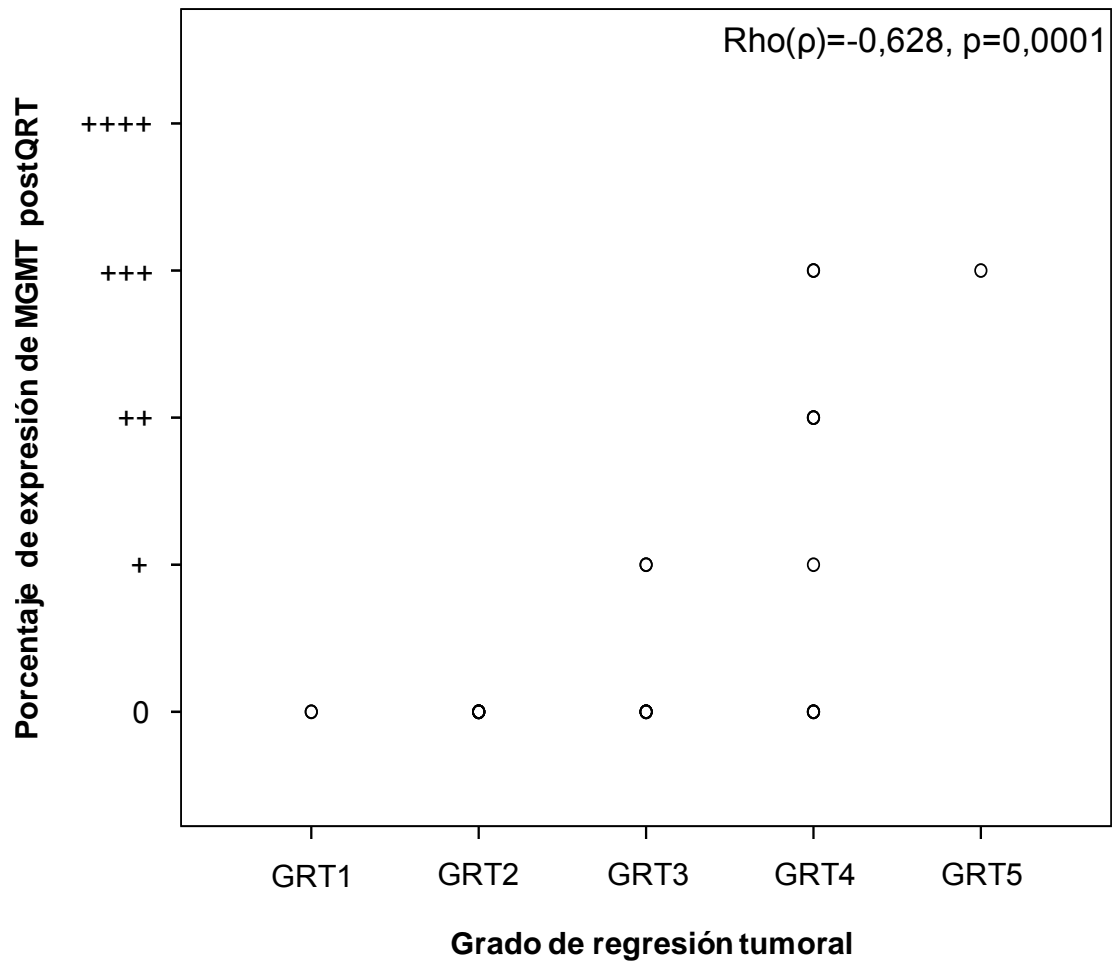


Figura 75. Correlación entre el grado de regresión tumoral y % de expresión de MGMT durante la fase de postratamiento. 0: 0%, +: entre el 1 y el 25%;++: entre el 25 y 50%, +++: entre el 50 y el 75% y ++++: más del 75%.

4.3.4. ANÁLISIS DE LA INTENSIDAD DE MARCAJE DE MGMT MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA

4.3.4.1. Intensidad de marcaje de MGMT en tejido tumoral en fase pretratamiento y fase postratamiento

Como en el caso anterior, el estudio de la intensidad de marcaje de MGMT se realizó sólo en el tejido tumoral en la fase de pretratamiento y en la fase de postratamiento. Los tejidos tumorales de la fase de pretratamiento mostraron un marcaje nulo en el 7,7% (2/26) de los pacientes, una intensidad débil en el 26,9% (7/26), moderada en el 30,8% (8/26), alta en el 11,5% (3/26) y muy alta en 23,1% (6/26) de los pacientes. No se pudieron valorar 3 pacientes.

Los datos en las muestras tumorales en la fase de postratamiento mostraron una intensidad de marcaje nula en el 33,3% (9/27) de los pacientes, débil en el 51,9% (14/27) y moderada en el 14,8% (4/27). Como en el % de expresión de MGMT, se transformó la intensidad de marcaje en una variable dicotómica agrupándolas en: alta intensidad (0, + y ++) y baja intensidad (++ y +++) para poder realizar el análisis de asociación (Tabla 31).

Variable	Biopsias	Clasificación: n (%)		
		Alta	Baja	NV
Intensidad de expresión de MGMT	PreQRT	9 (34,6)	17 (65,4)	3
	PostQRT	0 (00,0)	27 (100)	2

Tabla 31. Intensidad de marcaje de MGMT. NV, no valorable.

El análisis entre fases de pretratamiento y postratamiento demostró una tendencia de reducción de la intensidad significativa ($p < 0,0001$) entre ambas biopsias observando en un 70,8% (17/24) de los pacientes reducción y en el 29,2% (7/24) ausencia de cambios. Cinco pacientes no pudieron ser valorados. Resultados similares se observaron al considerar la variable dicotómica ($p = 0,004$) (Tabla 32)

Variable	Biopsias	Evolución entre muestras: n (%)			NV	p valor
		Reducción	Estable	Aumento		
Intensidad de expresión de MGMT	PreQRT-PostQRT	9 (37,5)	15 (62,5)	0 (0,0)	5	0,004**

Tabla 32. Evolución de la intensidad de expresión de MGMT entre las distintas fases. NV, no valorable.

4.3.4.2. Comportamiento de la variable intensidad de marcaje de MGMT en relación a los datos clínicos

No se pudieron apreciar asociaciones significativas entre la intensidad de marcaje de MGMT y las variables clínicas como muestra la Tabla 33.

Tabla 33. Asociaciones entre la intensidad de expresión proteica de MGMT y variables clínicas.

Variables	Biopsias	Características	PreQRT			PostQRT			Pre-postQRT		
			Baja	Alta	p	Baja	Alta	p	Reduce	Estable	p
Estadio tumoral (TNM)	preQRT	II	6 (60)	4 (40)	0,692	10 (100)	0 (0)	NV	4 (40)	6 (60)	1
		III	11 (68,8)	5 (31,3)		17 (100)	0 (0)		5 (35,7)	9 (64,3)	
	postQRT	0-I	8 (72,7)	3 (27,3)	0,683	9 (100)	0 (0)	NV	3 (33,3)	8 (66,7)	1
		II-III	9 (60)	6 (40)		18 (100)	0 (0)		6 (40)	9 (60)	
Respuesta tratamiento	pre-post QRT	Progresión/estable	5 (62,5)	3 (37,5)	1	9 (100)	0 (0)	NV	3 (37,5)	5 (62,5)	1
		Parcial/completa	12 (66,7)	6 (33,3)		18 (100)	0 (0)		6 (37,5)	10 (62,5)	
Invasión nodos linfáticos (N)	preQRT	Si	11 (68,8)	5 (31,3)	0,692	17 (100)	0 (0)	NV	5 (35,7)	9 (64,3)	1
		No	6 (60)	4 (40)		10 (100)	0 (0)		4 (40)	6 (60)	
	postQRT	Si	5 (55,6)	4 (44,4)	0,667	11 (100)	0 (0)	NV	4 (44,4)	5 (55,6)	0,678
		No	12 (70,6)	5 (29,4)		16 (100)	0 (0)		5 (33,3)	10 (66,7)	
	pre-post QRT	Reducción	6 (75)	2 (25)	0,667	8 (100)	0 (0)	NV	2 (33,3)	4 (66,7)	1
		Aumenta/ Estable	11 (61,1)	7 (38,9)		19 (100)	0 (0)		7 (38,9)	11 (61,1)	
Infiltración tumoral (T)	preQRT	T3	17 (68,0)	8 (32,0)	0,346	26 (100)	0 (0)	NV	8 (34,8)	15 (65,2)	0,375
		T4	0 (0)	1 (100)		1 (100)	0 (0)		1 (100)	0 (0)	
	postQRT	T0-T1	3 (60)	2 (40)	1	4 (100)	0 (0)	NV	2 (50)	2 (50)	0,615
		T2-T3	14 (66,7)	7 (33,3)		23 (100)	0 (0)		7 (35)	13 (65)	
	pre-post QRT	Reducción	8 (66,7)	4 (33,3)	1	10 (100)	0 (0)	NV	4 (40)	6 (60)	1
		Estable	9 (64,3)	5 (35,7)		17 (100)	0 (0)		5 (35,7)	9 (64,3)	
GRT	pre-post QRT	GRT 1 o 2	6 (60)	4 (40)	0,692	9 (100)	0 (0)	NV	4 (50)	4 (50)	0,412
		GRT 3, 4 o 5	11 (68,8)	5 (31,3)		18 (100)	0 (0)		5 (31,5)	11 (68,8)	

(*p<0,05; **p>0,001). p, valor p. Normal: tejido normal circundante. NV, no valorable.

4.3.5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE CD133 MEDIANTE qPCR

4.3.5.1 Expresión de CD133 en tejido normal y tumoral en fase pretratamiento y postratamiento

Todos los resultados obtenidos mediante qPCR se referenciaron a los datos obtenidos del *pool* de ARN control (ver Material y Métodos). La Tabla 34 resume los valores de expresión de CD133 respecto al *pool* de tejido normal pudiendo observar que mostraron una expresión por encima de 2 *folds* en el 26,1% (6/23) de las muestras de tejido normal, en el 56,5% (13/23) de las muestras de tejido tumoral pretratamiento y por último, en el 68,2% (15/22) de las muestras de tejido tumoral postratamiento (Tabla 34).

Variable	Biopsias	Clasificación: n (%)		
		<2 folds	≥2 folds	NV
Expresión de CD133 ARN	Normal	17 (73,9)	6 (26,1)	6
	PreQRT	10 (43,5)	13 (56,5)	6
	PostQRT	7 (31,8)	15 (68,2)	7

Tabla 34. Expresión de ARNm del gen CD133 en las biopsias. Se observó una $\Delta\Delta Ct$ respecto al *pool* de tejido normal de $0,93\pm 0,61$ *folds* en tejido normal, una $\Delta\Delta Ct$ de $2,21\pm 3,76$ *folds* en tejido tumoral pretratamiento y una $\Delta\Delta Ct$ de $2,43\pm 3,61$ *folds* en tejido tumoral postratamiento.

Desde un punto de vista descriptivo, al analizar los cambios entre biopsias (punto de corte ± 1 *fold*), observamos que un 69,6% (16/23) de los pacientes en la fase pretratamiento se mantuvo estable la expresión de CD133 en relación al tejido normal y tan sólo en el 30,4% (7/23) aumentó. Cuando se compararon muestras pre con postratamiento, el 87% (20/23) de pacientes mostró estabilidad en la expresión y tan sólo en un 13% (3/23) un aumento de expresión. Finalmente, tomando como referencia el tejido tumoral pretratamiento, un 77,3% (17/22) de los pacientes mantuvo la expresión de

CD133 y un 22,7% (5/22) la aumentó. Ningún paciente presentó reducción de la expresión. De este modo, no se apreció una tendencia significativa en la evolución de la expresión de CD133 entre el tejido tumoral y el tejido normal ni entre pretratamiento y postratamiento (Tabla 35).

Variable	Biopsias	Evolución entre muestras: n (%)			NV	p valor
		Reducción	Estable	Aumento		
Expresión de ARNm de CD133	Normal-PreQRT	0 (0,0)	16 (69,6)	7 (30,4)	6	0,246
	Normal-PostQRT	0 (0,0)	20 (87,0)	3 (13,0)	6	0,309
	PreQRT-PostQRT	0 (0,0)	17 (77,3)	5 (22,7)	7	0,616

Tabla 35. Evolución de la expresión de ARNm de CD133 entre las distintas fases. NV, no valorable

4.3.5.2. Comportamiento de la variable expresión de CD133 en relación a los datos clínicos

No se observaron asociaciones estadísticamente significativas entre los niveles de expresión de ARN de CD133, ni la evolución de su expresión con las distintas variables clínicas analizadas (Tabla 36 y 37).

Tabla 36. Asociación entre expresión de ARN de CD133 y las variables clínicas.

Variables	Biopsias	Características	Normal			PreQRT			PostQRT		
			<2folds	≥2folds	p	<2folds	≥2folds	p	<2folds	≥2folds	p
Estadio tumoral (TNM)	preQRT	II	1 (50)	1 (50)	0,643	1 (50)	1 (50)	1	1 (50)	1 (50)	1
		III	6 (66,7)	3 (33,3)		5 (55,6)	4 (44,4)		5 (62,5)	3 (37,5)	
	postQRT	0-I	11 (78,6)	3 (21,4)	0,371	8 (57,1)	6 (42,9)	1	10 (71,4)	4 (28,6)	1
		II-III	7 (63,6)	4 (36,4)		6 (54,5)	5 (45,5)		7 (70)	3 (30)	
Respuesta tratamiento	pre-post QRT	Progresión/estable	10 (83,3)	2 (16,7)	1	7 (58,3)	5 (41,7)	0,66	8 (66,7)	4 (33,3)	0,334
		Parcial/completa	5 (83,3)	1 (16,7)		4 (66,7)	2 (33,3)		3 (50)	3 (50)	
Invasión nodos linfáticos (N)	preQRT	Si	12 (70,6)	5 (29,4)	0,643	9 (52,9)	8 (47,1)	1	12 (75)	4 (25)	1
		No	11 (78,6)	3 (21,4)		8 (57,1)	6 (42,9)		10 (71,4)	4 (28,6)	
	postQRT	Si	6 (66,7)	3 (33,3)	1	5 (55,6)	4 (44,4)	0,221	5 (62,5)	3 (37,5)	0,343
		No	6 (75)	2 (25)		3 (37,5)	5 (62,5)		4 (50)	4 (50)	
	pre-post QRT	Reducción	11 (73,3)	4 (26,7)	1	10 (66,7)	5 (33,3)	0,405	11 (78,6)	3 (21,4)	0,35
		Aumenta/ Estable	5 (71,4)	2 (28,6)		5 (71,4)	2 (28,6)		6 (85,7)	1 (14,3)	
Infiltración tumoral (T)	preQRT	T3	12 (75)	4 (25)	1	8 (50)	8 (50)	1	9 (60)	6 (40)	1
		T4	16 (72,7)	6 (27,3)		12 (54,5)	10 (45,5)		14 (66,7)	7 (33,3)	
	postQRT	T0-T1	1 (100)	0 (0)	1	1 (100)	0 (0)	0,618	1 (100)	0 (0)	1
		T2-T3	4 (80)	1 (20)		2 (40)	3 (60)		3 (75)	1 (25)	
	pre-post QRT	Reducción	13 (72,2)	5 (27,8)	0,643	11 (61,1)	7 (38,9)	0,68	12 (66,7)	6 (33,3)	1
		Estable	8 (66,7)	4 (33,3)		6 (50)	6 (50)		8 (72,7)	3 (27,3)	
GRT	pre-post QRT	GRT 1 o 2	9 (81,8)	2 (18,2)	1	7 (63,6)	4 (36,4)	0,68	7 (63,6)	4 (36,4)	0,381
		GRT 3, 4 o 5	8 (72,7)	3 (27,3)		7 (63,6)	4 (36,4)		8 (80)	2 (20)	

(*p<0,05; **p>0,001).

Tabla 37. Asociación entre progresión de la expresión de ARN de CD133 y las variables clínicas.

Variables	Biopsias	Características	Normal-preQRT			Normal-postQ			Pre-postQRT		
			Estable	Aumenta	p	Estable	Aumenta	p	Estable	Aumenta	p
Estadio tumoral (TNM)	preQRT	II	7 (77,8)	2 (22,2)	0,657	7 (87,5)	1 (12,5)	1	6 (75)	2 (25)	1
		III	9 (64,3)	5 (35,7)		13 (86,7)	2 (13,3)		11 (78,6)	3 (21,4)	
	postQRT	0-I	9 (81,8)	2 (18,2)	0,371	9 (90)	1 (10)	1	8 (80)	2 (20)	1
		II-III	7 (58,3)	5 (41,7)		11 (84,6)	2 (15,4)		9 (75)	3(25)	
Respuesta tratamiento	pre-post QRT	Progresión/estable	4 (66,7)	2 (33,3)	1	6 (85,7)	1 (14,3)	1	4 (66,7)	2 (33,3)	0,585
		Parcial/completa	12 (70,6)	5 (29,4)		14 (87,5)	2 (12,5)		13 (81,3)	3 (18,8)	
Invasión nodos linfáticos (N)	preQRT	Si	9 (64,3)	5 (36,7)	0,657	13 (86,7)	2 (13,3)	1	11 (78,6)	3 (21,4)	1
		No	7 (77,8)	2 (22,2)		7 (87,5)	1 (12,5)		6 (75,0)	2 (25)	
	postQRT	Si	4 (50)	4 (50)	0,182	8 (88,9)	1 (11,1)	1	6 (75)	2 (25)	1
		No	12 (80)	3 (20)		12 (85,7)	2 (14,3)		11 (78,6)	3 (21,4)	
	pre-post QRT	Reducción	6 (85,7)	1 (14,3)	0,366	6 (85,7)	1 (14,3)	1	6 (85,7)	1 (14,3)	1
		Aumenta/ Estable	10 (62,5)	6 (37,5)		14 (87,5)	2 (12,5)		11 (73,3)	4 (28,7)	
Infiltración tumoral (T)	preQRT	T3	15 (68,2)	7 (31,8)	1	19 (86,4)	3 (13,6)	1	16 (76,2)	5 (23,8)	1
		T4	1 (100)	0 (0)		1 (100)	0 (0)		1 (100)	0 (0)	
	postQRT	T0-T1	3 (60)	2 (40)	0,621	3 (75)	1 (25)	0,453	3 (75)	1 (25)	1
		T2-T3	13 (72,2)	5 (27,8)		17 (89,5)	2 (10,5)		14 (77,8)	4 (22,2)	
pre-post QRT	Reducción	9 (75)	3 (25)	0,667	10 (90,9)	1 (9,1)	1	9 (81,8)	2 (18,2)	1	
	Estable	7 (63,6)	4 (36,4)		10 (83,3)	2 (16,7)		8 (72,7)	3 (27,3)		
GRT	pre-post QRT	GRT 1 o 2	8 (72,7)	3 (27,3)	1	9 (90)	1 (10)	1	8 (80)	2 (20)	1
		GRT 3, 4 o 5	8 (66,7)	4 (33,3)		11 (84,6)	2 (15,4)		9 (75)	3 (25)	

(*p<0,05; **p>0,001).

4.3.6. ANÁLISIS DEL % DE EXPRESIÓN DE CD133 MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA

4.3.6.1 % de expresión de CD133 en tejido en fase pretratamiento y fase postratamiento

Como en el caso de MGMT, el estudio del % de expresión de CD133 sólo se realizó en el tejido tumoral en la fase de pretratamiento y en la fase de postratamiento (Tabla 38). Pudimos observar que de las muestras de la fase pretratamiento, el 85,2% (23/27) presentaban una expresión $\geq 5\%$ y sólo el 14,8% (4/27) presentaron $< 5\%$ de expresión. No se pudo valorar en 2 pacientes. El análisis de las muestras de la fase postratamiento, mostró que el 27,6% (8/29) presentaban $< 5\%$ de expresión, y el 72,4% (21/29) una expresión de $\geq 5\%$.

Variable	Biopsias	Clasificación: n (%)		
		$\geq 5\%$	$< 5\%$	NV
Porcentaje de expresión de CD133	PreQRT	23 (85,2)	4 (14,8)	2
	PostQRT	21 (72,4)	8 (27,6)	0

Tabla 38. Porcentaje de expresión de CD133 en las biopsias antes y después del tratamiento. NV, no valorable.

El análisis estadístico demostró la ausencia de diferencias significativas entre las muestras obtenidas durante la fase pre y postratamiento produciéndose una reducción de la expresión en el 27,6% (8/27), la ausencia de alteración en el 55,2% (16/27) y un aumento de la expresión en un 10,3% (3/27) de los pacientes (Tabla 39).

Variable	Biopsias	Evolución entre muestras: n (%)			NV	p valor
		Reducción	Estable	Aumento		
Porcentaje de expresión de CD133	Pre-PostQRT	8 (27,6)	16 (55,2)	3 (10,3)	2	1

Tabla 39. Diferencias del % de expresión de CD133 desde la fase de pretratamiento a la de postratamiento. NV, no valorable.

4.3.6.2. Comportamiento de la variable % de expresión de CD133 en relación a los datos clínicos

Se pudo apreciar una asociación estadísticamente significativa entre el porcentaje de expresión de CD133 y las variables clínicas como muestra la Tabla 40. De este modo, el porcentaje de expresión durante la fase previa al tratamiento se asoció significativamente a la evolución de N ($p < 0,05$). Por otra parte, el porcentaje de expresión en la biopsia postratamiento se asoció al estadio tumoral después del tratamiento (TNM postQRT), a la infiltración tumoral después del tratamiento (T postQRT), a los cambios en la infiltración tumoral (evolución de T) y al GRT ($p < 0,01$). Finalmente, la progresión del porcentaje de expresión entre muestras se asoció al estadio tumoral después del tratamiento (TNM postQRT), la evolución frente al tratamiento de la infiltración tumoral entre las biopsias y el GRT ($p < 0,05$).

Tabla 40. Asociación entre la expresión proteica de CD133 y las variables clínicas

Variables	Biopsias	Características	PreQRT			PostQRT			Pre-postQRT		
			<5%	≥5%	p	<5%	≥5%	p	Reduce	Aumenta/estable	p
Estadio tumoral (TNM)	preQRT	II	0 (0)	9 (100)	0,268	5 (50)	5 (50)	0,083	5 (55,6)	4 (44,4)	0,072
		III	4 (22,2)	14 (77,8)		3 (15,8)	16 (84,2)		3 (16,7)	15 (83,3)	
	postQRT	0-I	1 (10)	9 (90)	1	7 (63,6)	4 (36,4)	0,001**	6 (60)	4 (40)	0,025*
		II-III	3 (17,6)	14 (82,4)		1 (5,6)	17 (94,4)		2 (11,8)	15 (88,2)	
Respuesta tratamiento	pre-post QRT	Progresión/estable	0 (0)	8 (100)	0,285	1 (11,1)	8 (88,9)	0,371	2 (25)	6 (75)	1
		Parcial/completa	4 (21,1)	15 (78,9)		7 (35)	13 (65)		6 (31,6)	13 (68,4)	
Invasión nodos linfáticos (N)	preQRT	Si	4 (22,2)	14 (77,8)	0,268	3 (15,8)	16 (84,2)	0,083	3 (16,7)	15 (83,3)	0,072
		No	0 (0)	9 (100)		5 (50)	5 (50)		5 (55,6)	4 (44,4)	
	postQRT	Si	0 (0)	10 (100)	0,264	1 (9,1)	10 (90,9)	0,11	2 (20)	8 (80)	0,666
		No	4 (23,4)	13 (76,5)		7 (38,9)	11 (61,1)		6 (35,3)	11 (64,7)	
	pre-post QRT	Reducción	4 (40)	6 (60)	0,012*	2 (20)	8 (80)	0,675	1 (10)	9 (90)	0,19
		Aumenta/ Estable	0 (0)	17 (100)		6 (31,6)	13 (68,4)		7 (41,2)	10 (58,8)	
Infiltración tumoral (T)	preQRT	T3	4 (15,4)	22 (84,6)	1	7 (25)	21 (75)	0,276	7 (26,9)	19 (73,1)	0,296
		T4	0 (0)	1(100)		1 (100)	0 (0)		1 (100)	0 (0)	
	postQRT	T0-T1	1 (20)	4 (80)	1	4 (80)	1 (20)	0,013*	3 (60)	2 (40)	0,136
		T2-T3	3 (13,6)	19 (86,4)		4 (16,7)	20 (83,3)		5 (22,7)	17 (77,3)	
	pre-post QRT	Reducción	1 (9,1)	10 (90,9)	0,624	7 (58,3)	5 (41,7)	0,003**	6 (54,5)	5 (45,5)	0,033*
		Estable	3 (18,8)	13 (81,3)		1 (5,9)	16 (94,1)		2 (12,5)	14 (87,5)	
GRT	pre-post QRT	GRT 1 o 2	1 (10)	9 (90)	1	7 (63,6)	4 (36,4)	0,001**	6 (60)	4 (40)	0,025*
		GRT 3. 4 o 5	3 (16,7)	14 (82,4)		1 (5,6)	17 (94,4)		2 (11,8)	15 (88,2)	

(*p<0,05, **p>0,001).

4.3.7. ANÁLISIS DE LA INTENSIDAD DE MARCAJE DE CD133 MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA

4.3.7.1. Intensidad de marcaje de CD133 en tejido en fase pretratamiento y fase postratamiento

La intensidad de marcaje se determinó en tejido tumoral en la fase de pretratamiento y postratamiento al igual que el % de expresión de CD133 (Tabla 41).

En la fase de pretratamiento, el 77,8% (21/27) de los pacientes presentaron una intensidad alta y el 22,2% (6/27) una intensidad baja mientras que en la fase de postratamiento, el 65,5% (19/29) mostraron una intensidad alta y el 34,5% (10/29) baja.

Variable	Biopsias	Clasificación: n (%)		
		Alta	Baja	NV
Intensidad de expresión de CD133	PreQRT	21 (77,8)	6 (22,2)	2
	PostQRT	19 (65,5)	10 (34,5)	0

Tabla 41. Intensidad de CD133 en las distintas biopsias. NV, no valorable.

Al analizar la evolución de marcaje entre las dos biopsias, no se observaron diferencias significativas detectándose en 25,9% (7/27) una reducción de la intensidad, en un 63,0% (17/27) mantenimiento estable y en un 11,1% (3/27) aumentó (Tabla 42).

Variable	Biopsias	Evolución entre muestras: n (%)			NV	p valor
		Reducción	Estable	Aumento		
Intensidad de expresión de CD133	PreQRT-PostQRT	7 (25,9)	17 (63,0)	3 (11,1)	2	0,344

Tabla 42. Evolución de la intensidad de marcaje de CD133 desde la fase de pretratamiento a la de postratamiento.

4.3.7.2. Comportamiento de la variable intensidad de marcaje de CD133 en relación a los datos clínicos

La intensidad de expresión de CD133 durante la fase de pretratamiento se encontró asociada a los cambios en la invasión de los nodos linfáticos (evolución de N) ($p < 0.05$). Por otra parte, la intensidad de expresión de CD133 durante la fase de postratamiento estuvo asociada al estadio tumoral después del tratamiento (TNM postQRT), al nivel de infiltración tumoral después del tratamiento (T postQRT), a los cambios en la infiltración tumoral (evolución de T) y al GRT ($p < 0.05$). Del mismo modo, la progresión entre las dos biopsias se asoció al estadio tumoral antes y después del tratamiento (TNM postQRT y preQRT), a la invasión de los nodos linfáticos antes del tratamiento (N preQRT), a los cambios en la infiltración tumoral (evolución de T) y al GRT ($p < 0,05$). (Tabla 43).

La correlación más significativa fue entre la evolución de la intensidad entre las biopsias (reducción, estable y aumento) y la T postQRT (T0, T1, T2, T3) ($p = 0,007$, $\rho = 0,505$).

Tabla 43. Asociación entre intensidad proteica de CD133 y las variables clínicas.

Variables	Biopsias	Características	PreQRT			PostQRT			Pre-postQRT		
			Baja	Alta	p	Baja	Alta	p	Reduce	Aumenta/estable	p
Estadio tumoral (TNM)	preQRT	II	0 (0)	9 (100)	0,071	5 (50)	5 (50)	0,244	5 (55,6)	4 (44,4)	0,023*
		III	6 (33,3)	12 (66,7)		5 (26,3)	14 (73,7)		2 (11,1)	16 (88,9)	
	postQRT	0-I	2 (20)	8 (80)	1	7 (63,6)	4 (36,4)	0,017*	6 (60)	4 (40)	0,004**
		II-III	4 (23,5)	13 (76,5)		3 (16,7)	15 (83,3)		1 (5,9)	16 (94,1)	
Respuesta tratamiento	pre-post QRT	Progresión/estable	1 (12,5)	7 (87,5)	0,633	1 (11,1)	8 (88,9)	0,107	0 (0)	8 (100)	0,068
		Parcial/completa	5 (26,3)	14 (73,7)		9 (45)	11 (55)		7 (36,8)	12 (63,2)	
Invasión nodos linfáticos (N)	preQRT	Si	6 (33,3)	12 (66,7)	0,071	5 (26,3)	14 (73,7)	0,244	2 (11,1)	16 (88,9)	0,023*
		No	0 (0)	9 (100)		5 (50)	5 (50)		5 (55,6)	4 (44,4)	
	postQRT	Si	1 (10)	9 (90)	0,363	2 (18,2)	9 (81,8)	0,234	1 (10)	9 (90)	0,204
		No	5 (29,4)	12 (70,6)		8 (44,4)	10 (55,6)		6 (35,3)	11 (64,7)	
	pre-post QRT	Reducción	5 (50)	5 (50)	0,015*	3 (30)	7 (70)	1	1 (10)	9 (90)	0,204
		Aumenta/ Estable	1 (5,9)	16 (94,1)		7 (36,8)	12 (63,2)		6 (35,3)	11 (64,7)	
Infiltración tumoral (T)	preQRT	T3	6 (23,1)	20 (76,9)	1	9 (32,1)	19 (67,9)	0,345	6 (23,1)	20 (76,9)	0,259
		T4	0 (0)	1 (100)		1 (100)	0 (0)		1 (100)	0 (0)	
	postQRT	T0-T1	2 (40)	3 (60)	0,303	4 (80)	1 (20)	0,036*	3 (60)	2 (40)	0,091
		T2-T3	4 (18,2)	18 (81,8)		6 (25)	18 (75)		4 (18,2)	18 (81,8)	
	pre-post QRT	Reducción	2 (18,2)	9 (81,8)	1	8 (66,7)	4 (33,3)	0,005**	7 (63,6)	4 (36,4)	0,0001**
		Estable	4 (25)	12 (75)		2 (11,8)	15 (88,2)		0 (0)	16 (100)	
GRT	pre-post QRT	GRT 1 o 2	2 (20)	8 (80)	1	7 (63,6)	4 (36,4)	0,017*	6 (60)	4 (40)	0,004*
		GRT 3. 4 o 5	4 (23,5)	13 (76,5)		3 (16,5)	15 (83,3)		1 (5,9)	16 (94,1)	

(*p<0,05; **p>0,001)

4.3.8. CORRELACIÓN ENTRE MGMT Y CD133

Finalmente, se realizó el estudio de correlación entre la expresión de ARN entre ambos biomarcadores y no se observó ninguna correlación entre los valores de $\Delta\Delta Ct$ de MGMT y CD133. Los resultados estadísticamente significativos del estudio de asociación entre ambos biomarcadores vienen resumidos en la Tabla 44.

Por otra parte, al analizar dentro de un mismo biomarcador las distintas variables, se pudo observar que únicamente se asociaban la intensidad y el porcentaje de expresión dentro de un mismo marcador en MGMT y CD133. Podemos destacar que no observamos asociación entre el estado de metilación y la expresión o intensidad proteica, ni entre la expresión o intensidad proteica y expresión de ARNm, ni entre la expresión de ARNm y el estado de metilación dentro de una misma muestra.

		MGMT			CD133		p
Variables	Biopsia	Características			Biopsia	Variables	
Metilación	PreQRT	UM	UM	M	PostQRT	Metilación	0,034*
		M	2 (66,7)	1 (33,3)			
$\Delta\Delta Ct$	PreQRT	<2folds	<2folds	$\geq 2folds$	PostQRT	$\Delta\Delta Ct$	0,023*
		$\geq 2folds$	6 (75,0)	2 (25,0)			
% expresión	PreQRT	<50%	Bajo	Alto	PreQRT	Intensidad de expresión	0,001*
		$\geq 50\%$	14 (93,3)	1 (6,7)			
			3 (27,3)	4 (72,7)			

Tabla 44. Asociaciones significativas entre MGMT y CD133, entre las distintas variables y biopsias. (* $p < 0,05$; ** $p > 0,001$).

5. DISCUSIÓN

Las estrategias para el tratamiento del CCR precisan de nuevos biomarcadores que sean capaces de diagnosticar la enfermedad en etapas tempranas, de identificar los pacientes que mejor respondan a un tipo de tratamiento y de pronosticar su evolución, lo que nos conducirá hacia una medicina más personalizada en esta patología. Sin embargo, en la actualidad no disponemos de ninguna biomolécula con estas características por lo que es muy difícil la selección de pacientes para ser incluidos en nuevos protocolos de tratamiento más específicos. Es por tanto esencial validar nuevos marcadores que nos ayuden, no sólo a diagnosticar, sino a determinar el pronóstico y respuesta al tratamiento de los pacientes con CCR.

En este contexto, las moléculas MGMT y CD133, están siendo estudiadas con gran interés en CCR por su posible relación con la evolución clínica de los pacientes bajo tratamiento. La relevancia de MGMT en la tumorigénesis colorrectal es muy compleja y no está bien caracterizada todavía. Mientras que en tejido normal MGMT aparece normalmente no metilado [221], algunos autores han encontrado alteraciones en la metilación de MGMT en criptas aberrantes. Estas criptas se han postulado como precursoras del CCR sugiriendo que MGMT podría intervenir en fases tempranas del inicio del tumor [222]. Según esta hipótesis, MGMT podría ser un candidato a biomarcador diagnóstico para CCR. Por otra parte, CD133 ha sido postulado como un marcador de CSC en diferentes cánceres, incluyendo CCR, aunque son muy pocos los datos que se tienen en cuanto a su expresión en este tipo de tumor en los distintos estadios de la enfermedad. Se sabe que CD133 está presente en pólipos intestinales hiperplásicos [223] y en estudios recientes, se ha observado que puede estar expresado hasta en la mitad de los CCRs [224]. Sin embargo, su valor como biomarcador pronóstico y de respuesta al tratamiento está por establecer.

La búsqueda de nuevos biomarcadores para CCR ha llevado a realizar un análisis en profundidad de los distintos elementos relacionados con las

moléculas MGMT y CD133. En primer lugar, se realizaron estudios en líneas celulares de CCR que nos permitieron, no sólo poner a punto distintas técnicas, sino además realizar una aproximación a los distintos objetivos del estudio. Una vez obtenidos los resultados *in vitro*, desarrollamos dos estudios *in vivo*: uno en pacientes afectos de CCR de los que se obtuvo muestra antes del tratamiento y otro en pacientes con cáncer rectal de los cuales se obtuvieron biopsias antes y después del tratamiento.

Modulación de MGMT y CD133 en cultivos celulares de líneas derivadas de CCR

Los cultivos celulares fueron utilizados para determinar el estado de metilación y/o expresión de los biomarcadores analizados y su modulación frente al tratamiento con 5-FU. En relación a MGMT, nuestros resultados demostraron que la única línea celular con el promotor de MGMT hipermetilado (M) (CCD18co) presentó niveles de expresión de ARN más bajos que las líneas celulares con el promotor no metilado (UM), como RKO y HT29, en donde dicha expresión fue más elevada. Por otra parte, las líneas con el promotor parcialmente metilado presentaban una expresión intermedia (HCT116, SW480, HCT15) o más alta (T84). Estos resultados apoyan la ya descrita relación entre la reducción de expresión del ARNm y la metilación del promotor de MGMT [166] pero también nos sugiere un proceso de regulación más complejo, en primer lugar, porque algunas líneas celulares no cumplen esta relación y en segundo lugar, porque en la línea CCD18co existía expresión de MGMT a pesar de estar completamente metilado su promotor. En base a estos resultados, incluimos en los estudios clínicos el análisis de estado de metilación de MGMT como un factor independiente a la expresión de ARN o proteína, con resultados que comentaremos con posterioridad. Los estudios *in vitro* en relación al marcador CD133, demostraron la no existencia de correlación entre el estado de metilación de su promotor y la expresión de ARNm. Sólo una línea celular apareció hipermetilada para este promotor, encontrándose parcialmente metiladas el resto. Esto nos llevó a no analizar el estado de metilación del promotor de CD133 en pacientes.

El estudio *in vitro* de la modulación de los biomarcadores por la exposición continua de 5-FU determinó que la expresión de ARNm de MGMT no se modificó significativamente, lo que coincide con estudios previos [193]. Sin embargo, en el análisis de la expresión de ARNm de CD133 observamos que las líneas con bajos niveles de CD133 (RKO y SW480) aumentaron de forma dosis-dependiente los niveles de expresión del CD133, mientras que las líneas con altos niveles basales de CD133 (HCT116, HT29, HCT15) no mostraron cambios significativos. Estudios previos han demostrado que la población CD133+ prolifera más que las CD133- bajo tratamiento con 5-FU enriqueciendo las CSC en líneas celulares de CCR (DLD1) [225], hepatoma (BEL-7402) [226] y adenocarcinoma de pulmón [227]. Esto concuerda con lo observado en las líneas RKO y SW480. Sin embargo el proceso debe ser más complejo ya que en poblaciones con altos niveles de CD133 no se modifica la expresión (HCT116, HT29, HCT15).

Con el fin de trabajar sobre una población enriquecida en CSC y analizarla en profundidad, se testaron varios medios de cultivo hasta obtener el que proporcionaba las condiciones óptimas para su selección (ver material y métodos). Utilizando estas condiciones de cultivo, pudimos demostrar que las poblaciones aisladas de CSC adquirían el fenotipo esferoide (propio de este tipo celular), presentaban altos niveles de CD133 e incrementaban su IC_{50} frente a 5-FU entre 64 veces, como en RKO y 2048 veces, como en SW480, siempre respecto a la población no enriquecida. Además, en ambas líneas enriquecidas pudimos demostrar una sobreexpresión de uno de los principales mecanismos de reparación del ADN como es MGMT y la ausencia de bloqueo en G1/S al tratarlas con 5-FU, lo que corroboraba la ausencia del efecto del fármaco. Por último, también pudimos apreciar una menor tasa de proliferación de las poblaciones enriquecidas en CSC, que coincide con el estado de latencia o quiescencia y por tanto baja proliferación y metabolismo descrito en CSC por otros autores [228,229]. Esta latencia puede estar asociada a un mecanismo de autopreservación parecido al que ocurre en las células madre en tejido sano, para evitar que se acumulen errores que se puedan transferir a las células al diferenciarse [230].

Estos resultados apoyan la hipótesis de que la quimiorresistencia es un fenómeno íntimamente asociado a las CSC [177,178,231,232] y que uno de sus mecanismos podría ser MGMT. De hecho, esta enzima ya ha sido relacionada con la resistencia a fármacos alquilantes en las CSC de glioma y glioblastoma [24,178] en donde se conoce su mecanismo de acción y su actividad. Sin embargo, sigue siendo incierta su importancia e incidencia en el tratamiento del CCR mediante 5-FU. El desarrollo de modelos de CSC con características como la sobreexpresión de CD133, sobreexpresión de MGMT, baja tasa de proliferación y presencia de quimiorresistencia (Figura 76), podría ayudar a encontrar nuevos marcadores diagnósticos, pronósticos y terapéuticos específicos para las CSC en CCR con importantes implicaciones a nivel clínico.

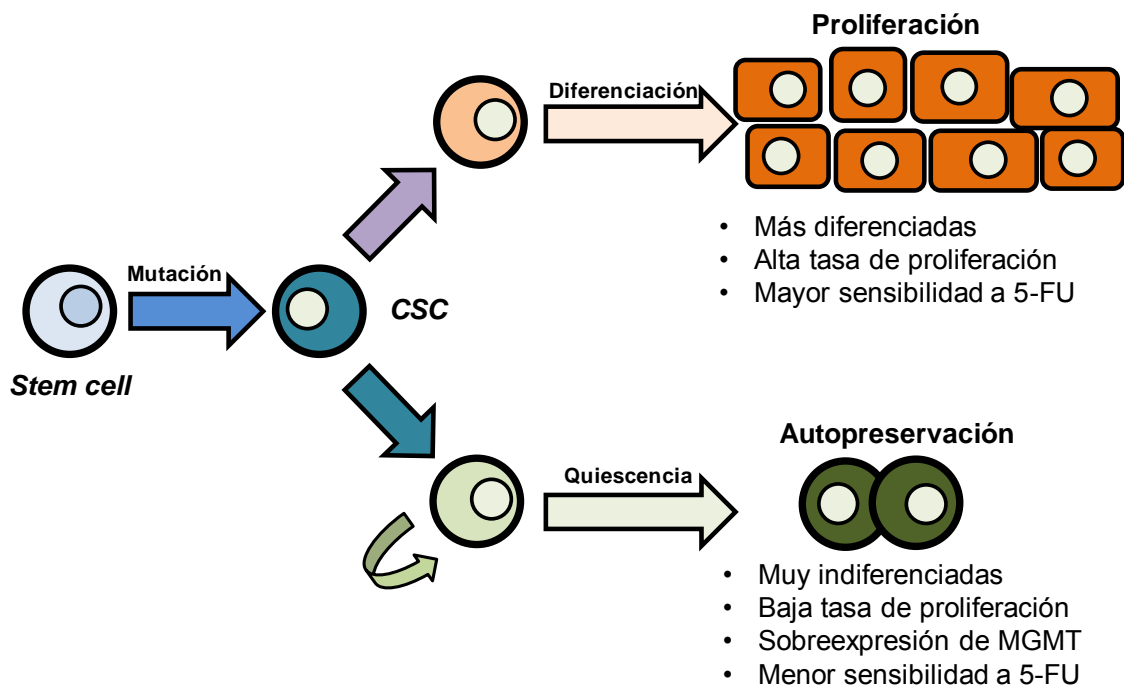


Figura 76. Modelo explicativo de la resistencia de las CSC. Gracias a las propiedades compartidas con las *stem cell*, las CSC pueden entrar en diferentes programas genéticos dependiendo del microambiente tumoral. Si el microambiente es favorable y presenta las señales adecuadas pueden diferenciarse y dar lugar a diferentes tipos celulares los cuales tienen una alta tasa de proliferación. En el caso opuesto, en circunstancias adversas, pueden mantenerse en estado de latencia o quiescencia para autopreservarse. Esta población muy indiferenciada, constituye propiamente las CSC y presentan marcadores de resistencia como MGMT, transportadores tipo ABC y otros mecanismos de conservación.

MGMT como biomarcador en CCR

La relevancia de MGMT en la carcinogénesis de CCR ha sido ampliamente analizada los últimos años. Estudios previos han detectado un aumento de la expresión de MGMT en el tejido tumoral en relación al normal [233]. A pesar de que el estado de metilación del promotor de MGMT juega un papel muy relevante en la expresión de esta enzima, el mecanismo por el cual se regula esta expresión sigue siendo controvertido. *Lee y cols.* [29] apreciaron que la metilación de varios genes, incluyendo MGMT, en etapas precancerosas como el adenoma estaba implicado en la progresión de la enfermedad y favorecía el avance hacia carcinoma [29,234]. De hecho, estudios previos que afrontan la importancia diagnóstica y pronóstica de MGMT, describen que el estado de metilación del promotor MGMT es un marcador útil para detectar las primeras etapas de CCR [235,236]. En esta dirección autores como *Kang y cols.* [237] proponen el análisis del estado de metilación del ADN en la sangre fecal de algunos genes, incluyendo MGMT por considerarlo un marcador útil para el diagnóstico de la enfermedad. Por el contrario, otros autores como *Sinha y cols.* [183] observaron que la metilación del promotor de MGMT se encontraba asociada a un estadio tumoral más avanzado (estadio III) e invasión linfática.

Nuestros resultados en el grupo de 123 pacientes diagnosticados de CCR y en los que MGMT fue analizado antes del tratamiento, demostraron que el estado de metilación del promotor de MGMT se asoció significativamente con la intensidad de expresión de MGMT y el grado de diferenciación, pero no con la SG, la SLE o el estadio tumoral. Por otra parte, la intensidad de expresión de MGMT sí se correlacionó con la SG, pero no con SLE, el estadio tumoral o el grado de diferenciación (Figura 77). De hecho, a partir de los 5 años, los pacientes con baja intensidad de expresión presentaron una supervivencia menor (61,36 meses) que los pacientes con alta intensidad (77,48 meses).

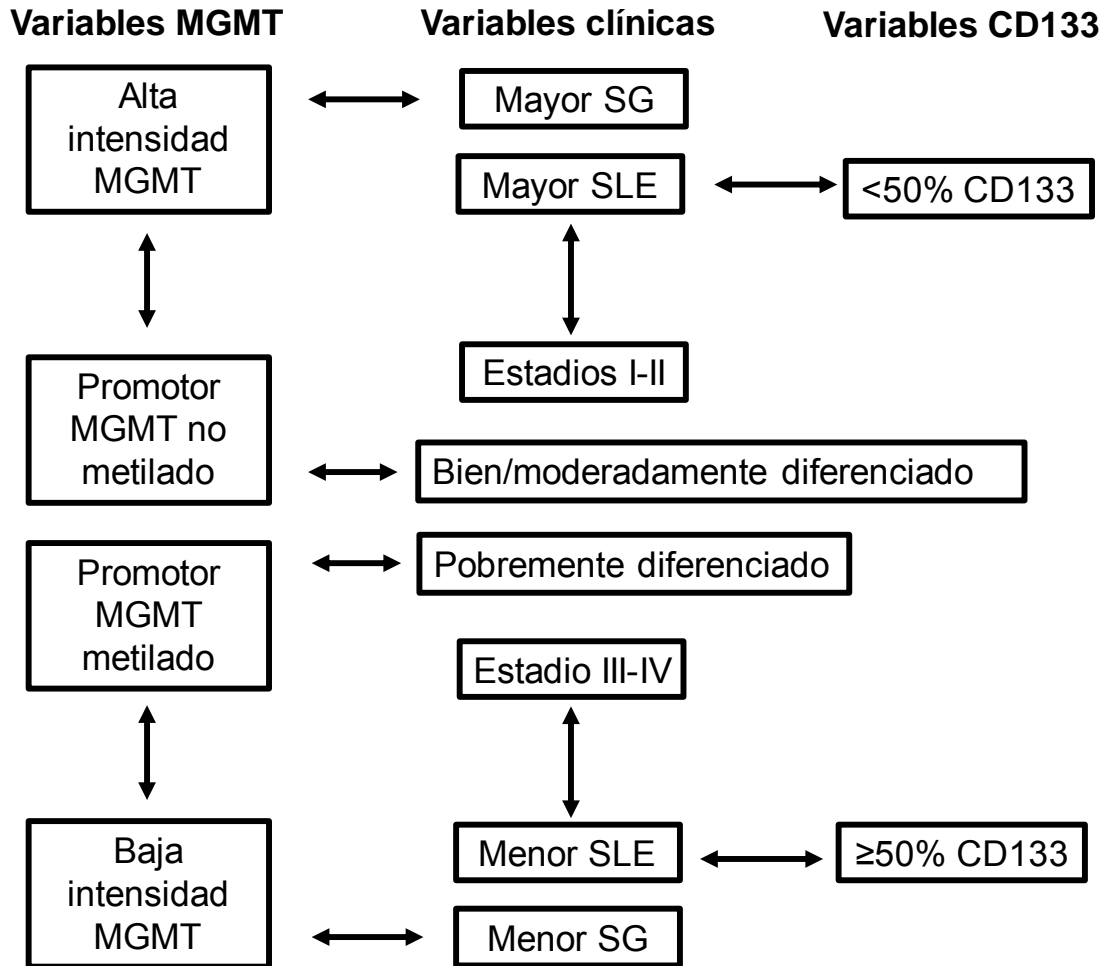


Figura 77. Resumen de asociaciones significativas entre variables clínicas y moleculares en pacientes con CCR. En esta figura podemos apreciar las principales asociaciones entre las variables clínicas y moleculares de MGMT y CD133. Las flechas indican las variables que presentan asociación entre sí. De este modo, el estado de metilación del promotor de MGMT se asociaba significativamente con la intensidad de expresión de MGMT y el grado de diferenciación tumoral. Por otra parte, la intensidad de expresión de MGMT se correlacionó con la SG. Dentro de las variables clínicas, se observó correlación del estadio tumoral con la SLE. Finalmente, el % de expresión de CD133 se correlacionó con la SLE.

Se ha planteado como hipótesis que MGMT posee una gran relevancia a corto plazo, respecto a la respuesta frente al tratamiento, de forma que los pacientes con baja expresión de MGMT (o el promotor silenciado) poseen una

mejor respuesta a la terapia [238,193]. Sin embargo, a largo plazo la ausencia de este sistema de reparación puede estar vinculada a una SG inferior y por tanto a un peor pronóstico. En este sentido, diversos autores han descrito los efectos de la inactivación de MGMT en otros genes relacionados con el inicio del proceso tumoral, apreciándose que el silenciamiento epigenético de MGMT por hipermetilación del promotor abre las puertas a transiciones de G:C a A:T y por tanto a mutaciones en genes como p53 [169], K-ras [170-172] y PIK3CA [169,173] entre otros. Estas alteraciones en genes esenciales para la regulación de diferentes procesos celulares facilitan la progresión del tumor a estadios más avanzados, empeorando el pronóstico del paciente a largo plazo (Figura 78). En contraste, *Shima y cols.* [170] no encontraron correlación significativa entre MGMT (a nivel proteico y epigenético) y la supervivencia, sugiriendo que tiene poca relevancia clínica.

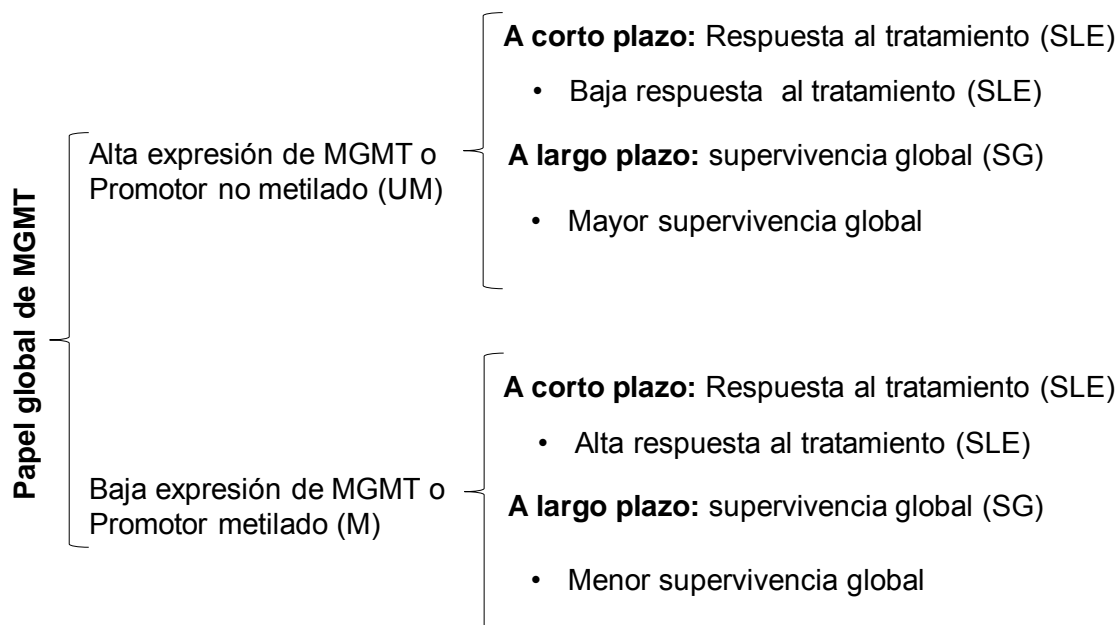


Figura 78. Papel global de MGMT. La hipótesis planteada indica que MGMT, a corto plazo, repercutiría en el tratamiento de forma que los pacientes con baja expresión de MGMT (o el promotor silenciado) poseerían una mejor respuesta a la terapia. Sin embargo, a largo plazo, la ausencia de este sistema de reparación podría vincularse a la progresión de la enfermedad y por tanto a peor pronóstico y SG.

Respecto a la implicación de MGMT en la respuesta al tratamiento, *Nagasaka y cols.* [238] sugieren que la hipermetilación de MGMT en CCR puede estar relacionada con la no recurrencia después de la quimioterapia. Datos experimentales *in vitro* apoyan esta hipótesis, ya que la citotoxicidad del 5-FU en líneas celulares de CCR con alta expresión de MGMT se incrementó al tratarlas con O6-bencilguanina, un potente inhibidor de MGMT. Esto sugiere que los niveles de MGMT elevados pueden ser un marcador de baja respuesta terapéutica [193]. De hecho, algunos estudios previos han mostrado una mayor supervivencia en los primeros 5 años (corto plazo) después del inicio del tratamiento en pacientes con el promotor metilado [239]. Sin embargo, como ya hemos comentado, nuestros resultados no encuentran una correlación significativa entre la metilación de MGMT y la SG o SLE sugiriendo que la determinación de esta variable antes del tratamiento podría no ser útil para el pronóstico de los pacientes. A pesar de esto, sí encontramos una asociación significativa entre la metilación del promotor de MGMT y el nivel de diferenciación tumoral, observando que la metilación se produce de forma más frecuente en los tumores pobremente diferenciados que son los que se comportan clínicamente de una forma más agresiva. En este sentido, la determinación del estado de metilación del promotor de MGMT podría representar un elemento más, aunque no el único, a tener en cuenta, a la hora de valorar la posible evolución de los pacientes con CCR.

Por último, debemos añadir que en la valoración de la importancia de los resultados de MGMT en los pacientes de CCR y en los tumores en general, debe tenerse en cuenta la gran variabilidad que las diferentes metodologías agregan a estos estudios y la disparidad entre los criterios de selección de los pacientes, que en muchos casos hace difícil la comparación de los resultados. Por otra parte, la regulación de MGMT parece ser un proceso multifactorial y más complejo de lo que se planteó en los estudios iniciales. Respecto a esto, en los últimos años se han observado dos patrones distintos de metilación de MGMT y se han asociado con diferentes mutaciones o cambios epigenéticos en CCR [240]. Además, estudios previos apuntan a que la metilación no es el único mecanismo de regulación de los niveles de proteína en MGMT [241]. De hecho, ya se ha demostrado que algunos polimorfismos en MGMT pueden

reducir su actividad y/o sensibilidad [184,242] y se han asociado con la supervivencia libre de progresión en pacientes con CCR [243].

CD133 como biomarcador en CCR

En los últimos años, CD133 ha sido ampliamente asociado a las células madre en tejido de colon sano y a las CSC en CCR [209,244,245]. Su expresión se detectó en aproximadamente la mitad de una serie de adenomas precancerosos [224] y se observó una notable expresión en los márgenes invasivos del CCR [210]. No obstante, existe una gran controversia en relación a este marcador ya que, en contra de lo que se pensaba, tanto las células CD133 positivas como las CD133 negativas han sido capaces de iniciar y desarrollar un tumor de forma completa [209]. Por tanto serán necesarios más estudios para determinar su papel en el CCR.

En nuestro estudio, el porcentaje de expresión de CD133 en los pacientes afectos de CCR analizados antes del tratamiento se correlacionó con la SLE, pero no con la SG, el estadio tumoral o el grado de diferenciación, lo que sugiere que esta molécula puede ser relevante para determinar la recurrencia y respuesta al tratamiento. Estos hallazgos apoyan estudios previos como el de *Coco y cols.* [246], quienes encontraron un mayor riesgo de recurrencia y muerte en pacientes con niveles de CD133 elevados. En la misma dirección, *Reggiani y cols.* [247] llegaron a la conclusión de que CD133 es un biomarcador útil para el pronóstico en las etapas iniciales de la patología (estadio I) y para la selección de pacientes que requieran tratamiento adyuvante en estas fases. Por otra parte, *Jao y cols.* [216] correlacionaron la expresión de CD133 citoplasmática con la recurrencia local del tumor y la supervivencia. Sin embargo, estudios similares no encontraron ninguna correlación entre la expresión de CD133 citoplasmática y la supervivencia de los pacientes [248]. *Kojima y cols.* [249] tampoco observaron diferencias en la SLE de los pacientes CD133 positivos y negativos. A pesar de ello, estos autores consideran que la sobreexpresión de CD133 es un factor de riesgo en pacientes con adenocarcinoma bien y moderadamente diferenciados. Algunos autores han analizado el patrón de expresión de CD133 en CCR teniendo en

cuenta el marcaje de la superficie endoluminal de las glándulas cancerosas y de los desechos celulares en su interior [210]. Basándose en este patrón, estos autores correlacionaron significativamente CD133 con una baja supervivencia en pacientes con CCR. Otros, como *Xi y cols.* [250], informaron de que la expresión de CD133 en la membrana y en el citoplasma de las células en la superficie luminal de las glándulas cancerosas era de valor pronóstico en pacientes con CCR.

Como en el caso de MGMT, las metodologías aplicadas en los diferentes estudios hacen difícil su comparación. De hecho, se pueden observar patrones de tinción de CD133 que podrían diferir en CCR dependiendo si se usan los anticuerpos monoclonales AC133 (*Miltenyi Biotech*), Ab19898 (*Abcam*) [246] o policlonales como el anticuerpos anti-CD133 (*Cell signal*), AC133 (*Miltenyi Biotech*) o anti-CD133 policlonal (*Santa Cruz Biotechnology*) [210]. A esto hay que añadir que, mientras que algunos autores establecen como baja expresión menos del 5% de las células marcadas y alta expresión más del 5% [246,250,251], otros compararon el número de glándulas marcadas mediante CD133 considerando como alta expresión la presencia de más del 50 % de estas [210].

Por último, aunque ambos biomarcadores se han asociado en varios estudios previos, no está clara la relación existente entre ellos. Así, la expresión de MGMT y/o estado de metilación de su promotor se ha relacionado con la radioquimiorresistencia en la población de CSC en algunos tumores tales como glioma o glioblastoma [177,178,252]. *He y cols.* [177] observaron que los pacientes con el promotor de MGMT metilado y alta expresión CD133 tenían la peor supervivencia libre de progresión. Por el contrario, *Metellus y cols.* [252] observaron una menor SG y SLE en pacientes con MGMT no metilado y alta expresión de CD133. Nuestros resultados, no encontraron asociación significativa entre MGMT y CD133 en pacientes con CCR. Sin embargo, de acuerdo con las conclusiones de *He y cols.* [177] la SLE y la SG fueron inferiores en pacientes con la intensidad de expresión de MGMT baja y ≥ 50 % de expresión de CD133.

MGMT y CD133 en cáncer rectal

Con el objeto de determinar el valor pronóstico de MGMT y CD133 específicamente en cáncer rectal tratado con quimioterapia y radioterapia y comparar los resultados con los obtenidos en la selección de pacientes de CCR, se realizó un segundo estudio utilizando un grupo muy homogéneo de 29 pacientes diagnosticados de esta patología y de los que pudimos obtener biopsias antes y después del tratamiento.

Pocos estudios se han centrado en el análisis específico del cáncer rectal en relación a la enzima MGMT. La mayoría de los estudios previos abarcan al CCR y como ya vimos, muestran resultados paradójicos. Uno de los estudios más completos, el de *Sinha y cols.* [183] concluye que el estado de metilación del promotor de MGMT y los niveles de expresión proteica, se correlacionan significativamente con al estadio tumoral en CCR esporádico. Nuestros resultados sugieren que la metilación del promotor de MGMT o la baja expresión de la proteína se asocian o correlacionan con una mejor respuesta al tratamiento, menor grado de regresión tumoral, ausencia de invasión en los nodos linfáticos y una mayor SLE. Por el contrario, se pudo comprobar que los pacientes con alto porcentaje de expresión de MGMT o el promotor no metilado evolucionaban negativamente en las mismas variables presentando mayores valores en el grado de regresión tumoral, mala respuesta al tratamiento y una menor SLE. Además, nuestros resultados apoyan la idea de que MGMT tiene un papel activo en la respuesta al tratamiento ya que se observa una disminución de los niveles de proteína en la mayoría de los pacientes después del tratamiento. En esta selección de pacientes con cáncer rectal también se analizaron los niveles de expresión del ARNm mediante PCR a tiempo real, lo que nos permitió observar que los pacientes con los valores mayores de $\Delta\Delta Ct$ de MGMT antes del tratamiento no mostraron invasión de los nodos linfáticos, hecho que sí fue evidente en los pacientes con un grado menor de expresión.

Por otra parte, la expresión diferencial entre el tejido tumoral de CCR y el tejido sano circundante han sido objeto de controversia. Algunos autores han

demostrado que MGMT posee una baja expresión en el tejido tumoral de CCR en comparación con el tejido circundante normal [233] destacando un posible papel diagnóstico de la enfermedad [29,235]. Otros autores observaron un nivel de metilación de MGMT y/o expresión similar entre el tejido normal y el tejido adenomatoso, posible precursor del CCR [236,253]. En este contexto, nosotros hemos apreciado una expresión constante de MGMT en el tejido circundante normal, aunque en las muestras tumorales antes del tratamiento observamos diferencias significativas de expresión. Probablemente la secuencia tejido normal / adenoma / adenocarcinoma temprano / adenocarcinoma avanzado presenta modulaciones en el estado de metilación del promotor de MGMT y por tanto en su expresión, lo que explicaría los diferentes resultados observados.

Uno de los mayores intereses en nuestro estudio ha sido analizar el papel que juega MGMT en la respuesta de pacientes afectados de cáncer rectal a la radioquimioterapia, estrategia terapéutica de elección en la mayoría de los casos. Estudios *in vitro* [193] relacionaron MGMT y 5-FU de forma que la reducción de MGMT mediante la O6-bencilguanina, produjo un aumento significativo del efecto antitumoral de 5-FU, volviendo las líneas celulares más sensibles al fármaco. Este fenómeno se acompañó de una reducción en los niveles de expresión proteica de MGMT después del tratamiento con 5-FU que sin embargo no se reflejó en la modificación de los niveles de ARNm [193]. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la regulación de la expresión de MGMT es un proceso complejo y multifactorial [241]. Nuestros resultados en pacientes confirman los datos experimentales obtenidos previamente *in vitro* [241] ya que en esta selección de pacientes apreciamos una reducción de los niveles de proteína de MGMT después del tratamiento, que sin embargo no se acompañó de cambios significativos en los niveles de ARNm, ni en el estado de metilación de su promotor. Queda, sin embargo, por dilucidar cuál es el mecanismo por el que se reduce la expresión de MGMT después de la radioquimioterapia asociada a 5-FU. En este sentido, otros mecanismos que implican modulación de MGMT por antineoplásicos como la temozolamida (fármaco usado en glioblastoma) permiten establecer ciertas hipótesis [254]. De hecho, *Minniti y cols.* [255] demuestran que la metilación del promotor de MGMT aumenta la SG y la SLE de pacientes con GBM tratados con TMZ y

radioterapia. En el contexto del CCR, tanto *Nagasaka y cols.* [238] como *Nilsson y cols.* [239] relacionan el estado de metilación de MGMT con la recurrencia de la enfermedad tras el tratamiento con 5-FU, siendo los pacientes con el promotor de MGMT metilado los que menor riesgo de recidiva poseen. En contraste, *Shima y cols.* [170] concluyen que el estado de metilación de MGMT o la pérdida de expresión de MGMT no es un indicador de respuesta al tratamiento. Como dicen *Ludlum y cols.* [256] y *Calzas y cols.* [73], se debe tener en cuenta que, a diferencia de la TMZ, el 5-FU no se ha asociado con el proceso de alquilación no estando por tanto clara su relación con la modulación de MGMT, ya sea a nivel de metilación o de expresión. Nuestros resultados corroboran lo observado por *Nagasaka* [238] y *Nilsson* [239] mostrando que los pacientes con el promotor de MGMT metilado o alta expresión de MGMT después del tratamiento presentaron mejor respuesta.

Por último, el grupo de pacientes afectos de cáncer rectal también fue analizado en relación a la expresión proteica de CD133 en muestras pre y postratamiento. Estudios recientes han intentado delimitar la utilidad de CD133 como biomarcador pronóstico en pacientes con CCR. *Xi y cols.* [250] correlacionaron de forma significativa, la expresión proteica de CD133 con el tamaño tumoral, el grado histológico, la profundidad de infiltración, la metástasis ganglionar, la metástasis a distancia, la TNM y la supervivencia en pacientes con CCR. *Coco y cols.* [246] establecen esa correlación sólo con la SG, SLE, invasión tumoral (T), estadio del tumor y recurrencia en el mismo tipo de pacientes. En la misma dirección, *Reggiani y cols.* [247] correlacionaron los niveles de proteína CD133 con la proliferación tumoral, la invasión vascular, la micrometástasis y la SLE.

Nuestros resultados demuestran que este biomarcador presentó correlación con la respuesta al tratamiento y las variables histopatológicas como invasión de los ganglios linfáticos (N), la infiltración o invasión tumoral (T), la TNM y el GRT. Así, la alta expresión proteica de CD133 o el incremento/ausencia de cambio de los niveles de expresión entre las biopsias pre y postratamiento se asoció con un pobre pronóstico y una mala respuesta al tratamiento. Por el contrario, los niveles bajos de expresión proteica CD133

en ambas biopsias o la reducción de los niveles de proteína entre ellas, se asociaron con un mejor pronóstico y respuesta al tratamiento. Además, a diferencia de los estudios *in vitro*, no se observó ninguna relación entre MGMT y CD133.

Por otra parte, nuestros resultados no mostraron una correlación significativa entre los niveles de ARNm de CD133 y las variables clínicas, lo que coincide con los datos obtenidos por *Huh y cols.* [257] en un estudio similar. Por el contrario, *Saigusa y cols.* [258] sí encuentran correlación entre la expresión del ARNm de CD133 obtenido después de la QRT y la supervivencia y recurrencia a distancia. Por otra parte, *Kawamoto y cols.* [259] describen que tras la QRT existe un aumento en los niveles de ARNm y de expresión proteica de CD133 dependiente de la dosis de radiación. Nosotros no apreciamos cambios significativos en los niveles de expresión entre ambas biopsias, aunque debemos destacar que ningún paciente mostró reducción de los niveles de ARN después del tratamiento con QRT. Del mismo modo, tanto *Kawamoto y cols.* [259] como *Yasuda y cols.* [260] asociaron los niveles altos de ARNm de CD133 con la invasión vascular, recurrencia y periodos cortos de SLE. Como en el caso de CCR, los estudios en este grupo reducido de pacientes no encuentran ninguna asociación ni correlación entre MGMT y CD133.

6. CONCLUSIONS/CONCLUSIONES

CONCLUSIONS

1. There is not any significant correlation between both MGMT and CD133 promoter methylation status and RNAm expression in the different cell lines suggesting that other regulating mechanism must exist.
2. The 5-FU treatment of CRC tumor cell lines at or above its IC_{50} dose does not modulate significantly the MGMT expression.
3. The 5-FU treatment of CRC tumor cell lines at or above the IC_{50} dose promotes a significant increase in the expression of CD133 in the cell lines without or with low basal CD133 mRNA expression.
4. Cancer stem cells enriched populations from different CRC cell lines show a general CD133 mRNA expression equal or higher than basal cell line.
5. Cancer stem cells enriched populations with increased CD133 mRNA expression (RKO and SW480 cell lines) showed 1) higher MGMT mRNA expression, 2) lower proliferation rates, 3) greater 5-FU IC_{50} than basal cell lines. These results suggest that CSC selection by 5-FU can be the base of chemoresistance in this kind of tumors.
6. The MGMT intensity of protein expression is a prognostic factor which correlates with overall survival and it is independent to other analyzed variables in CRC patients.

- 7.** The absence of MGMT protein expression and/or their promoter methylation status correlates with a good treatment response at short-term, while at long-term associate with reduced overall survival in CRC patients.

- 8.** MGMT and CD133 percentage expression after treatment correlate or associate with tumour regression grade highlighting the prognostic value of treatment response of both biomarkers in the rectal cancer patients.

- 9.** There is not any significant correlation between CD133 and MGMT molecular variables in CRC patients.

- 10.** These results suggest that both CD133 and MGMT could be useful as CRC prognostic biomarker for overall survival, disease-free survival and treatment response prediction.

CONCLUSIONES

1. No existe una correlación significativa entre el estado de metilación del promotor de MGMT y CD133 en las líneas celulares tumorales y transformada de colon y la expresión de ARNm de ambas moléculas, lo que sugiere que deben existir otros mecanismos de regulación de su expresión.
2. La exposición de células tumorales de CCR al agente 5-FU en dosis iguales o superiores a su IC_{50} , no modula de forma significativa la expresión de MGMT.
3. La exposición de células tumorales de CCR al agente 5-FU en dosis iguales o superiores a su IC_{50} promueve un aumento significativo de la expresión de CD133 en aquellas líneas celulares con ausencia o baja expresión basal del RNAm de CD133.
4. Las *cancer stem cells* aisladas a partir de las líneas tumorales derivadas de CCR muestran en general una expresión de RNAm de CD133 igual o mayor que la expresión en la línea basal.
5. Las poblaciones celulares enriquecidas en *cancer stem cells* con expresión elevada del RNAm de CD133 (RKO y SW80) mostraron 1) mayor expresión de RNAm de MGMT, 2) menor tasa de proliferación y 3) mayor IC_{50} para 5-FU que las células basales. Estos resultados sugieren que la selección de las CSC por el tratamiento con 5-FU puede ser la base de la quimiorresistencia de este tipo de tumores.
6. En pacientes con CCR, la intensidad de expresión de MGMT es un factor pronóstico que se correlaciona con la SG y es independiente del resto de variables analizadas.

- 7.** En pacientes con CCR, la ausencia de expresión de MGMT y/o la metilación de su promotor se correlaciona con una respuesta favorable al tratamiento a corto plazo, mientras que a largo plazo, se asocia a una reducción de la supervivencia global.

- 8.** En pacientes con cáncer rectal, el % de expresión de MGMT y de CD133 después del tratamiento se correlacionan o asocian con el grado de regresión tumoral, poniendo de manifiesto el valor predictivo de la respuesta al tratamiento de ambos biomarcadores.

- 9.** No existe ninguna correlación significativa entre las variables moleculares de CD133 y MGMT en los pacientes de CCR.

- 10.** Los resultados obtenidos sugieren que CD133 y MGMT podrían ser usados como biomarcadores de CCR con valor pronóstico en la determinación de la supervivencia global, la supervivencia libre de enfermedad y la respuesta al tratamiento.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. GLOBOCAN 2008 v2.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer 2010. Available from: <http://globocan.iarc.fr>. (Accessed on: September 13, 2012).
- [2] Chirlaque MD, Salmerón D, Ardanaz E, Galceran J, Martínez R, Marcos-Gragera R, *et al*. Cancer survival in Spain: estimate for nine major cancers. *Ann Oncol* 2010; 21 Suppl 3: iii21-29.
- [3] Asociación Española Contra el Cáncer (AECC). [internet] <https://www.aecc.es/> (Accessed on: August 31, 2013).
- [4] Hamilton SR, Aaltonen LA. Pathology and genetics of tumors of the digestive system. World Health Organization Classification of Tumours. International Agency for Research on Cancer (IARC) IARC Press. Lyon 2000; p 101-142.
- [5] Yoshimi I, Kaneko S. Comparison of cancer mortality (rectal cancer) in five countries: France, Italy, Japan, UK and USA from WHO mortality database (1960-2000). *Jpn J Clin Oncol* 2008; 35(4): 224-7.
- [6] Martínez ME. Primary prevention of colorectal cancer: lifestyle, nutrition, exercise. *Recent Results Cancer Res* 2005; 166: 177-211.
- [7] Giovannucci E, Rimm EB, Ascherio A, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC. Alcohol, low-methionine-low-folate diets, and risk of colon cancer in men. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87(4): 265-73.
- [8] Nan H, Lee JE, Rimm EB, Fuchs CS, Giovannucci EL, Cho E. Prospective study of alcohol consumption and the risk of colorectal cancer before and after folic acid fortification in the United States. *Ann Epidemiol* 2013 [Epub ahead of print].
- [9] Cho E, Smith-Warner SA, Ritz J, van den Brandt PA, Colditz GA, Folsom AR, *et al*. Alcohol intake and colorectal cancer: a pooled analysis of 8 cohort studies. *Ann Intern Med* 2004; 140(8): 603-13.
- [10] American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2013*. Atlanta: American Cancer Society 2013.
- [11] Phipps AI, Shi Q, Newcomb PA, Nelson GD, Sargent DJ, Alberts SR, *et al*. Associations between cigarette smoking status and colon cancer prognosis among participants in North Central Cancer Treatment Group Phase III Trial N0147. *Clin Oncol* 2013; 31(16): 2016-23.
- [12] El-Bolkainy TN, Sakr MA, Nouh AA, El-Din NH. A comparative study of rectal and colonic carcinoma: demographic, pathologic and TNM staging analysis. *J Egypt Natl Canc Inst* 2006; 18(3): 258-63.

- [13] Bergström A, Pisani P, Tenet V, Wolk A, Adami HO. Overweight as an avoidable cause of cancer in Europe. *Int J Cancer* 2001; 91(3): 421-30.
- [14] Berrino F, Krogh V, Riboli E. Epidemiology studies on diet and cancer. *Tumori* 2003; 89(6): 581-5.
- [15] Burkitt DP. Epidemiology of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 1971; 28(1): 3-13.
- [16] Alberts DS, Martínez ME, Roe DJ, Guillén-Rodríguez JM, Marshall JR, van Leeuwen JB *et al.* Lack of effect of a high-fiber cereal supplement on the recurrence of colorectal adenomas. Phoenix Colon Cancer Prevention Physicians' Network. *N Engl J Med* 2000; 342(16): 1156-62.
- [17] Park Y, Hunter DJ, Spiegelman D, Bergkvist L, Berrino F, van den Brandt PA *et al.* Dietary fiber intake and risk of colorectal cancer: a pooled analysis of prospective cohort studies. *JAMA* 2005; 294(22): 2849-57.
- [18] Connelly-Frost A, Poole C, Satia JA, Kupper LL, Millikan RC, Sandler RS. Selenium, apoptosis, and colorectal adenomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15(3): 486-93.
- [19] Pálmer HG, González-Sancho JM, Espada J, Berciano MT, Puig I, Baulida J *et al.* Vitamin D(3) promotes the differentiation of colon carcinoma cells by the induction of E-cadherin and the inhibition of beta-catenin signaling. *J Cell Biol* 2001; 154(2): 369-87.
- [20] Qu X, Jin F, Hao Y, Zhu Z, Li H, Tang T, *et al.* Nonlinear association between magnesium intake and the risk of colorectal cancer. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2013; 25(3): 309-18.
- [21] Kuno T, Hatano Y, Tomita H, Hara A, Hirose Y, Hirata A *et al.* Organomagnesium suppresses inflammation-associated colon carcinogenesis in male Crj: CD-1 mice. *Carcinogenesis* 2013; 34(2): 361-9.
- [22] Bassett JK, Severi G, Hodge AM, Baglietto L, Hopper JL, English DR, *et al.* Dietary intake of B vitamins and methionine and colorectal cancer risk. *Nutr Cancer* 2013; 65(5): 659-67.
- [23] Casimiro C. Etiopathogenic factors in colorectal cancer. Genetic and clinical features. *Nutr Hosp* 2002; 17(2): 63-71.
- [24] Scheppach W, Bingham S, Boutron-Ruault MC, Gerhardsson de Verdier M, Moreno V, Nagengast FM, *et al.* WHO consensus statement on the role of nutrition in colorectal cancer. *Eur J Cancer Prev* 1999; 8(1): 57-62.
- [25] Rosen N: Chapter 32.1. Cancers of the Gastrointestinal Tract. *Cancer: Principles & Practice of Oncology, Fifth Edition*, edited by Vincent DeVita Jr, Samuel Hellman, Steven A. Rosenberg. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia © 1997.

- [26] Hawkins NJ, Ward RL. Sporadic colorectal cancers with microsatellite instability and their possible origin in hyperplastic polyps and serrated adenomas. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93(17): 1307-13.
- [27] Freedman AN, Michalek AM, Marshall JR, Mettlin CJ, Petrelli NJ, Black JD, *et al.* Familial and nutritional risk factors for p53 overexpression in colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996; 5(4): 285-91.
- [28] 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(9): 675-84.
- [29] Lee KH, Lee JS, Nam JH, Choi C, Lee MC, Park CS, *et al.* Promoter methylation status of hMLH1, hMSH2, and MGMT genes in colorectal cancer associated with adenoma-carcinoma sequence. *Langenbecks Arch Surg* 2011; 396(7): 1017-26.
- [30] Vukobrat-Bijedic Z, Husic-Selimovic A, Sofic A, Bijedic N, Gogov B, Djuran A *et al.* The application of current diagnostic protocols of patients with colon cancer in preparation for therapy. *Acta Inform Med* 2012; 20(4): 238-41.
- [31] Borda F, Jiménez FJ, Borda A, Urman J, Goñi S, Ostiz M, *et al.* Endoscopic localization of colorectal cancer: study of its accuracy and possible error factors. *Rev Esp Enferm Dig* 2012; 104(10): 512-7.
- [32] El Demellawy D, Khalifa MA, Ismiil N, Wong S, Ghorab Z. Primary colorectal small cell carcinoma: a clinicopathological and immunohistochemical study of 10 cases. *Diagn Pathol* 2007; 2: 35.
- [33] Theodosopoulos TK, Marinis AD, Dafnios NA, Vassiliou JG, Samanides LD, Carvounis EE, *et al.* Aggressive treatment of metastatic squamous cell carcinoma of the rectum to the liver: a case report and a brief review of the literature. *World J Surg Oncol* 2006; 4: 49.
- [34] Shafaghi A, Askari K, Ashoobi MT, Mansour-Ghanaei F. Adenosquamous carcinoma of the sigmoid colon: a case report and review of literature. *Int J Clin Exp Med* 2013; 6(5): 390-2.
- [35] Murray SE, Lloyd RV, Sippel RS, Chen H. Clinicopathologic characteristics of colonic carcinoid tumors. *J Surg Res* 2013; 184(1): 183-8.
- [36] Modlin IM, Lye KD, Kidd M. A 5-decade analysis of 13,715 carcinoid tumors. *Cancer* 2003; 97(4): 934-59.
- [37] Pascual M, Sánchez-González B, García M, Pera M, Grande L. Primary lymphoma of the colon. *Rev Esp Enferm Dig* 2013; 105(2): 74-78.
- [38] Chia-Lin C, Shin-Ching C, Tzu-Chen L, Wei-Shone C, Jeng-Kae J, Huann-Sheng W, *et al.* Clinical analysis and surgical results of primary colorectal sarcoma. *J Soc Colon Rectal Surgeon* 2010; 21: 161-168.

- [39] Iversen LH. Aspects of survival from colorectal cancer in Denmark. *Dan Med J* 2012; 59(4): B4428.
- [40] Duffy MJ. Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: Is it clinically useful? *Clin Chem* 2001; 47(4): 624-30.
- [41] Block, C., Mittmann, K., Arntz, C. Optimized adhesin fragments and corresponding nanoparticles. US20110110856 (2011).
- [42] Duffy MJ, van Dalen A, Haglund C, Hansson L, Klapdor R, Lamerz R, *et al.* Clinical utility of biochemical markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines. *Eur J Cancer* 2003; 39(6): 718-27.
- [43] Sajid KM, Chaouachi K, Mahmood R. Hookah smoking and cancer: Carcinoembryonic antigen (CEA) levels in exclusive/ever hookah smokers. *Harm Reduct J* 2008; 5:19.
- [44] Lemech C, Arkenau H-T. Biomarkers in advanced colorectal cancer: Challenges in translating clinical research into practice. *Cancers* 2011; 3(2): 1844-60.
- [45] Duffy MJ. CA 19-9 as a marker for gastrointestinal cancers: A review. *Ann Clin Biochem* 1998; 35 (Pt 3): 364-70.
- [46] Lindmark G, Bergström R, Pählman L, Glimelius B. The association of preoperative serum tumor markers with Dukes' stage and survival in colorectal cancer. *Br J Cancer* 1995; 71(5): 1090-4.
- [47] Nakayama T, Watanabe M, Teramoto T, Kitajima M. CA 19-9 as a predictor of recurrence in patients with colorectal cancer. *J Surg Oncol* 1997; 66(4): 238-43.
- [48] Reiter W, Stieber P, Reuter C, Nagel D, Lau-Werner U, Pahl H, *et al.* Preoperative serum levels of CEA and CA 19-9 and their prognostic significance in colorectal carcinoma. *Anticancer Res* 1997; 17(4B): 2935-8.
- [49] Instituto Nacional del Cáncer <http://www.cancer.gov/espanol> [internet] (Accessed on: September 17, 2013).
- [50] Bokey EL, Moore JW, Chapuis PH, Newland RC. Morbidity and mortality following laparoscopic-assisted right hemicolectomy for cancer. *Dis Colon Rectum* 1996; 39(10 Suppl): S24-8.
- [51] Franklin ME, Rosenthal D, Abrego-Medina D, Dorman JP, Glass JL, Norem R, *et al.* Prospective comparison of open vs. laparoscopic colon surgery for carcinoma. Five-year results. *Dis Colon Rectum* 1996; 39(10 Suppl): S35-46.

- [52] Fleshman JW, Nelson H, Peters WR, Kim HC, Larach S, Boorse RR, *et al.* Early results of laparoscopic surgery for colorectal cancer. Retrospective analysis of 372 patients treated by Clinical Outcomes of Surgical Therapy (COST) Study Group. *Dis Colon Rectum* 1996; 39(10 Suppl): S53-8.
- [53] Schwenk W, Böhm B, Müller JM. Postoperative pain and fatigue after laparoscopic or conventional colorectal resections. A prospective randomized trial. *Surg Endosc* 1998; 12(9): 1131-6.
- [54] Winawer SJ, Zauber AG, Fletcher RH, Stillman JS, O'Brien MJ, Levin B, *et al.* Guidelines for colonoscopy surveillance after polypectomy: a consensus update by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer and the American Cancer Society. *Gastroenterology* 2006; 130(6): 1872-85.
- [55] Winawer SJ, Zauber AG, Ho MN, O'Brien MJ, Gottlieb LS, Sternberg SS, *et al.* Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med* 1993; 329(27): 1977-81.
- [56] Thiis-Evensen E, Hoff GS, Sauar J, Langmark F, Majak BM, Vatn MH. Population-based surveillance by colonoscopy: effect on the incidence of colorectal cancer. Telemark Polyp Study I. *Scand J Gastroenterol* 1999; 34(4): 414-20.
- [57] [No authors listed]. Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in B2 colon cancer. International Multicentre Pooled Analysis of B2 Colon Cancer Trials (IMPACT B2) Investigators. *J Clin Oncol* 1999; 17(5): 1356-63.
- [58] Gill S, Loprinzi CL, Sargent DJ, Thomé SD, Alberts SR, Haller DG, *et al.* Pooled analysis of fluorouracil-based adjuvant therapy for stage II and III colon cancer: who benefits and by how much? *J Clin Oncol* 2004; 22(10): 1797-806.
- [59] Mamounas E, Wieand S, Wolmark N, Bear HD, Atkins JN, Song K, *et al.* Comparative efficacy of adjuvant chemotherapy in patients with Dukes' B versus Dukes' C colon cancer: results from four National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project adjuvant studies (C-01, C-02, C-03, and C-04) *J Clin Oncol* 1999; 17(5): 1349-55.
- [60] Generalitat de Catalunya, Departament de Salut. *OncoGuía de colon y recto. Guías de práctica clínica de cáncer en Cataluña* 2008.
- [61] Willett C, Tepper JE, Cohen A, Orlow E, Welch C, Donaldson G. Local failure following curative resection of colonic adenocarcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1984; 10(5): 645-51.
- [62] Willett C, Tepper JE, Cohen A, Orlow E, Welch C. Obstructive and perforative colonic carcinoma: patterns of failure. *J Clin Oncol* 1985; 3(3): 379-84.

- [63] Gunderson LL, Sosin H, Levitt S. Extrapelvic colon-areas of failure in a reoperation series: implications for adjuvant therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1985; 11(4): 731-41.
- [64] Willett CG, Fung CY, Kaufman DS, Efird J, Shellito PC. Postoperative radiation therapy for high-risk colon carcinoma. *J Clin Oncol* 1993; 11(6): 1112-7.
- [65] Willett CG, Goldberg S, Shellito PC, Grossbard M, Clark J, Fung C, *et al.* Does postoperative irradiation play a role in the adjuvant therapy of stage T4 colon cancer? *Cancer J Sci Am* 1999; 5(4): 242-7.
- [66] Schild SE, Gunderson LL, Haddock MG, Wong WW, Nelson H. The treatment of locally advanced colon cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997; 37(1): 51-8.
- [67] Benson AB, Schrag D, Somerfield MR, Cohen AM, Figueredo AT, Flynn PJ, *et al.* American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22(16): 3408-19.
- [68] Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, Conley B, Cooper HS, Hamilton SR, *et al.* Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists. Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124(7): 979-94.
- [69] O'Connell MJ, Laurie JA, Kahn M, Fitzgibbons RJ, Erlichman C, Shepherd L, *et al.* Prospectively randomized trial of postoperative adjuvant chemotherapy in patients with high-risk colon cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16(1): 295-300.
- [70] Waddell JA, Solimando DA. Leucovorin, fluorouracil, and oxaliplatin (FOLFOX 6 and 7) regimens for colorectal cancer. *Hosp Pharm* 2005; 40(8): 662-670.
- [71] Huang MY, Tsai HL, Lin CH, Huang CW, Ma CJ, Huang CM, *et al.* Predictive value of ERCC1, ERCC2, and XRCC1 overexpression for stage III colorectal cancer patients receiving FOLFOX-4 adjuvant chemotherapy. *J Surg Oncol* 2013; 108(7): 457-64.
- [72] Sharif S, O'Connell MJ, Yothers G, Lopa S, Wolmark N. FOLFOX and FLOX regimens for the adjuvant treatment of resected stage II and III colon cancer. *Cancer Invest* 2008; 26(9): 956-63.
- [73] Calzas Rodríguez J, de la Nogal Fernández B, Arrieta Garmendia JM, Lastra Aras E, García Castaño A, Barrio Gil-Fournier A, *et al.* Capecitabine: an oral chemotherapeutic agent against metastatic breast and colorectal cancer *Farm Hosp* 2003; 27(3): 171-8.
- [74] Tokunaga E, Oda S, Fukushima M, Maehara Y, Sugimachi K. Differential growth inhibition by 5-fluorouracil in human colorectal carcinoma cell lines. *Eur J Cancer* 2000; 36(15): 1998-2006.

- [75] Wiseman LR, Adkins JC, Plosker GL, Goa KL. Oxaliplatin: a review of its use in the management of metastatic colorectal cancer. *Drugs Aging* 1999; 14(6): 459-75.
- [76] Scheeff ED, Howell SB. Computer modeling of the primary cisplatin and oxaliplatin DNA adducts and relevance to mismatch repair recognition. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1998; 39: 158.
- [77] Sinicrope FA, Mahoney MR, Smyrk TC, Thibodeau SN, Warren RS, Bertagnolli MM, *et al.* Prognostic Impact of Deficient DNA Mismatch Repair in Patients With Stage III Colon Cancer From a Randomized Trial of FOLFOX-Based Adjuvant Chemotherapy. *J Clin Oncol* 2013; 31(29): 3664-72.
- [78] Kim ST, Lee J, Park SH, Park JO, Lim HY, Kang WK, *et al.* The effect of DNA mismatch repair (MMR) status on oxaliplatin-based first-line chemotherapy as in recurrent or metastatic colon cancer. *Med Oncol* 2010; 27(4): 1277-85.
- [79] Hsieh P, Yamane K. DNA mismatch repair: molecular mechanism, cancer, and ageing. *Mech Ageing Dev* 2008; 129(7-8): 391-407.
- [80] Dalen H, Oftebro R, Engeset A. The effect of methotrexate and leucovorin on cell division in chang cells. *Cancer* 1965; 18: 41-8.
- [81] Budai B, Nagy T, Láng I, Hitre E. The use of high dose d,l-leucovorin in first-line bevacizumab+mFOLFIRI treatment of patients with metastatic colorectal cancer may enhance the antiangiogenic effect of bevacizumab. *Angiogenesis* 2013; 16(1): 113-21.
- [82] Thirion P, Michiels S, Pignon JP, Buyse M, Braud AC, Carlson RW, *et al.* Modulation of fluorouracil by leucovorin in patients with advanced colorectal cancer: an updated meta-analysis. *J Clin Oncol* 2004; 22(18): 3766-75.
- [83] Van Cutsem E, Findlay M, Osterwalder B, Kocha W, Dalley D, Pazdur R, *et al.* Capecitabine, an oral fluoropyrimidine carbamate with substantial activity in advanced colorectal cancer: results of a randomized phase II study. *J Clin Oncol* 2000; 18(6): 1337-45.
- [84] Twelves C, Wong A, Nowacki MP, Abt M, Burris H, Carrato A, *et al.* Capecitabine as adjuvant treatment for stage III colon cancer. *N Engl J Med* 2005; 352(26): 2696-704.
- [85] Hoff PM, Pazdur R, Benner SE, Canetta R. UFT and leucovorin: a review of its clinical development and therapeutic potential in the oral treatment of cancer. *Anticancer Drugs* 1998; 9(6): 479-90.
- [86] Lembersky BC, Wieand HS, Petrelli NJ, O'Connell MJ, Colangelo LH, Smith RE, *et al.* Oral uracil and tegafur plus leucovorin compared with intravenous fluorouracil and leucovorin in stage II and III carcinoma of the colon: results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol C-06. *J Clin Oncol* 2006; 24(13): 2059-64.

[87] Douillard JY, Hoff PM, Skillings JR, Eisenberg P, Davidson N, Harper P, *et al.* Multicenter phase III study of uracil/tegafur and oral leucovorin versus fluorouracil and leucovorin in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20(17): 3605-16.

[88] Wolmark N, Rockette H, Mamounas E, Jones J, Wieand S, Wickerham DL, *et al.* Clinical trial to assess the relative efficacy of fluorouracil and leucovorin, fluorouracil and levamisole, and fluorouracil, leucovorin, and levamisole in patients with Dukes' B and C carcinoma of the colon: results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project C-04. *J Clin Oncol* 1999; 17(11): 3553-9.

[89] Schippinger W, Jagoditsch M, Sorre C, Gnant M, Steger G, Hausmaninger H, *et al.* A prospective randomised trial to study the role of levamisole and interferon alfa in an adjuvant therapy with 5-FU for stage III colon cancer. *Br J Cancer* 2005; 92(9): 1655-62.

[90] Sargent DJ, Wieand HS, Haller DG, Gray R, Benedetti JK, Buyse M, *et al.* Disease-free survival versus overall survival as a primary end point for adjuvant colon cancer studies: individual patient data from 20,898 patients on 18 randomized trials. *J Clin Oncol* 2005; 23(34): 8664-70.

[91] Jackman AL, Taylor GA, Gibson W, Kimbell R, Brown M, Calvert AH, *et al.* ICI D1694, a quinazoline antifolate thymidylate synthase inhibitor that is a potent inhibitor of L1210 tumor cell growth in vitro and in vivo: a new agent for clinical study. *Cancer Res* 1991; 51(20): 5579-86.

[92] Cunningham D, Zalcborg JR, Rath U, Oliver I, van Cutsem E, Svensson C, *et al.* Final results of a randomised trial comparing 'Tomudex' (raltitrexed) with 5-fluorouracil plus leucovorin in advanced colorectal cancer. "Tomudex" Colorectal Cancer Study Group. *Ann Oncol* 1996; 7(9): 961-5.

[93] Cocconi G, Cunningham D, Van Cutsem E, Francois E, Gustavsson B, van Hazel G, *et al.* Open, randomized, multicenter trial of raltitrexed versus fluorouracil plus high-dose leucovorin in patients with advanced colorectal cancer. Tomudex Colorectal Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 1998; 16(9): 2943-52.

[94] Popov I, Carrato A, Sobrero A, Vincent M, Kerr D, Labianca R, *et al.* Raltitrexed (Tomudex) versus standard leucovorin-modulated bolus 5-fluorouracil: Results from the randomised phase III Pan-European Trial in Adjuvant Colon Cancer 01 (PETACC-1). *Eur J Cancer* 2008; 44(15): 2204-11.

[95] Martenson JA, Willett CG, Sargent DJ, Mailliard JA, Donohue JH, Gunderson LL, *et al.* Phase III study of adjuvant chemotherapy and radiation therapy compared with chemotherapy alone in the surgical adjuvant treatment of colon cancer: results of intergroup protocol 0130. *J Clin Oncol* 2004; 22(16): 3277-83.

[96] Coppa GF, Eng K, Ranson JH, Gouge TH, Localio SA. Hepatic resection for metastatic colon and rectal cancer. An evaluation of preoperative and postoperative factors. *Ann Surg* 1985; 202(2): 203-8.

[97] Fong Y, Fortner J, Sun RL, Brennan MF, Blumgart LH. Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases. *Ann Surg* 1999; 230(3): 309-18.

[98] Leonard GD, Brenner B, Kemeny NE. Neoadjuvant chemotherapy before liver resection for patients with unresectable liver metastases from colorectal carcinoma. *J Clin Oncol* 2005; 23(9): 2038-48.

[99] Seifert JK, Morris DL. Prognostic factors after cryotherapy for hepatic metastases from colorectal cancer. *Ann Surg* 1998; 228(2): 201-8.

[100] Pawlik TM, Izzo F, Cohen DS, Morris JS, Curley SA. Combined resection and radiofrequency ablation for advanced hepatic malignancies: results in 172 patients. *Ann Surg Oncol* 2003; 10(9): 1059-69.

[101] Yukawa M, Furukawa J, Shingai T, Takekuni K, Azama T, Katsumoto Y, *et al.* Repetitive chemo-embolization with degradable starch microspheres (DSM) to each left and replaced right hepatic artery in a patient with multiple liver metastases of colon cancer. *Gan To Kagaku Ryoho* 2000; 27(12): 1977-80.

[102] Kemeny MM, Adak S, Gray B, Macdonald JS, Smith T, Lipsitz S, *et al.* Combined-modality treatment for resectable metastatic colorectal carcinoma to the liver: surgical resection of hepatic metastases in combination with continuous infusion of chemotherapy--an intergroup study. *J Clin Oncol* 2002; 20(6): 1499-505.

[103] Kemeny N, Daly J, Reichman B, Geller N, Botet J, Oderman P. Intrahepatic or systemic infusion of fluorodeoxyuridine in patients with liver metastases from colorectal carcinoma. A randomized trial. *Ann Intern Med* 1987; 107(4): 459-65.

[104] Tono T, Hasuike Y, Ohzato H, Takatsuka Y, Kikkawa N. Limited but definite efficacy of prophylactic hepatic arterial infusion chemotherapy after curative resection of colorectal liver metastases: A randomized study. *Cancer* 2000; 88(7): 1549-56.

[105] Tono T, Monden T. The role of prophylactic hepatic arterial infusion chemotherapy after potentially curative resection of hepatic metastases from colorectal cancer. *Nihon Geka Gakkai Zasshi* 2000; 101(8): 568-73.

[106] Glimelius B. Benefit-risk assessment of irinotecan in advanced colorectal cancer. *Drug Saf* 2005; 28(5): 417-33.

[107] Champoux JJ. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem* 2001; 70: 369-413.

- [108] Tesaro C, Morozzo Della Rocca B, Ottaviani A, Coletta A, Zuccaro L, Arnò B, *et al.* Molecular mechanism of the camptothecin resistance of Glu710Gly topoisomerase IB mutant analyzed in vitro and in silico. *Mol Cancer* 2013; 12(1): 100.
- [109] Tyagi P. Adjuvant irinotecan regimens in combination with infusional 5-fluorouracil/leucovorin fail to improve outcomes in surgically resected colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2005; 5(2): 86-8.
- [110] Uemura N, Yamada Y. FOLFIRI regimen for metastatic or recurrent colorectal cancer. *Gan To Kagaku Ryoho* 2006; 33(7): 904-6.
- [111] Takahari D, Tsuji Y, Tanaka S, Tsushima T, Ohura K, Honda K, *et al.* Feasibility of modified FOLFIRI regimen for patients with refractory advanced or recurrent colorectal cancer. *Gan To Kagaku Ryoho* 2007; 34(2): 207-11.
- [112] Sawai K, Goi T, Koneri K, Katayama K, Yamaguchi A. Partial response after transcatheter arterial infusion chemotherapy in a patient with systemic chemotherapy-resistant unresectable colon cancer and hepatic metastasis: (case report). *World J Surg Oncol* 2013, 11(1): 203.
- [113] Matsutani T, Sasajima K, Suzuki S, Matsushita A, Maruyama H, Matsuda A, *et al.* A case of ascending colon cancer with local recurrence responding completely to alternating modified-FOLFOX6 and FOLFIRI regimens(modified-FIREFOX regimen). *Gan To Kagaku Ryoho* 2009; 36(3): 505-7.
- [114] Hong-Qing Z, Zhi-Yong Y, Wang P. Research Progress on the Mechanisms of Combined Bevacizumab and Radiotherapy. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2014; 9(1): 129-34.
- [115] Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9(6): 669-76.
- [116] Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, *et al.* Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 350(23): 2335-42.
- [117] Nishina T, Takano Y, Denda T, Yasui H, Takeda K, Ura T *et al.* A Phase II Clinical Study of mFOLFOX6 Plus Bevacizumab as First-line Therapy for Japanese Advanced/Recurrent Colorectal Cancer Patients. *Jpn J Clin Oncol* 2013; 43(11): 1080-6.
- [118] Abe H, Mafune K, Minamimura K, Abe M, Umemura A, Hirata T. Second-line FOLFIRI plus bevacizumab for patients with metastatic colorectal cancer after resection of the primary lesion. *Gan To Kagaku Ryoho* 2013; 40(5): 601-4.

[119] Ducreux M, Adenis A, Pignon JP, François E, Chauffert B, Ichanté JL, *et al.* Efficacy and safety of bevacizumab-based combination regimens in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: final results from a randomised phase II study of bevacizumab plus 5-fluorouracil, leucovorin plus irinotecan versus bevacizumab plus capecitabine plus irinotecan (FNCLCC ACCORD 13/0503 study). *Eur J Cancer* 2013; 49(6): 1236-45.

[120] Smaglo BG, Hwang J. Continuum of care with anti-angiogenic therapies in metastatic colorectal cancer. *J Gastrointest Oncol* 2013; 4(3): 299-307.

[121] Van Cutsem E, Tabernero J, Lakomy R, Prenen H, Prausová J, Macarulla T, *et al.* Addition of aflibercept to fluorouracil, leucovorin, and irinotecan improves survival in a phase III randomized trial in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with an oxaliplatin-based regimen. *J Clin Oncol* 2012; 30(28): 3499-506.

[122] Grothey A, Van Cutsem E, Sobrero A, Siena S, Falcone A, Ychou M, *et al.* Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2013; 381(9863): 303-12.

[123] García-Foncillas J, Díaz-Rubio E. Progress in metastatic colorectal cancer: growing role of cetuximab to optimize clinical outcome. *Clin Transl Oncol* 2010; 12(8): 533-42.

[124] Taieb J, Puig PL, Bedenne L. Cetuximab plus FOLFOX-4 for fully resected stage III colon carcinoma: scientific background and the ongoing PETACC-8 trial. *Expert Rev Anticancer Ther* 2008; 8(2): 183-9.

[125] Ocvirk J, Brodowicz T, Wrba F, Ciuleanu TE, Kurteva G, Beslija S, *et al.* Cetuximab plus FOLFOX6 or FOLFIRI in metastatic colorectal cancer: CECOG trial. *World J Gastroenterol* 2010; 16(25): 3133-43.

[126] De Roock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilas G, *et al.* Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol* 2010; 11(8): 753-62.

[127] Scheffzek K, Ahmadian MR, Kabsch W, Wiesmüller L, Lautwein A, Schmitz F, *et al.* The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science* 1997; 277(5324): 333-8.

[128] Pentheroudakis G, Kotoula V, De Roock W, Kouvatsos G, Papakostas P, Makatsoris T, *et al.* Biomarkers of benefit from cetuximab-based therapy in metastatic colorectal cancer: interaction of EGFR ligand expression with RAS/RAF, PIK3CA genotypes. *BMC Cancer* 2013; 13: 49.

- [129] Keating GM. Spotlight on panitumumab in metastatic colorectal cancer. *BioDrugs* 2010; 24(4): 275-8.
- [130] Glimelius B, Pålman L, Cervantes A; ESMO Guidelines Working Group. Rectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2010; 21 Suppl 5: v82-6.
- [131] Velenik V, Anderluh F, Oblak I, Strojan P, Zakotnik B. Capecitabine as a radiosensitizing agent in neoadjuvant treatment of locally advanced resectable rectal cancer: prospective phase II trial. *Croat Med J* 2006; 47(5): 693-700.
- [132] Heath JP. Epithelial cell migration in the intestine. *Cell Biol Int* 1996; 20(2): 139-46.
- [133] van Es JH, van Gijn ME, Riccio O, van den Born M, Vooijs M, Begthel H, *et al.* Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature* 2005; 435(7044): 959-63.
- [134] Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61(5): 759-67.
- [135] Arnold CN, Goel A, Blum HE, Boland CR. Molecular pathogenesis of colorectal cancer: implications for molecular diagnosis. *Cancer* 2005; 104(10): 2035-47.
- [136] Puglisi MA, Tesori V, Lattanzi W, Gasbarrini GB, Gasbarrini A. Colon cancer stem cells: controversies and perspectives. *World J Gastroenterol* 2013; 19(20): 2997-3006.
- [137] Lobo NA, Shimono Y, Qian D, Clarke MF. The biology of cancer stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007; 23: 675-99.
- [138] Dalerba P, Cho RW, Clarke MF. Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med* 2007; 58: 267-84.
- [139] Li F, Tiede B, Massagué J, Kang Y. Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis. *Cell Res* 2007; 17(1): 3-14.
- [140] Boman BM, Wicha MS, Fields JZ, Runquist OA. Symmetric division of cancer stem cells--a key mechanism in tumor growth that should be targeted in future therapeutic approaches. *Clin Pharmacol Ther* 2007; 81(6): 893-8.
- [141] Boman BM, Fields JZ, Cavanaugh KL, Guetter A, Runquist OA. How dysregulated colonic crypt dynamics cause stem cell overpopulation and initiate colon cancer. *Cancer Res* 2008; 68(9): 3304-13.
- [142] Pantic I. Cancer stem cell hypotheses: impact on modern molecular physiology and pharmacology research. *J Biosci* 2011; 36(5): 957-61.

- [143] Peitzsch C, Kurth I, Kunz-Schughart L, Baumann M, Dubrovskaja A. Discovery of the cancer stem cell related determinants of radioresistance. *Radiother Oncol* 2013; 108(3): 378-87.
- [144] Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. *Cancer Staging Handbook: From the AJCC Cancer Staging Manual*: Springer Publishing Company 2010.
- [145] Pilati P, Mocellin S, Bertazza L, Galdi F, Briarava M, Mammano E, *et al*. Prognostic value of putative circulating cancer stem cells in patients undergoing hepatic resection for colorectal liver metastasis. *Ann Surg Oncol* 2012; 19(2): 402-8.
- [146] Humphries A, Wright NA. Colonic crypt organization and tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2008; 8(6): 415-24.
- [147] Li L, Clevers H. Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. *Science* 2010; 327 (5965): 542-5.
- [148] Gulino A, Ferretti E, De Smaele E. Hedgehog signalling in colon cancer and stem cells. *EMBO Mol Med* 2009; 1(6-7): 300-2.
- [149] Potten CS, Gandara R, Mahida YR, Loeffler M, Wright NA. The stem cells of small intestinal crypts: where are they? *Cell Prolif* 2009; 42(6): 731-50.
- [150] Vaiopoulos AG, Kostakis ID, Koutsilieris M, Papavassiliou AG. Colorectal cancer stem cells. *Stem Cells* 2012; 30(3): 363-71.
- [151] Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 1999; 284(5415): 770-6.
- [152] Takebe N, Harris PJ, Warren RQ, Ivy SP. Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog pathways. *Nat Rev Clin Oncol* 2011; 8(2): 97-106.
- [153] Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 2006; 127(3): 469-80.
- [154] Majeti R, Becker MW, Tian Q, Lee TL, Yan X, Liu R, *et al*. Dysregulated gene expression networks in human acute myelogenous leukemia stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(9): 3396-401.
- [155] Roy S, Majumdar AP. Signaling in colon cancer stem cells. *J Mol Signal* 2012; 7(1): 11.
- [156] Liu YS, Hsu HC, Tseng KC, Chen HC, Chen SJ. Lgr5 promotes cancer stemness and confers chemoresistance through ABCB1 in colorectal cancer. *Biomed Pharmacother* 2013; 67(8): 791-9.

- [157] Wang Y, Sharpless N, Chang S. p16INK4 a protects against dysfunctional telomere-induced ATR-dependent DNA damage responses. *J Clin Invest* 2013; 123(10): 4489-501.
- [158] Siddique HR, Saleem M. Role of BMI1, a stem cell factor, in cancer recurrence and chemoresistance: preclinical and clinical evidences. *Stem Cells* 2012; 30(3): 372-8.
- [159] Boman BM, Huang E. Human colon cancer stem cells: a new paradigm in gastrointestinal oncology. *J Clin Oncol* 2008; 26(17): 2828-38.
- [160] Shen Z, Zhan G, Ye D, Ren Y, Cheng L, Wu Z, *et al.* MicroRNA-34a affects the occurrence of laryngeal squamous cell carcinoma by targeting the antiapoptotic gene survivin. *Med Oncol* 2012; 29(4): 2473-80.
- [161] Ding ZY, Liu GH, Olsson B, Sun XF. Upregulation of the antiapoptotic factor Livin contributes to cisplatin resistance in colon cancer cells. *Tumour Biol* 2013; 34(2): 683-93.
- [162] Ling V. Multidrug resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1997; 40 Suppl: S3-8.
- [163] Pawłowski KM, Mucha J, Majchrzak K, Motyl T, Król M. Expression and role of PGP, BCRP, MRP1 and MRP3 in multidrug resistance of canine mammary cancer cells. *BMC Vet Res* 2013; 9: 119.
- [164] Nyskohus LS, Watson AJ, Margison GP, Leu RK, Kim SW, *et al.* Repair and removal of azoxymethane-induced O6-methylguanine in rat colon by O6-methylguanine DNA methyltransferase and apoptosis. *Mutat Res* 2013; 758(1-2): 80-6.
- [165] Haghghi MM, Aghagolzadeh P, Zadeh SM, Molaei M, Zali MR, Radpour R. Telomere Shortening: A Biological Marker of Sporadic Colorectal Cancer with Normal Expression of p53 and Mismatch Repair Proteins. *Genet Test Mol Biomarkers* 2014; 18(4): 236-44.
- [166] Jacinto FV, Esteller M. MGMT hypermethylation: a prognostic foe, a predictive friend. *DNA Repair (Amst)* 2007; 6(8): 1155-60.
- [167] Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, *et al.* Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Research* 1999; 59: 793-797.
- [168] Hegi ME, Liu L, Herman JG, Stupp R, Wick W, Weller M, *et al.* Correlation of O6-Methylguanine Methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *J Clin Oncol* 2008; 26: 4189-4199.

- [169] Esteller M, Risques RA, Toyota M, Capella G, Moreno V, *et al.* Promoter hypermethylation of the DNA repair gene O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase is associated with the presence of G:C to A:T transition mutations in p53 in human colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 2001; 61: 4689-4692.
- [170] Shima K, Morikawa T, Baba Y, Nosho K, Suzuki M, Yamauchi M, *et al.* MGMT promoter methylation, loss of expression and prognosis in 855 colorectal cancers. *Cancer Causes Control* 2011; 22(2): 301-9.
- [171] Esteller M, Toyota M, Sanchez-Cespedes M, Capella G, Peinado MA, *et al.* Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is associated with G to A mutations in K-ras in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 2000; 60: 2368-2371.
- [172] Qi J, Zhu YQ, Huang MF, Yang D. Hypermethylation of CpG island in O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene was associated with K-ras G to A mutation in colorectal tumor. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2022-2025.
- [173] Rosty C, Young JP, Walsh MD, Clendenning M, Sanderson K, *et al.* PIK3CA activating mutation in colorectal carcinoma: associations with molecular features and survival. *PLoS One* 2013; 8: e65479.
- [174] Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, *et al.* MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; 352(10): 997-1003.
- [175] Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, *et al.* Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* 2000; 343(19):1350-4.
- [176] Esteller M, Fraga MF, Paz MF, y cols. Cancer epigenetics and methylation. *Science* 2002; 297:1807-1808.
- [177] He J, Shan Z, Li L, Liu F, Liu Z, Song M, *et al.* Expression of glioma stem cell marker CD133 and O6-methylguanine-DNA methyltransferase is associated with resistance to radiotherapy in gliomas. *Oncol Rep* 2011; 26(5): 1305-13.
- [178] Rivera AL, Pelloski CE, Gilbert MR, Colman H, De La Cruz C, Sulman EP, *et al.* MGMT promoter methylation is predictive of response to radiotherapy and prognostic in the absence of adjuvant alkylating chemotherapy for glioblastoma. *Neuro Oncol* 2010; 12(2): 116-21.
- [179] Salozhin SV, Prokhorchuk EB, Georgiev GP. Methylation of DNA of the Major Epigenetic Markers. *Boichemistry* 2005; 70:525-532.
- [180] Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nature Rev Genet* 2005; 6: 597-610.

- [181] Rodríguez-Dorantes M, Téllez-Ascencio N, Cerbón MA, López M, Cervantes A. DNA methylation: an epigenetic process of medical importance. *Rev Invest Clin* 2004; 56(1): 56-71.
- [182] Chan AO, Broaddus RR, Houlihan PS, Issa JP, Hamilton SR, Rashid A. CpG island methylation in aberrant crypt foci of the colorectum. *Am J Pathol* 2002; 160(5): 1823-30.
- [183] Sinha R, Hussain S, Mehrotra R, Kumar RS, Kumar K, Pande P, *et al.* Kras gene mutation and RASSF1A, FHIT and MGMT gene promoter hypermethylation: indicators of tumor staging and metastasis in adenocarcinomatous sporadic colorectal cancer in Indian population. *PLoS One* 2013; 8(4): e60142.
- [184] Hawkins NJ, Lee JH, Wong JJ, Kwok CT, Ward RL, Hitchins MP. MGMT methylation is associated primarily with the germline C >T SNP (rs16906252) in colorectal cancer and normal colonic mucosa. *Mod Pathol* 2009; 22: 1588–99.
- [185] Ye C, Shrubsole MJ, Cai Q, Ness R, Grady WM, Smalley W, *et al.* Promoter methylation status of the MGMT, hMLH1, and CDKN2A/p16 genes in non-neoplastic mucosa of patients with and without colorectal adenomas. *Oncol Rep* 2006; 16: 429–35.
- [186] Svrcek M, Buhard O, Colas C, Coulet F, Dumont S, Massaoudi I, *et al.* Methylation tolerance due to an O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) field defect in the colonic mucosa: an initiating step in the development of mismatch repair-deficient colorectal cancers. *Gut* 2010; 59: 1516–26.
- [187] Worthley DL, Whitehall VL, Buttenshaw RL, Irahara N, Greco SA, Ramsnes I, *et al.* DNA methylation within the normal colorectal mucosa is associated with pathway-specific predisposition to cancer. *Oncogene* 2010; 29: 1653–62.
- [188] Shen L, Kondo Y, Rosner GL, Xiao L, Hernandez NS, Vilaythong J, *et al.* MGMT promoter methylation and field defect in sporadic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97(18): 1330-8.
- [189] Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(15): 8681-6.
- [190] Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA, *et al.* CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet* 2006; 38(7): 787-93.
- [191] Kohonen-Corish MR, Daniel JJ, Chan C, Lin BP, Kwun SY, Dent OF, *et al.* Low microsatellite instability is associated with poor prognosis in stage C colon cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23(10): 2318-24.

- [192] Kim JC, Choi JS, Roh SA, Cho DH, Kim TW, Kim YS. Promoter methylation of specific genes is associated with the phenotype and progression of colorectal adenocarcinomas. *Ann Surg Oncol* 2010; 17(7): 1767-76.
- [193] Murakami J, Lee YJ, Koikeguchi S, Tsujigiwa H, Asaumi J, Nagatsuka H, *et al.* Depletion of O6-methylguanine-DNA methyltransferase by O6-benzylguanine enhances 5-FU cytotoxicity in colon and oral cancer cell lines. *Oncol Rep* 2007; 17(6): 1461-7.
- [194] Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, Atkins K, Warnke R, Holden JT, *et al.* A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood* 1997; 90: 5013–5021.
- [195] Lehnus KS, Donovan LK, Huang X, Zhao N, Warr TJ, Pilkington GJ, *et al.* CD133 glycosylation is enhanced by hypoxia in cultured glioma stem cells. *Int J Oncol* 2013; 42(3): 1011-7.
- [196] Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, *et al.* AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 1997; 90: 5002–5012.
- [197] Weigmann A, Corbeil D, Hellwig A, Huttner W.B. Prominin, a novel microvilluspecific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 12425–12430.
- [198] Uchida N, Buck DW, He D, Reitsma MJ, Masek M, Phan TV, *et al.* Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 14720–14725.
- [199] Salven P, Mustjoki S, Alitalo R, Alitalo K, Rafii S. VEGFR-3 and CD133 identify a population of CD341 lymphatic/vascular endothelial precursor cells. *Blood* 2003; 101: 168–172.
- [200] Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, *et al.* Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004; 432 (7015): 396-401.
- [201] Wang J, Li ZH, White J, Zhang LB. Lung Cancer Stem Cells and Implications for Future Therapeutics. *Cell Biochem Biophys* 2014; 69(3): 389-98.
- [202] Zhou J, Hu Z, Li Z, Yu P, Wu J, Zheng S. The role of liver cancer stem cells in donor liver allocation for patients with hepatocellular carcinoma. *Postgrad Med* 2013; 125(6): 24-30.
- [203] Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, *et al.* Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell* 2007; 1(3): 313-23.

- [204] O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 2007; 445(7123): 106-10.
- [205] Shmelkov SV, Jun L, St Clair R, McGarrigle D, Derderian CA, Usenko JK, *et al.* Alternative promoters regulate transcription of the gene that encodes stem cell surface protein AC133. *Blood* 2004; 103(6): 2055-61.
- [206] Yu Y, Flint A, Dvorin EL, Bischoff J. AC133-2, a novel isoform of human AC133 stem cell antigen. *J Biol Chem* 2002; 277(23): 20711-6.
- [207] Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, *et al.* Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 2007, 445(4): 111-115.
- [208] Todaro M, Alea MP, Di Stefano AB, Cammareri P, Vermeulen L, Iovino F, *et al.* Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4. *Cell Stem Cell* 2007; 1(4): 389-402.
- [209] Shmelkov SV, Butler JM, Hooper AT, Hormigo A, Kushner J, Milde T, *et al.* CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors. *J Clin Invest* 2008; 118(6): 2111-20.
- [210] Horst D, Kriegel L, Engel J, Kirchner T, Jung A. CD133 expression is an independent prognostic marker for cancer. *Br J Cancer* 2008; 99: 1285-1289.
- [211] Fanali C, Lucchetti D, Farina M, Corbi M, Cufino V, Cittadini A, *et al.* Cancer stem cells in colorectal cancer from pathogenesis to therapy: Controversies and perspectives. *World J Gastroenterol* 2014; 20(4): 923-942.
- [212] Corbeil D, Roper K, Hellwig A, Tavian M, Miraglia S, Watt SM, *et al.* The human AC133 hematopoietic stem cell antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusions. *J Biol Chem* 2000, 275: 5512–5520.
- [213] Röper K, Corbeil D, Huttner WB. Retention of prominin in microvilli reveals distinct cholesterol-based lipid micro-domains in the apical plasma membrane. *Nat Cell Biol* 2000; 2(9): 582-92.
- [214] Corbeil D, Roper K, Fargeas CA, Joester A, Huttner WB. Prominin: a story of cholesterol, plasma membrane protrusions and human pathology. *Traffic* 2001; 2: 82–91.
- [215] Ren F, Sheng WQ, Du X. CD133: a cancer stem cells marker, is used in colorectal cancers. *World J Gastroenterol* 2013; 19(17): 2603-11.

- [216] Jao SW, Chen SF, Lin YS, Chang YC, Lee TY, Wu CC, *et al.* Cytoplasmic CD133 expression is a reliable prognostic indicator of tumor regression after neoadjuvant concurrent chemoradiotherapy in patients with rectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2012; 19(11): 3432-40.
- [217] Saigusa S, Tanaka K, Toiyama Y, Yokoe T, Okugawa Y, Kawamoto A, *et al.* Immunohistochemical features of CD133 expression: Association with resistance to chemoradiotherapy in rectal cancer. *Oncol Rep* 2010; 24(2): 345-50.
- [218] Ong CW, Kim LG, Kong HH, Low LY, Iacopetta B, Soong R, *et al.* CD133 expression predicts for non-response to chemotherapy in colorectal cancer. *Mod Pathol* 2010; 23(3): 450-7.
- [219] Zhu L, Gibson P, Currle DS, Tong Y, Richardson RJ, Bayazitov IT, *et al.* Prominin 1 marks intestinal stem cells that are susceptible to neoplastic transformation. *Nature* 2009; 457(7229): 603-7.
- [220] Kemper K, Sprick MR, de Bree M, Scopelliti A, Vermeulen L, Hoek M, *et al.* The AC133 epitope, but not the CD133 protein, is lost upon cancer stem cell differentiation. *Cancer Res* 2010; 70(2): 719-29.
- [221] Shen L, Kondo Y, Rosner GL, Xiao L, Hernandez NS, Vilaythong J, *et al.* MGMT promoter methylation and field defect in sporadic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 1330–810.
- [222] Chan AO, Broaddus RR, Houlihan PS, Issa JP, Hamilton SR, Rashid A. CpG island methylation in aberrant crypt foci of the colorectum. *Am J Pathol* 2002; 160: 1823–3010.
- [223] Mohammadi M, Bzorek M, Bonde JH. The stem cell marker CD133 is highly expressed in sessile serrated adenoma and its borderline variant compared with hyperplastic polyp. *J Clin Pathol* 2013; 66: 403–8.
- [224] Handra-Luca A, Taconet S. CD133 expression in colorectal adenomas. *J Clin Pathol* 2013; 66: 1097-1098.
- [225] Deng YH, Pu XX, Huang MJ, Xiao J, Zhou JM, Lin TY, *et al.* 5-Fluorouracil upregulates the activity of Wnt signaling pathway in CD133-positive colon cancer stem-like cells. *Chin J Cancer* 2010; 29(9): 810-5.
- [226] Yang Y, Li DL, Zhu WJ, Liu F, Kang MT, Zhao S, *et al.* The effect of 5-fluorouracil on enriching cancer stem cells of hepatoma cell line BEL-7402. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2011; 19(9): 686-91.
- [227] Shi MM, Xiong YL, Jia XS, Li X, Zhang L, Li XL, *et al.* Fluorouracil selectively enriches stem-like cells in the lung adenocarcinoma cell line SPC. *Tumour Biol* 2013; 34(3): 1503-10.

- [228] Liao Y, Hu X, Huang X, He C. Quantitative analyses of CD133 expression facilitate researches on tumor stem cells. *Biol Pharm Bull* 2010; 33(5): 738-42.
- [229] Touil Y, Igoudjil W, Corvaisier M, Dessein AF, Vandomme J, Monté D, *et al.* Colon cancer cells escape 5FU chemotherapy-induced cell death by entering stemness and quiescence associated with the c-Yes/YAP axis. *Clin Cancer Res* 2014; 20(4): 837-46.
- [230] Naka K, Hirao A. Maintenance of genomic integrity in hematopoietic stem cells. *Int J Hematol* 2011; 93(4): 434-9.
- [231] Emmink BL, Verheem A, Van Houdt WJ, Steller EJ, Govaert KM, Pham TV, *et al.* The secretome of colon cancer stem cells contains drug-metabolizing enzymes. *J Proteomics* 2013; 91: 84-96.
- [232] Alisi A, Cho WC, Locatelli F, Fruci D. Multidrug resistance and cancer stem cells in neuroblastoma and hepatoblastoma. *Int J Mol Sci* 2013; 14(12): 24706-25.
- [233] Cordeiro AT, Silva CM, Bartchewsky W, Ribeiro ML, Martinez CA: Evaluation of the expression of the MGMT gene in normal and neoplastic tissue of patients with colorectal cancer. *Rev Col Bras Cir* 2012; 39: 48-53.
- [234] Psofaki V, Kalogera C, Tzambouras N, Stephanou D, Tsianos E, Seferiadis K, *et al.* Promoter methylation status of hMLH1, MGMT, and CDKN2A/p16 in colorectal adenomas. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 3553-3560.
- [235] Farzanehfar M, Vossoughinia H, Jabini R, Tavassoli A, Saadatnia H, Khorashad AK, *et al.* Evaluation of methylation of MGMT (O6-methylguanine-DNA methyltransferase) gene promoter in sporadic colorectal cancer. *DNA Cell Biol* 2013; 32: 371-377.
- [236] Ahlquist T, Lind GE, Costa VL, Meling GI, Vatn M, Hoff GS, *et al.* Gene methylation profiles of normal mucosa, and benign and malignant colorectal tumors identify early onset markers. *Mol Cancer* 2008; 7: 94.
- [237] Kang YP, Cao FA, Chang WJ, Lou Z, Wang H, Wu LL, *et al.* Gene methylation in stool for the screening of colorectal cancer and pre-malignant lesions. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi* 2011; 14: 52-56.
- [238] Nagasaka T, Sharp GB, Notohara K, Kambara T, Sasamoto H, Isozaki H, *et al.* Hypermethylation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter may predict nonrecurrence after chemotherapy in colorectal cancer cases. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 5306-5312.
- [239] Nilsson TK, Löf-Öhlin ZM, Sun XF. DNA methylation of the p14ARF, RASSF1A and APC1A genes as an independent prognostic factor in colorectal cancer patients. *Int J Oncol* 2013; 42: 127-133.

- [240] Mokarram P, Zamani M, Kavousipour S, Naghibalhossaini F, Irajie C, Moradi Sarabi M, *et al.* Different patterns of DNA methylation of the two distinct O6-methylguanine-DNA methyltransferase (O6-MGMT) promoter regions in colorectal cancer. *Mol Biol Rep* 2013; 40: 3851-3857.
- [241] Ishiguro K, Shyam K, Penketh PG, Baumann RP, Sartorelli AC, Rutherford TJ, *et al.* Expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase examined by alkyl-transfer assays, methylation-specific PCR and western blots in tumors and matched normal tissue. *J Cancer Ther* 2013; 4: 919-931.
- [242] Ogino S, Hazra A, Tranah GJ, Kirkner GJ, Kawasaki T, Nosho K, *et al.* MGMT germline polymorphism is associated with somatic MGMT promoter methylation and gene silencing in colorectal cancer. *Carcinogenesis* 2007; 28:1985-1990.
- [243] Park JH, Kim NS, Park JY, Chae YS, Kim JG, Sohn SK, *et al.* MGMT - 535G>T polymorphism is associated with prognosis for patients with metastatic colorectal cancer treated with oxaliplatin-based chemotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010; 136: 1135-1142.
- [244] Schneider M, Huber J, Hadaschik B, Siegers GM, Fiebig HH, Schüler J. Characterization of colon cancer cells: a functional approach characterizing CD133 as a potential stem cell marker. *BMC Cancer* 2012; 12: 96.
- [245] Yang ZL, Zheng Q, Yan J, Pan Y, Wang ZG. Upregulated CD133 expression in tumorigenesis of colon cancer cells. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 932-937.
- [246] Coco C, Zannoni GF, Caredda E, Sioletic S, Boninsegna A, Migaldi M, *et al.* Increased expression of CD133 and reduced dystroglycan expression are strong predictors of poor outcome in colon cancer patients. *J Exp Clin Cancer Res* 2012; 31: 71.
- [247] Reggiani L, Migaldi M, Caredda E, Boninsegna A, Ponz De Leon M, Di Gregorio C, *et al.* Increased expression of CD133 is a strong predictor of poor outcome in stage I colorectal cancer patients. *Scand J Gastroenterol* 2012; 47: 1211-1217.
- [248] Choi D, Lee HW, Hur KY, Kim JJ, Park GS, Jang SH, *et al.* Cancer stem cell markers CD133 and CD24 correlate with invasiveness and differentiation in colorectal adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 2258-2264.
- [249] Kojima M, Ishii G, Atsumi N, Fujii S, Saito N, Ochiai A. Immunohistochemical detection of CD133 expression in colorectal cancer: a clinicopathological study. *Cancer Sci* 2008; 99: 1578-1583.
- [250] Xi HQ, Zhao P. Clinicopathological significance and prognostic value of EphA3 and CD133 expression in colorectal carcinoma. *J Clin Pathol* 2011; 64: 498-503.

[251] Li CY, Li BX, Liang Y, Peng RQ, Ding Y, Xu DZ, *et al.* Higher percentage of CD133+ cells is associated with poor prognosis in colon carcinoma patients with stage IIIB. *J Transl Med* 2009; 7: 56.

[252] Metellus P, Nanni-Metellus I, Delfino C, Colin C, Tchogandjian A, Coulibaly B, *et al.* Prognostic impact of CD133 mRNA expression in 48 glioblastoma patients treated with concomitant radiochemotherapy: a prospective patient cohort at a single institution. *Ann Surg Oncol* 2011; 18: 2937-2945.

[253] Kycler W, Szarzyńska B, Loziński C, Korski K, Lamperska K. Analysis of O6-methylguanine-DNA methyltransferase methylation status in sporadic colon polyps. *Rep Pract Oncol Radiother* 2012; 17(1): 13-8.

[254] Cankovic M, Nikiforova MN, Snuderl M, Adesina AM, Lindeman N, Wen PY, *et al.* The role of MGMT testing in clinical practice: a report of the association for molecular pathology. *J Mol Diagn* 2013; 15(5): 539-55.

[255] Minniti G, Salvati M, Arcella A, Buttarelli F, D'Elia A, Lanzetta G, *et al.* Correlation between O6-methylguanine-DNA methyltransferase and survival in elderly patients with glioblastoma treated with radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide. *J Neurooncol* 2011; 102(2): 311-6.

[256] Ludlum DB. DNA alkylation by the haloethylnitrosoureas: nature of modifications produced and their enzymatic repair or removal. *Mutat Res* 1990; 233 (1-2): 117-26.

[257] Huh JW, Lee JH, Kim HR. Pretreatment Expression of 13 Molecular Markers as a Predictor of Tumor Responses After Neoadjuvant Chemoradiation in Rectal Cancer. *Ann Surg* 2014; 259(3): 508-15.

[258] Saigusa S, Tanaka K, Toiyama Y, Yokoe T, Okugawa Y, Ioue Y, *et al.* Correlation of CD133, OCT4, and SOX2 in rectal cancer and their association with distant recurrence after chemoradiotherapy. *Ann Surg Oncol* 2009; 16(12): 3488-98.

[259] Kawamoto A, Tanaka K, Saigusa S, Toiyama Y, Morimoto Y, Fujikawa H, *et al.* Clinical significance of radiation-induced CD133 expression in residual rectal cancer cells after chemoradiotherapy 2012; 3(3): 403-409.

[260] Yasuda H, Tanaka K, Saigusa S, Toiyama Y, Koike Y, Okugawa Y, *et al.* Elevated CD133, but not VEGF or EGFR, as a predictive marker of distant recurrence after preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer. *Oncol Rep* 2009; 22(4): 709-17.

8. ANEXO

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Prognostic impact of MGMT promoter methylation and MGMT and CD133 expression in colorectal adenocarcinoma

Jaime Antonio Oliver¹, Raúl Ortiz^{1,2,3}, Consolación Melguizo^{1,3,4*}, Pablo Juan Álvarez^{1,3}, Jaime Gómez-Millán⁵ and Jose Prados^{1,3,4}

Abstract

Background: New biomarkers are needed for the prognosis of advanced colorectal cancer, which remains incurable by conventional treatments. O⁶-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) methylation and protein expression have been related to colorectal cancer treatment failure and tumor progression. Moreover, the presence in these tumors of cancer stem cells, which are characterized by CD133 expression, has been associated with chemoresistance, radioresistance, metastasis, and local recurrence. The objective of this study was to determine the prognostic value of CD133 and MGMT and their possible interaction in colorectal cancer patients.

Methods: MGMT and CD133 expression was analyzed by immunohistochemistry in 123 paraffin-embedded colorectal adenocarcinoma samples, obtaining the percentage staining and intensity. MGMT promoter methylation status was obtained by using bisulfite modification and methylation-specific PCR (MSP). These values were correlated with clinical data, including overall survival (OS), disease-free survival (DFS), tumor stage, and differentiation grade.

Results: Low MGMT expression intensity was significantly correlated with shorter OS and was a prognostic factor independently of treatment and histopathological variables. High percentage of CD133 expression was significantly correlated with shorter DFS but was not an independent factor. Patients with low-intensity MGMT expression and $\geq 50\%$ CD133 expression had the poorest DFS and OS outcomes.

Conclusions: Our results support the hypothesis that MGMT expression may be an OS biomarker as useful as tumor stage or differentiation grade and that CD133 expression may be a predictive biomarker of DFS. Thus, MGMT and CD133 may both be useful for determining the prognosis of colorectal cancer patients and to identify those requiring more aggressive adjuvant therapies. Future studies will be necessary to determine its clinical utility.

Keywords: Colorectal cancer, MGMT, CD133, Methylation status, Biomarker, Overall survival, Disease free-survival

Background

According to the World Health Organization (WHO), colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer in males and the second in females and is the fourth cause of cancer death. The WHO expects an increase in CRC incidence and mortality, with estimates of around 1,471,808 newly diagnosed patients and 726,028 deaths worldwide in 2015 [1]. Almost all (95%) of these new

CRCs are likely to be adenocarcinomas and, despite recent advances in detection and therapy, 25% of these patients will develop metastasis and have a very low 5-year survival rate of around 10% [2,3]. New biomarkers of CRC are needed to permit an earlier diagnosis and to predict the response to treatment.

Screening for the early detection of CRC is the most effective approach against this disease [4]. Carcinoembryonic antigen (CEA) is recommended as a biomarker to detect spread of the cancer and to follow up CRC patients. However, in the diagnosis of early CRC it has major limitations such as low sensitivity and specificity (36% and 87% respectively). In addition, until a rate of

* Correspondence: melguizo@ugr.es

¹Institute of Biopathology and Regenerative Medicine (IBIMER), University of Granada, Granada 18100, Spain

³Biosanitary Institute of Granada (ibs.GRANADA), SAS-Universidad de Granada, Granada, Spain

Full list of author information is available at the end of the article

16% may be false positives [5,6]. Novel biomarkers such as O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) and CD133 have been proposed as useful tools for the diagnosis, prognosis, and follow-up of CRC and for the detection of relapse [7]. MGMT is a DNA repair protein that removes O⁶-guanine adducts from DNA [8]. MGMT restores mutagenic O⁶-methylguanine to guanine in normal colonic tissue, preventing DNA alkylation damage [9]. MGMT hypermethylation in CpG islands and low MGMT protein expression appear to be early events in CRC patients. This MGMT epigenetic silencing may lead to G:C to A:T transition mutations in *p53* [10], *K-ras* [11-13], *PIK3CA* [11,14], and *hMLH1* [15], among others. Furthermore, CD133, a transmembrane glycoprotein related to cell-cell interaction and signal transduction, has been associated with cancer stem cells (CSCs), including those in CRC [16]. This CSC subpopulation represents a small number of tumor cells that can self-renew indefinitely and recreate parent tumor cells expressing different surface biomarkers [17]. This marker permits the hierarchical organization of tumor heterogeneity, dividing CRC cells between CD133-positive (CSCs) and CD133-negative cells (non-CSCs) cells [18]. CD133-positive CRC cells have shown special properties, including the capacity to form tumors in xenografts [19], chemo- and radioresistance [20,21], and metastasis promotion [22,23]. Previous studies associated CSC chemo/radio-resistance to MGMT expression in other cancers [24-26].

The aim of the present study was to analyze the clinical implications of MGMT and CD133 in CRC and the possible interactions between them in order to develop a new prognostic biomarker for these patients. Immunohistochemical analysis of MGMT and CD133 expression was carried out in colorectal cancer samples from 123 patients, and MGMT methylation status was determined by methylation-specific PCR (MSP). The expression pattern of the two molecules and MGMT methylation status were correlated with overall survival (OS), disease-free survival (DFS), tumor stage, and differentiation grade, among others. MGMT expression intensity and percentage CD133 expression may be clinically useful for CRC prognosis, but this does not appear to be the case for MGMT methylation status or CD133 expression intensity.

Methods

Clinical tissue samples

In this cross-sectional study (case-series design), colorectal adenocarcinoma samples were obtained from patients at three hospitals in Southern Spain (Puerta del Mar Hospital, Cádiz; Puerto Real Hospital, Cádiz; and San Cecilio Hospital, Granada) between 2004 and 2009. Clinical data of the patients were obtained from the hospital records. Written informed consent was obtained from all patients and controls before their enrolment in

the study. The study protocol was approved by the Biomedical Investigation Ethic Committee (Consejería de Salud; Servicio Andaluz de Salud). Paraffin-embedded tumor specimens were obtained from 123 CRC patients. The differentiation grade and tumor stage were determined according to standard histopathological criteria by two expert pathologists [27]. DNA extraction and analysis, MGMT methylation status test, tissue microarray (TMA) construction, and MGMT and CD133 immunohistochemical analyses were performed in samples from each specimen. None of the patients had received any pre-operative treatment. After the tumor resection, most patients had been treated with chemotherapy (5-fluorouracil [5-FU], oxaliplatin, and/or irinotecan) and/or radiotherapy according to their clinical characteristics.

DNA extraction, bisulfite treatment, and methylation-specific PCR

DNA was extracted from waxed tissue samples by using the Chemagic MSM I robot (Chemagen, Germany, Baesweiler) in accordance with the manufacturer's standard recommendations. Determination of methylation patterns in MGMT promoter CpG islands was based on the chemical modification of unmethylated (but not methylated) cytosine to uracil. MSP was performed with specific primers for either methylated or unmethylated DNA, as previously described [10]. Briefly, a 2- μ g DNA sample was denatured with sodium hydroxide, modified with sodium bisulfite, and then purified (EpiTect Bisulfite kit, Qiagen, USA, Maryland). Primer sequences were 5'-TTTGTGTTTTGATGTTTGTAGGTTTTTGT-3' (forward primer) and 5'-AACTCCACACTCTTCCAAAAACAAAACA-3' (reverse primer) for the unmethylated (UM) reaction and were 5'-TTTCGACGTTCTAGGTTTTTCGC-3' (forward primer) and 5'-GCACTCTTCCGAAAA CGAAACG-3' (reverse primer) for the methylated (M) reaction. PCR-amplified products were electrophoresed on 3% agarose gels, visualized by staining with ethidium bromide, and examined under UV illumination. A sample was classified as hypermethylated when the methylation amplification product alone was observed, partially methylated when both methylated and unmethylated amplification products were seen, and unmethylated when it showed unmethylated amplification products alone. For the statistical analysis, the hypermethylated and partially methylated samples were considered as the methylated (M) group and compared with the unmethylated (UM) group.

Immunohistochemistry

Formalin-fixed paraffin-embedded CRC tumor samples were used in the construction of TMAs. Briefly, four representative areas were selected from whole hematoxylin-eosin tissue sections of each adenocarcinoma specimen.

Cores with diameter of 1 mm were placed 0.8 mm apart in a grid layout using a Manual Tissue Microarrayer (Beecher Instruments, Silver Spring, MD). The resulting tissue microarray blocks were cut into 5- μ m sections with a microtome, placed on slides by the adhesive tape-transfer method (Instrumedics, Inc., Hackensack, NJ), and UV cross-linked. TMA dewaxing, rehydration, epitope recovery, and all staining procedures were performed at the same time with the DakoAutostainer EnVision™ FLEX kit (Dako, Barcelona, Spain) using antibodies against MGMT (1:50, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Germany) and CD133 (1:50, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). The antibodies were incubated with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) substrate-chromogen, resulting in a brown-colored precipitate at the antigen site, and cell nuclei were visualized with hematoxylin (blue) counterstaining; nerve tissue was used as a positive control [28]. The readings were done by two experienced pathologists under light microscopy. In the most of specimens, there weren't significant differences between observers and sample punches. Furthermore, the patients with heterogeneous staining for any antibody were not included in this study. The MGMT staining of tumor cells was scored and grouped as low expression (<50%) (-, +, and ++ scores) and high expression (\geq 50%) (+++ and ++++ scores). CD133 staining of tumor glands was classified as 0%, <50%, or \geq 50%; CD133 staining on the apical and/or endoluminal surface of tumor glands and/or on cell debris was considered positive, in accordance with previous studies [29]. For the statistical analysis, CD133 expression was considered in two categories: low (<50%) or high (\geq 50%). The intensity of MGMT and CD133 staining was scored as low or high. Thereby, percentage only consider number of cells or tumor glands stained for MGMT and CD133 independently to dye distribution; moreover, intensity was scored high when nucleus or tumor glands were completely stained and low when showed partially or lack of staining regardless of number of cells or tumor glands stained.

Statistical analysis

Contingency tables and associations were analyzed with the chi-square (χ^2) test and Fisher's exact test. DFS (time elapsed between diagnosis and disease recurrence) and OS (time between diagnosis and death) curves were estimated with the Kaplan-Meier method. A two-sided log-rank test was used to determine significant differences between independent curves and patient groups. Significant prognostic factors associated with DFS and/or OS were identified by applying the Cox proportional hazards model, which was constructed using the most relevant molecular, histopathological, and treatment variables. SPSS version 15.0 was used for the data analyses; $p < 0.05$ was considered significant.

Results

Patient characteristics

Table 1 summarizes the characteristics of the 123 patients in the study (65% males, 35% females); the mean (\pm standard deviation) age was 71.73 ± 10.57 yrs (range, 40 to 93 yrs). The tumor was in stage III in 40.2% (49/122) of patients and the differentiation grade was moderate in 50.4% (59/117). At the most recent follow up, 17.8% (18/101) of the patients had died due to the colorectal adenocarcinoma and 41.9% (44/105) of the patients did not respond to treatment, evidencing local or distal recurrence. The follow-up period ranged between 2 and 93 months. The mean OS of the whole sample was 40.20 ± 22.09 months and the mean DFS was 35.98 ± 24.75 months.

MGMT promoter methylation status and MGMT expression

Table 2 summarizes the molecular characteristics of the patients. MGMT promoter methylation status could be

Table 1 Clinical characteristics of colon adenocarcinoma patients

Feature	Classification	n (%)
Sex	Male	80 (65)
	Female	43 (35)
Age	\geq 50 years	116 (94.3)
	<50 years	7 (5.7)
Tumor differentiation grade	Well differentiated	37 (31.6)
	Moderately differentiated	59 (50.4)
	Poorly differentiated	21 (17.9)
Tumor stage	I	14 (11.5)
	II	44 (36.1)
	III	49 (40.2)
	IV	15 (12.3)
Radiotherapy treatment	Did not receive radiotherapy	96 (87.3)
	Received radiotherapy	14 (12.7)
Chemotherapy treatment	Did not receive chemotherapy	47 (38.8)
	Received chemotherapy	74 (61.2)
Treatment	No chemotherapy or radiotherapy	40 (36.4)
	Some treatment	70 (63.6)
Treatment response	Response	61 (58.1)
	No response	44 (41.9)
Last follow-up status	Alive without disease	66 (65.3)
	Alive with disease	17 (16.8)
	Disease progression and death	18 (17.8)

Sample size for sex and age (n = 123), for tumor differentiation grade (n = 117), for tumor stage (n = 122), for radiotherapy treatment (n = 110), for chemotherapy treatment (n = 121), for a treatment (n = 110), for treatment response (n = 105) and last follow-up status (n = 101).

Table 2 Molecular characteristics of colon adenocarcinoma patients

Feature	Classification	n (%)
MGMT methylation status	Unmethylated	24 (21.8)
	Methylated	86 (78.2)
Percentage MGMT expression	Low	55 (48.2)
	High	59 (51.8)
MGMT expression intensity	Low	30 (26.3)
	High	84 (73.7)
Percentage CD133 expression	Low	52 (47.3)
	High	58 (52.7)
CD133 expression intensity	Low	70 (63.6)
	High	40 (36.4)

Sample size for MGMT methylation status (n = 110), for percentage MGMT expression (n = 114), MGMT expression intensity (n = 114), percentage CD133 expression (n = 110), and CD133 expression intensity (n = 110).

determined in 89.4% (110/123) of the tumors; PCR amplification was unsuccessful or evaluation was not possible in the remaining 13 specimens. The M group included 78.2% of the 110 cases and the UM group 21.8%. Out of the M group, 75.6% showed partial methylation (amplification with UM and M primers) and 24.4% hypermethylation (amplification with M primer alone) (Figure 1).

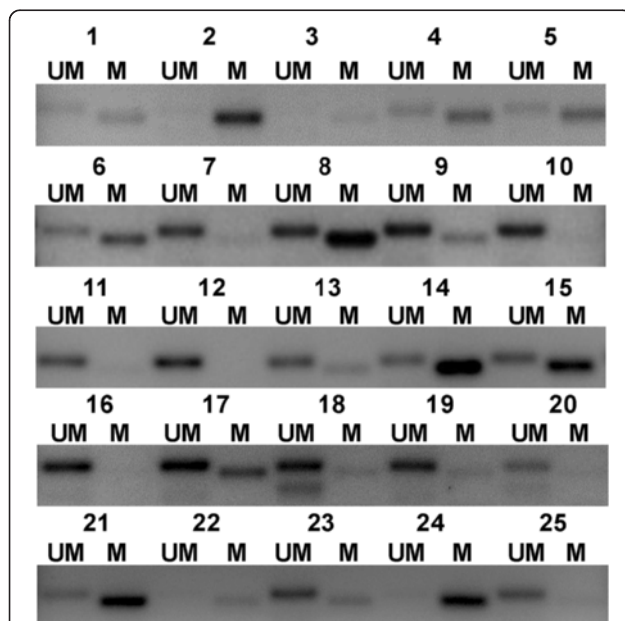


Figure 1 Methylation-specific PCR analysis of the MGMT promoter in colorectal adenocarcinoma tissue samples.

Representative image showing MGMT promoter methylation study of 25 of the 110 analyzed patients. Partially-methylated patients showed amplification of both UM and M lanes. Hypermethylated patients showed only amplification of M lane. Unmethylated (UM) patients showed lack of M lane.

MGMT staining was always nuclear in colorectal adenocarcinoma gland cells and always detected in surrounding tissue (Figure 2). Data on the percentage MGMT expression were available for 92.7% (114/123) of the patients. Out of these 114 cases, no expression was observed in 15.8%, and expression was scored as + in 2.6%, ++ in 29.8%, +++ in 43.9%, and ++++ in 7.9% (Figure 2); hence, low (<50%) MGMT expression was observed in 48.2% of cases and high expression (≥50%) in 51.8%. No association was found between percentage MGMT expression and MGMT promoter methylation status (Additional file 1: Table S1). A low intensity of MGMT expression was observed in 26.3% of the 114 patients and a high intensity in 73.7% (Figure 2). A significant association was found between low MGMT expression intensity and MGMT promoter methylated (M) (Additional file 1: Table S1). An association was observed between poor-tumor differentiation grade and methylated MGMT promoter (M) (Additional file 2: Table S2).

Influence of MGMT promoter methylation status and MGMT protein expression on overall survival and disease-free survival

The mean OS was 61.36 months in patients with low-intensity MGMT expression *versus* 77.48 months in those with high-intensity MGMT expression (Table 3); the correlation between OS and MGMT expression intensity was significant ($p < 0.01$) (Figure 3). MGMT expression intensity was a prognostic factor for OS after adjusting for treatment and histopathology variables (Table 4). No significant correlation was found between OS and MGMT promoter methylation status or percentage MGMT expression (Table 3). No significant correlation was observed between DFS and MGMT methylation status, MGMT expression intensity, or percentage MGMT expression (Table 3).

CD133 protein expression

CD133 expression results were available for 110 (89.4%) of the patients (Table 2). CD133 expression was detected on the endoluminal surface of tumor glands and on cell debris; no staining was observed in other tumor regions or in normal tissues. Out of the 110 specimens analyzed, the staining was scored as 0% in 12.7%, <50% in 34.6%, and ≥50% in 52.7% (Figure 4). In addition, 36.4% of the 110 patients had a high-intensity CD133 expression and 63.6% a low-intensity expression (Figure 4). An association was observed between no treatment response and high CD133 percentage expression (Additional file 3: Table S3).

Influence of CD133 protein expression on overall survival and disease-free survival

OS was not significantly associated with CD133 protein expression intensity or percentage (Table 3). However, a

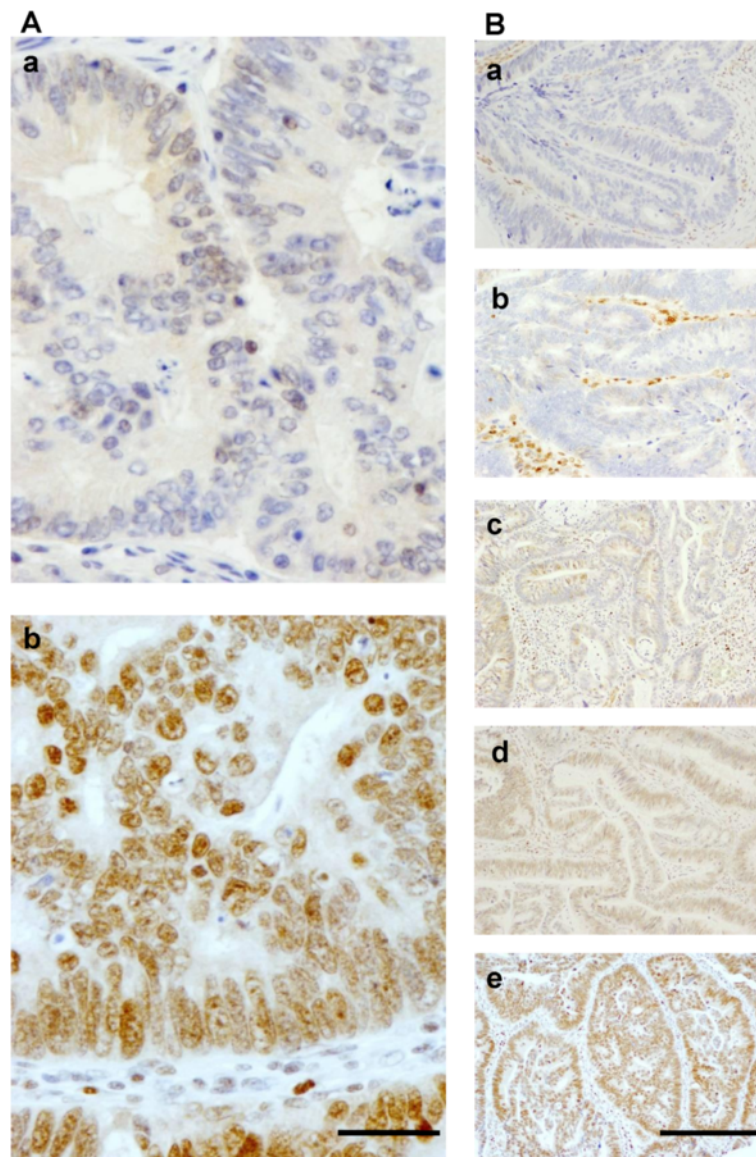


Figure 2 Immunohistochemical MGMT staining in colorectal adenocarcinoma tissue samples. (A) Representative photomicrographs of TMA punches illustrating low (a) and high (b) MGMT expression intensity; bar, 50 μ m. (B) Photomicrographs of TMA punches illustrating different percentages MGMT expression levels: negative (a), <50% (b and c) and \geq 50% (d and e); bar, 200 μ m.

statistically significant correlation ($p < 0.05$) was observed between DFS and percentage CD133 expression (Figure 3), with a mean DFS of 67.91 months in those with low (<50%) expression *versus* 46.01 months in those with higher (\geq 50%) CD133 expression (Table 3). The tumor stage was also correlated with DFS (Table 3). The multi-variable analysis results showed that CD133 protein expression was not an independent prognostic factor (Table 4).

MGMT and CD133 interactions and clinical influence

No significant association was found between MGMT promoter methylation or MGMT expression percentage/

intensity and CD133 expression percentage/intensity (Additional file 1: Table S1). CD133 expression percentage and MGMT intensity could be compared in 109 patients. Among the patients with low MGMT intensity, CD133 expression percentage was low in 42.9% and high in 57.1%. Among the patients with high MGMT intensity, CD133 expression percentage was low in 48.1% and high in 51.9%.

Study of the potential relationship of MGMT intensity and percentage CD133 expression with clinical outcome variables (Figure 3) revealed a significant correlation with OS but no significant correlation with DFS (Table 3). The patients with low-intensity MGMT expression and high

Table 3 Interaction of overall survival (OS) and disease-free survival (DFS) with histopathological variables

Variables		OS		DFS	
		Mean (95% CI)	p value	Mean (95% CI)	p value
Sex	Male	72.08 (62.61-81.55)	0.103	52.15 (42.12-62.18)	0.179
	Female	79.52 (71.55-87.50)		61.00 (49.16-72.85)	
Differentiation grade	Well-moderate	77.62 (70.03-85.21)	0.408	56.25 (47.45-65.06)	0.649
	Poor	64.14 (48.53-79.75)		56.50 (38.35-74.64)	
Tumor stage	I-II	80.75 (71.71-89.78)	0.167	70.31 (59.84-80.78)	0.002*
	III-IV	68.89 (58.72-79.05)		42.44 (32.30-52.58)	
MGMT methylation status	Unmethylated	73.54 (65.17-81.90)	0.398	49.87 (34.54-65.20)	0.949
	Methylated	76.07 (67.82-84.32)		57.33 (47.55-67.12)	
Percentage MGMT expression	Low	70.53 (60.02-81.05)	0.211	50.77 (39.35-62.20)	0.328
	High	77.04 (69.58-84.50)		58.62 (48.37-68.87)	
MGMT expression intensity	Low	61.36 (45.99-76.72)	0.006*	47.76 (32.80-62.71)	0.171
	High	77.48 (70.75-84.21)		56.43 (47.39-65.47)	
Percentage CD133 expression	Low	82.03 (72.97-91.10)	0.273	67.91 (56.68-79.14)	0.014*
	High	70.41 (61.33-79.50)		46.01 (35.06-56.97)	
CD133 expression intensity	Low	77.90 (69.39-86.41)	0.642	59.76 (49.62-69.89)	0.517
	High	78.00 (67.92-88.08)		53.74 (39.44-68.05)	
High MGMT intensity	CD133 ≥ 50%	73.06 (63.99-82.14)	0.032*	49.14 (36.25-62.04)	0.140
	CD133 < 50%	72.33 (61.82-82.84)		57.08 (44.64-69.51)	
Low MGMT intensity	CD133 ≥ 50%	52.36 (30.53-74.19)		37.85 (18.87-56.83)	
	CD133 < 50%	69.50 (45.88-93.11)		64.50 (41.41-87.59)	

Statistically significant variables (*p < 0.05). CI, confidence interval.

(≥50%) CD133 expression had the worst OS (52.36 months) and DFS (37.85 months) outcomes (Table 3).

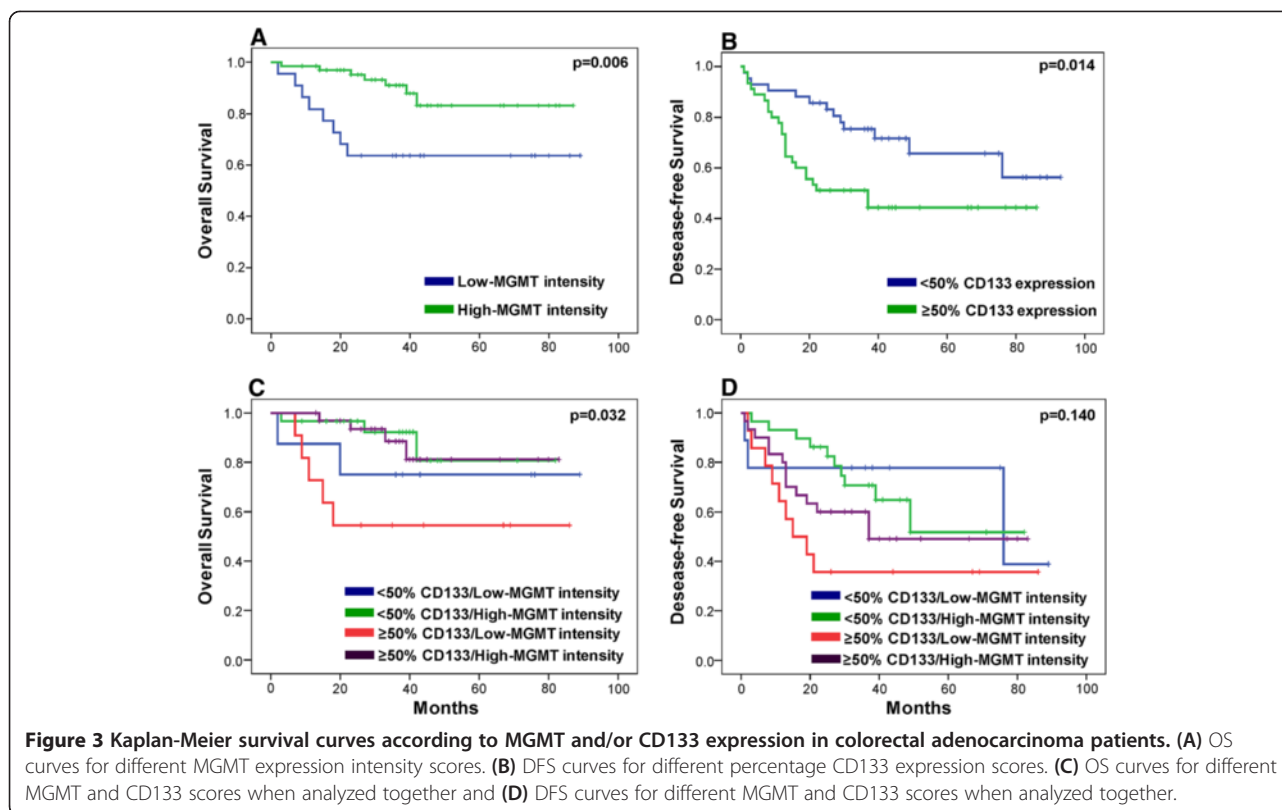
Discussion

In this study of tumors from CRC patients, methylated MGMT promoter was significantly associated with low MGMT expression intensity and poor-differentiation grade but not with OS, DFS, or tumor stage. High MGMT expression intensity was correlated with longer OS but not with DFS, tumor stage, or differentiation grade. High percentage of CD133 expression was correlated with shorter DFS but not with OS, tumor stage, or differentiation grade. MGMT expression intensity can be considered as an independent prognostic factor for OS, but the influence of percentage CD133 expression on the prognosis for DFS also depends on the tumor stage.

The relevance of MGMT in CRC carcinogenesis is widely accepted, and reduced MGMT expression has been documented in tumor *versus* normal colon tissue [30]; however, the mechanism by which MGMT expression is controlled remains controversial. Lee *et al.* [31] observed hypermethylated genes, including MGMT, in early stages of colorectal adenoma, and MGMT promoter methylation has been implicated in colon cancer progression (in the adenoma-carcinoma sequence) [31,32]. Sinha

et al. [33] demonstrated that MGMT promoter methylation was associated with tumor stage, metastasis, and lymphatic invasion in advanced CRC. Various authors have reported the effects of MGMT inactivation on other cancer-related genes. It has been found that the epigenetic silencing of MGMT by promoter hypermethylation can lead to G:C to A:T transition mutations in *p53* [10], *K-ras* [11-13], and *PIK3CA* [11,14], facilitating progression of the tumor to more advanced stages.

Based on the above data, research efforts have focused on the diagnostic and prognostic relevance of MGMT. Various authors have reported that MGMT methylation is a useful marker to detect early stages of CRC [34,35]. Kang *et al.* [36] concluded that a more sensitive screening can be achieved by testing the DNA methylation status of some genes, including MGMT, than by analyzing fecal blood. In addition, Nagasaka *et al.* [37] and Nilsson *et al.* [38] suggested that MGMT hypermethylation in CRC may be related to non-recurrence after chemotherapy and better survival. Experimental data support this possibility, because 5-FU cytotoxicity was enhanced by O6-benzylguanine-induced MGMT depletion in colon cancer cells with high MGMT expression. It was suggested that elevated MGMT levels may be a marker of a low therapeutic response [39], and MGMT hypermethylation



was associated with a better prognosis in CRC patients [38]. In contrast, Shima *et al.* [11] found no significant correlation between MGMT promoter status and survival and suggested that this status has little clinical relevance. Our results showed a significant association of methylated MGMT promoter with low-MGMT expression intensity and poor-differentiation grade. However, no correlation was found between MGMT methylation and OS or DFS in CRC patients, whereas high MGMT intensity was correlated with longer OS but not with tumor grade or differentiation. These contradictory results may be related to the multifactorial and complex regulation of MGMT protein expression. Two distinct patterns of MGMT methylation have been associated with different mutations or

epigenetic changes in CRC [40], and methylation is not the sole regulatory mechanism of MGMT protein levels [41]. Some MGMT polymorphisms may reduce MGMT activity and/or sensitivity [42,43] and have been associated with progression-free survival in CRC patients [44]. Despite MGMT hypermethylation or lack of MGMT protein has been associated with a better treatment response and survival at short-term [37-39], the epigenetic silencing of MGMT promotes different mutations [10-14] which could facilitate the tumor progression reducing the overall survival at long-term.

CD133 is widely recognized as a stem cell biomarker in normal and cancer colon tissue [45-47]. Its expression was detected in around half of a series of precancerous

Table 4 Multivariate analysis: cox proportional hazards model for OS and DFS

Variables	OS		DFS	
	HR (CI)	p value	HR (CI)	p value
Sex (male/female)	2.69 (0.77-9.34)	0.118	1.56 (0.80-3.05)	0.186
Differentiation grade (well-moderate/poor)	0.62 (0.20-1.93)	0.412	1.24 (0.48-3.17)	0.652
Tumor grade (I-II/III-VI)	0.50 (0.18-1.35)	0.175	0.38 (0.19-0.73)	0.004*
Radiotherapy (no/yes)	0.41 (0.13-1.27)	0.123	0.64 (0.29-1.41)	0.276
Chemotherapy (no/yes)	0.48 (0.16-1.49)	0.210	0.50 (0.25-0.99)	0.049*
MGMT expression intensity (low/high)	3.73 (1.35-10.33)	0.011*	1.55 (0.81-2.99)	0.182
Percentage CD133 expression (low/high)	0.54 (0.18-1.65)	0.280	0.44 (0.22-0.86)	0.018*

HR, Hazard ratio. CI, confidence interval. Statistically significant variables (*p < 0.05).

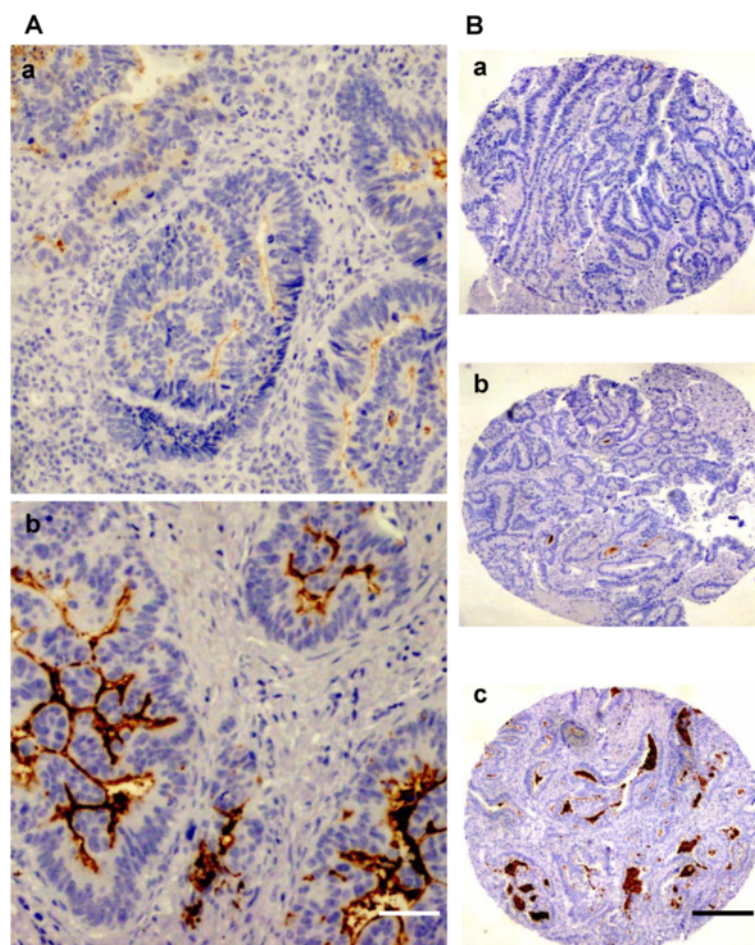


Figure 4 Immunohistochemical CD133 staining in colorectal adenocarcinoma tissue samples. (A) Representative photomicrographs of TMA punches illustrating low (a) and high (b) CD133 expression intensity; bar, 50 μ m. (B) Photomicrographs of TMA punches illustrating different percentage CD133 expression levels: negative (a), <50% (b), \geq 50% (c); bar, 200 μ m.

colon adenomas [48] and was found to be pronounced in invasive margins of colorectal tumors [29]. Other authors reported that CD133 expression is not restricted to intestinal stem or cancer-initiating cells and that both CD133-positive and CD133-negative cells can initiate a tumor [47]. In the present study, the high percentage of CD133 expression was correlated with shorter DFS but not with OS, tumor stage, or differentiation grade in CRC patients, suggesting that this molecule may be relevant to determine recurrence. These findings are consistent with the study by Coco *et al.* [49], who found a higher risk of recurrence and death in CRC patients with increased CD133 levels. Reggiani *et al.* [50] concluded that CD133 is useful for the prognosis in stage I CRC patients and for the selection of patients requiring adjuvant treatment. Moreover, Jao *et al.* [51] correlated cytoplasmic CD133 expression with tumor local recurrence and survival in CRC patients. However, a similar study found no correlation between cytoplasmic CD133 and patient survival [52], while Kojima *et al.* [53] observed

no differences in DFS between CD133-positive and -negative patients, although they considered CD133 over-expression to be a risk factor in patients with well- and moderately-differentiated adenocarcinomas. CD133 expression on cell debris and the endoluminal surface has also been proposed as CRC biomarker. Horst *et al.* [29] found a significant correlation between endoluminal surface CD133 expression and low survival in CRC patients, while Xi *et al.* [54] reported that CD133 expression in membrane and cytoplasm of cells on the luminal surface of cancerous glands was of prognostic value in CRC patients. All these results are supported by CD133 mRNA studies too. Saigusa *et al.* [55] observed correlation between CD133 mRNA expression and survival and distant recurrence in rectal patients. Further, Kawamoto *et al.* [56] associated recurrence and short DFS with higher CD133 RNAm levels. Similar results observed Yasuda *et al.* [57].

The comparison of results among studies is hampered by methodological differences. Thus, CD133 staining

patterns were found to differ in CRC between the use of AC133 (Miltenyi Biotech) and Ab19898 (Abcam) monoclonal antibodies [49] and among the application of anti-CD133 (Cell Signalling), AC133 (Miltenyi Biotech), and polyclonal anti-CD133 (Santa Cruz Biotechnology) antibodies [29]. These staining variations were confirmed in previous glioblastoma studies [58]. In addition, whereas some authors compared cell cytoplasm staining between patients with less and more than 5% CD133 positive cells [49,54,59], others compared the number of CD133-stained glands between patients with less and more than 50% positive glands [29].

Finally, MGMT expression or methylation status has been related to radio-chemo/resistance in the CSC population in some tumors such as glioma [24-26]. He *et al.* [25] reported that patients with methylated MGMT promoter and high CD133 expression had the worst progression-free survival. In contrast, Metellus *et al.* [26] observed shorter OS and progression-free survival in patients with unmethylated MGMT and high CD133 expression. In the present study, no significant association was found between MGMT and CD133 in CRC patients. However, consistent with the findings of He *et al.* [25], DFS and OS outcomes were worse in patients with low MGMT expression intensity and $\geq 50\%$ CD133 expression.

Conclusions

Our study evidences the relevance of MGMT and CD133 in the clinical outcome of CRC patients. High MGMT expression intensity was correlated with longer overall survival, while high percentage of CD133 expression was related to shorter-recurrence time lapse. Hence, the intensity of MGMT protein expression and the percentage CD133 protein expression may help to identify patients who need a more aggressive adjuvant therapy.

Additional files

Additional file 1: Tables S1. Association between molecular variables.

Additional file 2: Tables S2. Association between histopathological and MGMT molecular variables.

Additional file 3: Tables S3. Association between histopathological variables and CD133 protein expression.

Abbreviations

MGMT: O⁶-methylguanine DNA methyltransferase; WHO: World health organization; MSP: Methylation-specific PCR; OS: Overall survival; DFS: Disease-free survival; CRC: Colorectal cancer; CEA: Carcinoembryonic antigen; CSCm: Cancer stem cells; TMA: Tissue microarray; 5-FU: 5-fluorouracil; M: Methylated; UM: Unmethylated; DAB: 3,3'-diaminobenzidine (DAB); HR: Hazard ratio; CI: Confidence interval.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

Conceived and designed the experiments: CM, JP, RO. Performed the experiments: JAO, RO, CM. Analyzed the data: JAO, RO, CM, PJA, JGM. Wrote the paper: JAO, CM, JP. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This study was supported by FEDER, Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (I + D + I), Instituto de Salud Carlos III (FIS) through Project no. PI11/01862 and by the Consejería de Salud de la Junta de Andalucía through Project no. PI-0338. The authors are grateful to the Biobank of the Andalusian Public Healthcare System (Granada, Spain) for invaluable assistance.

Author details

¹Institute of Biopathology and Regenerative Medicine (IBIMER), University of Granada, Granada 18100, Spain. ²Department of Health Sciences, University of Jaén, Jaén 23071, Spain. ³Biosanitary Institute of Granada (ibs.GRANADA), SAS-Universidad de Granada, Granada, Spain. ⁴Department of Anatomy and Embryology, University of Granada, Granada 18012, Spain. ⁵Radiation Oncology Department, Hospital Clínico Universitario Virgen de la Victoria, Málaga 29010, Spain.

Received: 8 May 2014 Accepted: 7 July 2014

Published: 11 July 2014

References

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F: **GLOBOCAN 2012 v1.0, cancer incidence and mortality worldwide: IARC cancer base no. 11.** <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>.
2. Van Cutsem E, Köhne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, D'Haens G, Pintér T, Lim R, Bodoky G, Roh JK, Folprecht G, Ruff P, Stroh C, Tejpar S, Schlichting M, Nippgen J, Rougier P: **Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer.** *N Engl J Med* 2009, **360**:1408-1417.
3. Labianca R, Merelli B: **Screening and diagnosis for colorectal cancer: present and future.** *Tumori* 2010, **96**:889-901.
4. American Cancer Society: **Cancer facts and figures 2013.** Atlanta, Ga: American Cancer Society; 2013.
5. Peng Y, Wang L, Gu J: **Elevated preoperative carcinoembryonic antigen (CEA) and Ki67 is predictor of decreased survival in IIA stage colon cancer.** *World J Surg* 2013, **37**:208-213.
6. McKeown E, Nelson DW, Johnson EK, Maykel JA, Stojadinovic A, Nissan A, Avital I, Brücher BL, Steele SR: **Current approaches and challenges for monitoring treatment response in colon and rectal cancer.** *J Cancer* 2014, **5**:31-43.
7. Duffy MJ, van Dalen A, Haglund C, Hansson L, Klapdor R, Lamerz R, Nilsson O, Sturgeon C, Topolcan O: **Clinical utility of biochemical markers in colorectal cancer: European group on tumour markers (EGTM) guidelines.** *Eur J Cancer* 2003, **39**:718-727.
8. Pegg AE, Dolan ME, Moschel RC: **Structure, function, and inhibition of O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase.** *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1995, **51**:167-223.
9. Jacinto FV, Esteller M: **MGMT hypermethylation: a prognostic foe, a predictive friend.** *DNA Repair (Amst)* 2007, **6**:1155-1160.
10. Esteller M, Rissnes RA, Toyota M, Capella G, Moreno V, Peinado MA, Baylin SB, Herman JG: **Promoter hypermethylation of the DNA repair gene O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase is associated with the presence of G: C to A:T transition mutations in p53 in human colorectal tumorigenesis.** *Cancer Res* 2001, **61**:4689-4692.
11. Shima K, Morikawa T, Baba Y, Noshio K, Suzuki M, Yamauchi M, Hayashi M, Giovannucci E, Fuchs CS, Ogino S: **MGMT promoter methylation, loss of expression and prognosis in 855 colorectal cancers.** *Cancer Causes Control* 2011, **22**:301-309.
12. Esteller M, Toyota M, Sanchez-Céspedes M, Capella G, Peinado MA, Watkins DN, Issa JP, Sidransky D, Baylin SB, Herman JG: **Inactivation of the DNA repair gene O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is associated with G to A mutations in K-ras in colorectal tumorigenesis.** *Cancer Res* 2000, **60**:2368-2371.
13. Qi J, Zhu YQ, Huang MF, Yang D: **Hypermethylation of CpG island in O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase gene was associated with**

- K-ras G to A mutation in colorectal tumor. *World J Gastroenterol* 2005, **11**:2022–2025.
14. Rosty C, Young JP, Walsh MD, Clendenning M, Sanderson K, Walters RJ, Parry S, Jenkins MA, Win AK, Southey MC, Giles GG, Williamson EJ, English DR, Buchanan DD: **PIK3CA activating mutation in colorectal carcinoma: associations with molecular features and survival.** *PLoS One* 2013, **8**:e65479.
 15. Suehiro Y, Wong CW, Chirieac LR, Kondo Y, Shen L, Webb CR, Chan YW, Chan AS, Chan TL, Wu TT, Rashid A, Hamanaka Y, Hinoda Y, Shannon RL, Wang X, Morris J, Issa JP, Yuen ST, Leung SY, Hamilton SR: **Epigenetic-genetic interactions in the APC/WNT, RAS/RAF, and P53 pathways in colorectal carcinoma.** *Clin Cancer Res* 2008, **14**:2560–2569.
 16. Ren F, Sheng WQ, Du X: **CD133: a cancer stem cells marker, is used in colorectal cancers.** *World J Gastroenterol* 2013, **19**:2603–2611.
 17. Maenhaut C, Dumont JE, Roger PP, van Staveren WC: **Cancer stem cells: a reality, a myth, a fuzzy concept or a misnomer? an analysis.** *Carcinogenesis* 2010, **31**:149–158.
 18. Puglisi MA, Tesori V, Lattanzi V, Gasbarrini GB, Gasbarrini A: **Colon cancer stem cells: controversies and perspectives.** *World J Gastroenterol* 2013, **19**:2997–3006.
 19. Irollo E, Pirozzi G: **CD133: to be or not to be, is this the real question?** *Am J Transl Res* 2013, **5**:563–581.
 20. Pantic I: **Cancer stem cell hypotheses: impact on modern molecular physiology and pharmacology research.** *J Biosci* 2011, **36**:957–961.
 21. Peitzsch C, Kurth I, Kunz-Schughart L, Baumann M, Dubrovskaja A: **Discovery of the cancer stem cell related determinants of radioresistance.** *Radiother Oncol* 2013, **108**:378–387.
 22. Pilati P, Mocellin S, Bertazza L, Galdi F, Briarava M, Mammano E, Tessari E, Zavagno G, Nitti D: **Prognostic value of putative circulating cancer stem cells in patients undergoing hepatic resection for colorectal liver metastasis.** *Ann Surg Oncol* 2012, **19**:402–408.
 23. Chen KL, Pan F, Jiang H, Chen JF, Pei L, Xie FW, Liang HJ: **Highly enriched CD133(+)/CD44(+) stem-like cells with CD133(+)/CD44(high) metastatic subset in HCT116 colon cancer cells.** *Clin Exp Metastasis* 2011, **28**:751–763.
 24. Liu G, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir IR, Lu L, Irvin D, Black KL, Yu JS: **Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma.** *Mol Cancer* 2006, **5**:67.
 25. He J, Shan Z, Li L, Liu F, Liu Z, Song M, Zhu H: **Expression of glioma stem cell marker CD133 and O6-methylguanine-DNA methyltransferase is associated with resistance to radiotherapy in gliomas.** *Oncol Rep* 2011, **26**:1305–1313.
 26. Metellus P, Nanni-Metellus I, Delfino C, Colin C, Tchogandjian A, Coulibaly B, Fina F, Loundou A, Barrie M, Chinot O, Ouafik L, Figarella-Branger D: **Prognostic impact of CD133 mRNA expression in 48 glioblastoma patients treated with concomitant radiochemotherapy: a prospective patient cohort at a single institution.** *Ann Surg Oncol* 2011, **18**:2937–2945.
 27. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A: *Cancer staging handbook*. 7th edition. New York: USA: Springer Publishing Company 2010; 2010.
 28. Melguizo C, Prados J, González B, Ortiz R, Concha A, Alvarez PJ, Madeddu R, Perazzoli G, Oliver JA, López R, Rodríguez-Serrano F, Aránega A: **MGMT promoter methylation status and MGMT and CD133 immunohistochemical expression as prognostic markers in glioblastoma patients treated with temozolomide plus radiotherapy.** *J Transl Med.* 2012, **10**:250.
 29. Horst D, Kriegl L, Engel J, Kirchner T, Jung A: **CD133 expression is an independent prognostic marker for low survival in colorectal cancer.** *Br J Cancer* 2008, **99**:1285–1289.
 30. Cordeiro AT, Silva CM, Bartchewsky Júnior W, Ribeiro ML, Martinez CA: **Evaluation of the expression of the MGMT gene in normal and neoplastic tissue of patients with colorectal cancer.** *Rev Col Bras Cir* 2012, **39**:48–53.
 31. Lee KH, Lee JS, Nam JH, Choi C, Lee MC, Park CS, Juhng SW, Lee JH: **Promoter methylation status of hMLH1, hMSH2, and MGMT genes in colorectal cancer associated with adenoma-carcinoma sequence.** *Langenbecks Arch Surg* 2011, **396**:1017–1026.
 32. Psafaki V, Kalogera C, Tzambouras N, Stephanou D, Tsianos E, Seferiadis K, Kolios G: **Promoter methylation status of hMLH1, MGMT, and CDKN2A/p16 in colorectal adenomas.** *World J Gastroenterol* 2010, **16**:3553–3560.
 33. Sinha R, Hussain S, Mehrotra R, Kumar RS, Kumar K, Pande P, Doval DC, Basir SF, Bharadwaj M: **Kras gene mutation and RASSF1A, FHIT and MGMT gene promoter hypermethylation: indicators of tumor staging and metastasis in adenocarcinomatous sporadic colorectal cancer in Indian population.** *PLoS One* 2013, **8**:e60142.
 34. Farzanehfar M, Vossoughinia H, Jabini R, Tavassoli A, Saadatnia H, Khorashad AK, Ahadi M, Afzalaghaee M, Ghayoor Karimiani E, Mirzaei F, Ayatollahi H: **Evaluation of methylation of MGMT (O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase) gene promoter in sporadic colorectal cancer.** *DNA Cell Biol* 2013, **32**:371–377.
 35. Ahlquist T, Lind GE, Costa VL, Meling GI, Vatn M, Hoff GS, Rognum TO, Skotheim RI, Thiis-Evensen E, Lothe RA: **Gene methylation profiles of normal mucosa, and benign and malignant colorectal tumors identify early onset markers.** *Mol Cancer* 2008, **7**:94.
 36. Kang YP, Cao FA, Chang WJ, Lou Z, Wang H, Wu LL, Fu CG, Cao GW: **Gene methylation in stool for the screening of colorectal cancer and pre-malignant lesions.** *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi* 2011, **14**:52–56.
 37. Nagasaka T, Sharp GB, Notohara K, Kambara T, Sasamoto H, Isozaki H, MacPhee DG, Jass JR, Tanaka N, Matsubara N: **Hypermethylation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter may predict nonrecurrence after chemotherapy in colorectal cancer cases.** *Clin Cancer Res* 2003, **9**:5306–5312.
 38. Nilsson TK, Löf-Öhlin ZM, Sun XF: **DNA methylation of the p14ARF, RASSF1A and APC1A genes as an independent prognostic factor in colorectal cancer patients.** *Int J Oncol* 2013, **42**:127–133.
 39. Murakami J, Lee YJ, Koikeguchi S, Tsujigawa H, Asaumi J, Nagatsuka H, Fukui K, Kuroda M, Tanaka N, Matsubara N: **Depletion of O6-methylguanine-DNA methyltransferase by O6-benzylguanine enhances 5-FU cytotoxicity in colon and oral cancer cell lines.** *Oncol Rep* 2007, **17**:1461–1417.
 40. Mokarram P, Zamani M, Kavousipour S, Naghibalhosseini F, Irajie C, Moradi Sarabi M, Hosseini SV: **Different patterns of DNA methylation of the two distinct O6-methylguanine-DNA methyltransferase (O6-MGMT) promoter regions in colorectal cancer.** *Mol Biol Rep* 2013, **40**:3851–3857.
 41. Ishiguro K, Shyam K, Penketh PG, Baumann RP, Sartorelli AC, Rutherford TJ, Ratner ES: **Expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase examined by alkyl-transfer assays, methylation-specific PCR and western blots in tumors and matched normal tissue.** *J Cancer Ther* 2013, **4**:919–931.
 42. Ogino S, Hazra A, Tranah GJ, Kirkner GJ, Kawasaki T, Noshio K, Ohnishi M, Suemoto Y, Meyerhardt JA, Hunter DJ, Fuchs CS: **MGMT germline polymorphism is associated with somatic MGMT promoter methylation and gene silencing in colorectal cancer.** *Carcinogenesis* 2007, **28**:1985–1990.
 43. Hawkins NJ, Lee JH, Wong JJ, Kwok CT, Ward RL, Hitchins MP: **MGMT methylation is associated primarily with the germline C > T SNP (rs16906252) in colorectal cancer and normal colonic mucosa.** *Mod Pathol* 2009, **22**:1588–1599.
 44. Park JH, Kim NS, Park JY, Chae YS, Kim JG, Sohn SK, Moon JH, Kang BW, Ryou HM, Bae SH, Choi GS, Jun SH: **MGMT -535G > T polymorphism is associated with prognosis for patients with metastatic colorectal cancer treated with oxaliplatin-based chemotherapy.** *J Cancer Res Clin Oncol* 2010, **136**:1135–1142.
 45. Schneider M, Huber J, Hadaschik B, Siegers GM, Fiebig HH, Schüler J: **Characterization of colon cancer cells: a functional approach characterizing CD133 as a potential stem cell marker.** *BMC Cancer* 2012, **12**:96.
 46. Yang ZL, Zheng Q, Yan J, Pan Y, Wang ZG: **Upregulated CD133 expression in tumorigenesis of colon cancer cells.** *World J Gastroenterol* 2011, **17**:932–937.
 47. Shmelkov SV, Butler JM, Hooper AT, Hormigo A, Kushner J, Milde T, St Clair R, Baljovic M, White I, Jin DK, Chadburn A, Murphy AJ, Valenzuela DM, Gale NW, Thurston G, Yancopoulos GD, D'Angelica M, Kemeny N, Lyden D, Rafii S: **CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors.** *J Clin Invest* 2008, **118**:2111–2120.
 48. Handra-Luca A, Taconet S: **CD133 expression in colorectal adenomas.** *J Clin Pathol* 2013, **66**:1097–1098.
 49. Coco C, Zannoni GF, Caredda E, Sioletic S, Boninsegna A, Migaldi M, Rizzo G, Bonetti LR, Genovese G, Stigliano E, Cittadini A, Sgambato A: **Increased expression of CD133 and reduced dystroglycan expression are strong predictors of poor outcome in colon cancer patients.** *J Exp Clin Cancer Res* 2012, **31**:71.
 50. Reggiani Bonetti L, Migaldi M, Caredda E, Boninsegna A, Ponz De Leon M, Di Gregorio C, Barresi V, Scannone D, Danese S, Cittadini A, Sgambato A:

Increased expression of CD133 is a strong predictor of poor outcome in stage I colorectal cancer patients. *Scand J Gastroenterol* 2012, **47**:1211–1217.

51. Jao SW, Chen SF, Lin YS, Chang YC, Lee TY, Wu CC, Jin JS, Nieh S: **Cytoplasmic CD133 expression is a reliable prognostic indicator of tumor regression after neoadjuvant concurrent chemoradiotherapy in patients with rectal cancer.** *Ann Surg Oncol* 2012, **19**:3432–3440.
52. Choi D, Lee HW, Hur KY, Kim JJ, Park GS, Jang SH, Song YS, Jang KS, Paik SS: **Cancer stem cell markers CD133 and CD24 correlate with invasiveness and differentiation in colorectal adenocarcinoma.** *World J Gastroenterol* 2009, **15**:2258–2264.
53. Kojima M, Ishii G, Atsumi N, Fujii S, Saito N, Ochiai A: **Immunohistochemical detection of CD133 expression in colorectal cancer: a clinicopathological study.** *Cancer Sci* 2008, **99**:1578–1583.
54. Xi HQ, Zhao P: **Clinicopathological significance and prognostic value of EphA3 and CD133 expression in colorectal carcinoma.** *J Clin Pathol* 2011, **64**:498–503.
55. Saigusa S, Tanaka K, Toiyama Y, Yokoe T, Okugawa Y, Ioue Y, Miki C, Kusunoki M: **Correlation of CD133, OCT4, and SOX2 in rectal cancer and their association with distant recurrence after chemoradiotherapy.** *Ann Surg Oncol* 2009, **16**:3488–98.
56. Kawamoto A, Tanaka K, Saigusa S, Toiyama Y, Morimoto Y, Fujikawa H, Iwata T, Matsushita K, Yokoe T, Yasuda H, Inoue Y, Miki C, Kusunoki M: **Clinical significance of radiation-induced CD133 expression in residual rectal cancer cells after chemoradiotherapy.** *Exp Ther Med* 2012, **3**:403–409.
57. Yasuda H, Tanaka K, Saigusa S, Toiyama Y, Koike Y, Okugawa Y, Yokoe T, Kawamoto A, Inoue Y, Miki C, Kusunoki M: **Elevated CD133, but not VEGF or EGFR, as a predictive marker of distant recurrence after preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer.** *Oncol Rep* 2009, **22**:709–17.
58. Hermansen SK, Christensen KG, Jensen SS, Kristensen BW: **Inconsistent immunohistochemical expression patterns of four different CD133 antibody clones in glioblastoma.** *J Histochem Cytochem.* 2011, **59**:391–407.
59. Li CY, Li BX, Liang Y, Peng RQ, Ding Y, Xu DZ, Zhang X, Pan ZZ, Wan DS, Zeng YX, Zhu XF, Zhang XS: **Higher percentage of CD133+ cells is associated with poor prognosis in colon carcinoma patients with stage IIIB.** *J Transl Med* 2009, **7**:56.

doi:10.1186/1471-2407-14-511

Cite this article as: Oliver *et al.*: Prognostic impact of MGMT promoter methylation and MGMT and CD133 expression in colorectal adenocarcinoma. *BMC Cancer* 2014 **14**:511.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

