



# UNIVERSIDAD DE LEÓN

**Departamento de Ciencias Biomédicas**  
**Área de Fisiología**

---

***PAPEL DE LAS HIALURONIDASAS COMO  
QUIMIOSENSIBILIZADORES EN EL  
TRATAMIENTO DEL CÁNCER COLORRECTAL***

---

**Prudencio Alonso Otero**

**León, 2015**

**Directores:**

**Dr. Julio Gabriel Prieto Fernández y Dr. Florencio Marzo Pérez**



**Financiación.**

El presente estudio ha sido realizado en el Departamento de Ciencias Biomédicas (área de Fisiología), de la Universidad de León, en el marco del proyecto "Papel de las hialuronidasas como quimiosensibilizadores en el tratamiento del cáncer con Cetuximab" (Contratos de investigación art. 83: ULE-MERCK, S.L., 2013-2014).



**Agradecimientos.**

Ha sido grande el esfuerzo que me ha supuesto el poder llegar hasta aquí; primero, intentando aprender muchas cosas, ya nuevas para mí, y segundo tratando de rescatar todas aquéllas que ya habían pasado a formar parte de mi "baúl de los recuerdos".

Esto me hubiera sido absolutamente imposible sin la ayuda real y el apoyo moral de las personas que me los han dispensado.

Por ello, quiero expresar mi más sincero agradecimiento:

A mi director, Julio, por haberme abierto las puertas de su equipo y haberse embarcado conmigo en una travesía que, aunque intuía que no le llevaría a puertos lejanos, lo hizo con la generosidad que le caracteriza, volcándose en todo momento en este proyecto.

A mi otro director, Florencio, que en esa misma línea se tomó múltiples molestias, viniendo desde Pamplona, para apoyarme, orientarme, darme algún empujoncito e, incluso, "apretarme las clavijas" cuando ha sido necesario.

A, Ana, quien asumió una carga importante en el momento clave, haciendo gala de un espíritu resolutivo, una agilidad mental y una capacidad de trabajo envidiables.

Al resto de miembros del equipo (el "A", como no podría ser de otra manera): Manu, Virginia, Borja, Andoni, Dafne, Gracia; por sus enseñanzas y su predisposición a echarme una mano cuando lo he necesitado; con alguno, más estrechamente, ha sido muy grato tratar de buscar las claves para solucionar los problemas de nuestro pequeño mundo, "ya tu sabes mi amigo". Por supuesto, a Ludi, en su ámbito y Héctor, en el suyo, así como a Zapico, como catalizador de la distensión.

A otras personas, como Diana, que compartió conmigo y llevó a término una parte de todo este trabajo, y Alex, que, sin ni siquiera conocerme, me ayudó generosamente. Y a quién, aunque no mencione, ha estado implicado en este proyecto.

A Rita, por estar ahí, por la espera a veces tensa...

*¡A TODOS GRACIAS, MUCHAS GRACIAS!*



**ÍNDICE GENERAL.**

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. El Cáncer	3
1.2. Cáncer colorrectal	5
1.2.1. El sistema gastrointestinal: anatomía y fisiología	5
1.2.2. Definición y epidemiología del cáncer colorrectal	8
1.2.3. Estadificación del cáncer colorrectal	10
1.2.4. Crecimientos anormales en el colon y el recto	12
1.2.4.1. Tipos de cáncer en el colon y el recto	14
1.2.5. Factores de riesgo del cáncer colorrectal	14
1.2.5.1. Factores relacionados con los estilos de vida	15
1.2.5.2. Otros factores de riesgo	16
1.2.6. Agentes inductores del cáncer colorrectal	19
1.2.7. Desarrollo del cáncer colorrectal	21
1.2.8. Terapias farmacológicas en el cáncer colorrectal	22
1.2.8.1. Quimioterapia	22
1.2.8.2. Otros tratamientos	24
1.2.9. Cetuximab y cáncer colorrectal	26
1.2.9.1. Mecanismo de acción del cetuximab	27
1.2.9.2. Receptor para el factor de crecimiento epidérmico	28
1.3. El ácido hialurónico	29
1.3.1. Síntesis del ácido hialurónico	30
1.3.2. Degradación del ácido hialurónico: hialuronidasas	31
1.3.3. Receptores del ácido hialurónico: CD44	35
1.3.4. Ácido hialurónico y cáncer	36
1.3.5. Hialuronidasas y cáncer	38
1.4. Marcadores en cáncer colorrectal	40
2. OBJETIVOS	47
3. MATERIAL Y MÉTODOS	51
3.1. Reactivos	53
3.1.1. Inductores químicos del cáncer colorrectal	53
3.2. Animales de experimentación	54

---

3.2.1. Ratas	54
3.2.1.1. Diseño experimental	55
3.2.1.2. Tratamiento	57
3.2.1.3. Técnicas de seguimiento y control de la patología	59
3.2.1.3.1. Colonoscopia	59
3.2.1.3.2. Estudio histológico e inmunohistoquímico	59
3.2.1.4. Determinación de ácido hialurónico	64
3.2.1.4.1. Método del carbazol	65
3.2.1.4.2. Método ELISA	67
3.2.2. Ratones	70
3.2.2.1. Diseño experimental	70
3.2.2.2. Tratamiento	71
3.2.2.3. Seguimiento de la patología	72
3.2.2.3.1. Colonoscopia	73
3.2.2.3.2. Estudio histológico e inmunohistoquímico	73
3.2.2.3.3. Estudio de expresión de citoquinas y genes	74
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	77
4.1. Inducción de tumores colorrectales	79
4.1.1. Colonoscopia	79
4.1.1.1. Ratas	79
4.1.1.2. Ratones	79
4.2. Estudios histológicos e inmunohistoquímicos	80
4.2.1. Ratas	80
4.2.1.1. Expresión del índice de proliferación celular (Ki67)	82
4.2.1.2. Expresión señal de ácido hialurónico	87
4.2.1.3. Efectos colaterales	89
4.2.2. Ratones	90
4.2.2.1. Expresión del índice de proliferación celular (Ki67)	92
4.2.2.2. Efectos colaterales	93
4.3. Determinación de ácido hialurónico en tejido colónico de ratas	94
4.3.1. Método del carbazol	94
4.3.1.1. Buffer I	94

4.3.1.2. Buffer II	96
4.3.2. Método ELISA	97
4.3.3. Análisis estadístico	100
4.4. Expresión de citoquinas y genes	108
4.4.1. Tejidos	108
4.4.1.1. Potencia estadística	121
4.4.1.2. Test de potencia estadística y marcadores en CCR	122
4.4.2. Sangre (test ELISA)	124
5. CONCLUSIONES	127
6. BIBLIOGRAFÍA	131



**ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.**

Figura 1.1. Mantenimiento de la homeostasis celular	3
Figura 1.2. Fases del Ciclo Celular	4
Figura 1.3. Sistema Gastro Intestinal	6
Figura 1.4. Partes del intestino grueso	7
Figura 1.5. Capas de la pared del colon	8
Figura 1.6. Crecimiento tumoral en las capas del colon	9
Figura 1.7. Estadios del cáncer colorrectal	12
Figura 1.8. Tratamientos combinados en CCR	25
Figura 1.9. Conformación tridimensional molécula Cetuximab	26
Figura 1.10. Esquema de la unión del ligando al EGFR	27
Figura 1.11. Receptor para el factor de crecimiento epidérmico	29
Figura 1.12. Estructura química del dímero de ácido hialurónico	30
Figura 1.13. Esquema proceso síntesis ácido hialurónico	31
Figura 1.14. Biodegradación del ácido hialurónico	33
Figura 1.15. Unión de AH y el receptor CD44	35
Figura 3.1. Estructura química de la dimetilhidrazina	53
Figura 3.2. Estructura química del Azoximetano	54
Figura 3.3. Cronograma experimental inducción ratas A con 1,1-DMH	55
Figura 3.4. Curvas de crecimiento ratas lote A	56
Figura 3.5. Cronograma desarrollo experimental 1,2-DMH (ratas B)	56
Figura 3.6. Curvas de crecimiento ratas lote B	57
Figura 3.7. Fotografía del colonoscopio y sonda utilizados	59
Figura 3.8. Extracción y lavado de intestino	60
Figura 3.9. Protocolos determinación analítica (Carbazol y ELISA)	65
Figura 3.10. Fotografía laboratorio reacción carbazol	67
Figura 3.11. Esquema ensayo ELISA	68
Figura 3.12. Fotografía de la placa de detección (ensayo ELISA)	69
Figura 3.13. Cronograma desarrollo experimentación con ratones	70
Figura 3.14. Curva de crecimiento ratones experimentación	71
Figura 3.15. Extracción de intestino y otros órganos de ratones	73
Figura 4.1. Imágenes colonoscopia en ratas CCR (1,2-DMH)	79
Figura 4.2. Imágenes colonoscopia en ratones CCR (AOM)	80
Figura 4.3. Corte transversal colon ratón CCR (AOM), desarrollo tumor	80
Figura 4.4. Fotografías colon ratas CCR (1,2-DMH), tumor	81
Figura 4.5. Cortes histológicos tumores inducidos en colon de rata	81
Figura 4.6. Análisis inmunohistoquímico cortes colon ratas (Ki67)	82

Figura 4.7. Comparativa Ki67 ratas no tratadas vs tratadas Cet/Hia	83
Figura 4.8. Comparativa Ki67 ratas no tratadas, tratadas Ce X,.CetX/2	84
Figura 4.9. Comparativa Ki67 ratas no tratadas y tratadas Cet X+X/2	84
Figura 4.10. Tendencia ratas no tratadas y tratadas Cet X, Cet X/2	85
Figura 4.11. Tendencia ratas no tratadas y tratadas Cet+Hia (Y e Y/2)	86
Figura 4.12. Expresión Ki67 grupo tratado con Cet (X) +Hial	87
Figura 4.13. Expresión Ki67 grupo tratado con Cet (X/2)+Hial	87
Figura 4.14. Cortes histológicos ratas (expresión de AH)	88
Figura 4.15. Gráfica expresión AH en ratas no tratadas vs tratadas	89
Figura 4.16. Ratas inducidas (1,2-DMH), quistes submandibulares	89
Figura 4.17. Preparación histológica quiste folicular infundibular	90
Figura 4.18. Muestras colon ratones inducidos (AOM), tumores	91
Figura 4.19. Cortes transversales colon ratones (AOM), tumores	91
Figura 4.20. Cortes transversales colon ratones (AOM), expresión Ki67	92
Figura 4.21. Comparativa Ki67 ratones (AOM) distintos grupos	93
Figura 4.22. Quistes perianales ratones (AOM)	93
Figura 4.23. Frotis punción quistes perianales ratones (AOM)	94
Figura 4.24. Gráfica concentraciones ácido glucurónico (buffer I)	95
Figura 4.25. Gráfica concentraciones ácido glucurónico (buffer II)	96
Figura 4.26. Gráfica recta patrón AH	98
Figura 4.27. Gráfica media y DS (Resultados carbazol y ELISA)	101
Figura 4.28. Gráfica media y DS de GAGsT y AH vs Cet	102
Figura 4.29. Gráfica valores GAGsT y AH vs grupo tto. (carb. y ELISA)	104
Figura 4.30. Expresión genes (ratones control vs inducidos)	109
Figura 4.31. Gráficas expresión gen ACTB vs grupos tratamiento	110
Figura 4.32. Gráficas expresión gen CASP3 vs grupos tratamiento	111
Figura 4.33. Gráficas expresión gen CASP8 vs grupos tratamiento	112
Figura 4.34. Gráficas expresión gen CASP9 vs grupos tratamiento	113
Figura 4.35. Gráficas expresión gen CTNNB1 vs grupos tratamiento	114
Figura 4.36. Gráficas expresión gen KRAS vs grupos tratamiento	115
Figura 4.37. Gráficas expresión gen NFkB1 vs grupos tratamiento	116
Figura 4.38. Gráficas expresión gen PTGS2 vs grupos tratamiento	117
Figura 4.39. Gráficas expresión gen TNF vs grupos tratamiento	118
Figura 4.40. Gráficas expresión gen TRP53 vs grupos tratamiento	119
Figura 4.41. Gráficas expresión gen VEGFA vs grupos tratamiento	120
Figura 4.42. Gráficas expresión IL6 y TNF (ratones ctrl vs inducidos)	125
Figura 4.43. Gráficas expresión IL6 y TNF (ratones ttdos vs induc.)	125

---

Tabla 3.1. Grupos experimentales ratas A (inducción DMH)	55
Tabla 3.2. Grupos de tratamiento con Cet/Hia	58
Tabla 3.3. Grupos experimentales de ratones	72
Tabla 4.1. Valores medios (%) Ki67 y DS grupos ratones	92
Tabla 4.2. Contenido de AH en muestras (buffer I)	95
Tabla 4.3. Contenidos de AH en muestras (buffer II)	96
Tabla 4.4. Comparativa resultados (carbazol), buffer I y II	97
Tabla 4.5. Valores absorbancia para distintas concentraciones de AH	98
Tabla 4.6. Valores GAGsT y AH en tejidos (carbazol y ELISA)	99
Tabla 4.7. Media y DS métodos carbazol y ELISA por grupos tto	100
Tabla 4.8. Media y DS carbazol vs ELISA (animales control y CCR)	101
Tabla 4.9. Media y DS carbazol vs ELISA (Cet X o X/2)	102
Tabla 4.10. Media y DS carbazol vs ELISA (Cet. e Hial.)	103
Tabla 4.11. Datos expresión genes colon (ratones control e inducidos)	108
Tabla 4.12. Datos expresión genes colon (ratones induc. y grupos tto.)	109
Tabla 4.13. Porcentajes potencia estadística (distintos grupos tto.)	121
Tabla 4.14. Tamaño muestral potencia estadística	121
Tabla 4.15. Expresión IL6 y TNF en grupos de ratones (ELISA)	124



## ***ABREVIATURAS***



1,2-DMH: 1,2-dimetilhidrazina.

5-FU: 5-Fluorouracilo.

ADC: Adenocarcinoma.

AH: Ácido hialurónico.

AHS: Ácido hialurónico sintasas (3 isoformas: AHS1, 2 y 3).

AHs: Fragmentos de ácido hialurónico de alto peso molecular de pequeño tamaño.

AINE: Antiinflamatorios no esteroideos.

AJs: Uniones adherentes.

ALP: Enzima fosfatasa alcalina.

AOM: Azoximetano.

APC: Gen "*Adenomatous polyposis coli*".

ASO: Anión superóxido.

CAMs: Moléculas de adhesión celular.

CAPOX: Capecitabina+oxaliplatino.

CCR (CRC): Cáncer colorrectal.

CD44: Receptor de superficie celular para el ácido hialurónico.

CEA: Antígeno carcinoembrionario.

Células NK: Células natural killer.

Cet: Cetuximab

CS: Condroitín sulfato.

DE : Desviación estándar.

DMH: Dimetilhidrazina.

DS: Dermatán sulfato.

EEM: Error estándar de la media.

EGF: Factor de crecimiento epidérmico.

EGFR: Receptor para el factor de crecimiento epidérmico.

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay.

FAP: Poliposis adenomatosa familiar.

FOLFIRI: 5-Fluorouracilo+leucovorina+irinotecan.

FOLFOX: 5-Fluorouracilo+leucovorina+oxaliplatino.

FOLFOXIRI: 5-Fluorouracilo+leucovorina+oxaliplatino+irinotecan.

FP: Fluoropirimidina.

GAG: Glicosaminoglicano.

GFP: *Green Fluorescent Protein*.

GlcA: Ácido glucurónico.

GlcNAc: N-acetil glucosamina.

GPI: Glicosil fosfatidilinositol.

HIA: Hialuronidasa.

HNPCC: Cáncer de Colon Hereditario No Polipoideo.

HS: Heparán sulfato (heparina).

Hyal: Enzima hialuronidasa (7 isoformas: Hyal1, 2, 3, 4, 5, HyalP1 y PH-20/Spam1).

IHQ: Inmunohistoquímica.

IL-6: Interleucina-6.

I.P.: Intraperitoneal.

kb: Kilobase.

KDa: Kilodalton.

Ki67: Índice de proliferación celular.

Knk: Ratón *Knockout*.

KRAS: Oncogen (*Kirsten Rat Sarcome*).

KS: Queratán sulfato.

LV: Leucovorina.

mAb: Anticuerpo monoclonal.

MAF: Frecuencia alélica menor.

MAPK: "*Mitogen-activated proteinkinases*".

mCRC: Cáncer colorrectal metastásico.

Min: Neoplasia intestinal múltiple.

MMR: Genes reparadores del DNA.

MNNG: N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanina.

MNU: N-metil-N-nitrosourea.

MSI: Microsatélites.

MSI-H: Microsatélites de alta inestabilidad.

NK: Células *natural killer*.

OS (SG): Supervivencia global.

p.c.: Peso corporal.

PAF: Poliposis Adenomatosa Familiar.

pb: Pares de bases.

PBS: Tampón fosfato salino.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PDGFR: Receptor para el factor de crecimiento derivado de plaquetas.

PEGPH20: Enzima hialuronidasa pegilada.

PFS (SLP): Supervivencia libre de progresión.

Pm: Peso molecular.

pNPP: Para-nitrofenil fosfato.

RHAMM: Receptores para la motilidad mediada por el ácido hialurónico.

RLO: Radicales libres de oxígeno.

RNS: Especies reactivas del nitrógeno.

ROS: Especies reactivas del oxígeno.

RT: Transcripción reversa.

RTKs: Receptores de tirosina kinasa.

SDS: Dodecil sulfato sódico.

SLE (DFS): Supervivencia libre de enfermedad.

SLP: Supervivencia libre de progresión.

SOD: Superóxido dismutasa.

TKIs: Inhibidores de tirosina kinasa.

TLR: Receptores *Toll-Like*.

TMD: Dominio transmembrana.

TNF: Factor de necrosis tumoral.

Tris: Tris(hidroximetil)aminometano.

VEGF: Factor de crecimiento vasculo-endotelial.

VEGFR: Receptor para el factor de crecimiento vasculo-endotelial.

WHO (OMS): Organización mundial de la salud.

WT: "*Wild type*".



## ***1. INTRODUCCIÓN***



## 1. INTRODUCCIÓN.

### 1.1. El Cáncer.

El cuerpo está compuesto por millones de millones de células vivas. Las células normales del cuerpo crecen, se dividen para crear nuevas células y mueren de manera ordenada. Durante los primeros años de vida de una persona, las células normales están creciendo y se dividen más rápidamente. Una vez que se llega a la edad adulta, la mayoría de las células sólo se dividen para reemplazar a las células desgastadas o a las que están muriendo y para reparar lesiones.

El cáncer se origina cuando las células en alguna parte del cuerpo comienzan a crecer de manera descontrolada. Existen muchos tipos de cáncer, pero todos comienzan debido a que unas células anormales crecen descontroladamente. El crecimiento de las células cancerosas es diferente al crecimiento de las células normales. En lugar de morir, las células cancerosas continúan creciendo y forman nuevas células anormales. En la mayoría de los casos, las células cancerosas forman un tumor.

(American Cancer Society 2014. [www.cancer.org](http://www.cancer.org))

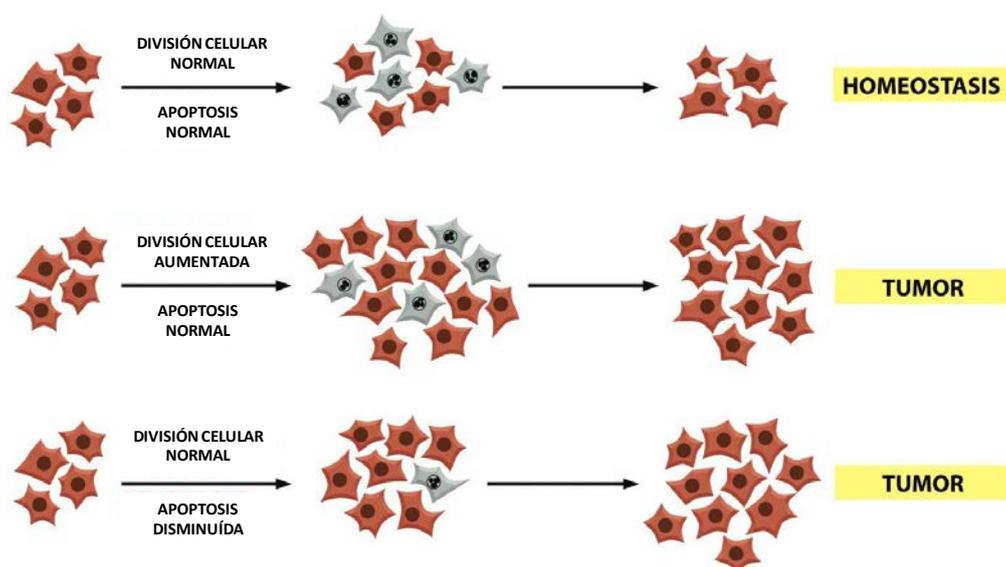


Figura 1.1. Mantenimiento de la homeostasis celular.

Las células cancerosas pueden también invadir o propagarse a otros tejidos, algo que las células normales no pueden hacer. El hecho de que crezcan sin control e invadan otros tejidos es lo que hace que una célula sea cancerosa.

Las células se transforman en células cancerosas debido a una alteración en el ADN. El ADN se encuentra en cada célula y dirige todas sus actividades, conforme a un ciclo celular regulado.

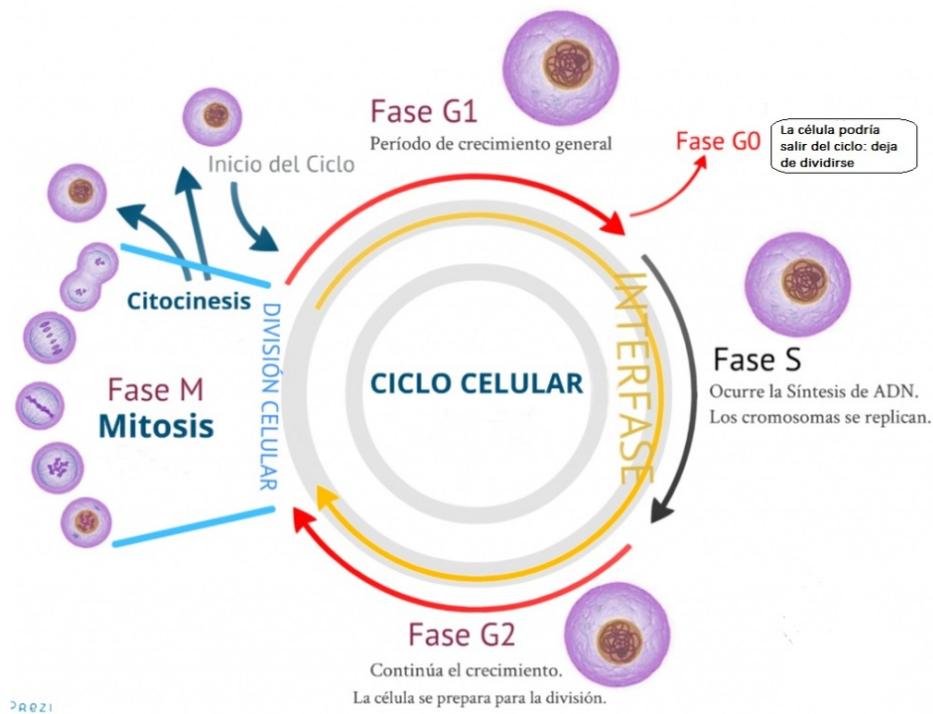


Figura 1.2. Fases del Ciclo Celular.

En una célula normal, cuando se altera el ADN, la célula repara la alteración o muere (apoptosis). Por el contrario, en las células cancerosas el ADN alterado no se repara, y la célula no muere como debería. En lugar de esto, esta célula persiste en producir más células que el cuerpo no necesita. Todas estas células nuevas tendrán el mismo ADN alterado que tuvo la primera célula anormal.

Las personas pueden heredar un ADN alterado, pero con más frecuencia las alteraciones del ADN son causadas por errores que ocurren durante la reproducción de una célula normal o por algún otro factor del ambiente.

Algunas veces, la causa del daño al ADN es algo obvio, no obstante, es frecuente que no se encuentre una causa clara.

Las células cancerosas a menudo se trasladan a otras partes del organismo donde comienzan a crecer y a formar nuevos tumores que remplazan al tejido normal. A este proceso se le conoce como **metástasis**. Ocurre cuando las células cancerosas entran al torrente sanguíneo o a los vasos linfáticos de nuestro organismo.

Independientemente del lugar hacia el cual se propague el cáncer, se le da el nombre según el lugar donde se originó. Por ejemplo, el cáncer de colon que se extiende al hígado sigue siendo cáncer de colon y no cáncer de hígado.

Los diferentes tipos de cáncer se pueden comportar de manera muy distinta. Por ejemplo, el cáncer de pulmón y el cáncer de mama son dos enfermedades muy diferentes. Crecen a velocidades distintas y responden a distintos tratamientos. Por esta razón, las personas con cáncer necesitan recibir un tratamiento dirigido a su particular tipo de cáncer.

No todos los tumores son cancerosos. A los tumores que no son cancerosos se les llama **tumores benignos**. Los tumores benignos pueden causar problemas, ya que pueden crecer mucho y ocasionar presión en los tejidos y órganos sanos. Sin embargo, estos tumores no pueden crecer (invadir) hacia otros tejidos. Debido a que no pueden invadir otros tejidos, tampoco se pueden propagar a otras partes del cuerpo (hacer metástasis). Estos tumores pocas veces ponen en riesgo la vida de una persona.

## **1.2. Cáncer colorrectal (CCR).**

### **1.2.1. El sistema gastrointestinal: anatomía y fisiología.**

Para entender el cáncer colorrectal, es necesario conocer un poco sobre la estructura normal del sistema digestivo y cómo funciona.

El colon y el recto son partes del sistema digestivo, que también se denomina sistema gastrointestinal (GI). La primera parte del sistema digestivo (el estómago y el intestino delgado) procesa los alimentos para obtener energía mientras que la parte final (el colon y el recto) absorbe líquido para formar residuos sólidos (heces fecales) que luego salen del cuerpo.

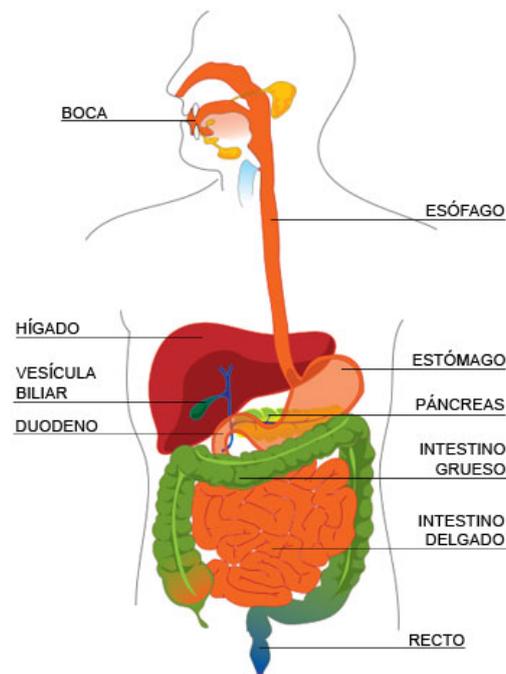


Figura 1.3. Sistema Gastro Intestinal. (Obtenida de <http://www.genomasur.com/>)

Después de masticar y tragar los alimentos, éstos se desplazan a través del esófago hasta el estómago. Ahí, se descomponen parcialmente y pasan al intestino delgado, el cual continúa digiriendo los alimentos y absorbe la mayoría de los nutrientes.

El intestino delgado se une al intestino grueso en el abdomen inferior derecho. La mayor parte del intestino grueso está compuesto por el **colon**, un conducto muscular de aproximadamente 1,5 metros de longitud, que absorbe agua y sales de los alimentos y sirve como área de almacenamiento para la materia de desecho.

El colon consta de cuatro secciones:

-La primera sección se llama **colon ascendente**. Comienza con una pequeña bolsa (el ciego) donde el intestino delgado se une al colon y se extiende hacia arriba en el lado derecho del abdomen. El ciego también se ubica donde el apéndice se une al colon.

-La segunda sección se llama **colon transverso** ya que se extiende a través del cuerpo del lado derecho hacia el lado izquierdo en el abdomen superior.

-La tercera sección, el **colon descendente**, continúa hacia abajo en el lado izquierdo.

-La cuarta y última sección se conoce como **colon sigmoide** debido a su forma en “S” o forma “sigmoide”.

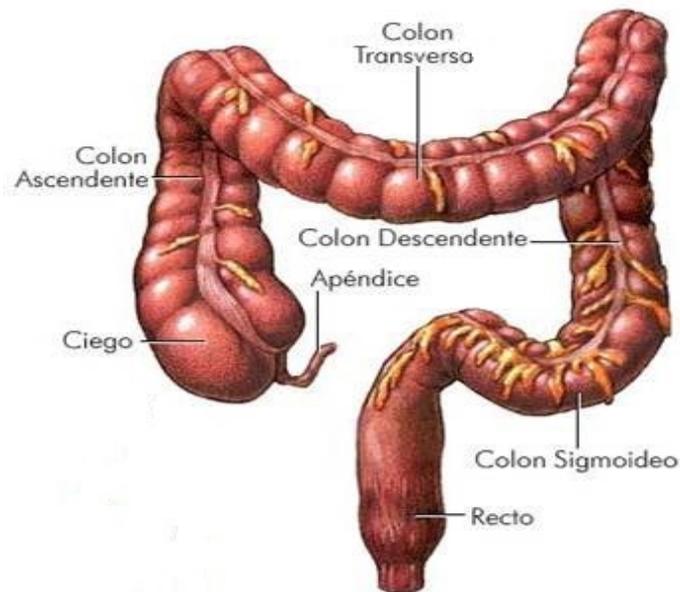


Figura 1.4. Partes del intestino grueso.

El material de desecho que queda después de pasar por el colon se conoce como heces fecales o excremento, el cual pasa al recto, la parte final del sistema digestivo, cuya longitud es de unos 15 cm, donde se almacena hasta que pasa fuera del cuerpo a través del ano.

La pared del colon y del recto está compuesta por varias capas:

**-Mucosa.** Es la capa más interna, en contacto con la luz del intestino, y está formada por epitelio superficial, lámina propia de tejido conjuntivo, glándulas secretoras de moco (células caliciformes) y tejido muscular (*muscularis mucosae*). Forma vellosidades y criptas (criptas de Lieberkühn).

**-Submucosa.** Por debajo de la anterior, está compuesta por tejido conjuntivo y a través de ella pasan las venas, arterias y vasos linfáticos, así como fibras nerviosas.

**-Muscular.** Formada por músculos circulares y músculos longitudinales, le da capacidad contráctil al colon.

**-Serosa.** Es la capa más externa, formada por tejido conjuntivo laxo, vasos sanguíneos y linfáticos, adipocitos. Está en contacto con el mesotelio peritoneal.

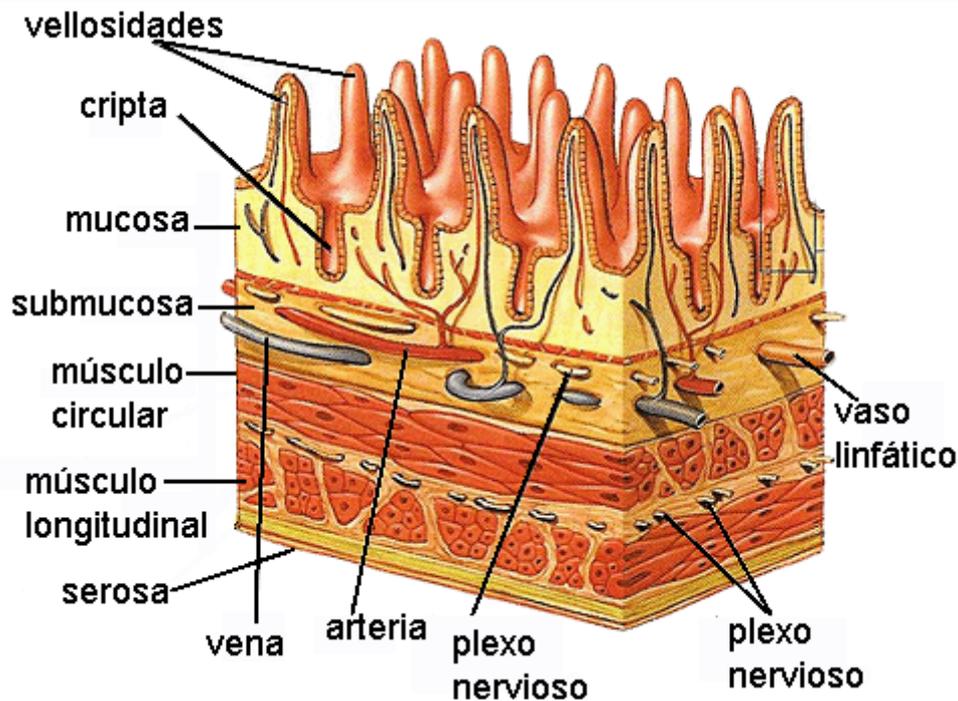


Figura 1.5. Capas de la pared del colon.

### 1.2.2. Definición y epidemiología del cáncer colorrectal.

El cáncer colorrectal es un término que se emplea para el cáncer que se origina en el colon o el recto. A estos cánceres se les puede llamar por separado cáncer de colon o cáncer de recto dependiendo del lugar donde se origina. Tanto el cáncer de colon como el cáncer de recto comparten muchas características en común.

El cáncer colorrectal se origina en la capa más interna (mucosa) y puede crecer a través de algunas o de todas las demás capas.

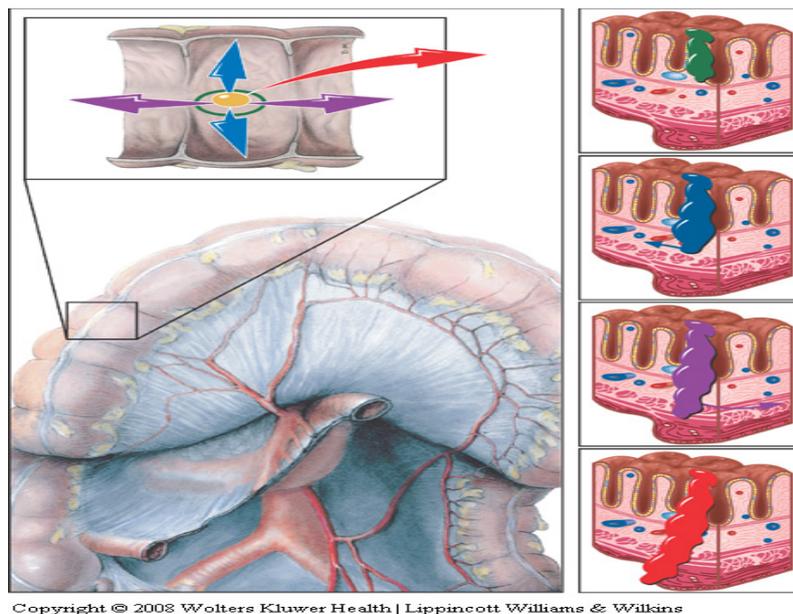


Figura 1.6. Crecimiento tumoral en las capas del colon. (Modificada de *TNM Staging Atlas*. 2008. Ed. Wolters Kluwer-Lippincott Williams & Wilkins).

En realidad, el término cáncer colorrectal hace referencia a un adenocarcinoma localizado en el colon o recto, que es el principal tipo de tumor que se produce en estas localizaciones, aunque no es el único. Otros tumores, o tienen una incidencia muy baja o son tumores secundarios debidos a metástasis de otros tipos de cáncer, como el de mama y el de pulmón.

A nivel mundial, el cáncer colorrectal representa el tercer tipo de cáncer más frecuente en los hombres (tras el cáncer de pulmón y próstata), y el segundo en las mujeres (tras el cáncer de mama).

Aproximadamente cada año se diagnostican en el mundo 1,36 millones de nuevos casos (*Cunningham y cols. 2010; Ferlay y cols. 2015; GLOBOCAN 2012*), suponiendo el 9,7% de todos los cánceres. Se aprecia una mayor incidencia de la enfermedad en hombres que en mujeres. Además este tipo de tumor presenta diferencias geográficas, siendo más frecuente en países desarrollados (*Ferlay y cols. 2013, 2015*).

En España, la incidencia se considera alta en ambos sexos. La tasa anual en el año 2012 fue de 43,9 nuevos casos por cada 100.000 habitantes en hombres, con una mortalidad de 17,1 por cada 100.000 habitantes, y de 24,2

nuevos casos por cada 100.000 habitantes en mujeres, con una mortalidad de 8,5 (GLOBOCAN. 2012). Su tendencia es a aumentar en ambos sexos, con más celeridad en el sexo masculino (Ferlay y cols. 2015). Agrupando los datos de ambos sexos, el CCR es el tercer tipo de cáncer con mayor incidencia: 33,1 nuevos casos por cada 100.000 habitantes, con una mortalidad de 12,3 (GLOBOCAN 2012).

### 1.2.3. Estadificación del cáncer colorrectal.

La etapa o estadio (extensión de la propagación) del cáncer colorrectal depende en gran medida de cuán profundo crece en las distintas capas de que consta la pared.

Para la estadificación del cáncer colorrectal se emplea el **sistema TNM**, en el que la letra **T** describe cuánto ha crecido el tumor primario hacia la pared del intestino y áreas adyacentes, la letra **N** describe la extensión de la propagación a los ganglios adyacentes y la letra **M** indica si se ha producido metástasis.

Estas letras se acompañan de un número, comprendido entre el 0 y el 4, que indica la gravedad en orden ascendente, o de la letra X, que indica que el estado del tumor no puede ser evaluado por falta de información.

Una vez se han determinado las categorías T, N y M, esta información se combina en un proceso de agrupamiento por etapas, que distingue los siguientes estadios. (Ayuso y cols. 2010):

**-Estadio 0** (Tis, N0, M0): El tumor se encuentra en su etapa más temprana y se localiza solo en la capa interna (mucosa) del colon o del recto. En esta etapa el cáncer colorrectal también se conoce como carcinoma *in situ*.

**-Estadio I** (T1-T2, N0, M0): El tumor ha crecido a través de la pared interior del colon o recto hasta las capas submucosa (T1) o muscular (T2), pero no se ha propagado a ganglios linfáticos adyacentes ni a áreas distantes.

**-Estadio II** (T3-T4a-T4b, N0, M0): El tumor ha crecido a través de la pared del colon o recto. Es posible que haya invadido tejido cercano, pero no se ha

diseminado a los ganglios linfáticos. En función del grado de penetración se distinguen los subtipos IIA (T3), IIB (T4a) y IIC (T4b).

**-Estadio III** (T1-T2-T3-T4a, N1-N2a-N2b, M0): El tumor ha crecido a través de la pared interior del colon o recto hasta las capas submucosa (T1), muscular (T2) o externas del colon o del recto (T3), o a través del peritoneo visceral (T4a). Además se ha propagado a ganglios linfáticos cercanos (N1 entre 1 y 3 ganglios, N2a entre 4 y 6 ganglios y N2b a 7 o más ganglios) pero no a partes distantes. En función del grado de penetración se distinguen los subtipos IIIA, IIIB y IIIC.

**-Estadio IV:** Si el tumor se ha diseminado a uno (subtipo IV-A) o más (subtipo IV-B) órganos distantes.

**-Cáncer recurrente:** Si, tras el tratamiento, el tumor se reproduce en el colon, en el recto o en otras partes del cuerpo.

(Fig. 1.7).

DEFINICIÓN DE TNM		T <sub>is</sub>	N <sub>0</sub>	ESTADIOS
0	<p><b>T1</b> El tumor invade submucosa</p> <p><b>T2</b> El tumor invade muscularis externa</p> <p><b>N0</b> No metástasis en ganglios regionales</p>			<p><b>Estadio I</b> T1 N0 M0 T2 N0 M0</p>
I	<p><b>T3</b> El tumor invade subserosa o tejidos perirrectales o pericólicos, a través de la muscularis externa</p> <p><b>T4</b> El tumor invade directamente otros órganos o estructuras, y/o perfora el peritoneo visceral</p> <p><b>N0</b> No metástasis en ganglios regionales</p>			<p><b>Estadio IIA</b> T3 N0 M0</p> <p><b>Estadio IIB</b> T4 N0 M0</p>
II	<p><b>N1</b> Metástasis en 1-3 ganglios regionales</p>			<p><b>Estadio IIIA</b> T1-T2 N1 M0</p> <p><b>Estadio IIIB</b> T3-T4 N2 M0</p>
IIIA/B	<p><b>N2</b> Metástasis en 4 o más ganglios regionales</p>			<p><b>Estadio IIIC</b> Any T N2 M0</p>
IIC	<p><b>M1</b> Metástasis distante</p>			<p><b>Estadio IV</b> Any T Any N M1</p>
IV				

Figura 1.7. Estadios del cáncer colorrectal. (Modificada de *TNM Staging Atlas*. 2008. Ed. Wolters Kluwer-Lippincott Williams & Wilkins).

#### 1.2.4. Crecimientos anormales en el colon o en el recto.

La mayoría de los cánceres colorrectales se desarrollan lentamente durante varios años. Antes de que se origine un cáncer, habitualmente se

forma un crecimiento de tejido que es un **pólipo** no canceroso en el revestimiento interno del colon o del recto.

Un tumor consiste en tejido anormal que puede ser benigno (no canceroso) o maligno (canceroso). Un pólipo es un tumor benigno, es decir, no canceroso. Algunos pólipos (no todos) pueden transformarse en cáncer, y la probabilidad de transformarse en cáncer depende de la clase de pólipo.

Si un pólipo se transforma en cáncer, con el tiempo, puede comenzar a crecer en el espesor de la pared del colon o del recto. Cuando las células cancerosas se encuentran en la pared, éstas pueden crecer hacia los vasos sanguíneos o los vasos linfáticos. Una vez que las células cancerosas se propagan a los vasos sanguíneos o linfáticos, éstas pueden trasladarse hasta los ganglios linfáticos adyacentes o a partes distantes del cuerpo (como hígado, etc), dando lugar a **metástasis**.

Hay dos tipos principales de pólipos:

-Los **pólipos adenomatosos (adenomas)**. Son pólipos que pueden transformarse en cáncer. Debido a esto, a los adenomas se les considera una afección precancerosa.

-Los **pólipos inflamatorios y los pólipos hiperplásicos**. Por lo general, no son precancerosos. Pero algunos investigadores creen que algunos pólipos hiperplásicos pueden convertirse en precancerosos o pueden ser un signo de un mayor riesgo de adenomas y cáncer, particularmente cuando estos pólipos crecen en el colon ascendente.

La **displasia** es otra clase de afección precancerosa. La displasia es un área en el revestimiento del colon o del recto donde las células muestran un aspecto anormal (pero no como células cancerosas verdaderas) cuando son observadas con un microscopio. Estas células pueden transformarse en cáncer con el paso del tiempo. Por lo general, la displasia se presenta en las personas que han tenido enfermedades, como la colitis ulcerosa o la enfermedad de Crohn, durante muchos años. Ambas enfermedades causan inflamación crónica del colon.

#### 1.2.4.1. Tipos de cáncer en el colon y el recto.

Varios tipos de cáncer pueden comenzar en el colon o el recto.

**-Adenocarcinomas:** más del 95% de los tumores colorrectales son adenocarcinomas. Estos cánceres comienzan en las células que forman glándulas que producen mucosidad para lubricar el interior del colon y del recto. Casi siempre que se habla de cáncer colorrectal se hace referencia a este tipo de cáncer.

Otros tipos de tumores menos comunes también pueden comenzar en el colon y en el recto:

**-Tumores carcinoides:** estos tumores se originan a partir de células especializadas productoras de hormonas del intestino.

**-Tumores del estroma gastrointestinal:** se originan a partir de células especializadas en la pared del colon llamadas células intersticiales de Cajal. Algunos son benignos, mientras que otros son malignos. Estos tumores pueden encontrarse en cualquier parte del tracto digestivo, aunque son poco comunes en el colon.

**-Linfomas:** éstos son cánceres de las células del sistema inmunológico que típicamente se forman en los ganglios linfáticos, pero que también pueden comenzar en el colon y el recto o en otros órganos.

**-Sarcomas:** estos tumores pueden comenzar en los vasos sanguíneos, así como en el tejido muscular y conjuntivo de la pared del colon y recto. Los sarcomas del colon o del recto son poco frecuentes.

#### 1.2.5. Factores de riesgo del cáncer colorrectal.

Un factor de riesgo es todo aquel que aumenta la probabilidad de padecer una enfermedad, como por ejemplo el cáncer.

Los distintos tipos de cáncer tienen diferentes factores de riesgo. Sin embargo, los factores de riesgo no lo indican todo. Presentar uno o incluso varios factores de riesgo no significa que se vaya a desarrollar la enfermedad. Además, algunas personas que desarrollan la enfermedad puede que no tengan ningún factor de riesgo conocido. Aun cuando una persona con cáncer

colorrectal tenga un factor de riesgo, a menudo es muy difícil saber cuánto pudo éste haber contribuido a la patología.

Se han puesto de manifiesto varios factores de riesgo que pueden aumentar las probabilidades de presentar pólipos o cáncer colorrectal:

#### **1.2.5.1. Factores relacionados con los estilos de vida**

Varios factores relacionados con el estilo de vida han sido asociados al cáncer colorrectal. De hecho, la relación que hay entre la alimentación, el peso y el ejercicio con el riesgo de cáncer colorrectal es una de las más fuertes para cualquier tipo de cáncer.

##### **-Alimentación.**

Una alimentación con un alto consumo de carne roja (tal como vaca, cerdo, cordero o hígado) y carnes procesadas (perritos calientes, hamburguesas y algunas carnes frías) pueden aumentar el riesgo de cáncer colorrectal. Cocinar las carnes a temperaturas muy altas (freír, asar o cocinar a la parrilla) crea químicos que pueden aumentar el riesgo de cáncer, aunque no está claro cuánto de esto puede contribuir a un aumento en el riesgo de cáncer colorrectal.

Una alimentación con un alto consumo de vegetales, verduras, frutas y granos integrales ha sido asociada a un menor riesgo de cáncer colorrectal, aunque los suplementos de fibra no parecen ayudar a reducir este riesgo (*Buchner y cols. 2009 y 2011; Ross, 2010*).

No está claro si otros componentes alimenticios (por ejemplo, ciertos tipos de grasas) incrementan el riesgo de cáncer colorrectal.

##### **-Actividad física.**

La inactividad física incrementa la probabilidad de padecer cáncer colorrectal. Un aumento en la actividad física puede ayudar a reducir el riesgo.

##### **-Obesidad.**

El exceso de peso, también aumenta el riesgo de padecer cáncer colorrectal, tanto en los hombres como en las mujeres, aunque esta asociación parece ser mayor entre los hombres.

**-Tabaquismo.**

Las personas que fuman desde hace mucho tiempo tienen una probabilidad mayor de padecer y morir de cáncer colorrectal que las personas que no fuman. Se sabe que fumar causa cáncer de pulmón, pero también está asociado a otros cánceres, como el cáncer colorrectal.

**-Consumo excesivo de alcohol.**

El cáncer colorrectal ha sido vinculado al consumo excesivo de alcohol. En parte, puede que se deba al hecho de que las personas que consumen alcohol en exceso tienden a presentar bajos niveles de ácido fólico en el cuerpo.

**1.2.5.2. Otros factores de riesgo.**

**-Edad.**

Los adultos más jóvenes pueden padecer cáncer colorrectal, aunque las probabilidades aumentan significativamente después de los 50 años de edad. Alrededor de 9 de cada 10 personas diagnosticadas de cáncer colorrectal tienen al menos 50 años de edad.

**-Antecedente personal de cáncer colorrectal o pólipos colorrectales.**

Antecedentes de pólipos adenomatosos (adenomas), provocan un mayor riesgo de cáncer colorrectal. Esto es especialmente cierto si los pólipos son grandes o si existen muchos de ellos.

El haber padecido cáncer colorrectal, aunque se haya extirpado completamente, también aumenta las probabilidades de padecer nuevos cánceres en otras áreas del colon y del recto. Las probabilidades de que esto suceda son mucho mayores si se padeció el primer cáncer colorrectal siendo joven.

**-Antecedente personal de enfermedad inflamatoria del intestino.**

La **enfermedad inflamatoria intestinal** (inflammatory bowel disease, IBD), incluyendo la **colitis ulcerosa** y la **enfermedad de Crohn**, es una afección en la cual el colon se encuentra inflamado durante un período prolongado de tiempo. Las personas que han padecido IBD por muchos años, a menudo desarrollan displasias, que pueden transformarse en cáncer con el paso del tiempo. Por tanto, el riesgo de padecer cáncer colorrectal aumenta, y

puede ser necesario comenzar las pruebas de detección a una edad más temprana y con más frecuencia.

La enfermedad inflamatoria intestinal es diferente al **síndrome del intestino irritable (IBS)**, el cual no aumenta su riesgo de cáncer colorrectal.

**-Antecedente familiar de cáncer colorrectal o pólipos adenomatosos.**

La mayoría de los cánceres colorrectales ocurren en personas sin antecedentes familiares de cáncer colorrectal. A pesar de esto, una de cada cinco personas que padece cáncer colorrectal tiene otros familiares que han sido afectados por esta enfermedad.

Las personas con un antecedente de cáncer colorrectal en uno o más familiares de primer grado (padres, hermanos o hijos) tienen un riesgo aumentado. El riesgo es alrededor del doble para aquellas personas con un solo familiar de primer grado afectado. El riesgo es aún mayor si el familiar fue diagnosticado con cáncer cuando tenía menos de 45 años, o si más de un familiar de primer grado es afectado.

Las razones para el riesgo aumentado no están claras en todos los casos. Los cánceres que “vienen de familia” pueden deberse a genes heredados, a que se comparten factores ambientales o a cierta combinación de estos factores.

Tener familiares que hayan tenido pólipos adenomatosos también está asociado a un mayor riesgo de cáncer de colon. (Los pólipos adenomatosos son la clase de pólipos que se pueden convertir en cancerosos).

**-Síndromes hereditarios.**

Alrededor del 5% al 10% de las personas que padecen cáncer colorrectal presentan defectos genéticos hereditarios (mutaciones) que pueden causar síndromes de cáncer familiares y que pueden llevar a padecer la enfermedad. Estos síndromes a menudo provocan que se origine el cáncer a una edad más temprana de lo común. También están vinculados a otros cánceres, además del cáncer colorrectal. Algunos de estos síndromes también están vinculados a los pólipos.

La identificación de las familias con estos síndromes hereditarios es importante, ya que permite tomar medidas específicas, como pruebas de detección y otras medidas preventivas cuando la persona es más joven.

Los síndromes hereditarios más comunes asociados a los cánceres colorrectales son la *poliposis familiar adenomatosa (familial adenomatous polyposis, FAP)* y el *cáncer colorrectal hereditario sin poliposis (hereditary non-polyposis colorectal cancer, HNPCC)*, aunque otros síndromes mucho menos comunes también aumentan el riesgo de cáncer colorrectal.

**-Poliposis adenomatosa familiar (FAP):** es causada por mutaciones en el **gen APC** (*Adenomatous polyposis coli*) que una persona hereda de sus padres. Aproximadamente el 1% de todos los cánceres colorrectales se debe a la poliposis adenomatosa familiar (*Kinzler y Vogelstein. 1996; Vogelstein y cols. 1988*).

El tipo más común de FAP provoca que las personas desarrollen cientos o miles de pólipos en el colon y el recto, por lo general en la adolescencia o en la edad adulta temprana. El cáncer, por lo general, surge en uno o más de estos pólipos tan pronto como a la edad de 20 años. Al cumplir los 40 años, casi todas las personas con este trastorno tendrán cáncer de colon, si primero no se extrae el colon para prevenirlo. Los pólipos que pueden convertirse en cáncer también se pueden desarrollar en el estómago y el intestino delgado.

En la FAP atenuada, que es un subtipo de este trastorno, los pacientes tienen un menor número de pólipos (menos de 100) y el cáncer colorrectal tiende a ocurrir a una edad más avanzada.

**-Síndrome de Gardner:** es un tipo de FAP que también se manifiesta con tumores benignos de la piel, el tejido blando y los huesos.

**-Cáncer de colon hereditario sin poliposis (HNPCC):** también conocido como **síndrome de Lynch**, representa alrededor del 2% al 4% de todos los cánceres colorrectales. En la mayoría de los casos, este trastorno es causado por una mutación en el gen **MLH1** o el gen **MSH2**, pero otros genes también pueden causar HNPCC. Los genes involucrados ayudan normalmente a reparar el ADN dañado.

Este cáncer también se desarrolla en personas relativamente jóvenes, aunque no tan jóvenes como en la poliposis adenomatosa familiar (FAP). Las personas con HNPCC también pudieran presentar pólipos, pero muy pocos, no cientos de ellos como en el caso de la poliposis adenomatosa familiar. El riesgo de cáncer colorrectal en el transcurso de la vida de una persona con esta afección puede ser tan alto como 80%.

Las mujeres con esta afección también tienen un riesgo muy alto de cáncer de endometrio. Otros cánceres asociados al HNPCC incluyen el cáncer de ovario, estómago, intestino delgado, páncreas, riñón, encéfalo, uréteres y las vías biliares.

**-Síndrome de Turcot:** ésta es una afección hereditaria que se presenta en raras ocasiones, en la que las personas están en riesgo aumentado de pólipos adenomatosos y cáncer colorrectal, así como tumores cerebrales. En realidad, existen dos tipos de síndrome de Turcot:

**-Meduloblastomas,** causados por cambios genéticos similares a aquellos vistos en FAP.

**-Glioblastomas,** pueden ser causados por cambios genéticos similares a aquellos vistos en HNPCC.

**-Síndrome Peutz-Jeghers:** es causado por mutaciones en el **gen STK1**. Las personas con esta afección hereditaria, poco común, tienen un riesgo significativamente mayor de cáncer colorrectal, así como de otros cánceres, que se suelen presentar a una edad más temprana de lo habitual.

**-Poliposis asociada a MUTYH:** las personas con este síndrome desarrollan pólipos, que se volverán cancerosos si no se remueve el colon. También tienen un riesgo aumentado de cánceres de intestino delgado, piel, ovario y vejiga. Este síndrome es causado por mutaciones en el gen MUTYH.

#### 1.2.6. Agentes inductores de cáncer colorrectal.

Se conocen diversas sustancias, que administradas por vía oral, parenteral o rectal son capaces de provocar CCR en animales de experimentación.

Los carcinógenos más frecuentemente utilizados son **Dimetilhidrazina (DMH)** y sus metabolitos N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanina (MNNG), N-metil-N-nitrosourea (MNU) y **Azoximetano (AOM)**.

-La DMH puede ser administrada por vía oral, subcutánea, intraperitoneal, intrarrectal e intramuscular, con resultados variables (*Koek-Larsen y cols. 2000*).

La administración intrarrectal induce una rápida hiperplasia y lesiones preneoplásicas en el colon tras 34 semanas, mientras que cuando se administra vía oral la incidencia tumoral es baja (del 14 al 30%).

La administración intraperitoneal induce la aparición de FCA (focos de criptas aberrantes) y otras lesiones preneoplásicas en colon, al cabo de 12-30 semanas, dependiendo de las dosis y pautas de administración (*Perse & Cerar, 2011; Yusup y cols. 2011*).

Los resultados de la administración subcutánea de DMH son muy variables (incidencia tumoral desde el 0 al 100%) (*Perse & Cerar, 2011* (Heijstek y cols. 2005).

-El AOM puede ser administrado tanto vía subcutánea como intraperitoneal mediante inyecciones semanales de 7 a 15 mg/kg de peso durante 10 a 12 semanas en ratas o ratones de varias edades (*Rogers y Pegg, 1977*). El intervalo de latencia es aproximadamente de cuatro semanas (Kanagalingam y Balis, 1975). Este es un modelo simple, reproducible y efectivo y es extensamente utilizado (*Teraoka y cols. 2011*).

Con altas dosis de AOM (15mg/kg/semana) tienen lugar predominantemente neoplasias en el colon izquierdo, mientras que con dosis bajas (7 mg/kg/semana) el colon derecho se afecta más frecuentemente (*Ward y Yamamoto, 1973*). Estudios genéticos han demostrado que produce un cáncer con baja inestabilidad de microsatélites (*Guda y cols. 2004*).

Un gran inconveniente del CCR inducido por carcinógenos es la baja incidencia de tumor, por lo que en general deben usarse muchos animales.

La incidencia de desarrollo de CCR depende, por lo tanto, del carcinógeno utilizado, la dosis administrada, la duración del tratamiento y la frecuencia de administración, así como la vía y forma de administración (*Heijstek y cols. 2005*).

La flora intestinal, la dieta y el estado inmunológico de los animales pueden interferir con el metabolismo de los compuestos carcinogénicos y de ese modo influir en su concentración local efectiva (*Corpet y Pierre, 2005*).

Además, otros factores como el sexo, la edad y el contexto genético de los animales afectan a la incidencia del desarrollo del CCR.

### **1.2.7. Desarrollo del cáncer colorrectal.**

El CCR puede inducirse a través de dos vías moleculares, la vía supresora y la vía mutadora, que fenotípicamente dan soporte a dos tipos de CCR diferentes, el polipoideo y el no polipoideo:

-La VÍA SUPRESORA se asocia a inestabilidad cromosómica y se manifiesta en el desarrollo de tumores con aneuploidía y pérdidas frecuentes de heterocigosidad (LOH) en múltiples locus, así como mutaciones que activan oncogenes e inactivan o bloquean genes supresores. En el CCR, el oncogén Ras y los genes supresores APC y p53 son los prototipos. Pertenecen a este grupo el 80-85% de los CCRs de tipo esporádico (sin antecedentes familiares) polipoideos y los hereditarios de la poliposis adenomatosa familiar (PAF), que tienden a afectar más al colon distal.

-La VÍA MUTADORA se asocia a inestabilidad de MSI+ (microsatélites). Se presenta en el 15% de los tumores esporádicos así como en el 85% de los HNPCC (*Umar y cols. 2004*) que, en general, se caracterizan por estar localizados fundamentalmente en colon proximal y tener un mejor pronóstico con respecto a los cánceres de la vía supresora, aunque pueden tener peor respuesta a la quimioterapia (*Ribic y cols. 2003*). Estos tumores son diploides y se observa una ausencia de mutaciones de los genes alterados habitualmente en los tumores de la vía supresora (*Ras, APC y p53*), siendo las mutaciones en MSI consecuencia de otras mutaciones en los genes reparadores del DNA.

En resumen, el desarrollo del CCR es un complicado proceso que involucra una combinación de factores genéticos y medioambientales. No se ha determinado aún cuántas vías son necesarias desde el punto de partida hasta la malignidad establecida o cuántos puentes de comunicación pueden existir.

Es probable que vayan surgiendo genes involucrados y la relación de estos con factores genéticos y medioambientales. El papel de genes supresores tumorales como *p16, Ki-67, E-cadherina y  $\beta$ -catenina* (*Tomlinson y cols. 1998*), y

de proteínas involucradas en la apoptosis y el envejecimiento celular, como bcl-2 y telomerasa, también necesitan ser clarificados.

### **1.2.8. Terapias farmacológicas en cáncer colorrectal.**

Para el tratamiento del cáncer colorrectal existen distintos abordajes farmacológicos, que no son excluyentes entre sí, sino que pueden utilizarse conjuntamente en gran variedad de combinaciones en función de la evolución de la patología.

#### **1.2.8.1. Quimioterapia.**

Según la Asociación Española contra el Cáncer ([www.aecc.es](http://www.aecc.es)), la quimioterapia es una de las modalidades terapéuticas más empleada en el tratamiento del cáncer. Su objetivo es destruir las células que componen el tumor con el fin de lograr la reducción o desaparición de la enfermedad.

Consiste en la administración de fármacos por vía intravenosa o por vía oral, para combatir el cáncer y controlar su crecimiento. La quimioterapia se administra cuando:

-Se ha efectuado una cirugía radical, para reducir las posibilidades de reproducción del tumor. Se suele administrar durante un período de 6 a 8 meses.

-La enfermedad se halla en una fase más avanzada. Se aplica durante un período de tiempo más variable, siempre que se controle paralelamente, la evolución de la enfermedad.

Actualmente, existen muchos fármacos **citotóxicos**, tales como el **5-fluorouracilo (5-FU)**, la **leucovorina (LV)**, el **oxaliplatino**, el **irinotecan** y la **capecitabina**. Mayoritariamente, se administran por vía intravenosa, aunque algunos también pueden administrarse por vía oral. Con la aparición de estos fármacos, los tratamientos con quimioterapia son más selectivos, la administración por vía oral es más cómoda y ocasiona menos trastornos a los pacientes, mejorando su calidad de vida.

La columna vertebral del tratamiento en primera línea con quimioterapia paliativa sola, así como en combinación con agentes dirigidos, consiste en una **fluoropirimidina (FP)** (5-FU intravenoso o capecitabina oral), en varias combinaciones y pautas de administración (*Van Cutsem y cols. 2014; Stintzing, 2014*).

A lo largo del tratamiento, pueden utilizarse diversas combinaciones de fármacos:

-**FOLFOX**: combinación de 5-FU+LV+oxaliplatino.

-**FOLFIRI**: combinación de 5-FU+LV+irinotecán.

-**FOLFOXIRI**: 5-FU+LV+oxaliplatino+irinotecán.

-**CAPOX (XELOX)**: capecitabina+oxaliplatino.

Estos fármacos (denominados fármacos antineoplásicos o quimioterápicos) llegan a prácticamente todos los tejidos del organismo y ahí es dónde ejercen su acción, tanto sobre las células malignas como sobre las sanas. Debido a su acción sobre éstas últimas, pueden aparecer una serie de efectos secundarios más o menos intensos y generalmente transitorios.

Los tumores malignos se caracterizan por estar formados por células transformadas cuyos mecanismos que regulan la división se han alterado, por lo que son capaces de dividirse descontroladamente e invadir y afectar órganos vecinos.

La mayoría de los fármacos que se emplean en el tratamiento quimioterápico están diseñados para poder destruir las células mientras se dividen. Cuanto más rápido se dividen más sensibles son al tratamiento.

La quimioterapia en el cáncer de colon no está indicada en todos los casos. Su administración dependerá de determinados factores:

-Estadio tumoral: afectación o no de ganglios y/o de órganos próximos al tumor y/o aparición o no de metástasis.

-Estado general del paciente previo a la administración del tratamiento.

En función de estos aspectos la administración de quimioterapia puede tener tres finalidades:

**-Curativa:** la intención de la quimioterapia es curar la enfermedad. En este caso se emplea como tratamiento complementario a la cirugía. Está demostrado que en estadios II-III, es decir, cuando hay ganglios linfáticos afectados por el tumor, la quimioterapia adyuvante mejora de una forma significativa la supervivencia libre de enfermedad (SLE) y la supervivencia global (SG). Por ello, se aconseja administrar siempre que no existan contraindicaciones una quimioterapia adyuvante durante 6 meses. Se utiliza la combinación de Fluoropirimidinas y Oxaliplatino.

**-Potencialmente curativa:** en los pacientes que tienen metástasis hepáticas, que pueden ser resecadas con una cirugía, la quimioterapia, antes de la intervención sobre el hígado, puede contribuir a que aumenten las posibilidades de una supervivencia prolongada. A esta forma de tratamiento se le llama "**quimioterapia neoadyuvante**".

**-Paliativa (control de síntomas):** con la quimioterapia se pretenden controlar los síntomas producidos por el tumor y/o las metástasis y su objetivo primordial es mejorar la calidad de vida del enfermo que tiene una enfermedad avanzada.

#### 1.2.8.2. Otros tratamientos.

Otra estrategia de tratamiento que se realiza en pacientes con cáncer de colon avanzado es el uso de agentes biológicos dirigidos a moléculas específicas de la célula tumoral o de su entorno ("**terapias dirigidas**").

En la actualidad, existen estudios suficientes que demuestran que **anticuerpos monoclonales** asociados a la quimioterapia mejoran los resultados frente a la quimioterapia sola. (*Van Cutsem y cols. 2014*).

Un ejemplo de tratamientos combinados se puede ver en el siguiente árbol de decisión, propuesto para el tratamiento en primera línea del CCRm (*Stintzing, 2014*):

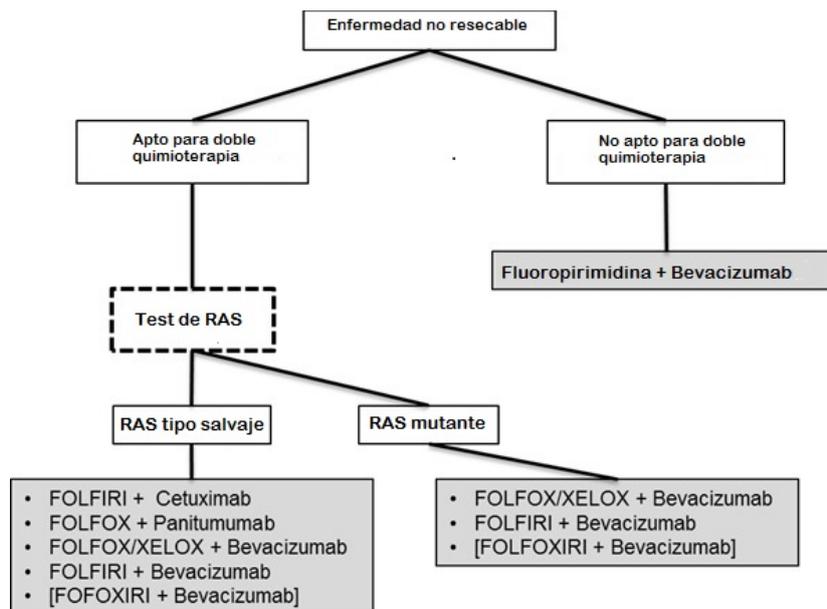


Figura 1.8. Tratamientos combinados en CCR. (de Stinzing, 2014)

Los anticuerpos monoclonales tienen la característica de actuar destruyendo células tumorales, sin poseer prácticamente efecto sobre las células sanas, por lo que los efectos secundarios suelen ser bien tolerados.

Existen tres tipos fundamentales de anticuerpos monoclonales aprobados para su uso en cáncer colorrectal:

**-Anticuerpos anti-EGFR.** Dirigidos contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico. Hay dos fármacos: **Cetuximab** y Panitumumab.

Ambos se deben utilizar solamente en pacientes con el gen KRAS tipo silvestre. Es decir, si este gen tiene alguna mutación se ha comprobado que estos fármacos no tienen ninguna eficacia. Por su mecanismo de acción tienen una toxicidad cutánea que suele ser de moderada a leve (Chang y cols. 2009).

**-Anti-VEGF.** Dirigidos contra el factor de crecimiento del endotelio vascular. El mecanismo de acción de este tipo de fármacos es impedir o dificultar que se formen vasos sanguíneos que "alimenten" a las células tumorales. El Bevacizumab es el anticuerpo monoclonal aprobado para su uso en cáncer colorrectal avanzado. (Stintzing, 2014).

**-Dirigidos contra varias proteínas involucradas en el crecimiento tumoral.** Es el caso de Regorafenib que es un inhibidor oral multiquinasa que

inhibe varias quinasas involucradas en el crecimiento y progresión del tumor, angiogénesis, oncogénesis y microambiente tumoral, incluyendo VEGFR 1-3, KIT, RET, PDGFR y FGFR, que individual y colectivamente afectan al crecimiento del tumor, la formación del microambiente del estroma y progresión de la enfermedad.

### 1.2.9. Cetuximab y cáncer colorrectal.

Desde su introducción, en el año 2005, hasta la actualidad, el Cetuximab ha constituido un tratamiento muy efectivo para cáncer colorrectal.

Es un anticuerpo monoclonal (mAb) quimérico entre ratón y humano, de la subclase de las inmunoglobulinas G1 (IgG1), que actúa bloqueando el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), proteína expresada en la mayoría de los cánceres colorrectales.

Consta de 4 cadenas polipeptídicas, dos pesadas y dos ligeras, unidas por enlaces covalentes y no covalentes con un dominio de unión funcional entre el anticuerpo murino y el EGFR humano (Colomer, 2005).

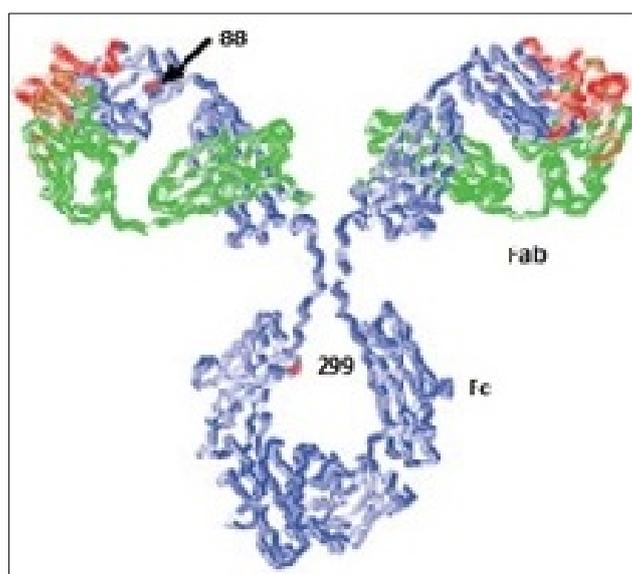


Figura 1.9. Conformación tridimensional de la molécula de inmunoglobulina de Cetuximab. (Colomer, 2005).

### 1.2.9.1. Mecanismo de acción de Cetuximab.

Se une específicamente al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), ya que posee una mayor afinidad por él que sus ligandos naturales, generándose una inhibición competitiva entre el cetuximab y ellos. Además, el cetuximab, al promover la internalización de estos receptores, disminuye el número de los receptores de superficie celular y consecuentemente la señalización de los mismos (Colomer, 2005; Li y cols. 2015).

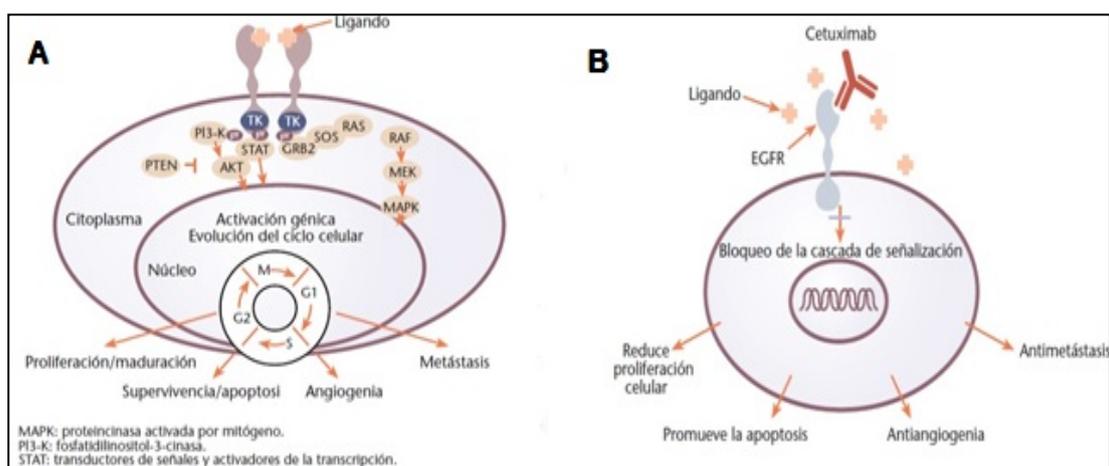


Figura 1.10. A) Esquema de la transducción de señales intracelulares mediadas por la unión del ligando al EGFR. B) Esquema de las actividades antitumorales propuestas para la acción del Cetuximab. (Colomer, 2005).

El cetuximab, al bloquear el EGFR, inhibe el crecimiento anormal de las células cancerosas, reduciendo a su vez el tamaño de la metástasis.

Los efectos biológicos generados por el bloqueo del EGFR por parte del cetuximab, incluyen una menor activación de la tirosín quinasa (TK) y numerosos efectos sobre todas las funciones celulares implicadas en el crecimiento y metástasis tumoral, como la proliferación y supervivencia celulares, la reparación del DNA, la angiogénesis tumoral, y la motilidad e invasión celulares (Colomer, 2005; Li y cols. 2015).

Mediante estudios *in vitro*, se ha visto que el cetuximab se une al EGFR, pero *in vivo* su actividad es considerablemente superior (Colomer, 2005). Posee efectos antitumorales potentes cuando se administra en monoterapia, reduciendo hasta un 15% el riesgo de progresión del cáncer, y efectos

sinérgicos con quimioterapia y radioterapia sobre el crecimiento tumoral. Es posible que la combinación de cetuximab con algún otro compuesto pueda presentar mayores efectos sobre la progresión del cáncer y la metástasis (Cutsem et al., 2009).

En estudios farmacocinéticos se ha demostrado que las concentraciones séricas del fármaco alcanzan sus valores máximos aproximadamente 1-2 horas tras la administración intravenosa, con una vida media de eliminación prolongada que oscila entre las 70-100 horas.

Se pueden producir algunas reacciones adversas, pero ninguna fuera de lo normal, respecto a lo que a un tratamiento quimioterápico se refiere, como por ejemplo, malestar general, fiebre, náuseas, vómitos, diarrea, estreñimiento, cefalea, dolor abdominal, erupción cutánea, anorexia, reacción relacionada con la infusión del fármaco, etc, y mucho menos comunes son los casos de reacciones de hipersensibilidad al cetuximab (Colomer, 2005).

El éxito o no de este fármaco reside en parte en una condición genética del paciente que recibe el tratamiento. El gen *KRAS* codifica una pequeña proteína G que relaciona la activación del receptor dependiente de ligando y las vías intracelulares de la cascada de señalización del EGFR. Si este gen muta en un sitio concreto, se produce una activación constitutiva de la señalización de *KRAS*, por lo que el cetuximab es totalmente ineficaz en la masa tumoral (Cutsem y cols., 2009; Li y cols. 2015).

#### **1.2.9.2. Receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR).**

El receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR), es una proteína transmembrana que se encuentra relacionada con la progresión de diversos tumores malignos, incluido el cáncer colorrectal. Produce un crecimiento mucho más rápido del tumor, lo que disminuye las perspectivas de supervivencia.

El bloqueo de este tipo de receptores constituye, por tanto, una estrategia terapéutica eficaz ya que, al tratarse de una inhibición específica, se encuentra exenta de las toxicidades asociadas a muchos fármacos citotóxicos (Colomer, 2005).

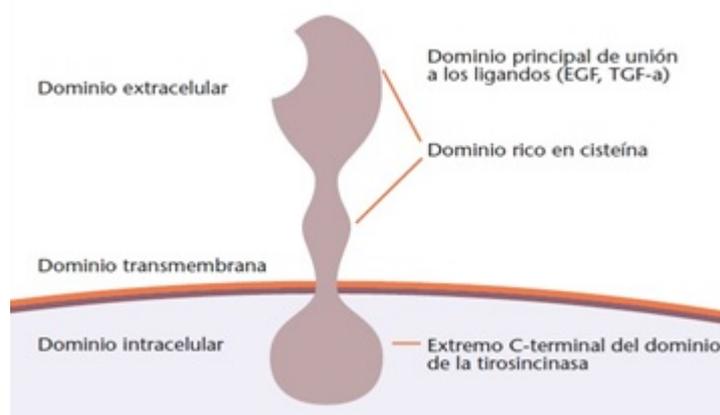


Figura 1.11. Estructura del receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR).  
(Colomer, 2005).

### 1.3. Ácido Hialurónico.

El ácido hialurónico (AH) es un polímero simple de cadena lineal y de alto peso molecular, presente en casi todos los tejidos animales, siendo un componente habitual de la membrana basal y responsable de la integridad estructural de los mismos (*Noble, 2002; Jiang y cols. 2011*).

Particularmente se encuentra en los tejidos conjuntivos, tales como el cartílago, tendón, piel y paredes de los vasos sanguíneos, constituidos por fibras de colágeno y elastina, siendo el ácido hialurónico un componente importante en el líquido sinovial que lubrica las articulaciones y el humor vítreo del ojo (*Voet y Voet, 2006*).

Dependiendo de la fuente de tejido, el ácido hialurónico se compone de, aproximadamente, unas 2.000-25.000 unidades de disacáridos, cuya masa molecular ronda alrededor de  $10^6$ - $10^7$ Da (*Bouga y cols., 2010*). Posee numerosos grupos aniónicos que se repelen mutuamente, convirtiendo al AH en una entidad rígida y muy hidratada, que en disolución ocupa aproximadamente 1000 veces más que en estado seco; estas disoluciones poseen una gran viscosidad (*Voet y Voet, 2006*).

Cuando se halla presente en la matriz extracelular (ECM), no se une de forma covalente a las proteínas, pero sí existen numerosas proteínas a las que se puede asociar (como por ejemplo, agregcano y versicano), lo que proporciona integridad estructural a la misma, influyendo sobre características fisiológicas

de los tejidos. Posee una alta capacidad de hidratación, por lo que contribuye a la homeostasis del tejido, permitiendo a su vez la formación de espacios intersticiales para la proliferación y migración celular (Schmaus y cols., 2014).

### 1.3.1. Síntesis del ácido hialurónico.

El ácido hialurónico se sintetiza en la superficie citoplasmática de la membrana plasmática, y se transporta al exterior celular a medida que se va sintetizando, debido a su gran tamaño, sin sufrir modificaciones posteriores (Stern y cols., 2006). Los disacáridos que lo componen, el ácido D-glucurónico y la N-acetil-glucosamina, se encuentran unidos mediante enlaces alternos 1,4 ó 1,3- $\beta$ -glicósidos (Plätzer y cols., 1999).

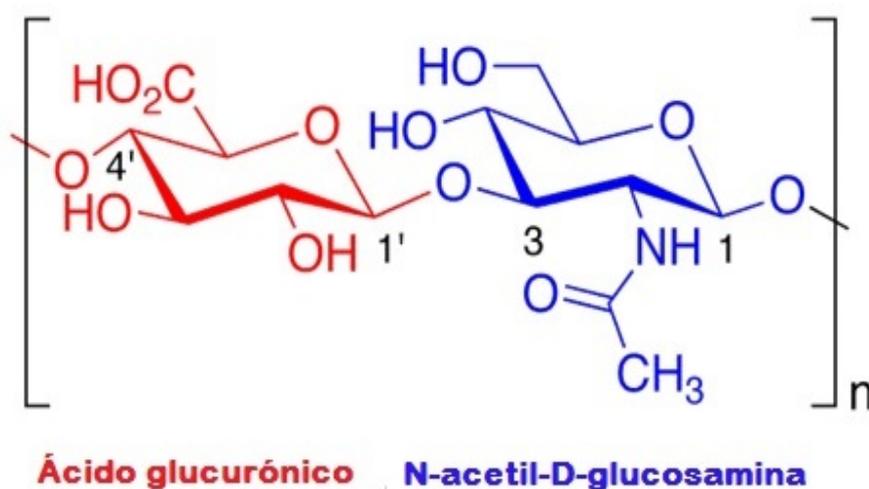


Figura 1.12. Estructura química del dímero de ácido hialurónico.

La síntesis se lleva a cabo por medio de enzimas sintasas (AH sintasas): son glicosiltransferasas y existen tres isoformas en mamíferos, con diferentes propiedades, catalizando la misma reacción pero difiriendo en el tamaño de sus productos (Stern y cols. 2006). Estas enzimas poseen varias regiones transmembrana que catalizan la formación de enlaces  $\beta$ -1,3 ó  $\beta$ -1,4 entre las unidades de azúcar que componen el AH (Schmaus y cols., 2014).

Durante la síntesis de AH, se van generando fragmentos de muy diversos tamaños. Los fragmentos iniciales de tamaño intermedio producidos extracelularmente son internalizados y degradados (Schmaus y cols., 2014) (Fig. 1.13).

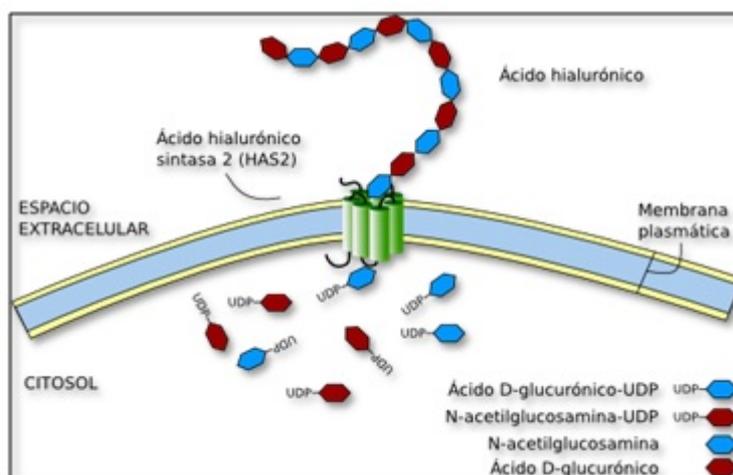


Figura 1.13. Esquema del proceso de síntesis de ácido hialurónico llevado a cabo por la AH sintasa 2 (AHS2). (modificado de Escudero, 2009).

### 1.3.2. Degradación del ácido hialurónico: hialuronidasas.

La degradación de AH es un proceso muy importante en la célula: éste sufre una despolimerización por parte de un grupo de enzimas -que en células animales pueden ser **hialuronidasas**, condroitinasas y hexosaminidasas- y como resultado se generan fragmentos de múltiples tamaños moleculares. Esta despolimerización se ha observado frecuentemente en situaciones de estrés celular (Noble, 2002; Noble, 2011).

Las hialuronidasas, de las enzimas que intervienen en este proceso, son de las que mayor información se posee (Stern y cols., 2006). Estas enzimas están implicadas en procesos biológicos, tales como el desarrollo y la tumorigénesis (Bouga y cols., 2010). En mamíferos son endo- $\beta$ -N-acetil-hexosaminidasas y su función es hidrolizar el ácido hialurónico. Poseen un alto grado de homología de secuencia, pero difieren en su distribución tisular, ya que pueden ser enzimas específicas de órgano, o de amplia distribución (Schmaus y cols., 2014).

La mayoría de las hialuronidasas son enzimas lisosomales y requieren pH ácido para alcanzar una actividad máxima (*Jiang y cols., 2011*). Junto con las enzimas  $\beta$ -glucuronidasas y  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasas, degradan el AH completamente (*Bouga y cols., 2010*).

Se conocen hasta siete isoformas de la enzima:

**-Hyal1:** es una enzima secretada que se encuentra en la mayoría de los tejidos somáticos, plasma y algunas secreciones de pacientes con cáncer.

Se localiza en el interior de los lisosomas, donde existe el pH ácido necesario para que alcance su actividad óptima y poder degradar correctamente el ácido hialurónico (por el contrario, en suero no existe ambiente ácido).

Su expresión se ve estimulada por AH de alto peso molecular -existiendo un efecto de retroalimentación auto-reguladora- al que degrada a pequeños oligómeros, principalmente tetrasacáridos.

**-Hyal2:** también se encuentra en la mayoría de los tejidos somáticos, pero ésta se encuentra anclada a una molécula de glicosil fosfatidilinositol (GPI) situada en la membrana extracelular y en los lisosomas.

A diferencia de la isoforma 1, *Hyal2* es activa en un amplio rango de pH, pudiendo así degradar AH extracelular a pH fisiológico. Degrada el AH de alto peso molecular para generar productos de  $\pm 20$  kDa.

**-Hyal3:** se localiza en tejidos somáticos y en el interior de vesículas, contribuyendo a aumentar la actividad de *Hyal1*.

**-Hyal4:** es también una condroitinasa que degrada condroitín sulfato (CS, un GAG sulfatado) y se encuentra en los músculos y la placenta.

**-PH-20/Spam1, Hyal5 y HyalP1:** se localizan en el testículo. Las dos primeras se unen a GPI en la membrana, siendo activas tanto en condiciones ácidas como neutras, degradando AH en fragmentos de 2-3 disacáridos; la tercera, en humanos, es un pseudogen que se transcribe pero no se traduce (*Schmaus y cols., 2014*).

Durante el proceso de degradación del AH, por parte de enzimas hialuronidasas, el polímero de alto peso molecular se escinde progresivamente, generándose así fragmentos de cada vez menor tamaño.

Las isoformas de la enzima hialuronidasa, *Hyal1* y *2*, degradan ácido hialurónico de forma coordinada y secuencial en los tejidos somáticos: el AH se une a su receptor de superficie celular, el **CD44**, degradándose en fragmentos de tamaño intermedio en el exterior de la membrana plasmática por acción de *Hyal2* unida a GPI; posteriormente *Hyal1* degrada totalmente esos fragmentos resultantes, bien sea en el exterior celular o en el interior de los lisosomas.

Por otro lado, el AH de alto peso molecular puede degradarse en dos clases: AHs (de pequeño tamaño: 2-25 disacáridos) y AH de tamaño intermedio (25-1000 disacáridos). Ambos regulan una gran variedad de procesos biológicos: AHs posee propiedades angiogénicas, pero requiere un mínimo de 3 disacáridos para estimular la proliferación de células endoteliales para la formación de nuevos vasos sanguíneos; esto ocurre a bajas concentraciones de AHs, a altas concentraciones no se produce ningún efecto, e incluso puede resultar anti-proliferativo (*Schmaus y cols., 2014*).

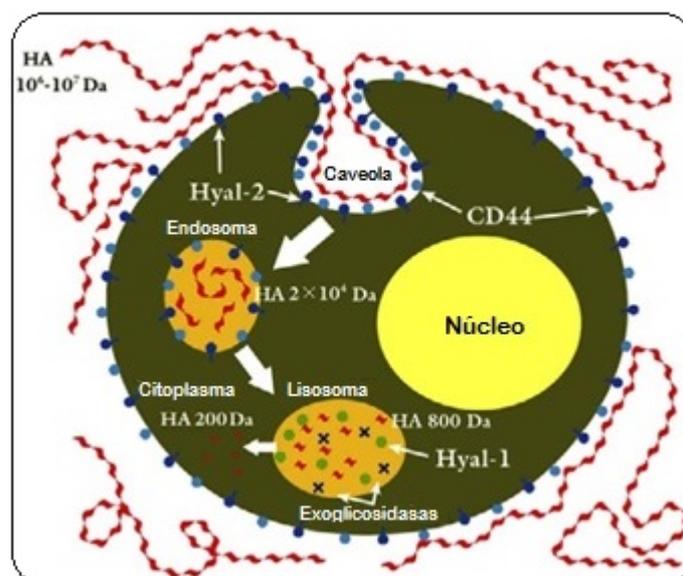


Figura 1.14. Biodegradación del ácido hialurónico, por medio de las enzimas hialuronidasas, en el interior celular. (modificado de *Dicker y cols. 2014*).

El tamaño de estos productos de degradación determinará sus funciones biológicas dentro de la propia célula, pudiendo desencadenar diferentes acciones celulares en función del estado celular reinante en el momento.

Las múltiples propiedades de los sucesivos productos de degradación pueden ser incluso contradictorias en algunos casos (*Stern y cols., 2006*).

Los polímeros de alto peso molecular constituyen uno de los grupos de moléculas más grandes que existen en la matriz, por lo que generalmente suelen situarse en el exterior, uniéndose a receptores de superficie celular, como el CD44 (*Stern y cols., 2006*).

En algunas situaciones patológicas concretas, la concentración celular de estos AH de alto peso molecular aumenta, aunque generalmente son indicativos de tejidos sanos (*Bouga y cols., 2010*).

Estos polímeros llenan el espacio que hidrata los tejidos, y presentan numerosas funciones: son antiangiogénicos, antiinflamatorios e inmunosupresores, inhiben la fagocitosis, están involucrados en la ovulación, fecundación y embriogénesis, promueven la quiescencia celular y la integridad del tejido, y en el caso de receptores CD44 transmembranales pueden provocar la detención del ciclo celular.

En general, protegen a las células contra el daño, manteniendo la integridad de células epiteliales, y proporcionan protección contra la apoptosis a través de la activación de NF- $\kappa$ B, (*Stern y cols., 2006*).

Por el contrario, los polímeros de bajo peso molecular (< 20 disacáridos), que son dependientes de pH, temperatura, concentración de sales y cationes específicos, poseen funciones tales como: capacidad angiogénica, inflamatoria e inmunoestimulante, es decir, van a estar involucrados en el sistema de alarma del cuerpo, transmitiendo señales de peligro.

Los que son aún más pequeños parece que aumentan aún más esta señalización de estrés (*Stern y cols., 2006*) y pueden estar relacionados con numerosas patologías del organismo, incluyendo el cáncer, ya que son capaces de activar vías de señalización críticas para la progresión del cáncer. Además, estos fragmentos pueden proceder de la síntesis de AH o de la acción de las enzimas hialuronidasas (*Bouga y cols., 2010*).

### 1.3.3. Receptores del ácido hialurónico: CD44.

El CD44 es un receptor de superficie celular para el AH. Ambos participan en la invasión de células tumorales y la migración celular, ya que el CD44 se escinde de su dominio extra e intracelular en la superficie de células neoplásicas, provocando un aumento de su propia expresión y contribuyendo a una mayor motilidad celular. Esto provoca la invasión y progresión tumoral, ya que el CD44 escindido pasa a la circulación sistémica.

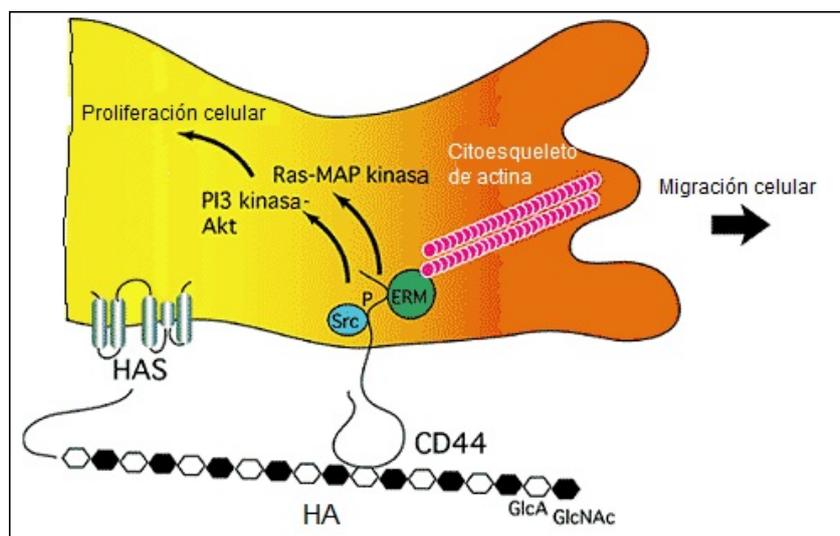


Figura 1.15. Unión de AH y CD44: estimulación de moléculas de señalización intracelulares. (Modif. de Naoki Itano, <http://www.glycoforum.gr.jp/>).

Así pues, la interacción entre el ácido hialurónico y su receptor CD44 juega un papel importantísimo en ciertas situaciones patológicas como el cáncer, pudiendo producir cambios en la morfología y motilidad de las células tumorales. Incluso, algunos tipos celulares tumorales pueden producir hialuronidasas que degradan el AH en pequeños oligosacáridos y que aumentan la escisión de CD44 (Sugahara y cols., 2006). De hecho, algunos fragmentos de AH en células endoteliales, tumorales y condrocitos son capaces de activar vías de señalización intracelular.

Aunque el CD44 es el más importante de los receptores del AH, existen muchos más, a través de los cuales el AH media en numerosos procesos celulares. Por ejemplo, los receptores de la familia Toll-Like (TLR) están implicados en el reconocimiento de patógenos y la activación de respuestas

inmunes. Los receptores para la motilidad mediada por AH (RHAMM) son proteínas citoplasmáticas que median la motilidad de las células tumorales en la superficie celular, y junto con el receptor CD44 contribuyen a la angiogénesis (*Schmaus y cols., 2014*).

#### **1.3.4. Ácido Hialurónico y cáncer.**

Sabemos que los tumores están constituidos por células cancerosas y un estroma rico en moléculas de señalización, matriz extracelular y una variedad de células no malignas. El microambiente estromal evoluciona progresivamente durante el desarrollo del tumor primario, jugando un papel muy importante en procesos que tienen lugar durante el mismo.

El ácido hialurónico es un componente esencial de la matriz extracelular, y por tanto, también se encuentra presente en las masas tumorales; así pues, los cambios que se produzcan en el metabolismo del AH durante la progresión tumoral, también generarán cambios en las propiedades y el comportamiento tumorales (*Schmaus et al., 2014*).

En los últimos años ha aumentado la preocupación por el papel que juega el AH en los tumores. Hay numerosos estudios que están de acuerdo en que el AH está implicado en la regulación de una variedad de funciones celulares, tanto en células tumorales como células estromales asociadas a los tumores.

Tanto es así, que los niveles alterados de AH influyen en el crecimiento tumoral y en la malignidad del propio tumor (así como en la expresión de varios reguladores del ciclo celular) y en el aumento de la tasa de proliferación y la inhibición de la apoptosis de las células tumorales.

El ácido hialurónico también se encuentra implicado en la denominada regulación epitelio-mesénquima en las células tumorales, esencial en la motilidad e invasión de estas células.

En cuanto a la capacidad angiogénica del AH, ésta se basa en el reclutamiento de macrófagos que contribuyen a la neo-vascularización tumoral, por lo que la masa tumoral crece de tamaño y puede metastatizar. De hecho, en ocasiones el AH es responsable de la producción de micro-metástasis, ya que se une a su receptor, el CD44, y éste a su vez se va

uniendo a diferentes células, aumentando a su vez la adhesión a las células endoteliales y comportándose como un "pegamento".

Las células tumorales que circulan por la sangre expresan receptores de superficie celular de AH (como el CD44), que les permite unirse a las células endoteliales. Sin embargo, el AH circulante puede saturar sus receptores, provocando que las células tumorales ya no se peguen al endotelio, sino que viajen sistémicamente, provocando metástasis a distancia (*Schmaus y cols., 2014*).

En numerosos estudios se ha encontrado, que en diversas situaciones patológicas del organismo -como en los tumores-, se muestran acumulaciones de AH de nueva síntesis. Por ejemplo, en situaciones de inflamación de un tejido se acumula AH de menor peso molecular, mientras que el de mayor peso molecular lo hace en la etapa de cicatrización de las heridas tras una lesión (*Stern y cols., 2006*).

En algunas ocasiones, el aumento de AH extracelular y de sus oligómeros parcialmente catabolizados, se correlaciona con varios tipos de tumores malignos (*Bouga y cols., 2010*).

Se han realizado estudios clínicos que indican una asociación posible entre nivel intra-tumoral de AH y resultados desfavorables en casos de cáncer de ovario y de estómago, mientras que otros señalan que el contenido de AH en el citosol tumoral, se relaciona con evolución adversa en tumores resecables colorrectales o gástricos.

En otros estudios clínicos, que evaluaron la relación entre AH y cáncer de mama, se observó que la expresión tumoral elevada de este polisacárido se asocia con parámetros clínicos y patológicos de agresividad, al igual que con menor supervivencia global (SG) de las pacientes (*Corte y cols. 2006*).

En situaciones neoplásicas se ha visto que aumenta la síntesis de AH, que forma una capa pericelular -alrededor de las células que forman la masa tumoral- e influye en la adhesión celular, migración y proliferación (*Sugahara y cols., 2006*).

Esa elevada síntesis de AH provoca alteraciones en la matriz extracelular, de tal manera que aumenta la hidratación y la turgencia de la misma, aumentando a su vez el espacio entre las láminas ortogonales de las fibras de

colágeno. Consecuentemente, disminuye la adhesión celular al sustrato, aumentando la motilidad celular, y por tanto, la invasividad de células tumorales (*Arias y cols., 1989*).

Existen evidencias acumuladas, que demuestran que la producción de HA es excesiva en tumores malignos; los niveles elevados de HA en suero y su deposición en el tejido tumoral están a menudo asociados con la progresión de la malignidad en cáncer colorrectal.

El HA puede bloquear la acción de muchos agentes quimioterapéuticos, ya que crea un microambiente muy denso alrededor del tumor. Consecuencia de ello es que incrementa la presión intersticial en el tumor e inhibe la entrada de drogas y su difusión dentro de las masas tumorales.

### **1.3.5. Hialuronidasas y cáncer.**

Se conoce la asociación entre el aumento de los niveles de hialuronidasas y el crecimiento tumoral y la metástasis. En muchos tipos de cáncer, estas enzimas aumentan su expresión, promoviendo la progresión tumoral debido al aumento de fragmentos de AH.

Algunas alteraciones en el organismo pueden estimular la actividad hialuronidasa, como por ejemplo, la respiración anaerobia, la hipoxia y el medio inflamatorio en el interior de las masas tumorales, ya que poseen un pH inferior al que existe en condiciones fisiológicas. Esto provoca una alteración en la degradación de AH, concretamente, en el tamaño de los fragmentos resultantes (*Schmaus y cols., 2014*).

De entre las hialuronidasas conocidas, la enzima *Hyal1* se expresa en una gran variedad de tumores, y es la principal hialuronidasa derivada de tumor. De hecho, todas las hialuronidasas parece que están implicadas en muchos carcinomas, destacando el cáncer colorrectal por su preocupante papel en él (*Bouga y cols., 2010*).

En condiciones fisiológicas, los productos de degradación de AH se eliminan rápidamente y no son detectables. En los tumores, si se produce una expresión simultánea de AHS, hialuronidasas, presencia de ROS y condiciones ácidas en el microambiente, todo ello promueve la degradación de AH durante la progresión tumoral, provocando la acumulación de productos resultantes de

dicha degradación. Los altos niveles de AH y productos de su degradación nos indican que los tumores son heridas que no cicatrizan y que se encuentran inflamadas crónicamente. Durante la inflamación de un tejido siempre aumentan los niveles de ácido hialurónico, y esto a menudo coincide con una mayor tasa de degradación del mismo (*Schmaus y cols., 2014*).

El ácido hialurónico de pequeño tamaño (AHs) posee un receptor en las células endoteliales linfáticas -el receptor endotelial 1 de vasos linfáticos de AH (Lyve-1)-, a través del cual induce la angiogénesis de los vasos linfáticos (linfangiogénesis) (*Schmaus y cols., 2014*).

También se ha visto que se acumula en los tumores, y que su actividad biológica depende en gran medida del tamaño y la concentración del mismo, así como el modo de su generación, bien sea por ROS, hialuronidasas o AHS, ya que las diferencias estructurales existentes entre los diferentes fragmentos generados pueden influir en la unión al receptor y en su activación.

Paradójicamente, tanto el HA como las hialuronidasas, se pueden correlacionar con la progresión del cáncer. Los altos niveles de HA en la superficie de las células tumorales son indicadores de mal pronóstico. Ciertas hialuronidasas se usan clínicamente en la terapia contra el cáncer y distintas publicaciones documentan que los niveles de hialuronidasas se correlacionan directamente con la agresividad del tumor (*Stern, 2005 y 2008*).

Por otro lado, existen datos preclínicos y clínicos, que confirman que altas dosis de hialuronidasas facilitan el acceso al tejido tumoral para quimioterapias, terapias de anticuerpos y otras macromoléculas.

La adición de hialuronidasas degrada en gran medida la mayor cantidad de AH que se encuentra en tumores, por lo que la presión intersticial disminuye y el tejido conjuntivo se relaja (*Guedan, 2010*). Esto mejora la accesibilidad de los agentes quimioterápicos, incrementando su eficacia.

Esas hialuronidasas, utilizadas previamente como un adyuvante en el tratamiento del cáncer (presumiblemente para mejorar la penetración de los fármacos quimioterapéuticos), pueden tener en sí una intrínseca actividad anti-cáncer. Las hialuronidasas podrían constituir una nueva clase de agentes terapéuticos contra el cáncer y sin efectos secundarios tóxicos (*Shuster y cols., 2002*).

Si se consigue optimizar la utilización de hialuronidasas en este contexto, rompiendo la barrera intersticial, que está constituida fundamentalmente por AH, podrían mejorar significativamente los tratamientos antitumorales, lo que redundaría en una mayor calidad de vida para el paciente oncológico (*Srinivas y cols., 2012*).

#### **1.4. Marcadores en cáncer colorrectal.**

A pesar de que existe una cantidad considerable de investigación sobre el cáncer colorrectal (CCR), que pone de manifiesto la existencia de muchas alteraciones genéticas como desencadenantes de la enfermedad y que mantienen su progresión, hay pocos biomarcadores moleculares de CCR, bien validados, clínicamente útiles.

La observación de que el cáncer es muy diverso, comparando tumores individuales, se manifiesta a nivel molecular por la existencia de patrones de expresión génica también diversos. Sin embargo, mientras que el análisis de la expresión génica se ha utilizado para identificar posibles biomarcadores de cáncer, éstos con frecuencia no se validan bien en conjuntos de datos independientes, lo que ha planteado lógicas preocupaciones sobre la utilidad de los marcadores basados en la expresión génica.

Para desarrollar biomarcadores más robustos, que puedan ser identificados y utilizados, se postula la integración (en redes) de la información sobre el funcionamiento de los productos génicos relacionados (*Mehmet Koyuturk and Rod K. Nibbe "Omics and Biomarkers Development for Intestinal Tumorigenesis" Intestinal tumorigenesis: Mechanisms of Development & Progression, Ed. Springer 2015*).

No obstante, existe una serie de marcadores, cuya expresión puede correlacionarse en mayor o menor medida con el estado patológico y que pueden ser útiles para el seguimiento del cáncer colorrectal. Algunos de ellos son (<http://www.genecards.org/>):

**-ACTB** (Beta-actina). Este gen codifica una de seis diferentes proteínas actina (las actinas son proteínas altamente conservadas, que están implicadas en la motilidad, estructura e integridad celular). Esta actina es el

constituyente principal del aparato contráctil y una de las dos actinas del citoesqueleto no muscular. Está relacionada con la vía de señalización *RAS* y los *proteoglicanos* en cáncer.

La actina es un componente del citoesqueleto y se enlaza con la *alfa-actinina*, *E-cadherina* y *beta-catenina* en uniones adherentes. Esto proporciona soporte mecánico a las células y las ancla entre ellas y a la matriz extracelular (ECM). Desempeña un papel en la motilidad celular por medio de la polimerización y despolimerización de las fibrillas.

Procesos en los que interviene: **Adhesión** y **migración**.

**-IL6** (Interleukina-6). Este gen codifica una citokina que actúa en la inflamación y en la maduración de las células B. La proteína se produce inicialmente en lugares de inflamación aguda y crónica, donde es secretada al suero e induce una respuesta inflamatoria transcripcional a través del receptor alfa de interleukina-6. Este gen está implicado en una amplia variedad de estados patológicos asociados a inflamación. Actúa sobre los linfocitos-B, linfocitos-T, hepatocitos, células progenitoras hematopoyéticas y células del Sistema nervioso central (SNC). Induce el desarrollo de mieloma y plasmacitoma e induce la diferenciación de las células nerviosas. Entre sus vías relacionadas se encuentran la vía de señalización *PI3K-Akt* y *Glioma*.

Procesos en los que interviene: **inflamación** y **apoptosis**.

**-TNF** (*Tumor Necrosis Factor*). Codifica una citokina pro-inflamatoria multifuncional, que pertenece a la superfamilia del TNF; es principalmente secretada por los macrófagos, a los que puede unirse y, por tanto, funciona a través de sus receptores *TNFRSF1A/TNFR1* y *TNFRSF1B/TNFR*. Esta citokina está implicada en la regulación de un amplio espectro de procesos biológicos que incluyen la proliferación celular, diferenciación, apoptosis, metabolismo lipídico y coagulación. Ha sido relacionada con una variedad de enfermedades, incluyendo el cáncer. Entre sus vías relacionadas están la vía de señalización *MAPK* y *Proteoglicanos* en cáncer. Puede inducir la muerte celular en ciertas líneas celulares tumorales. Bajo ciertas condiciones puede estimular la proliferación e inducir la diferenciación celular.

Procesos en los que interviene: **apoptosis, proliferación.**

**-TRP53** (Transformation related protein 53 → tumor protein p53 (tp53)). Este gen codifica una proteína supresora de tumores que contiene una activación transcripcional, unión al ADN, y dominios de oligomerización. La proteína codificada responde a diversos tipos de estrés celular para regular la expresión de genes diana, induciendo con ello la detención del ciclo celular, la apoptosis, senescencia, reparación del ADN o cambios en el metabolismo. Mutaciones en este gen están asociados con una variedad de cánceres humanos. Actúa como un supresor de tumores en muchos tipos tumorales; induce la detención del crecimiento o la apoptosis, dependiendo de las circunstancias fisiológicas y del tipo celular. Está implicado en la regulación del ciclo celular, como un trans-activador que regula negativamente la división celular, controlando un grupo de genes requeridos para este proceso. Uno de los genes activados es un inhibidor de kinasas ciclina-dependientes.

Procesos en los que interviene: **apoptosis, necrosis.**

**-KRAS** (*v-Ki-ras2, Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*). Este gen, un homólogo del oncogen Ras de Kirsten de la familia de los genes Ras de mamíferos, codifica una proteína perteneciente a la superfamilia de la pequeña GTPasa. Una única sustitución de aminoácidos es responsable de una mutación activadora. La proteína transformada que resulta, está implicada en varias neoplasias, que incluyen adenocarcinoma de pulmón, adenoma mucinoso, carcinoma ductal del páncreas y carcinoma colorrectal. Las proteínas Ras se unen a GDP/GTP y posee una actividad GTPasa intrínseca. Juega un importante papel en la regulación de la proliferación celular.

Procesos en los que interviene: **proliferación.**

**-CASPASAS** (*cysteinyll aspartate proteases*). Están involucradas en las vías de transducción de señales de apoptosis, necrosis e inflamación. Estas enzimas se pueden dividir en dos clases principales: **iniciadoras** (caspasas 1, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12) y **efectoras** (3, 6, 7). Las isoformas iniciadoras se activan, al inicio de la cascada, por moléculas adaptadoras, con las que

interactúan a través de dominios de interacción proteína-proteína, conocidos como CARD y DED. Las caspasas efectoras son responsables de la escisión de sustratos, al final de la cascada, y a veces se conocen como "caspasas ejecutoras".

Las caspasas iniciadoras, tales como la caspasa 8, pueden ser activadas directamente por receptores de muerte como FasR. Las caspasas también pueden encontrarse intracelularmente como parte de grandes complejos multiproteicos. Por ejemplo, la caspasa 9 es reclutada al apoptosoma formado durante la apoptosis, mientras que las caspasas 1 y 5 pueden formar parte del inflammasoma, una parte clave de procesamiento de citoquinas durante la inflamación.

Las caspasas son reguladas por inhibidores de la apoptosis y por las isoformas dominantes negativas. Han sido implicadas en la patogénesis de muchos trastornos, incluyendo apoplejía, enfermedad de Alzheimer, infarto de miocardio, cáncer y enfermedad inflamatoria.

La activación secuencial de las caspasas desempeña un papel central en la fase de ejecución de la apoptosis celular. Las diferentes caspasas están codificadas por sus correspondientes genes, como por ejemplo:

-Gen **CASP3**. Este gen codifica la caspasa 3, la cual escinde y activa las caspasas 6, 7 y 9 y ella misma es procesada por las caspasas 8, 9 y 10. Es la caspasa predominante implicada en la escisión de la proteína precursora 4A-beta amiloide (PPA), que se asocia con la muerte neuronal en la enfermedad de Alzheimer.

Procesos en los que interviene: **apoptosis**.

-Gen **CASP8**. Codifica la caspasa 8. Esta proteína está implicada en la muerte celular programada inducida por *Fas* y diversos estímulos apoptóticos. Se detectó en la fracción insoluble, de la región cerebral afectada, en pacientes con la enfermedad de Huntington, pero no en los controles normales, lo que implica su papel en enfermedades neurodegenerativas.

Procesos en los que interviene: **apoptosis**.

-Gen **CASP9**. Codifica la caspasa-9, la cual participa en uno de los primeros pasos en la cascada de activación, sometiéndose a un procesamiento autoproteolítico y a la activación por el apoptosoma (un complejo de proteínas del *Citocromo C* y el factor de activación de apoptosis *Peptidasa 1*). Se cree que desempeña un papel central en la apoptosis y como supresor de tumores. La unión de la caspasa-9 a *Apaf-1* conduce a la activación de la proteasa que luego se escinde y activa la caspasa-3.

Procesos en los que interviene: **apoptosis**.

-**VEGFA** (*Vascular Endothelial Growth Factor A*). Este gen es un miembro de la familia del factor de crecimiento PDGF/VEGF y codifica una proteína que a menudo se encuentra como un homodímero ligado a disulfuro. Esta proteína es un mitógeno glicosilado que actúa específicamente en las células endoteliales y tiene varios efectos, como el aumento de la permeabilidad vascular, la inducción de la angiogénesis, la vasculogénesis y crecimiento celular endotelial, la promoción de la migración celular y la inhibición de la apoptosis.

Procesos en los que interviene: **angiogénesis, apoptosis**.

-**CTNNB1** (*Catenin-cadherin associated protein-beta 1*). La proteína codificada por este gen es parte de un complejo de proteínas que constituyen uniones adherentes (AJs). Estas son necesarias para la formación y mantenimiento de las capas de células epiteliales, regulando el crecimiento celular y la adhesión entre las células. La proteína codificada también ancla el citoesqueleto de actina y puede ser responsable de transmitir la señal de inhibición por contacto, que hace que las células dejen de dividirse una vez que la lámina epitelial se ha completado. Esta proteína se une al producto del gen *APC*, el cual está mutado en la poliposis adenomatosa del colon. Las mutaciones en este gen son una causa de cáncer colorrectal (CRC), pilomatrixoma (PTR), meduloblastoma (MDB) y cáncer de ovario. Para este gen se han encontrado tres variantes de transcripción que codifican la misma proteína.

Procesos en los que interviene: **adhesión, crecimiento celular**.

**-PTGS2** (*Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2*). Este gen codifica la isoenzima inducible prostaglandina-endoperoxido sintasa 2 (PTGS-2 ó COX-2). Es una enzima ciclooxygenasa y es clave en la biosíntesis de prostanoídes (prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos); posee también actividad peroxidasa.

La enzima PTGS2 presenta una identidad en la secuencia de aminoácidos del 86-89% con las proteínas ortólogas de ratón, rata, oveja, vaca, caballo y conejo. La PTGS2 humana se expresa en un limitado número de tipos celulares y es regulada por estímulos específicos, lo que sugiere que es responsable de la biosíntesis de prostanoídes implicados en respuesta inflamatoria y en mitosis. Se ha observado que la expresión del gen *ptgs2* queda desregulada en ciertos tumores epiteliales.

Procesos en los que interviene: **inflamación, mitogénesis.**

**-NFKB1** (*Nuclear Factor Of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer In B-Cells 1*). Este gen codifica una proteína de 105 kD que puede someterse a procesamiento cotraduccional por los proteasoma 26S para producir una proteína de 50 kD. La proteína de 105 kD es un inhibidor de la transcripción específico de la proteína *Rel* y la proteína de 50 kD es una subunidad de unión al ADN del complejo de proteínas NF-kappa-B (NFkB).

La proteína NFkB está presente en casi todos los tipos celulares y es el punto final de una serie de eventos de transducción de señales que son iniciados por una amplia gama de estímulos relacionados con muchos procesos biológicos tales como la inflamación, la inmunidad, la diferenciación, el crecimiento celular, la tumorigénesis y la apoptosis. Los estímulos que la activan pueden ser intra y extra-celulares, tales como citoquinas, radicales libres oxidantes, irradiación ultravioleta y productos bacterianos o virales. La activación inapropiada de NFkB se ha asociado con un número de enfermedades inflamatorias, mientras que la inhibición persistente de NFkB conduce al desarrollo de células inmunes inapropiadas o crecimiento celular retardado.

Procesos en los que interviene: **inflamación, proliferación celular.**



## **2. OBJETIVOS**



## **2. OBJETIVOS.**

Los nuevos abordajes quimioterapéuticos tienen como objetivo aumentar la efectividad de los tratamientos contra los tumores más agresivos. El Ácido hialurónico forma parte de todos los tejidos orgánicos, incluidos los tejidos tumorales, y es en estas situaciones neoplásicas donde se ha encontrado un incremento de sus niveles de concentración. La reducción del Ácido hialurónico en el propio tumor, puede facilitar el tratamiento quimioterápico posterior ya que se debilitaría la cápsula que rodea la masa tumoral, facilitando el acceso del fármaco a las células tumorales.

Se plantean en este estudio, por tanto, los siguientes objetivos específicos:

1. Inducir cáncer de colon experimental en dos modelos de animales de laboratorio (rata y ratón), mediante agentes carcinogénicos químicos: dimetilhidrazina y azoximetano.
2. Estudiar el efecto del quimioterápico cetuximab (Cet) en los tumores colorrectales generados en ambos modelos animales.
3. Valorar el posible efecto adyuvante de la hialuronidasa (Hia) en el tratamiento conjunto con cetuximab.
4. Determinar los niveles de ácido hialurónico y buscar su correlación con la respuesta a los distintos tratamientos.



### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**



### **3. MATERIAL Y MÉTODOS.**

#### **3.1. Reactivos.**

Los compuestos químicos utilizados fueron los siguientes:

-1,1-Dimetilhidrazina (1,1-DMH), suministrada por Sigma-Aldrich. España.

-1,2-Dimetilhidrazina (1,2-DMH), suministrada por Sigma-Aldrich. España.

-Azoximetano (AOM), suministrado por Sigma-Aldrich. España.

-Cetuximab (Erbix®), proporcionada por Merck. Alemania.

-Hialuronidasa (Hylase Dessau®), suministrada por Riemsler. Alemania.

#### **3.1.1. Inductores químicos del cáncer colorrectal.**

En este estudio se han utilizado, como inductores químicos de la carcinogénesis, compuestos mutagénicos precursores de metil-azoxi-metanol glucósido: Dimetilhidrazina (DMH) y Azoximetano (AOM). Estos compuestos producen mutaciones somáticas en los genes APC, K-Ras y/o  $\beta$ -catenina entre otros, que provocan tumores en los que se observa la acumulación de  $\beta$ -catenina (Rosenberg, 2008).

#### **-Dimetilhidrazina (1,2-DMH).**

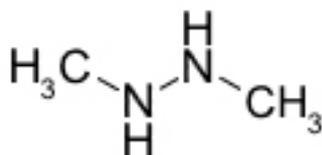


Figura 3.1. Estructura química de la dimetilhidrazina (1,2-dimetilhidrazina)

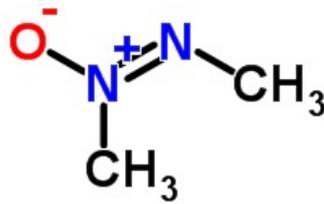
**-Azoximetano (AOM).**

Figura 3.2. Estructura química del Azoximetano ((E)-Methyl-NNO-azoxy]methane)

**3.2. Animales de experimentación.**

Se han utilizado dos modelos animales durante el desarrollo del estudio:

**3.2.1. Ratas.**

Se utilizaron Ratas Albinas Wistar macho de  $150 \pm 20$ g de peso en el momento de la recepción.

Los animales de experimentación fueron acondicionados en jaulas de plástico, dentro de las instalaciones del Animalario de la ULE (Registro MAPA n° 24089-25A) y mantenidos en condiciones controladas de luz (12 hr día : 12 hr noche), temperatura ( $22 \pm 2$  °C), humedad (50-60%) y con libre acceso a comida y bebida. Se les proporcionó una "dieta estándar" de mantenimiento (A04) a base de pellets de pienso de 15mm de diámetro suministrada por SAFE, Francia ([www.safe-diets.com](http://www.safe-diets.com)), con la siguiente composición:

**Composición centesimal:** Cereales 83,9%; Proteínas animales 4,0%; Proteínas vegetales 8,0%; Vitaminas y minerales 4,1%.

**Composición nutricional:** Extracto libre de nitrógeno 59,9%; Proteínas 16,1%; Fibras 3,9%; Minerales (cenizas) 5,1%; Humedad 11,9%; Lípidos 3,1%.

Ingesta calórica \*\* : 2 791 kcal/kg – 11,69 MJ/kg

\*\* Energía (general Atwater factors) = (% azúcares + % almidón + % proteínas) x 40 + % grasas x 90.

**3.2.1.1. Diseño experimental.**

El trabajo experimental se llevó a cabo de acuerdo al siguiente cronograma:

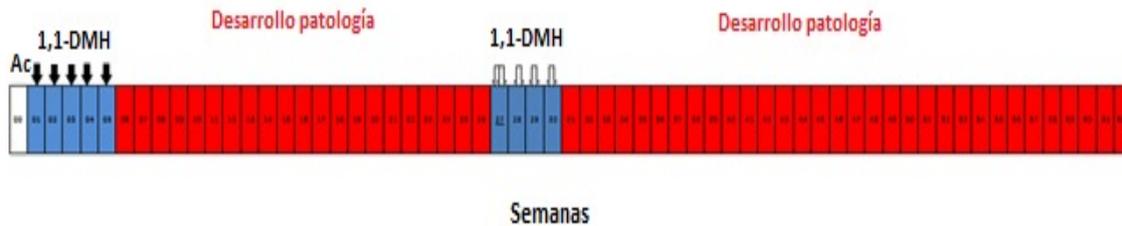


Figura 3.3. Cronograma desarrollo experimental, inducción con 1,1-DMH (ratas A).

Los animales se distribuyeron en grupos, en función de las distintas condiciones experimentales y con un Grupo Control, y se dejaron durante la primera semana para facilitar su adaptación al entorno (Tabla 3.1).

Nº ratas	GRUPO	DMH
8	1 control	No
8	2	Si
8	3	Si
8	4	Si
8	5	Si
8	6	Si
8	7	Si
8	8 ctrl hia	No
8	9	Si
8	10	Si
8	11	Si
8	12 ctrl hia	No

Tabla 3.1. Grupos experimentales de ratas lote A, para inducción con DMH.

Desde la segunda a la sexta semanas se procedió a la inducción de los animales, mediante inyección intraperitoneal (IP) de 40mg/ Kg de peso corporal/ semana del agente carcinogénico **dimetilhidrazina** (1,1-DMH) (Femia y cols., 2010; Perse y Cerar, 2011).

Periódicamente (cada semana, durante la fase de inducción inicial y cada 4 semanas a lo largo del desarrollo de la patología) se controló el peso de cada animal, para establecer su curva de crecimiento y comprobar si existía alguna correlación entre el desarrollo de la patología y una posible pérdida de peso.

Para ello se comparó la evolución del peso medio de las ratas control frente a las ratas inducidas con DMH. (Fig. 3.4)

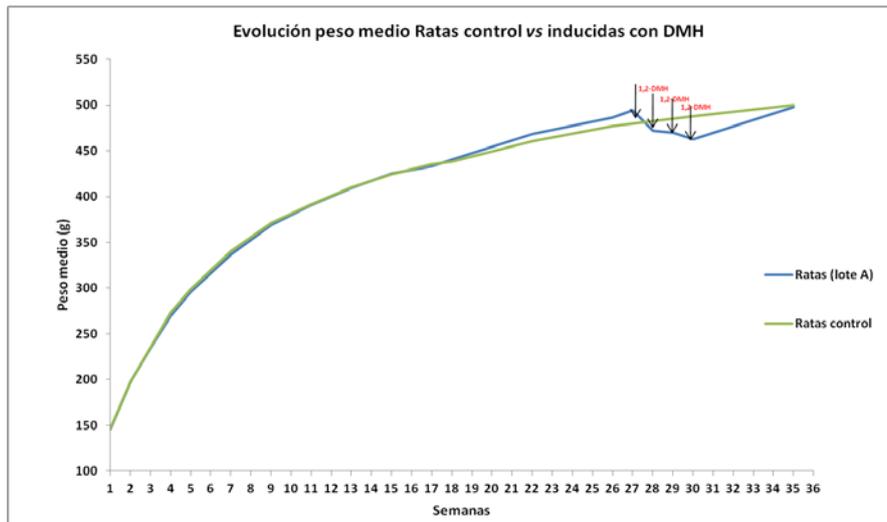


Figura 3.4. Curvas de crecimiento ratas lote A.

Para tener constancia del desarrollo de la patología se realizaron diversas observaciones por colonoscopia, con el fin de visualizar la posible aparición de focos de criptas aberrantes (ACF) o pólipos que indicaran el inicio de un proceso carcinogénico en colon.

Hasta la semana 26, desde el inicio de la inducción con DMH, no se detectó ningún signo indicativo de la existencia de patología significativa en colon, lo que nos llevó a revisar el protocolo experimental, comenzando a utilizar la 1,2-DMH, como agente carcinogénico (más potente que la 1,1-DMH utilizado hasta ese momento).

Se decidió iniciar la inducción con 1,2-DMH en un nuevo lote (B) de ratas, distribuyéndolas en grupos experimentales similares al lote anterior (Tabla 3.1), de acuerdo al siguiente cronograma (Figura 3.5).



Figura 3.5. Cronograma desarrollo experimental, inducción con 1,2-DMH (ratas B).

En este caso, la inducción con 1,2-DMH (40mg/Kg peso/semana en inyección intraperitoneal) se llevó a cabo en distintos períodos, en función de la aparición o no de signos indicativos del inicio de patología colorrectal, comenzando por un tratamiento de 6 semanas seguido de diversos períodos, espaciados en el tiempo, en los que se administraron diversas "dosis de refuerzo" (según cronograma Fig. 3.5).

Se controló el peso de cada animal, semanalmente durante las primeras 6 semanas (período de inducción inicial) y una vez al mes durante el resto de la experimentación, estableciéndose su curva de crecimiento. (Fig. 3.6)

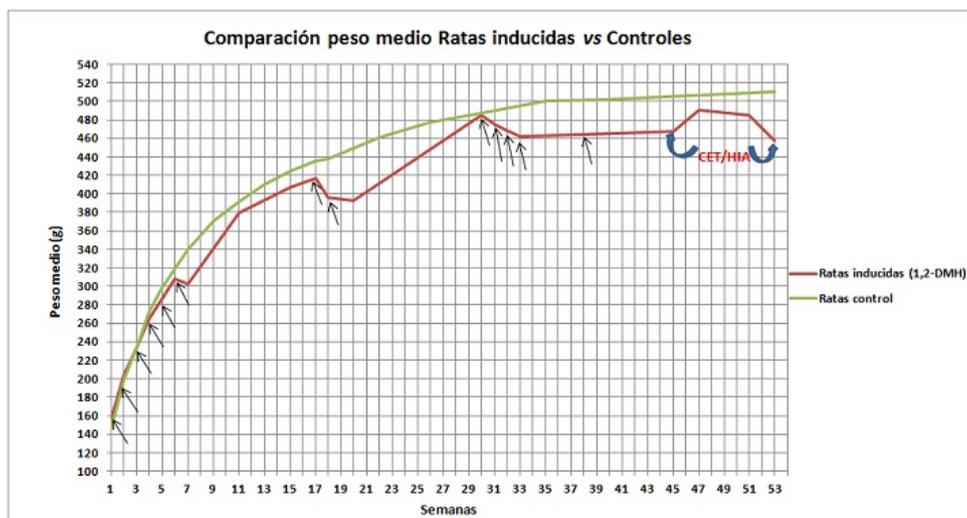


Figura 3.6. Curvas de crecimiento ratas lote B.

### 3.2.1.2. Tratamiento.

Una vez se tuvo constancia de la aparición de patología colorrectal -en algunos animales testados- se inició el tratamiento (en la semana 45) con el agente quimioterápico (Cetuximab) con/sin Hialuronidasa. La pauta de tratamiento fue la siguiente:

#### Cetuximab (dosis X):

-2 inyecciones IP de **10mg** (2ml) durante la semana 1 (200mg Cet/m<sup>2</sup> superficie corporal, calculada según la fórmula de Dubois y Dubois: Sup.corp.=0,1 X peso en Kg<sup>n</sup>, siendo n=0,685).

-2 inyecciones IP/semana de **5mg** (1ml) durante 7 semanas.

**Hialuronidasa** (dosis Y):

-2 inyecciones IP/semana de **10U** (0,5ml) durante 8 semanas.

Los animales se distribuyeron en los siguientes grupos de tratamiento (Tabla 3.2):

-Grupo 1: (n=6) dieta estándar y administración de solución salina + dosis X de Cetuximab.

-Grupo 2: (n=6) dieta estándar y administración de solución salina + dosis X/2 de Cetuximab.

-Grupo 3: (n=6) dieta estándar y administración de dosis Y de hialuronidasa + dosis X de Cetuximab.

-Grupo 4: (n=6) dieta estándar y administración de dosis Y de hialuronidasa + dosis X/2 de Cetuximab..

-Grupo 5: (n=6) dieta estándar y administración de dosis Y/2 de hialuronidasa + dosis X de Cetuximab.

-Grupo 6: (n=6) dieta estándar y administración de dosis Y/2 de hialuronidasa + dosis X/2 de Cetuximab.

-Grupo 7: (n=6) dieta estándar y administración de solución salina (como Grupo Control de ratas inducidas con 1,2-DMH, pero no tratadas). (Tabla 3.2).

GRUPO	Nº	CET	HIA
1	6	X	-
2	6	X/2	-
3	6	X	Y
4	6	X/2	Y
5	6	X	Y/2
6	6	X/2	Y/2
Ctrl	6		

Tabla 3.2. Grupos de tratamiento con Cet/Hia (X=10mg de Cetuximab; Y=10U de Hialuronidasa).

### **3.2.1.3. Técnicas de seguimiento y control de la patología.**

#### **3.2.1.3.1. Colonoscopia.**

(Realizada en colaboración con el Dr. José Manuel Gonzalo Orden, Dpto. de Cirugía, Facultad de Veterinaria, Universidad de León).

Se observaron las paredes del colon de los animales de experimentación, previamente sometidos a ayuno durante 24-48 horas y anestesiados con pentobarbital, utilizando una sonda con cámara (30° de inclinación) acoplada a un colonoscopio "Storz" (Fig. 3.7 ).



Figura 3.7. Fotografía del colonoscopio y sonda utilizados.

La técnica colonoscópica permitió la exploración exhaustiva de las paredes del colon, para detectar cualquier anomalía.

#### **3.2.1.3.2. Estudio histológico e inmunohistoquímico.**

(Realizados en colaboración con Micros Veterinaria, León).

Una vez finalizado el período de tratamiento con Cetuximab y/o Hialuronidasa, se procedió al sacrificio de los animales y su posterior disección y extracción de muestras para su análisis.(Fig. 3.8)



Figura 3.8. Extracción y lavado del intestino.

El intestino (tanto grueso como delgado) fué extraído y lavado, mediante una cánula, con solución salina al 0,9% y, posteriormente, fijado en formaldehído al 10% tamponado, para la conservación de las muestras hasta proceder a su estudio histológico. Parte del mismo, se congeló a  $-80^{\circ}\text{C}$  para utilizarlo en posteriores análisis.

También fueron extraídos otros órganos como hígado, riñón, bazo, testículo y pulmón, que fueron procesados de la misma manera.

Para el estudio histológico e inmunohistoquímico se toman muestras en formol tamponado al 4% de los siguientes órganos:

**COLON.** Se toman unos 5-6 cm de colon proximal en los que se realiza el recuento macroscópico de cualquier formación nodular en la pared. Se realiza un tallado sistemático del fragmento, tomando una muestra cada 1 cm de distancia e incluyendo todos los nódulos que se observan macroscópicamente para su procesamiento histológico.

**INTESTINO DELGADO.** Se toman unos 12-15 cm de intestino delgado. Al igual que en el colon se realiza un recuento macroscópico de posibles nódulos en la pared intestinal, tomándolos para su estudio histológico. También se toma una muestra para el procesamiento histológico cada 2 cm de distancia.

**HÍGADO, RIÑÓN, PULMÓN y PÁNCREAS.** Además del examen macroscópico, se toma una muestra de cada órgano para su examen

histológico, incluyendo las áreas en las que se observen alteraciones (cambios de coloración, de consistencia, nodulaciones, etc...).

**Examen histológico.**

Se realiza un procesado histológico convencional, en todos los casos en los 7 días siguientes a la toma de las muestras. Después del tallado se lleva a cabo la inclusión en parafina, mediante un procesador automático de tejidos.

Se realizan cortes de 3 micras para las diferentes pruebas histológicas e inmunohistoquímicas.

Se llevan a cabo las tinciones histológicas de Hematoxilina-eosina y PAS-Azul Alcían en las muestras de colon.

**Tinción hematoxilina-eosina.**

- Desparafinado e hidratación a través de paso por xilol y alcohol de gradación decreciente.
- Inmersión en Hematoxilina de Harris durante 5 minutos.
- Lavado en agua corriente durante 5 minutos.
- Inmersión en Eosina durante 1 minuto.
- Lavado en agua corriente y deshidratación en alcoholes de gradación creciente y xilol.

**Tinción de Pas Azul-Alcían.**

Reactivos empleados:

Ácido acético al 3% en agua destilada.

Solución de Azul Alcían al 1% en Ácido Acético al 3% en agua destilada.

Acido peryódico al 0,8% en agua destilada.

Rectivo de Schiff.

Hematoxilina de Harris.

Técnica.

- Desparafinado e hidratación a través de paso por xilol y alcohol de gradación decreciente y finalmente agua corriente.
- Inmersión en Ácido Acético al 3% durante 2 minutos.

- Inmersión en solución de Azul Alcían al 1% en Ácido Acético al 3% durante 30 minutos
- Lavado en agua corriente durante 5 minutos.
- Inmersión en Ácido Peryódico durante 5 minutos
- Lavado en agua corriente durante 5 minutos
- Lavado en agua destilada
- Inmersión en Reactivo de Schiff durante 30 minutos
- Lavado en agua corriente
- Inmersión en Hematoxilina de Harris durante 5 minutos
- Lavado en agua corriente y deshidratación en alcoholes de gradación creciente y xilol.

#### **Técnica inmunohistoquímica.**

Se realizan técnicas inmunohistoquímicas para la puesta en evidencia de la proteína nuclear Ki67, marcador de proliferación celular, a partir de secciones histológicas de 3 micras, siguiendo el siguiente protocolo.

Técnica:

- Desparafinado e hidratación a través de paso por xilol y alcohol de gradación decreciente y finalmente agua corriente.
- Inactivación de la peroxidasa interna mediante inmersión en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% en metanol durante 30 minutos en oscuridad.
- Lavados en TBS-Tween 20 al 0,05% (3 lavados de 5 minutos cada uno).
- Desenmascaramiento de antígenos mediante tratamiento térmico, con tampón citrato a pH6, en olla a presión durante 2 minutos a máxima presión.
- Lavados en TBS-Tween 20 al 0,05% (3 lavados de 5 minutos cada uno).
- Incubación de las secciones con el anticuerpo Ki67 a dilución 1/500 (Abcam ab15580 rabbit) en diluyente Antibody Diluent © (DAKO REAL S2022) durante 18 horas a 4°C.
- Lavados en TBS-Tween 20 al 0,05% (3 lavados de 5 minutos cada uno).

- Incubación con sistema Envision © anti-rabbit (DAKO K4009) durante 20 minutos a temperatura ambiente.
- Lavados en TBS-Tween 20 al 0,05% (3 lavados de 5 minutos cada uno).
- Revelado con Diaminobencidina- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediante el KIT DAB© (VECTOR SK4100).
- Lavado en agua corriente durante 5 minutos.
- Contraste en Hematoxilina de Harris durante 30 segundos.
- Lavado, deshidratación y montaje mediante pases por alcoholes de gradación creciente y xilol.

### **Valoración histológica.**

COLON. Se realiza una discriminación de los nódulos observados (nódulos de hiperplasia linfoide o tumores epiteliales). Cuando se observa la presencia de tumores epiteliales son clasificados según la clasificación de la WHO. Asimismo se realiza la medición del tamaño de los carcinomas observados.

INTESTINO DELGADO. Se valora la existencia de tumores, su tamaño y tipo, así como la eventual presencia de otras lesiones, neoplásicas o no neoplásicas.

OTROS ÓRGANOS. Se determina la existencia de eventuales lesiones, tanto neoplásicas (indicando su tamaño y tipo) como no neoplásicas.

### **Valoración Inmunohistoquímica.**

Se establece una relación entre las células positivas con el anticuerpo frente a la proteína Ki67 y el total de células existentes en dos microfotografías realizadas a x400 aumentos, de zonas representativas de las neoplasias observadas en cada animal, tanto carcinomas como adenomas, para determinar la tasa de replicación celular en cada caso.

#### **3.2.1.4. Determinación de ácido hialurónico.**

Se procedió a la determinación de los niveles de ácido hialurónico presente en las muestras de tejido colónico extraído de las ratas y mantenido en congelación a -80°C.

Los tejidos de partida fueron sometidos a un tratamiento de homogeneización total (con un volumen de 5 ml de agua MiliQ), y una posterior liofilización (Telstar LyoQuest, modelo HT40; Beijer Electronics, Suecia).

Una vez liofilizadas, las muestras se dividieron (en alícuotas de 10, 20, 30 y 40 mg) para los análisis de AH mediante el método del carbazol, con los dos buffers diferentes, y la determinación por el ensayo ELISA. Para optimizar las condiciones del ensayo se realizaron diferentes pruebas con el fin de elegir la cantidad idónea de tejido (mg de tejido por peso seco), decidiéndose utilizar muestras de 20 y 30 mg.

Tras pesar las cantidades necesarias en básculas de precisión, se coloca el contenido en tubos eppendorf y se somete a digestión con solución de papaína (10 mg/ml) y una solución buffer. Se utilizarán dos soluciones buffer ligeramente diferentes:

- a) Buffer 1. Compuesto por Tris HCl 50 mM, Urea 4 M, Ditiotreitól 100 mM, SDS 1% (Dodecilsulfato sódico: un detergente tensioactivo que rompe los enlaces covalentes de las proteínas, desnaturalizándolas, y solubiliza los aminoácidos hidrofóbicos), pH 7.
- b) Buffer 2. Compuesto por Metabisulfito 50 mM, Tris-HCl 50 mM, Urea 4 M, SDS 1%, pH 7.

Las condiciones de pH y temperatura de estas soluciones deben mantenerse estrictamente controladas: a pHs mayores de 8 y temperaturas por encima de 37 °C se pierde la actividad proteolítica de la papaína. En cada tubo eppendorf se añaden 100 µl de papaína y 900 µl de solución buffer (en cada caso, la que corresponda).

Tras lo anterior, las muestras se someten a una incubación en un baño de agua a 37 °C durante 1-2 horas hasta que se solubilice el tejido por completo. La digestión se facilita agitando las muestras brevemente a lo largo del

proceso. Transcurrido este tiempo, los tubos eppendorf se centrifugan 10 minutos a 10.000 rpm y se filtra el contenido mediante el uso de filtros de 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro.

La figura 3.9 resume el protocolo llevado a cabo.

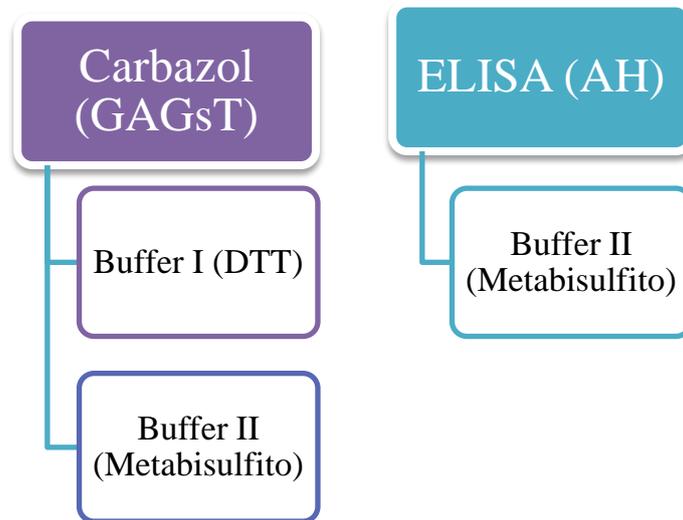


Figura 3.9. Protocolos realizados para la determinación analítica por el método de carbazol y ELISA. (Cedida por Diana Cuadrado Redondo).

#### **3.2.1.4.1. Método del Carbazol.**

Es un método directo de cuantificación de glicosaminoglicanos (GAGs). Se basa en la reacción de color asociada a la reacción del carbazol y los ácidos glucurónicos liberados por los GAGs que contengan dicha molécula en su estructura. La validez del ensayo depende en gran medida de que no existan interferencias en los resultados. (Frazier y cols., 2008). El método determina la cantidad absoluta de GAGs totales obtenidos de cada muestra por unidad de peso de dichas muestras (Arias y cols., 1989).

Reacción colorimétrica:

- ◆ Blanco agua: 1 ml H<sub>2</sub>O.
- ◆ Blanco búffer: 100  $\mu\text{l}$  búffer + 900  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O.

- ◆ Recta patrón ácido glucurónico: 100 µl de patrón (concentraciones de 6,5, 20, 40 y 65 µg/ml de ácido glucurónico (1 mg/ml) en buffer) + 900 µl H<sub>2</sub>O.
  
  - ◆ Muestras de tejido intestinal normal
  - ◆ Muestras de tejido intestinal tumoral
  - ◆ Blanco muestra de tejido normal
  - ◆ Blanco muestra de tejido tumoral
- } 100 µl muestra filtrada +  
900 µl H<sub>2</sub>O.

Tras mezclar bien, agitando en un vortex, las muestras se enfrían en un recipiente de porexpán que contiene hielo seco y se añaden 5 ml a cada tubo de una solución de ácido sulfúrico concentrado con tetraborato sódico (0,95 g/100 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). El ión borato facilitará que aumente la intensidad de color de la reacción entre el ácido glucurónico y el carbazol.

Este paso se realiza en hielo seco, y es esencial para la precisión del método. La mezcla se facilita con agitación (*Bitter y Muir, 1962*). En este paso se produce la hidrólisis de los glicosaminoglicanos en unidades monoméricas, por acción del ácido sulfúrico concentrado (*Plätzer y cols., 1999*), el cual rompe el enlace entre la glucosamina y el ácido glucurónico (*Arias y cols., 1989*), obteniéndose ácido urónico y glicosamina.

Por último, colocamos los tubos en una gradilla de plástico situada en el interior del baño caliente con agua hirviendo, a 100 °C durante 10 minutos (*Bitter y Muir, 1962*).

Transcurrido este tiempo, se vuelven a enfriar en hielo seco, y a continuación, se añaden 200µl a cada tubo: los tubos de las muestras contienen 200µl de solución carbazol (0'125g carbazol/100 ml etanol anhidro), y los tubos de las muestras blanco 200µl de etanol.

La reacción del ácido glucurónico con el carbazol produce una coloración violácea (*Plätzer y cols., 1999*), (Fig. 3.10). Para que esto se produzca, se debe mezclar bien el contenido de los tubos con el agitador, se enfrían en hielo, y se introducen otra vez en el baño a 100 °C durante 15 minutos.



Figura 3.10. Fotografía tomada en el laboratorio tras la segunda incubación en el baño de agua a 100 °C. Rango de concentración de derecha a izquierda (6,5-65  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de glucurónico). (Cedida por Diana Cuadrado Redondo).

Los tubos se dejan enfriar a temperatura ambiente y se lee la absorbancia de cada tubo en un espectrofotómetro a 530 nm; el color producido por la reacción del carbazol es estable durante 16 horas (Bitter y Muir, 1962).

#### **3.2.1.4.2. Método ELISA.**

Para la determinación del ácido hialurónico en las muestras de colon se realizó un test ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*).

El ELISA utilizado en este estudio consiste en un ensayo inmunoenzimático competitivo (Echelon Biosciences Inc., Salt Lake City, Utah, USA) en el que la señal colorimétrica es inversamente proporcional a la cantidad de AH presente en la muestra. En este ensayo, las muestras se unen al detector de AH en la placa de incubación, que es un anticuerpo anti-AH; esa mezcla se transfiere a la placa de detección que contiene hialurónico inmovilizado (el antígeno) en el fondo de cada pocillo. El detector de AH que no se haya unido al hialurónico de la muestra, se unirá a ese hialurónico

inmovilizado, por lo que, si hay mucho hialurónico en la muestra quedará poco detector de AH libre para unirse al hialurónico inmovilizado en los pocillos, y la detección colorimétrica basada en la reacción fosfatasa alcalina (ALP)/ para-nitrofenilfosfato (pNPP), será menor.

Este método es muy sensible y capaz de detectar concentraciones muy bajas de AH en diferentes tipos de muestras, bien sean tejidos homogeneizados o fluidos biológicos, tanto de origen humano como de animales (Rügheimer y cols., 2009; Lun y cols., 2010).

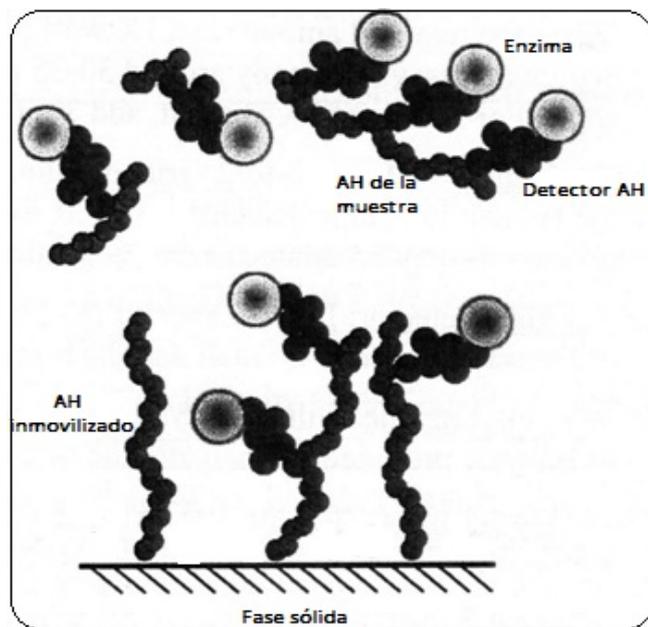


Figura 3.11. Esquema del ensayo ELISA de tipo competitivo utilizado en este estudio.  
(Modificado de Echelon Biosciences Inc., Salt Lake City, Utah, USA; 2015).

En nuestros ensayos, las muestras liofilizadas se diluyen en el buffer II (Metabisulfito 50 mM, Tris-HCl 50 mM, Urea 4 M, SDS 1%, pH 7), realizando inicialmente diluciones seriadas desde 1/10 a 1/1000 en alguna de las muestras, con el propósito de encontrar el rango de dilución más adecuado a la recta patrón en nuestras condiciones experimentales. La determinación analítica final se realizó a una dilución 1/100 para cada muestra y el rango de concentración utilizado para la recta patrón fue de 5-800 ng/ml. La determinación se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante.

El procedimiento seguido fué el siguiente:

1. Preparación de la Placa de Incubación, cada pocillo deberá contener 150 $\mu$ l.
  - a. Añadir 100 $\mu$ l de standars y muestras en los pocillos correspondientes.
  - b. Añadir 150 $\mu$ l del Diluyente en los pocillos del Blanco.
  - c. Añadir 50 $\mu$ l del HA Detector a todos los pocillos excepto a los del Blanco.
2. Agitar la placa con suavidad, cubrir con el precinto adhesivo e incubar durante 1 hora a 37°C.
3. Después de la incubación, transferir 100 $\mu$ l desde la Placa de Incubación a los correspondientes pocillos de la Placa de Detección.
4. Una vez completada la transferencia, mezclar la placa de Detección golpeando suavemente. Taparla con un precinto adhesivo e incubar a 4°C durante 30 minutos.
5. Verter la solución de la placa de detección. Lavar la placa 3 veces con 200 $\mu$ l del búffer de lavado. Asegurarse de que todo el búffer de lavado es eliminado de la placa, dándole la vuelta y secándola sobre un papel absorbente.
6. Añadir 100 $\mu$ l de la Enzima (ALP) a cada pocillo de la Placa de Detección.
7. Mezclar agitando suavemente la Placa de Detección, taparla con el precinto adhesivo e incubar a 37°C durante 30 minutos.
8. Repetir el paso de lavado 5.
9. Añadir 100 $\mu$ l de la Solución Substrato (con pNPP, compuesto cromogénico) a cada pocillo de la Placa de Detección.
10. Incubar la Placa de Detección en oscuridad a temperatura ambiente.
11. Medir la absorbancia de cada pocillo a 405nm (detección de p-NPP) empezando a T=15min.
12. Una vez concluida la reacción (45 min), parar la reacción añadiendo 50 $\mu$ l de Solución Stop a cada pocillo.

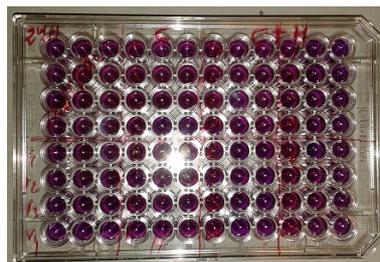


Figura 3.12. Fotografía de la placa de detección.

### 3.2.2. Ratones.

Se utilizaron, para el estudio, **Ratones ICR macho** de 40±5g de peso en el momento de su recepción. Fueron acondicionados en jaulas de plástico, dentro de las instalaciones del Animalario de la ULE (Registro MAPA nº 24089-25A) y mantenidos en condiciones controladas de luz, temperatura, humedad y con libre acceso a comida y bebida. Se les proporcionó una **dieta estándar** de mantenimiento (A04) a base de pellets de pienso de 15mm de diámetro suministrada por SAFE, Francia (*www.safe-diets.com*). (Ver apartado 2.1).

#### 3.2.2.1. Diseño experimental.

La experimentación se llevó a cabo conforme al siguiente cronograma:



Figura 3.13. Cronograma del desarrollo de la experimentación con ratones.

Los ratones se distribuyeron en grupos, en función de las distintas condiciones experimentales y con un Grupo Control, manteniéndolos durante una semana, previa al inicio de la inducción, para facilitar su adaptación al entorno (Fig 3.13).

Posteriormente, y durante cinco semanas, se procedió a la inducción de los animales mediante inyección intraperitoneal, de 10mg/Kg de peso corporal/semana, del agente carcinogénico, **Azoximetano (AOM)** (*Aviello y cols, 2012; Bissahoyo y cols, 2005*).

Se controló el peso de cada animal, estableciendo su curva de crecimiento y comprobando si existía alguna correlación entre el desarrollo de la patología y una posible pérdida de peso. Para ello se comparó la evolución del peso medio de los ratones control frente a los ratones inducidas con AOM, observándose un menor crecimiento en los ratones inducidos.

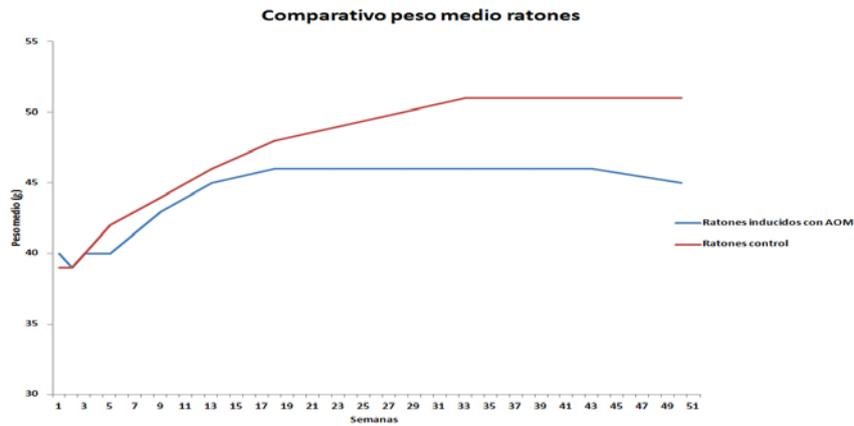


Figura 3.14. Curva de crecimiento de los ratones de experimentación.

### 3.2.2.2. Tratamiento.

Una vez observada la presencia de tumores colorrectales -en algunos animales sometidos a la exploración colonoscópica- se inició el tratamiento (en la semana 42) con Cetuximab con/sin Hialuronidasa. La pauta de tratamiento fue la siguiente:

#### **Cetuximab (dosis X):**

-2 inyecciones IP de **2,5mg** (0,5ml sol. Cet 5mg/ml) durante la primera semana.

-1 inyección IP/semana de **2,5mg** (0,5ml) durante 7 semanas.

#### **Hialuronidasa (dosis Y):**

-1 inyección IP de **50U** (0,5ml sol. Hial 100U/ml) con cada inyección de Cetuximab.

Los animales se distribuyeron en los siguientes grupos de tratamiento:

-Grupo 1: (n=7) dieta estándar y administración de solución salina + dosis X de Cetuximab.

-Grupo 2: (n=7) dieta estándar y administración de dosis Y de hialuronidasa + dosis X de Cetuximab.

-Grupo 3: (n=7) dieta estándar y administración de dosis Y/2 de hialuronidasa + dosis X de Cetuximab.

-Grupo 4: (n=7) dieta estándar y administración de solución salina + dosis X/2 de Cetuximab.

-Grupo 5: (n=7) dieta estándar y administración de dosis Y de hialuronidasa + dosis X/2 de Cetuximab.

-Grupo 6: (n=7) dieta estándar y administración de dosis Y/2 de hialuronidasa + dosis X/2 de Cetuximab.

-Grupo 7: (n=8) dieta estándar y administración de solución salina (como Grupo Control de CCR inducido).

-Grupo 8: (n=3) dieta estándar y administración de solución salina, sin AOM (como Grupo Control de CCR no inducido). (Tabla 3.3).

GRUPO	AOM	CET	HIA	GRUPO	AOM	CET	HIA	GRUPO	AOM	CET	HIA	GRUPO	AOM	CET	HIA
G1	SI	X		G2	SI	X	Y	G3	SI	X	Y/2	G4	SI	X/2	
G1	SI	X		G2	SI	X	Y	G3	SI	X	Y/2	G4	SI	X/2	
G1	SI	X		G2	SI	X	Y	G3	SI	X	Y/2	G4	SI	X/2	
G1	SI	X		G2	SI	X	Y	G3	SI	X	Y/2	G4	SI	X/2	
G1	SI	X		G2	SI	X	Y	G3	SI	X	Y/2	G4	SI	X/2	
G1	SI	X		G2	SI	X	Y	G3	SI	X	Y/2	G4	SI	X/2	
G1	SI	X		G2	SI	X	Y	G3	SI	X	Y/2	G4	SI	X/2	
G5	SI	X/2	Y	G6	SI	X/2	Y/2	G7	SI	NO	NO	Control	NO	NO	NO
G5	SI	X/2	Y	G6	SI	X/2	Y/2	G7	SI	NO	NO	Control	NO	NO	NO
G5	SI	X/2	Y	G6	SI	X/2	Y/2	G7	SI	NO	NO	Control	NO	NO	NO
G5	SI	X/2	Y	G6	SI	X/2	Y/2	G7	SI	NO	NO				
G5	SI	X/2	Y	G6	SI	X/2	Y/2	G7	SI	NO	NO	X=200mg Cet/m <sup>2</sup> sup. corp.			
G5	SI	X/2	Y	G6	SI	X/2	Y/2	G7	SI	NO	NO	X/2=100mg Cet/m <sup>2</sup> sup. corp.			
G5	SI	X/2	Y	G6	SI	X/2	Y/2	G7	SI	NO	NO	Y=50Ud Hia/ratón			
								G7	SI	NO	NO	Y/2=25Ud Hia/ratón			

Tabla 3.3. Grupos experimentales de ratones. Sup.corp.=0,1 X peso en Kg<sup>n</sup> (n=0,685)(\*Fórmula de Dubois&Dubois).

### 3.2.2.3. Seguimiento de la patología.

Las técnicas utilizadas para el seguimiento de la patología fueron las mismas que en el caso de las ratas.

### **3.2.2.3.1. Colonoscopia.**

Se observaron las paredes del colon de algunos ratones testigo, previamente sometidos a ayuno durante 24-48 horas y anestesiados con pentobarbital (50mg/Kg peso corporal), mediante una sonda con cámara frontal acoplada a un colonoscopio "Karl Storz". Se efectuaron diversas grabaciones y se tomaron fotografías de las diferentes partes del colon, pudiéndose apreciar claramente la formación de tumores.

### **3.2.2.3.2. Estudio histológico e inmunohistoquímico.**

Una vez finalizado el período de 8 semanas de tratamiento con Cetuximab y/o Hialuronidasa, se procedió al sacrificio de los animales y su posterior disección y extracción de muestras para su análisis.

El examen histológico se realizó mediante la observación microscópica sistemática de cortes consecutivos y transversales separados 0,5 cm entre sí, de muestras incluidas en parafina y posterior tinción con hematoxilina-eosina.

El intestino (tanto grueso como delgado) fué extraído y lavado con solución salina al 0,9% y, posteriormente, fijado en formaldehído al 10% tamponado, para proceder a su estudio histológico. Parte del mismo, se congeló a -80°C para posteriores análisis.

También fueron extraídos otros órganos como hígado, riñón, bazo, testículo y pulmón, que fueron procesados de la misma manera.



Figura 3.15. Extracción de intestino y otros órganos de los ratones sometidos a la experimentación.

La técnica del estudio histológico e inmunohistoquímico es la misma que se utilizó en el caso de las ratas (ver apartado 3.2.1.3.2).

### **3.2.2.3.3. Estudio de expresión de citoquinas y genes.**

(Realizado en colaboración con el Dr. Fermín Milagro Yoldi, Universidad de Navarra).

- Extracción del RNA total de cada una de las muestras analizadas según el diseño experimental, utilizando el reactivo *TRIzol*® (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Determinación de la concentración de RNA total obtenida de cada muestra mediante espectrofotometría utilizando el equipo *Nanodrop Spectrophotometer 1000* (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).
- Verificación de la integridad y pureza del RNA obtenido a partir de las diferentes muestras mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1,5%.
- Tratamiento del RNA total con DNasa I, siguiendo las instrucciones del fabricante (*DNA-Free Kit, Ambion, Carlsbad, CA, USA*).
- Transcripción inversa del RNA total para la obtención de cDNA utilizando la enzima *transcriptasa inversa M-MLV* (Invitrogen) y cebadores aleatorios (Invitrogen).
- PCR en tiempo real utilizando sondas *TaqMan*® prediseñadas específicamente para cada gen en estudio, la mezcla de reacción *master-mix* (*TaqMan Universal PCR Master Mix*) y el termociclador *ABI Prism 7300 HT Sequence Detection System* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*) programado según las condiciones facilitadas por el fabricante y empleando el gen 18s (Hs99999901\_s1) como control interno.

**Actb** Mm02619580\_g1 BETA-ACTIN

**IL6** Mm00446190\_m1 INTERLEUKIN-6

**TNF** Mm00443258\_m1 TUMOR NECROSIS FACTOR  
**Trp53** Mm01731290\_g1 TRANSFORMATION RELATED PROTEIN 53  
**Kras** Mm00517492\_m1 v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog  
**CASP8** Mm00802247\_m1 CASPASE 8  
**CASP9** Mm00516563\_m1 CASPASE 9  
**CASP3** Mm01195085\_m1 CASPASE 3  
**VEGFA** Mm00437306\_m1 vascular endothelial growth factor A  
**Ctnnb1** Mm00483033\_m1 catenin (cadherin associated protein), beta 1  
**rn18s** Mm003928990\_g1 18S ribosomal RNA

El *Fold change* entre grupos se calculó usando el método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

**-Niveles de citoquinas en plasma.**

Los niveles circulantes de **TNF-alfa** y de **Interleucina-6** se han medido mediante kits comerciales de ELISA siguiendo los protocolos facilitados por los fabricantes:

**MOUSE TNF-ALPHA QUANTIKINE ELISA KIT**

Ref. MTA00B R&D SYSTEMS

**MOUSE IL-6 QUANTIKINE ELISA KIT**

Ref. M6000B R&D SYSTEMS



## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

### **4.1. Inducción de tumores colorrectales.**

Una vez llevada a cabo la administración, en los animales de experimentación, de los agentes carcinogénicos anteriormente mencionados, y transcurrido el tiempo requerido para que la inducción tumoral tuviera efecto, se procedió a la comprobación de dicho efecto.

#### **4.1.1. Observación por colonoscopia.**

##### **4.1.1.1. Ratas.**

Pudieron apreciarse múltiples lesiones y tumores a lo largo de todo el recorrido del colon, en las ratas testigo utilizadas, correspondientes al grupo inducido por 1,2-DMH (Fig. 4.1).

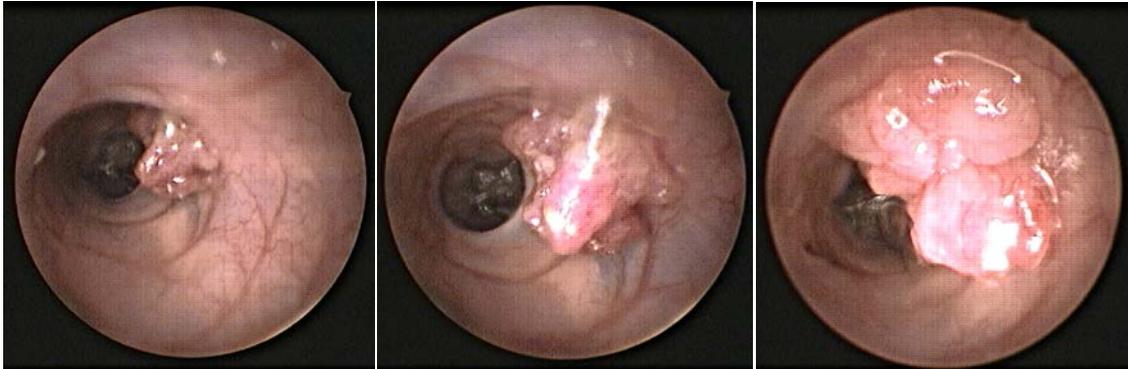


Figura 4.1. Imágenes obtenidas por colonoscopia en ratas con CCR inducido con 1,2-DMH.

##### **4.1.1.2. Ratones.**

Se observaron zonas hemorrágicas y grandes tumores en las paredes del colon de los ratones utilizados, del grupo de los inducidos con AOM (Fig. 4.2).

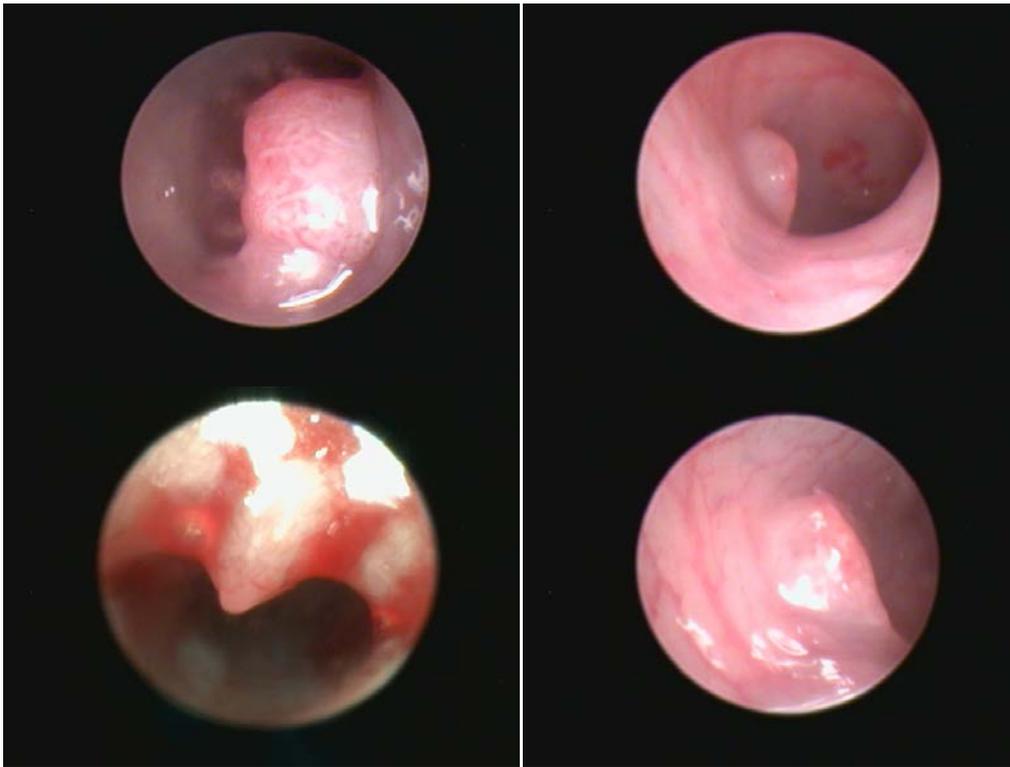


Figura 4.2. Imágenes obtenidas por colonoscopia en ratones con CCR inducido con AOM.



Figura 4.3. Corte transversal del colon de un ratón con CCR, inducido con AOM, en el que se puede apreciar desarrollo tumoral.

## **4.2. Estudios histológicos e inmunohistoquímicos.**

### **4.2.1. Ratas.**

Se han llevado a cabo estudios anatomopatológicos de las muestras de intestino, extraídas de las ratas pertenecientes a los distintos grupos experimentales. La observación macroscópica de las muestras fijadas de colon, permitió el conteo y medida de los tumores apreciables a simple vista (Fig.4.4).

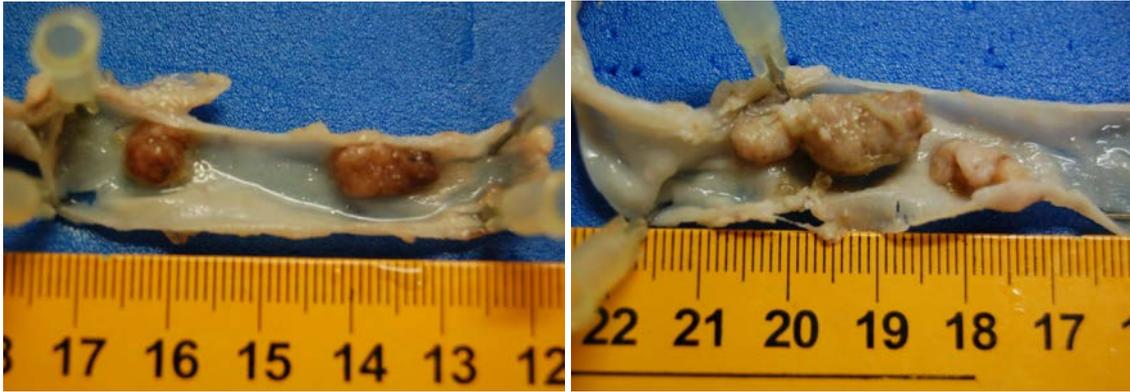
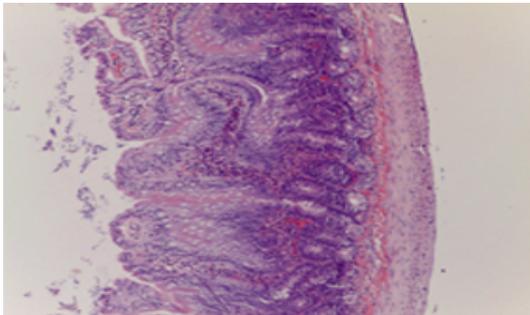
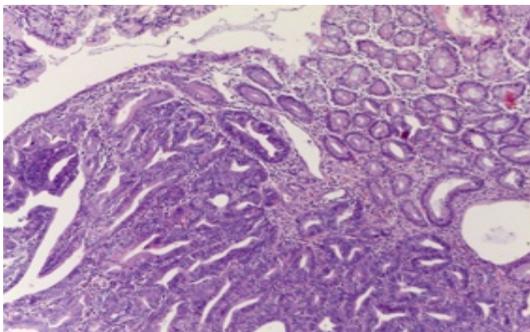


Figura 4.4. Fotografías de colon de ratas con CCR inducido con 1,2-DMH: se pueden observar tumores de tamaño considerable.

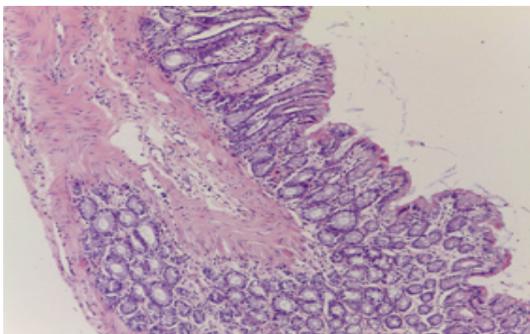
El análisis histológico se realizó mediante la observación microscópica sistemática de cortes consecutivos y transversales separados 0,5 cm entre sí.



**Colon Proximal:** El epitelio de revestimiento de vellosidades se muestra levemente hiperplásico. Igualmente se observa una moderada hiperplasia de células caliciformes (Imagen 1).



**Colon medio:** Hiperplasia más notable que en el tramo anteriormente estudiado de los enterocitos de las vellosidades. Algunas vellosidades aparecen fusionadas por el ápice entre sí, o bien en toda su longitud formando una vellosidad de doble grosor. Presencia de criptas displásicas que ocasionalmente muestran aberraciones en su morfología. Se observan abundantes mitosis entre las células epiteliales de criptas y vellosidades.



**Colon distal:** Macroscópicamente se detectan dos crecimientos intraluminales de aproximadamente 0,3 cm de diámetro y 0,2 cm en dos secciones examinadas que histológicamente se corresponde con una NEOPLASIA pedunculada cuyas características histológicas se resumen en los siguientes puntos:

Tipo de células: Epiteliales de origen glandular (Imagen 2)  
 Características del núcleo: Redondo, de nucleolos irregulares y prominentes, de pleomorfismo nuclear moderado.  
 Índice y tipo de mitosis: Moderado (4-5/campo de 400x). Presencia de figuras atípicas.  
 Características del citoplasma: Eosinófilo, poligonal, bordes bien definidos.  
 Organización de las células: Tubular/papiliforme, formando cavidades quísticas.  
 Infiltración del tejido adyacente y bordes quirúrgicos: Se trata de una masa infiltrativa que se expande lateralmente por la submucosa y penetra en la capa muscular (Imagen 3). No se observan células tumorales en la serosa subyacente.  
 Invasión tumoral de vasos: No. Diagnóstico:

ADENOCARCINOMA INTESTINAL TUBULOPAPILAR

Figura 4.5. Cortes histológicos de tumores inducidos en colon de rata.

Así mismo, se han realizado análisis inmunohistoquímicos, en cortes de tejido, valorándose la expresión del índice de proliferación celular (Ki67) y la expresión de ácido Hialurónico (tanto el intracelular como el integrante del estroma extracelular), de los tumores presentes en las distintas muestras (\*). (\*Estudios realizados por Micros Veterinaria, León).

#### **4.2.1.1. Expresión del índice de proliferación celular (Ki67).**

El índice Ki67 expresa el grado de actividad de las células tumorales, lo que da idea del estado de progresión del tumor.

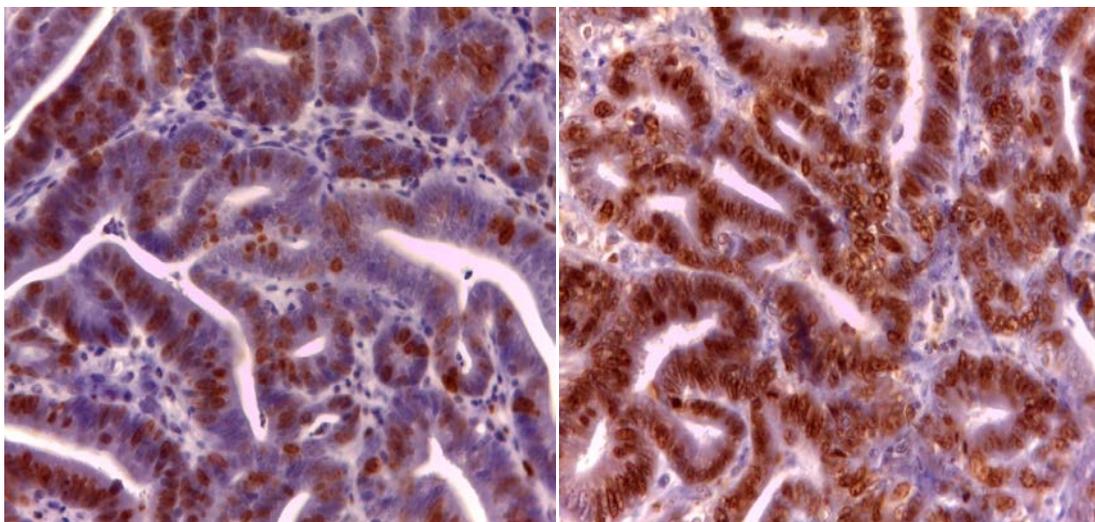


Imagen 1: Corte intestino (rata tratada).  
IHQ Ki67. Index Ki 67: 18%. Magnificación: x400

Imagen 2: Corte intestino (rata no tratada).  
IHQ Ki67. Index Ki 67: 72%. Magnificación: x400

Figura 4.6. Análisis inmunohistoquímico de cortes de colon de ratas, donde se puede observar la expresión del índice Ki67 (color marrón).

Las imágenes corresponden a una rata con CCR inducido con 1,2-DMH y **tratada con Cet X/2** (imagen 1) y una rata inducida con 1,2-DMH pero **no tratada** (imagen 2). Se observa que la actividad celular (constatada por la expresión del Ki67) es mucho más intensa en la rata inducida y no tratada (índice Ki67 del 72%) que en la tratada (índice Ki67 del 18%), lo que podría indicar que Cetuximab, a la dosis mencionada, está inhibiendo en parte esta proliferación celular.

**Comparativo: grupo no tratado vs grupo tratado.**

Comparando el grupo de animales que no recibieron tratamiento con el que sí fueron tratados con Cetuximab y/o Hialuronidasa, los resultados muestran una reducción significativa en el grupo de animales tratados, en cuanto a la expresión del índice de proliferación celular Ki67. Aunque los resultados no son estadísticamente significativos, esto parece indicar que el tratamiento (considerado de forma global) ralentiza en cierta medida la progresión tumoral. (Fig. 4.7).

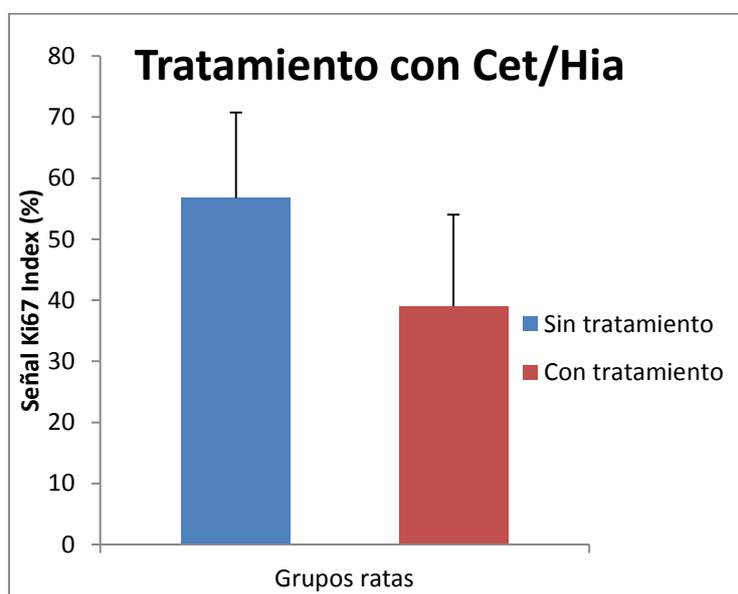


Figura 4.7. Gráfica comparativa entre la expresión del Ki67 en ratas no tratadas vs la de ratas tratadas (con Cet/Hia).

**Comparativo Cetuximab: dosis X vs dosis X/2.**

Realizando el análisis por grupos de tratamiento con Cetuximab a distintas dosis, observamos que la dosis de X/2 muestra una disminución más acusada -del índice Ki67- que la dosis X, aunque en ambos casos existe disminución respecto al grupo de animales no tratados. Esto no puede considerarse estadísticamente significativo, debido al pequeño tamaño de la muestra en los grupos comparados. (Fig. 4.8 y 4.9).

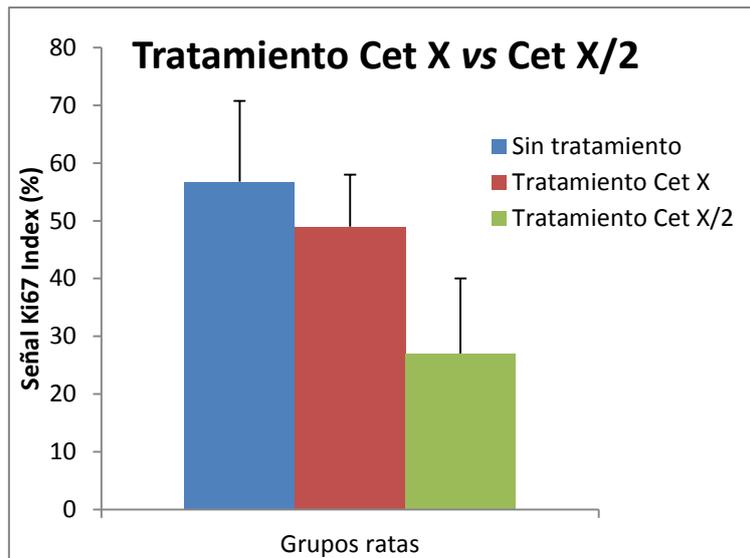


Figura 4.8. Gráfica comparativa de la expresión del Ki67 entre ratas no tratadas, ratas tratadas con Cet (dosis X) y ratas tratadas con Cet (dosis X/2).

Considerando en conjunto los grupos tratados con ambas dosis (X y X/2), se mantiene la reducción, respecto al grupo no tratado, del índice de proliferación celular Ki67.

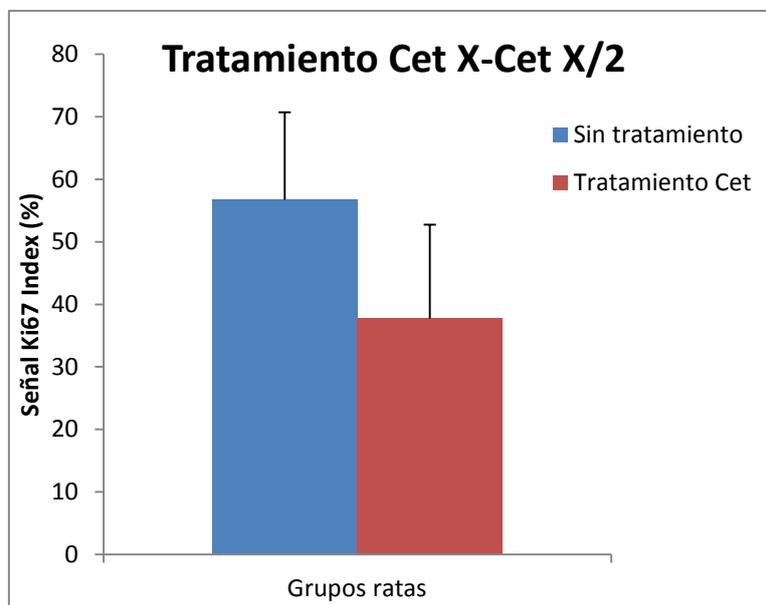


Figura 4.9. Gráfica comparativa de la expresión del Ki67 entre ratas no tratadas y ratas tratadas con Cet (dosis X + dosis X/2).

**Análisis de tendencias** (Figs. 4.10, 4.11, 4.12 y 4.13).

Las líneas de tendencia muestran, en general, una discreta correlación entre las dosis de tratamiento y la disminución del índice de proliferación celular para los distintos grupos, aunque en ningún caso se alcanza una correlación estadística.

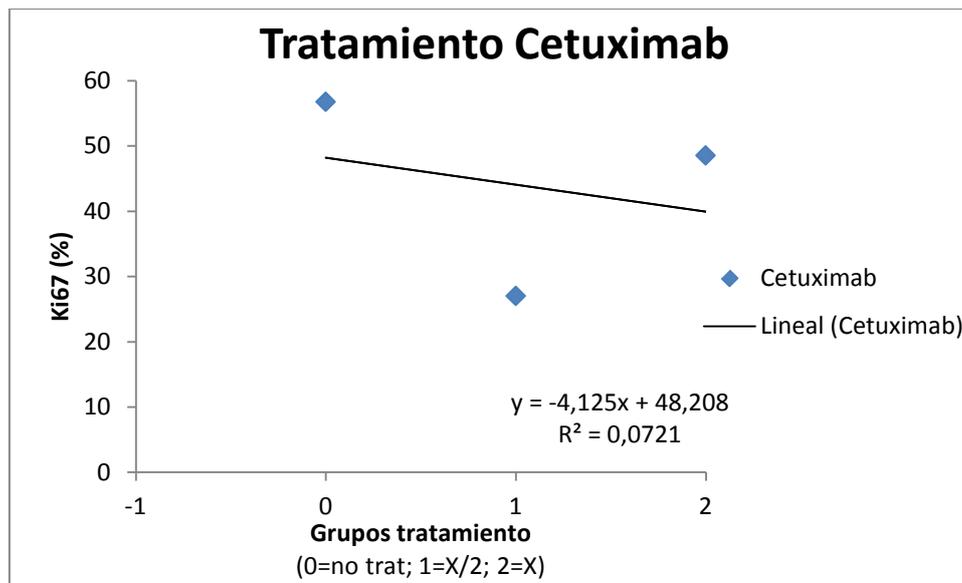


Figura 4.10. Línea de tendencia entre ratas no tratadas y ratas tratadas con Cet a dosis X y dosis X/2, en cuanto a la expresión del Ki67.

Si bien el incremento de la concentración de Cetuximab utilizada nos indica un descenso en el grado de proliferación celular, su mínima correlación nos indica que no podemos establecer una dosis dependencia, probablemente por una administración de Cetuximab en una concentración excesivamente baja respecto a lo que sería un tratamiento adecuado.

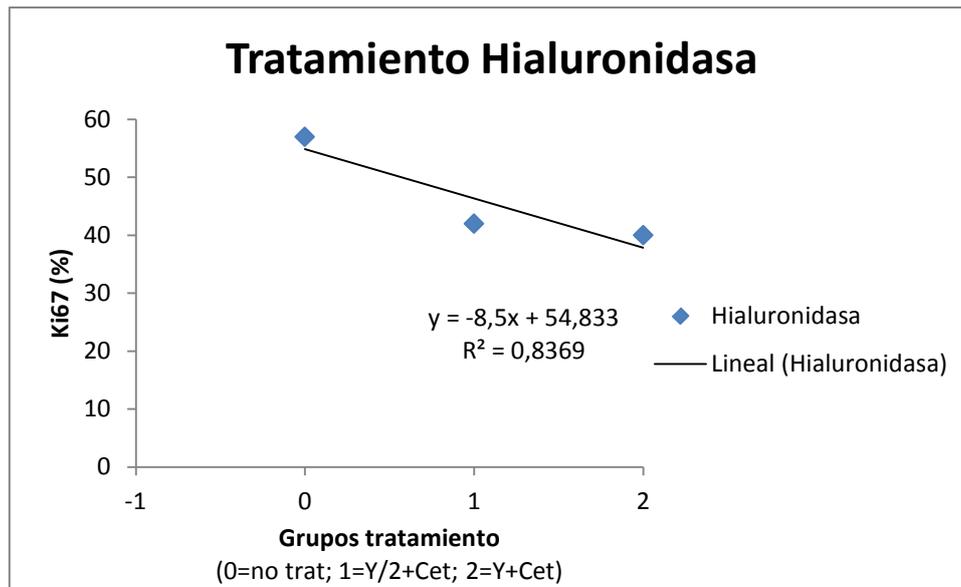


Figura 4.11. Línea de tendencia entre ratas no tratadas y ratas tratadas con Cet + Hia (dosis Y e Y/2, en cuanto a la expresión del Ki67).

Respecto al tratamiento con Hialuronidasa, podemos observar una leve correlación entre el incremento de dosis (Y/2, Y) y la disminución del índice Ki67, si bien ésta no es estadísticamente significativa (Fig. 14). En este caso, considerando la Hialuronidasa combinada con Cetuximab en conjunto (sin discriminar la dosis de éste).

Si comparamos las distintas dosis de Hialuronidasa (Y/2, Y) asociada con la dosis X de Cetuximab, la correlación es más alta (Fig. 15). Sin embargo, no ocurre así cuando la dosis de Cetuximab es de X/2 (Fig. 16). Podríamos interpretar que, en el efecto observado, tiene más peso el Cetuximab que la Hialuronidasa.

Probablemente, las dosis de Hialuronidasa utilizadas son demasiado bajas para poder detectar un efecto claro.

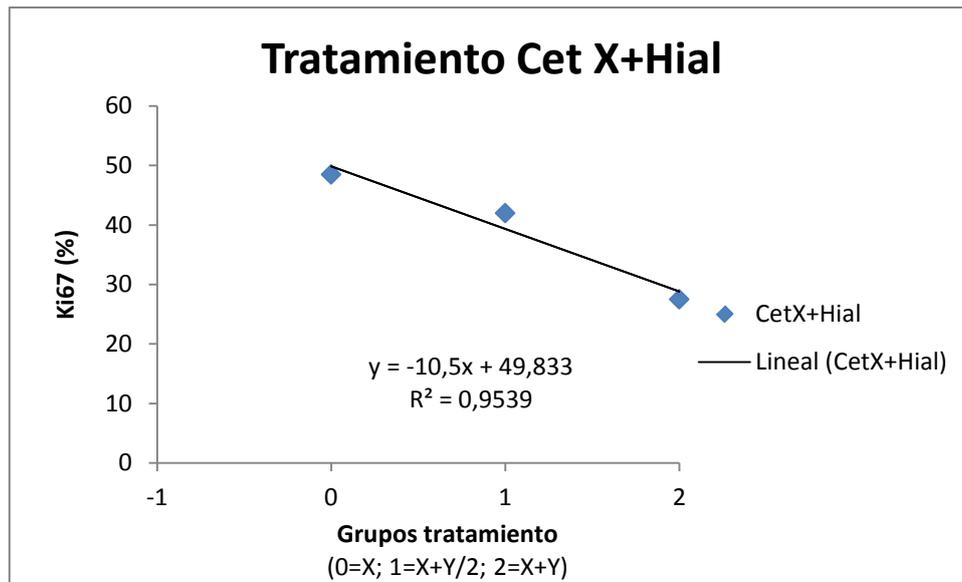


Figura 4.12. Expresión de Ki67 en grupo tratado con Cet (dosis X)+Hial.

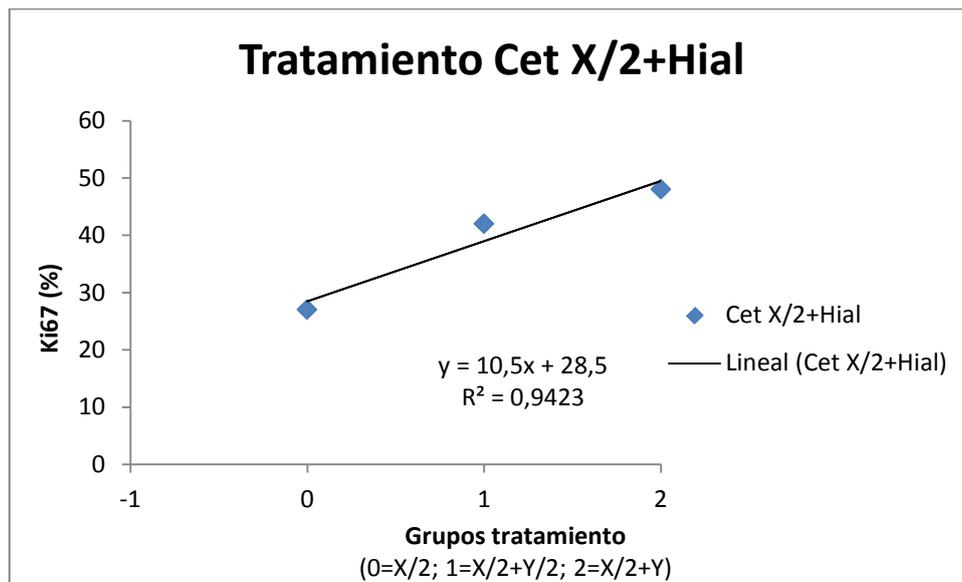


Figura 4.13. Expresión de Ki67 en grupo tratado con Cet (dosis X/2)+Hial.

#### 4.2.1.2. Expresión señal de Ácido Hialurónico.

En las siguientes imágenes -que corresponden a cortes de colon de un animal tratado y otro no tratado- se puede observar la diferencia en cuanto a la expresión de AH, tanto en células epiteliales como en el estroma

extracelular. La coloración marrón indica la cantidad de AH expresada. (Figura. 4.14)

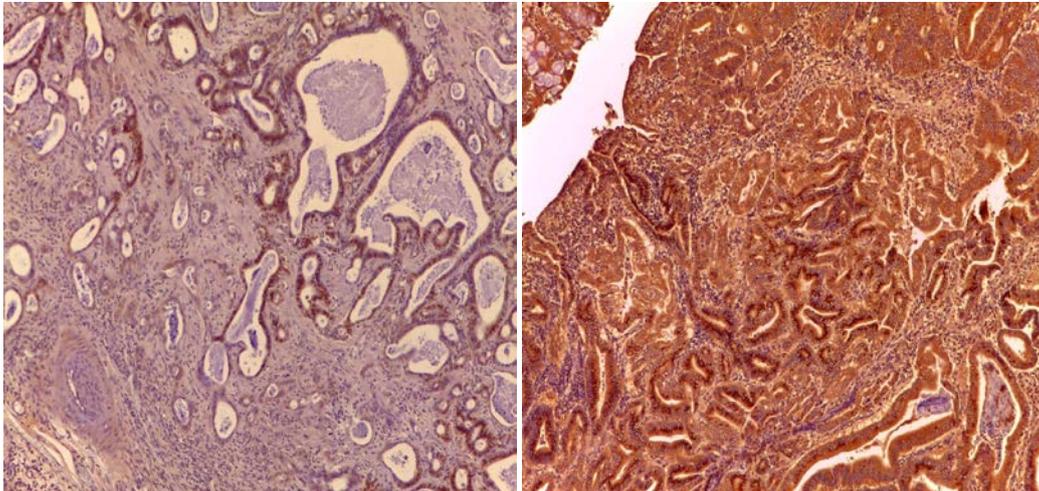


Imagen 1: Rata tratada. IHQ AH. Señal: 1/1(céls. epiteliales/estroma extracelular). Magnificación: x40

Imagen 2: Rata no tratada. IHQ AH.Señal: 3/3 (céls. epiteliales/estroma extracelular). Magnificación: x40

Figura 4.14. Cortes histológicos de rata tratada y rata no tratada, en los que se puede apreciar la señal de expresión del AH.

Analizada la expresión del Ácido Hialurónico, por técnicas inmunohistoquímicas, se puede observar una disminución de la misma cuando se compara el grupo de animales inducidos pero **no tratados** con el grupo de animales **tratados** (los distintos grupos de tratamiento), tanto en células epiteliales como en el estroma extracelular (expresión leve:1, moderada:2, intensa:3) (Fig. 4.15).

Esto concuerda con las hipótesis mantenidas en cuanto a una hiperproducción de AH en tejido tumoral, y que puede ser revertida.

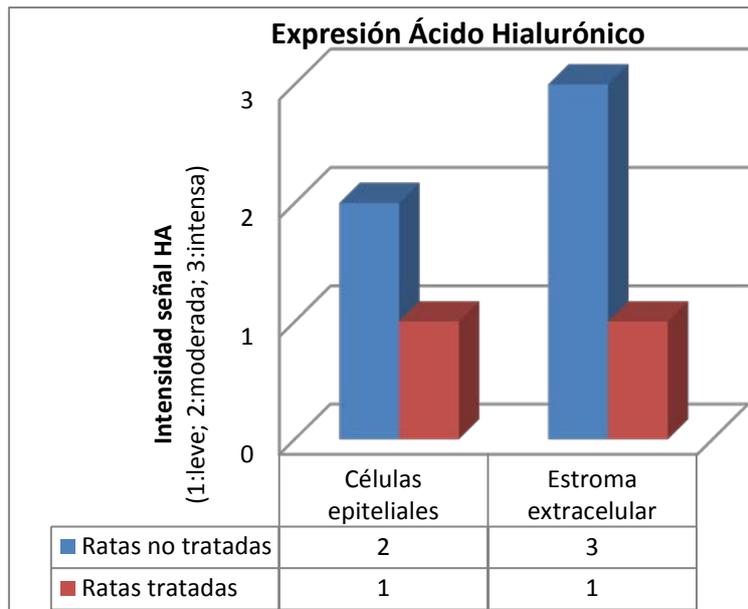


Figura 4.15. Expresión del AH en ratas no tratadas frente a ratas tratadas (1: expresión leve; 2: moderada; 3: intensa).

#### 4.2.1.3. Efectos colaterales.

Como efecto colateral a la inducción de carcinoma de colon con 1,2-DMH, se pudo observar la aparición de quistes/tumores submaxilares (Fig. 4.16) en las ratas (que podrían corresponder a la glándula de Zymbal), con una frecuencia inusualmente alta para ser explicada por un origen espontáneo (Reznik, 1990; Seely, 1994).



Figura 4.16. Ratas inducidas con 1,2-DMH, en las que se aprecia la aparición de quistes submandibulares (glándula de Zymbal).

Extraída esta masa submandibular (de consistencia firme y de 1cm de diámetro aproximadamente), se procedió a realizar estudio histológico, observándose la presencia de una estructura quística repleta de queratina madura en su interior y con una pared formada por epitelio plano estratificado bien diferenciado y que no presenta atipias. Diagnóstico anatomopatológico: "quiste folicular infundibular" (Fig. 4.16 ).

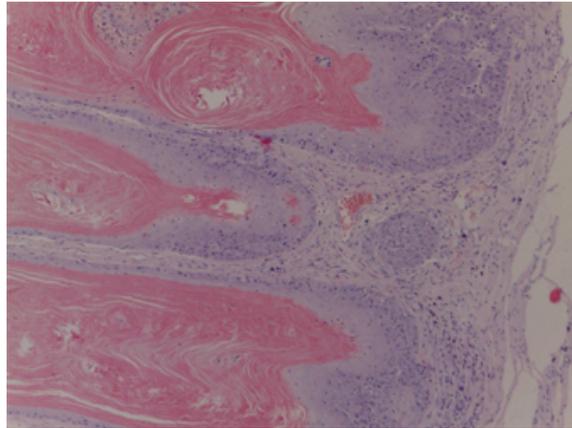


Figura 4.17 . Preparación histológica de quiste folicular infundibular en ratas.

El desarrollo de estos quistes (presuntamente inducidos por la 1,2-DMH) ocasionó una mortalidad elevada (por impedir la ingesta de pienso suficiente) en los distintos grupos de este lote de ratas, por lo que, al final del tratamiento, la población de estudio ha quedado significativamente disminuída.

#### **4.2.2. Ratones.**

Del estudio anatomopatológico de las muestras de intestino, extraídas de los ratones pertenecientes a los distintos grupos experimentales, se pudo constatar la presencia de tumores apreciables a la vista, lo que permitió el conteo y medida de los mismos (Fig. 4.18).

Así mismo se procedió a la realización de análisis histológicos e inmunohistoquímicos (IHQ) en cortes de dichos tumores (Figs. 4.19 y 4.20).



Figura 4.18 . Muestras (fijadas en formol) de colon de ratones inducidos con AOM, en las que se puede observar la presencia de tumores.

El examen histológico se realizó mediante la observación microscópica sistemática de cortes consecutivos y transversales separados 0,5 cm entre sí, de muestras incluidas en parafina y posterior tinción con hematoxilina-eosina.

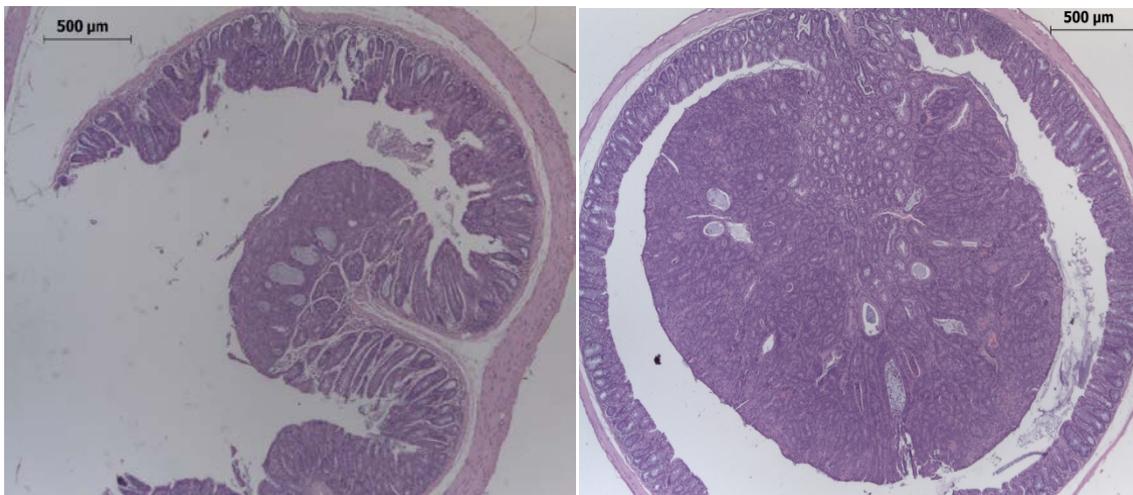


Figura 4.19. Cortes transversales de colon de ratones inducidos con AOM, en los que se puede apreciar el desarrollo de tumores.

**4.2.2.1. Expresión del índice de proliferación celular** (expresión de Ki67).

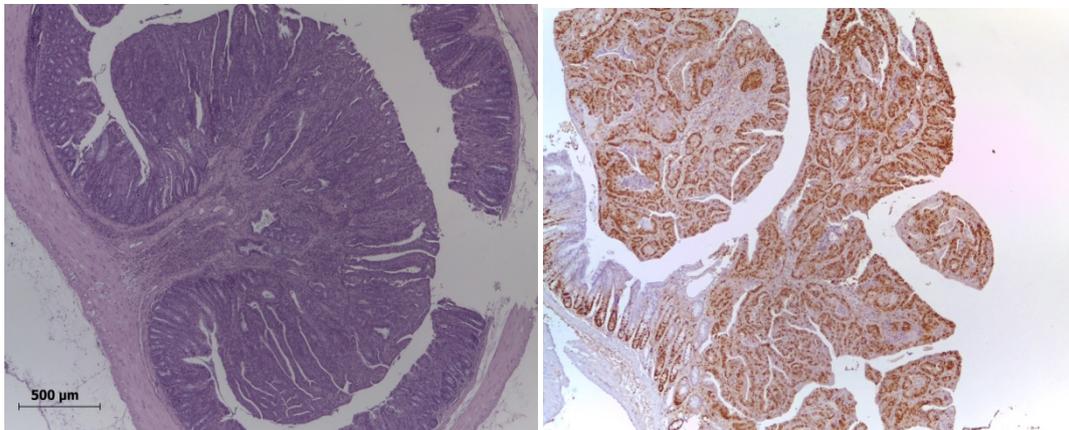


Figura 4.20. Cortes transversales de colon de ratones inducidos con AOM. La imagen de la derecha muestra la expresión del Ki67 (color marrón), indicando un alto grado de proliferación celular.

En la tabla siguiente se muestran los porcentajes medios de expresión del índice Ki67 ( $\pm$  DS) para los ratones pertenecientes a los distintos grupos de tratamiento. El porcentaje de expresión se consideró cero en los ratones control.

Expresión Ki67		
TRATAM.	Media (%)	Desv Est
CTRL	0,0	0,0
INDUC.	44,9	28,8
X	34,9	35,3
X+Y	48,9	28,4
X+Y/2	62,6	12,8
X/2	47,7	40,7
X/2+Y	48,3	30,3
X/2+Y/2	59,1	31,5

Tabla 4.1. Valores medios (%) de expresión de Ki67 y su desviación estándar, en ratones de los distintos grupos de tratamiento.

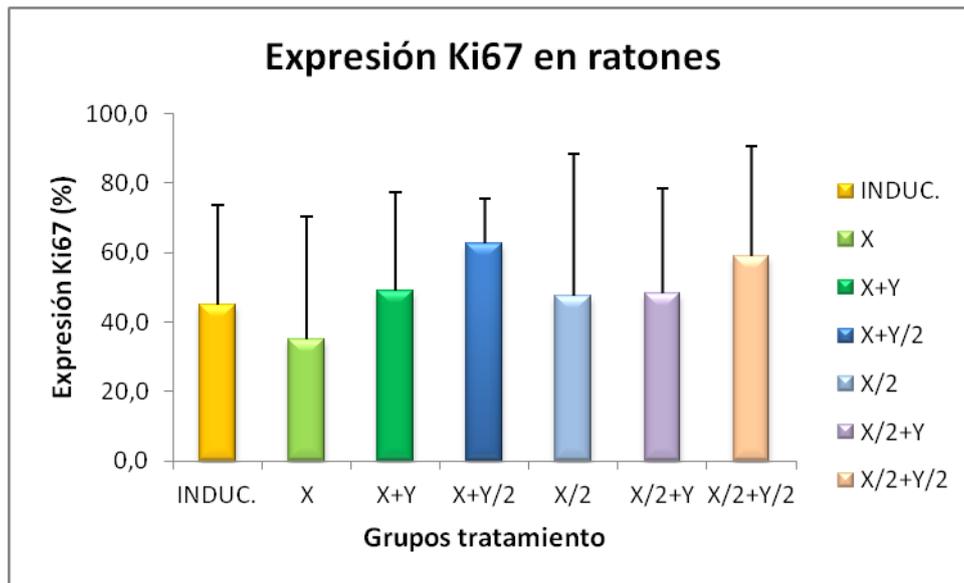


Figura 4.21. Gráfica comparativa, de la expresión de Ki67, en ratones inducidos con AOM pertenecientes a los distintos grupos experimentales.

#### 4.2.2.2. Efectos colaterales.

Como efectos colaterales a la inducción con AOM, se pudo observar, en algunos ratones, la presencia de quistes en la zona perianal que podrían corresponder a una glándula sebácea.



Figura 4.22. Quistes perianales en ratones inducidos con AOM.

Se realizó un estudio citológico, de muestras obtenidas por punción, de esos quistes perianales y se pudo determinar que se trata de células correspondientes a epitelio plano estratificado, que no presentan atipias.

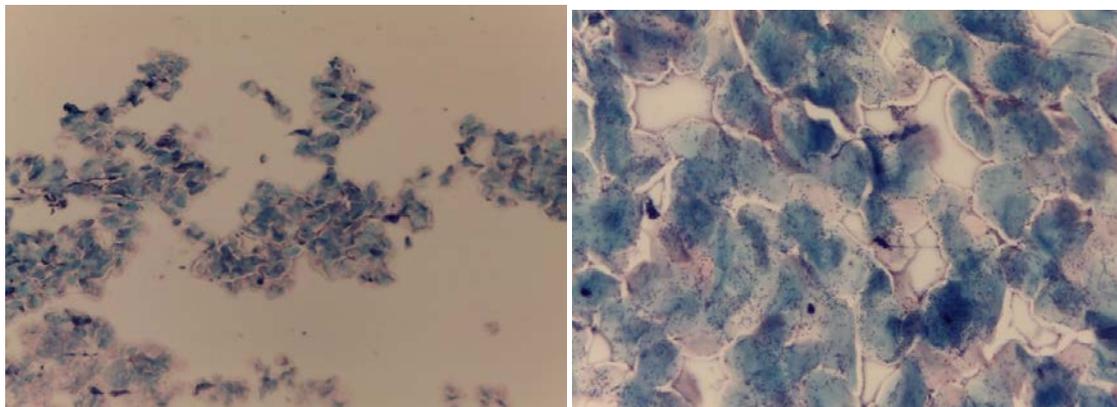


Figura 4.23. Frotis de punción de quistes perianales en ratones inducidos con AOM.

### **4.3. Determinación del ácido hialurónico en tejido colónico de ratas.**

Se utilizaron muestras de colon, tanto de ratas control (no inducidas y no tratadas) como de ratas inducidas y tratadas, para cuantificar los niveles de ácido hialurónico presentes.

#### **4.3.1. Método del carbazol.**

Por este método se pueden cuantificar los niveles de ácido glucurónico (uno de los azúcares que componen el dímero básico del ácido hialurónico) presentes en la muestra. Se ha llevado a cabo utilizando dos tipos distintos de buffer.

##### **4.3.1.1 Buffer I.**

Los valores de la recta patrón se obtuvieron tras realizar la media de cada valor de glucurónico patrón ensayado, restándole el valor correspondiente al blanco buffer. De igual modo, a los valores de las muestras, tanto controles como tumorales, se les resta su blanco muestra, que en vez de contener el reactivo de carbazol contienen etanol (único disolvente del carbazol).

Los valores medios de absorbancia, obtenidos de las muestras, se extrapolan utilizando la ecuación de la curva que nos proporciona la gráfica al insertar una línea de tendencia. Esos valores finales corresponden a los

GAGsT, en  $\mu\text{g/ml}$ , contenidos en cada muestra. Posteriormente, calcularemos los valores finales, considerando la dilución aplicada (1:10) y los mg de tejido utilizados (30 mg), para así obtener valores de GAGsT en  $\mu\text{g/mg}$  tejido.

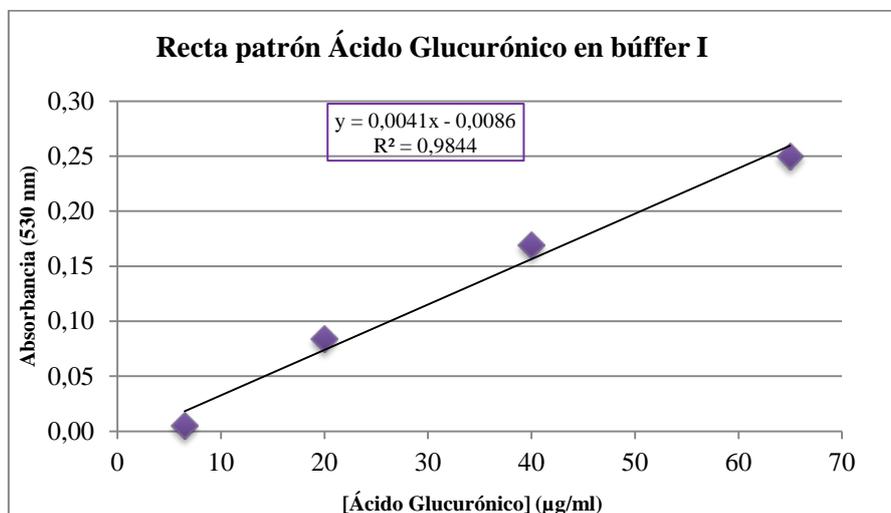


Figura 4.24. Representación de la concentración de ácido glucurónico en  $\mu\text{g/ml}$  frente a la absorbancia medida a 530 nm, obteniéndose así una recta patrón de ácido glucurónico para el buffer I.

	<b>GAGsT (<math>\mu\text{g/mg}</math> tejido)</b>
<b>30 mg normal</b>	15,726
	8,632
	10,854
<b>Media</b>	<b>12,179</b>
<b>30 mg tumoral</b>	14,530
	9,743
	13,077
<b>Media</b>	<b>12,450</b>

Tabla 4.2. Contenido de AH ( $\mu\text{g/mg}$  tejido) en las muestras ensayadas, considerando la curva patrón obtenida para el ácido glucurónico en buffer I, los cálculos de la dilución y los mg de tejido utilizados.

### 4.3.1.2. Buffer II.

Para obtener la recta patrón, se utilizó el segundo búffer (búffer II), al que le hemos sustituido el anterior agente reductor, el DTT, por el Metabisulfito; la sustitución se realiza para evitar la oxidación del DTT y conseguir una mayor reproducibilidad de los resultados. Las correcciones que se realizaron en los datos experimentales son exactamente las mismas que en el caso anterior con el búffer I, al igual que la extrapolación para obtener la concentración de GAGsT en  $\mu\text{g/ml}$ , y los cálculos finales aplicando la dilución realizada (1:10) y los mg de tejido utilizados para el ensayo (20 mg), obteniéndose valores de GAGsT en  $\mu\text{g/mg}$  tejido.

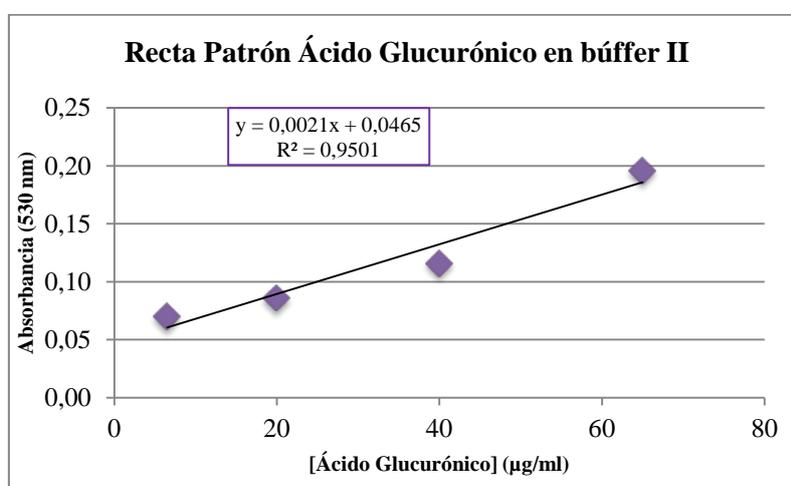


Figura 4.25. Gráfica de la concentración de ácido glucurónico ( $\mu\text{g/ml}$ ) frente a la absorbancia medida a 530 nm, obteniéndose así una recta patrón de ácido glucurónico para el búffer II.

	GAGsT ( $\mu\text{g/mg}$ tejido)
<b>20mg normal</b>	12,580
	1,389
	2,341
<b>Media</b>	<b>6,985</b>
<b>20mg tumoral</b>	7,024
	10,595
	16,785
<b>Media</b>	<b>11,468</b>

Tabla 4.3. Contenido de AH ( $\mu\text{g/mg}$  tejido) en las muestras ensayadas considerando la curva patrón obtenida para el ácido glucurónico en búffer II, los cálculos de la dilución y los mg de tejido utilizados.

Así, podemos comparar el mismo método realizado con dos soluciones búffer diferentes, así como observar la relación dosis-respuesta de los tejidos ensayados, ya que con el búffer I se utilizaron 30 mg de tejido y con el búffer II 20 mg de tejido .

<b>GAGsT (<math>\mu\text{g}/\text{mg}</math> tejido)</b>			
<b>Búffer I</b>		<b>Búffer II</b>	
<b>30 mg normal</b>	15,726	<b>20 mg normal</b>	12,580
	8,632		1,389
	10,854		2,341
<b>Media</b>	<b>12,179</b>	<b>Media</b>	<b>6,985</b>
<b>30mg tumoral</b>	14,530	<b>20 mg tumoral</b>	7,024
	9,743		10,595
	13,077		16,785
<b>Media</b>	<b>12,450</b>	<b>Media</b>	<b>11,468</b>

Tabla 4.4. Comparativa de los resultados obtenidos en  $\mu\text{g}/\text{mg}$  tejido mediante el método de carbazol, utilizando las dos soluciones buffer diferentes.

#### **4.3.2. Método ELISA.**

En el caso de los ensayos inmunoenzimáticos, la lectura de la absorbancia la realiza un espectrofotómetro que contiene un lector de placas, con pletina para introducir las placas de microtitulación de 96 pocillos para su lectura (BIO-TEK, modelo Synergy HT). Con la ayuda de un programa informático, el *Gen 5*, se obtienen los valores de absorbancia de cada pocillo a 405 nm (los datos obtenidos aparecen en la tabla 4.5). La representación directa de la absorbancia *vs.* concentración origina una curva sigmoidea, por lo que para el cálculo de los valores de concentración se realizó el correspondiente ajuste logarítmico.

Recta Patrón Hialurónico (ng/ml)	Absorbancia 405nm	Log Concentración AH	Absorbancia 405nm (-blanco)
800	0,351	2,903	0,217
400	0,642	2,602	0,508
200	1,039	2,301	0,905
100	1,506	2,000	1,372
50	1,747	1,699	1,613
5	2,972	0,699	2,838
0	3,087		
Blanco	0,134		

Tabla 4.5. Representa los valores de absorbancia obtenidos para cada concentración de ácido hialurónico.

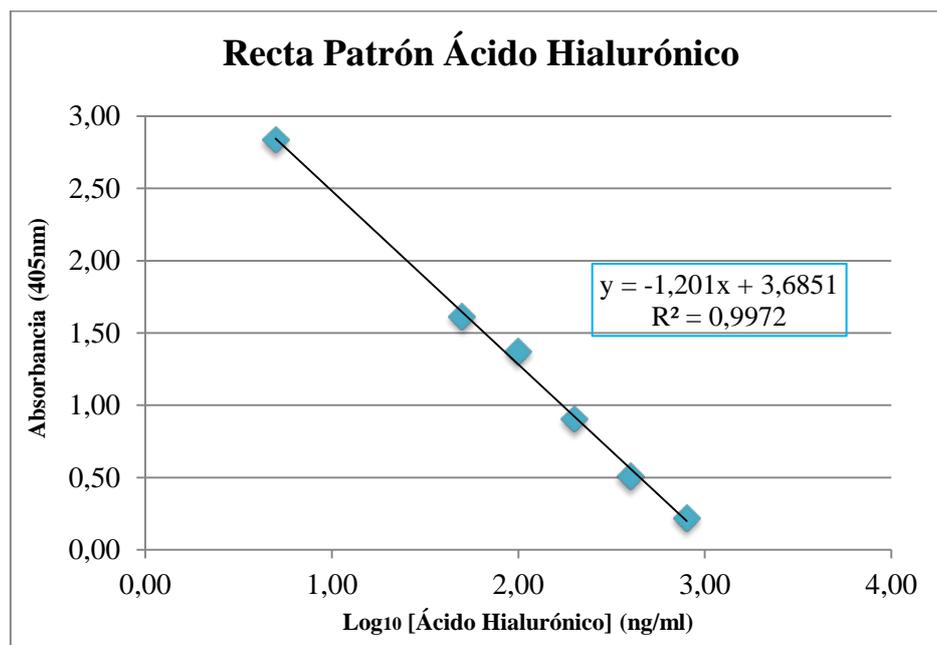


Figura 4.26. Representación gráfica del  $\log_{10}$  de la concentración de ácido hialurónico en ng/ml frente a la absorbancia medida a 405 nm, y la ecuación de la recta patrón.

Con los datos obtenidos por ambos métodos (carbazol y ELISA), se realiza un estudio comparativo de todos los valores.

Tratamiento	CARBAZOL		ELISA	
	GAGsT ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	Media GAGsT ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	AH ( $\text{ng}/\text{mg}$ )	Media AH ( $\text{ng}/\text{mg}$ )
<b>Control</b>	12,58	<b>5,383</b>	113,8	<b>110,633</b>
	1,31		107,45	
	2,26		110,65	
<b>Cetuximab</b>	7,03	<b>20,240</b>	510,75	<b>1135,713</b>
	10,6		894	
	36,07		1221,95	
	27,26		1916,15	
<b>Cet + Hia</b>	27,57	<b>18,003</b>	904,35	<b>1210,467</b>
	12,03		1735,55	
	14,41		991,5	
<b>Cet + Hia/2</b>	32,98	<b>31,550</b>	738,05	<b>702,883</b>
	30,6		646,6	
	31,07		724	
<b>Cet/2</b>	21,07	<b>35,200</b>	692,8	<b>747,150</b>
	43,93		698,1	
	40,6		850,55	
<b>Cet/2 + Hia</b>	22,98	<b>25,835</b>	1595,15	<b>1596,675</b>
	28,69		1598,2	
<b>Cet/2+ Hia/2</b>	35,88	<b>27,650</b>	1973,45	<b>2058,633</b>
	20,76		2163,65	
	26,31		2038,8	

Tabla 4.6. Valores de GAGsT en  $\mu\text{g}/\text{mg}$  tejido y AH en  $\text{ng}/\text{mg}$  tejido obtenidos en los métodos de carbazol y ELISA, respectivamente, considerando los distintos tratamientos.

Tratamientos	N	CARBAZOL		ELISA	
		Media (X)	Desviación Estándar ( $\pm$ DS)	Media (X)	Desviación Estándar ( $\pm$ DS)
<b>Total</b>	21	23,14	12,26	1058,35	654,27
<b>Control</b>	3	5,38	6,25	110,65	3,15
<b>Tumoral</b>	18	26,1	10,37	1216,3	564,48
<b>Control</b>	3	5,38	6,25	110,65	3,15
<b>Cetuximab</b>	10	22,96	10,72	1028,3	465,61
<b>Cetuximab/2</b>	8	30,02	9,03	1451,35	617,7
<b>Cetuximab</b>	4	20,23	13,75	1135,7	595,9
<b>Cetu + Hyal</b>	3	18	8,37	1210,45	456,82
<b>Cetu + Hyal/2</b>	3	31,54	1,25	702,9	49,27
<b>Cetu/2</b>	3	35,2	12,35	747,15	89,58
<b>Cetu/2 + Hyal</b>	2	25,83	4,04	1596,65	2,07
<b>Cetu/2 + Hyal/2</b>	3	55,3	15,3	2058,65	96,55

Tabla 4.7. Valores numéricos medios, y su correspondiente desviación estándar, de ambos métodos (carbazol y ELISA), organizados en grupos para su posterior análisis estadístico.

#### 4.3.3.- Análisis estadístico.

El análisis estadístico realizado se ha llevado a cabo con el programa informático *Statistica*, mediante la realización de análisis de varianza, ANOVA, de un factor o dos, los correspondientes test post-hoc de los ANOVAs han sido realizados con el test de Bonferroni, ( $P < 0,05$  y  $P < 0,01$ ). En todos los casos se pretende comparar el método de carbazol con el método ELISA, y observar si existe algún tipo de variación respecto de los resultados obtenidos en ambos.

En primer lugar, se ha analizado si existían diferencias considerando los tejidos controles utilizados (sin ningún tratamiento), y el resto de los tejidos incluyendo las muestras tumorales correspondientes a los tratamientos administrados.

	CARBAZOL ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )			ELISA ( $\text{ng}/\text{mg}$ )	
	Media	DS		Media	DS
<b>CONTROLES</b>	5,38	6,25	<b>CONTROLES</b>	110,65	3,15
<b>TUMORALES</b>	26,1	10,3	<b>TUMORALES</b>	1216,3	564,48

Tabla 4.8. Valores medios y desviación estándar (DS) de ambos métodos (Carbazol *vs.* ELISA) considerando a los animales controles y los que tenían cáncer de colon.

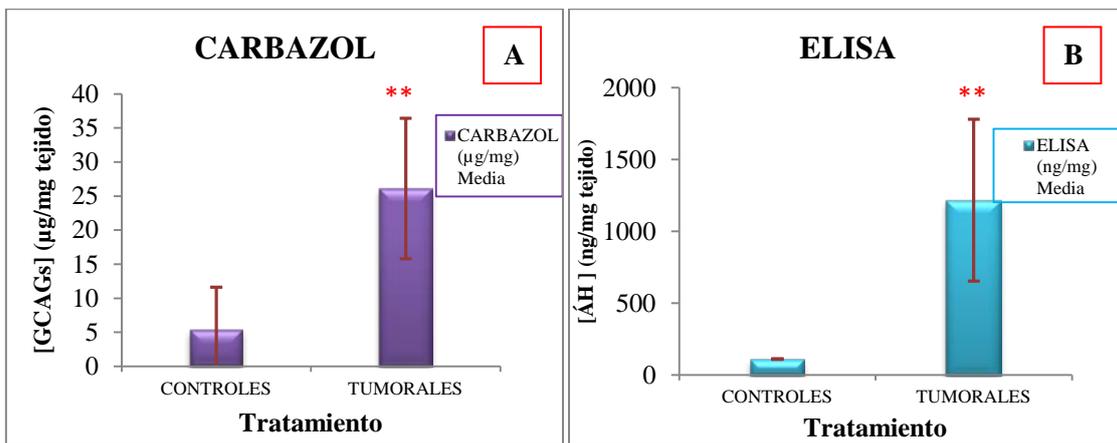


Figura 4.27. Valores medios y desviación estándar de A) resultados del método carbazol, y B) resultados del método ELISA (\*\* $P < 0.01$  respecto al control).

En este primer caso se observa cómo existe una alta significación de todas las muestras tumorales en conjunto respecto de las muestras controles para ambos métodos ( $P = 0,003$ ).

En segundo lugar se compara la eficacia del tratamiento quimioterápico con cetuximab en las dos dosis ensayadas (dosis completa de cetuximab, y cetuximab a la mitad ó cetuximab/2).

	CARBAZOL (µg/mg)			ELISA (ng/mg)	
	Media	SD		Media	SD
<b>CONTROLES</b>	5,38	6,25	<b>CONTROLES</b>	110,65	3,15
<b>CETUXIMAB (X)</b>	22,96	10,72	<b>CETUXIMAB (X)</b>	1028,3	465,61
<b>CETUXIMAB (X/2)</b>	30,02	9,03	<b>CETUXIMAB (X/2)</b>	1451,35	617,7

Tabla 4.9. Valores medios y desviación estándar (DS) de ambos métodos (Carbazol vs. ELISA), considerando la administración del tratamiento quimioterápico, y la dosis (X o X/2).

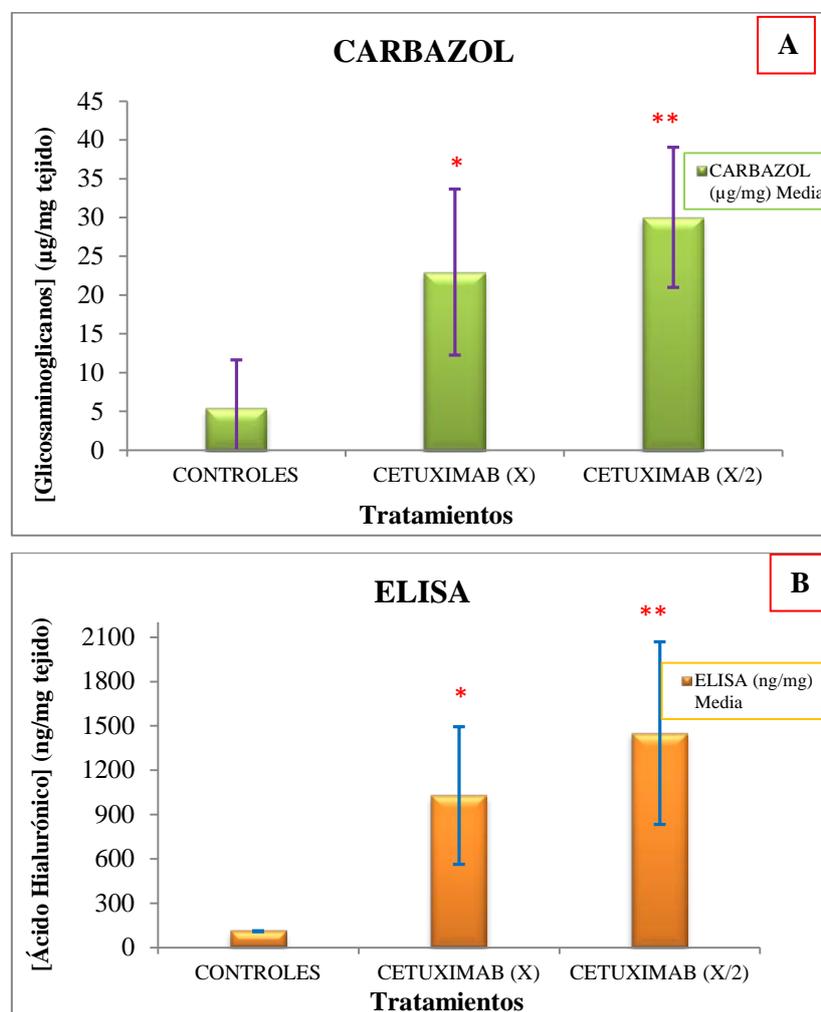


Figura 4.28. Valores medios y desviación estándar de GAGsT y AH, considerando la administración del cetuximab. A) Resultados del método carbazol, y B) resultados del método ELISA. (\* p < 0.05 respecto y \*\* p < 0.01 respecto al control).

En esta ocasión también se observan diferencias significativas a la hora de comparar las muestras controles con los dos tipos de dosis del fármaco quimioterápico, el cetuximab. Para el caso de la dosis completa, las diferencias con respecto al control son significativas ( $p = 0,02$  para carbazol y  $p = 0,03$  para ELISA), mientras que para la dosis mitad, que presenta mayores valores de GAGs y AH, las diferencias son altamente significativas con respecto al control ( $p = 0,003$  para ambos métodos). La elevada variabilidad experimental y el escaso número de muestras no permiten observar la existencia de diferencias significativas entre ellos ambos tratamientos.

El tratamiento quimioterápico bi-fármaco se estudia con la ayuda de un análisis multifactorial al comparar las cuatro posibles interacciones ensayadas entre los dos compuestos administrados, el cetuximab y la hialuronidasa, y observar qué efecto tuvo sobre los glicosaminoglicanos y el ácido hialurónico en los animales a los que se les indujo el cáncer de colon.

	<b>CARBAZOL (<math>\mu\text{g}/\text{mg}</math>)</b>			<b>ELISA (<math>\text{ng}/\text{mg}</math>)</b>	
	Media	DS		Media	DS
<b>Cetuximab + Hyal</b>	18	8,37	<b>Cetuximab + Hyal</b>	1210,45	456,82
<b>Cetuximab + Hyal/2</b>	31,54	1,25	<b>Cetuximab + Hyal/2</b>	702,9	49,27
<b>Cetuximab/2 + Hyal</b>	25,83	4,04	<b>Cetuximab/2 + Hyal</b>	1596,65	2,07
<b>Cetuximab/2 + Hyal/2</b>	27,65	7,65	<b>Cetuximab/2 + Hyal/2</b>	2058,65	96,55

Tabla 4.10. Valores medios y desviación estándar (DS) de ambos métodos (Carbazol *vs.* ELISA) al considerar los dos tratamientos (cetuximab e hialuronidasa) en las cuatro combinaciones realizadas.

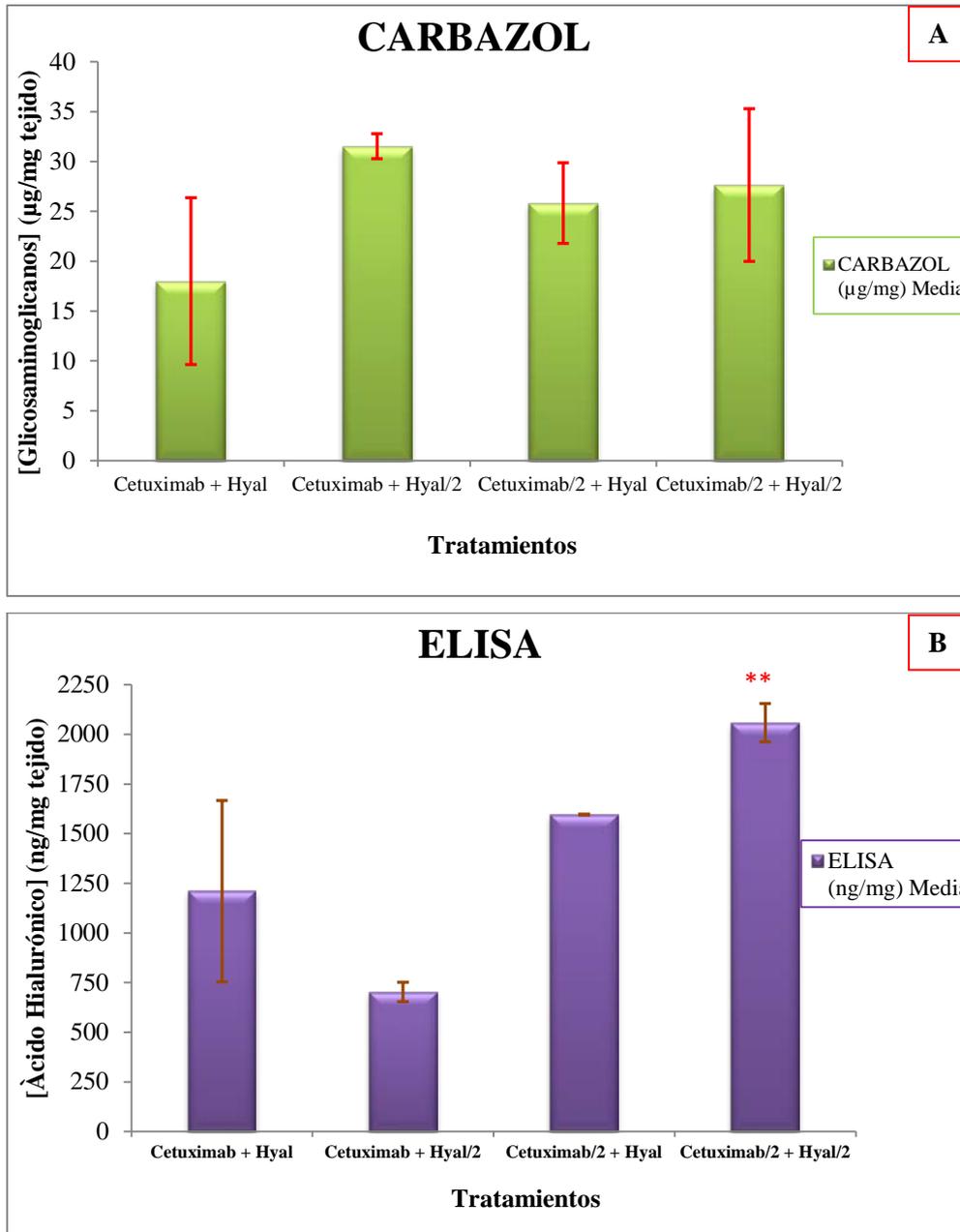


Figura 4.29. Valores medios y DS de los niveles de GAGsT y AH en los diferentes tratamientos realizados. A) Resultados del método carbazol, y B) resultados del método ELISA, (\*\* $P < 0.01$  respecto a Cetuximab).

En este último caso, para el método carbazol no existen diferencias significativas entre las cuatro combinaciones de cetuximab e hialuronidasa comparadas, mientras que para el ELISA, la única combinación que ha resultado significativa, al presentar los mayores valores de AH en las muestras tumorales ha sido la administración de la dosis a la mitad de ambos compuestos (cetuximab e hialuronidasa), siendo su  $P = 0,003$ ; respecto de las

dos combinaciones que presentan la dosis completa de cetuximab (cetuximab + hialuronidasa, y cetuximab + hialuronidasa/2).

Uno de nuestros objetivos es cuantificar los niveles de ácido hialurónico presentes en colon, tanto de animales control como de animales inducidos de cáncer colorrectal, tanto tratados como no tratados.

En este sentido hemos comparado dos métodos analíticos que nos permiten determinar glicosaminoglicanos, y más concretamente, el ácido hialurónico: método del carbazol y método ELISA.

En cuanto a las condiciones para realizar la curva patrón en el método de carbazol, se utilizó el ácido glucurónico como estándar externo para crear una curva estándar de calibración, a partir de la cual se extrapolan los valores obtenidos de las muestras de tejido intestinal, tanto del control como del tumoral (*Frazier y cols., 2008*). La recta patrón está comprendida entre los valores de 4 y 40  $\mu\text{g/ml}$  tal y como observaron Bitter y Muir en 1962, y más concretamente, valores entre 6,5 y 65  $\mu\text{g/ml}$ .

El ensayo ELISA posee una gran sensibilidad y especificidad, es sencillo de realizar, y es reproducible y adaptable a las características de cualquier laboratorio. Puede detectar sustancias del orden de  $\text{ng/ml}$  y/o  $\text{pg/ml}$  a partir de muy poca cantidad de la muestra problema ( $\mu\text{l}$ ). Utiliza enzimas como marcadores inmunoquímicos que permiten detectar las uniones primarias antígeno-anticuerpo, ya que las enzimas son fácilmente conjugables con anticuerpos o antígenos (*Haserodt y cols., 2011*).

Los valores obtenidos por ambos métodos de los dos compuestos a detectar, los GAGs y el ácido hialurónico correspondientes a las muestras control, es decir, tejido sano, (Tabla 4.6), son superiores de los detallados por *Lun y cols., (2010)* en tejido estomacal ovino, en torno a 4 y 2  $\text{mg/g}$  de tejido, respectivamente, obteniendo estos autores valores aún más bajos en la matriz estomacal.

Los resultados hallados en este trabajo pueden confirmar las observaciones hechas por *Arias y cols., (1989)*, que señala que los tejidos sanos presentan una mayor proporción de glicosaminoglicanos copoliméricos, es decir, los GAGs sulfatados, mientras que en los tejidos tumorales la situación se invierte, y los GAGs homopoliméricos (el ácido hialurónico) aumentan su concentración notablemente. Esto se puede ver reflejado en los

resultados obtenidos en los dos métodos realizados, en los que los GAGsT multiplican su valor absoluto aproximadamente x 5, mientras que los de AH lo hacen x 10 (Tabla 4.8 y Fig. 4.27).

Respecto a los GAGs sulfatados detectados por el método de carbazol, puede ocurrir que detectemos algunos GAGs sulfatados que hayan aumentado su concentración en el estado patológico en el que se encuentra el tejido, como por ejemplo, el condroitín sulfato (CS) y el heparán sulfato (HS), o su derivado, la heparina. Se ha descrito que los niveles de estos dos compuestos, al igual que el ácido hialurónico, pueden variar con la edad del individuo, con un máximo en el periodo fetal en el cual se produce un fuerte crecimiento y morfogénesis, disminuyendo paulatinamente con los años (*Bouziges y cols., 1991*). Sin embargo, el condroitín sulfato (CS) aumenta su expresión en los adenomas y carcinomas (como el de colon), pero estos niveles de CS no presentan una correlación significativa con el grado del tumor, por lo que no se encuentran relacionados de forma directa con la tumorigénesis y la metástasis (*Mukaratirwa y cols., 2004*). Algunos autores han señalado que derivados de CS pueden reducir la viabilidad de las células de cáncer de mama, e incluso inhibir el crecimiento tumoral, así como la metástasis en modelos experimentales (*Belting, 2014*). También se debe tener en cuenta que el receptor de superficie celular CD44 para el ácido hialurónico es un proteoglicano de condrotín sulfato (habitualmente los GAGs se conjugan con algunas familias de proteínas, como los proteoglicanos), por lo que al aumentar los niveles de AH en los tejidos tumorales, así como su receptor, es inevitable que los niveles de CS aumenten a su vez, aunque por ellos mismos no conlleven desarrollo tumoral (*Wegrowski y cols., 2006*).

Tras observar los resultados obtenidos en ambos métodos, tanto los valores numéricos como los valores de significación tras realizar el análisis estadístico de las varianzas, hemos constatado que en los individuos que presentaban tumores de cáncer colorrectal existe un aumento de la cantidad de ácido hialurónico en su tejido intestinal (concretamente, en el estroma localizado en la periferia de las masas tumorales), tal y como apuntaban diversos autores (*Arias y cols., 1989; Wang y cols., 1996; Mukaratirwa y cols., 2004; Stern y cols., 2006; Bouga y cols., 2010; Karbownik y cols., 2013; Dicker y cols., 2014; Schmaus y cols., 2014*).

Algunos autores, como *Cutsem y cols.*, (2009) han observado que el cetuximab, cuando se administra conjuntamente como fármaco quimioterápico secundario a otros, aumenta significativamente la supervivencia libre de progresión media de los pacientes, en comparación cuando solo se administra una combinación de fármacos quimioterápicos, pero que no incluyen al cetuximab.

A la hora de administrar conjuntamente el cetuximab y la enzima hialuronidasa, se hace patente la contribución tan variable de la hialuronidasa sobre el efecto del cetuximab, ya que se no se observa una tendencia clara entre las cuatro combinaciones posibles, así en el caso del ELISA, la hialuronidasa ejerce un mayor efecto sobre los niveles de ácido hialurónico cuando se encuentra en su dosis mitad (5 unidades) junto a la dosis completa del cetuximab; sin embargo, para el carbazol esta situación se encuentra invertida (Fig. 4.29).

El papel de la hialuronidasa puede parecer controvertido. La dosificación de esta enzima exógena para lograr una acción antitumoral es difícil de evaluar porque no se conoce con exactitud el papel que realiza en el interior del tumor, ni su actividad tras su administración, por otra parte, se han descrito incidencias de efectos adversos que han podido limitar posteriores investigaciones sobre el papel de las hialuronidasas como tratamiento concomitante junto a fármacos quimioterápicos (*Karbownik y cols.*, 2013).

En el trabajo realizado por *Singha y cols.*, (2015), observan el papel de una hialuronidasa especial, la hialuronidasa pegilada (PEGPH20), cuya función en los tejidos tumorales es promover un mayor acceso de las natural killer (células NK) a las células tumorales que presentan un alto contenido en ácido hialurónico, ya que la matriz pericelular de estas células impide a las NK acceder a ellas. Algunos fármacos cuya naturaleza es un anticuerpo monoclonal (mAb) también se ven favorecidos por la acción de esta hialuronidasa cuando se administran conjuntamente, favoreciendo la inhibición del crecimiento tumoral, constituyendo así un tratamiento adyuvante eficaz para tumores con una alta concentración de hialurónico (*Singha y cols.*, 2015).

**4.4. Expresión de citoquinas y genes.**

Se ha cuantificado la expresión de los marcadores ACTB, CASP3, CASP8, CASP9, CTNNB1, KRAS, NFKB1, PTGS2, TNF, TRP53 Y VGEFA en tejidos, y de IL6 y TNF en sangre, de los ratones correspondientes a los distintos grupos de tratamiento.

**4.4.1. Tejidos.**

En la siguiente tabla podemos ver los niveles de expresión, en tejido tumoral de colon, de los genes ACTB, CASP3, CASP8, CASP9, CTNNB1, KRAS, NFKB1, PTGS2, TNF, TRP53 Y VGEFA, en el grupo de ratones "**control**" (no inducidos con AOM y no tratados) y el grupo de ratones "**inducidos**" (si inducidos con AOM, pero no tratados).

	ACTB	CASP3	CASP8	CASP9	CTNNB1	KRAS	NFKB1	PTGS2	TNF	TRP53	VEGFA
	Promedio										
Controles	0,779	0,912	0,847	1,090	0,773	0,934	0,822	1,431	0,862	0,959	1,092
Inducidos	1,218	1,185	1,248	1,221	1,188	1,210	1,200	1,204	1,313	1,247	1,243
	Desv Est										
Controles	0,104	0,228	0,315	0,141	0,254	0,330	0,154	0,460	0,285	0,173	0,154
Inducidos	0,192	0,167	0,150	0,147	0,191	0,188	0,192	0,618	0,610	0,218	0,239

Tabla 4.11. Datos expresión genes en tejido colónico de ratones control y ratones inducidos.

Comparando ambos grupos, podemos apreciar, como era predecible, que para la mayoría de estos genes, la expresión es mayor en los ratones inducidos que en los control, aunque solamente se alcance significación estadística ( $p < 0,05$ ) para los genes ACTB y NFKB1.

Esto, en términos generales, concuerda con la observación de la existencia de tumores, en los ratones inducidos, en los que se activaría esa expresión génica. (Ver gráfica x). La proteína codificada por ACTB interviene en Procesos de Adhesión y migración ( *Artman y cols.*, 2014). Mientras que el NFKB1 responde a una amplia variedad de estímulos celulares

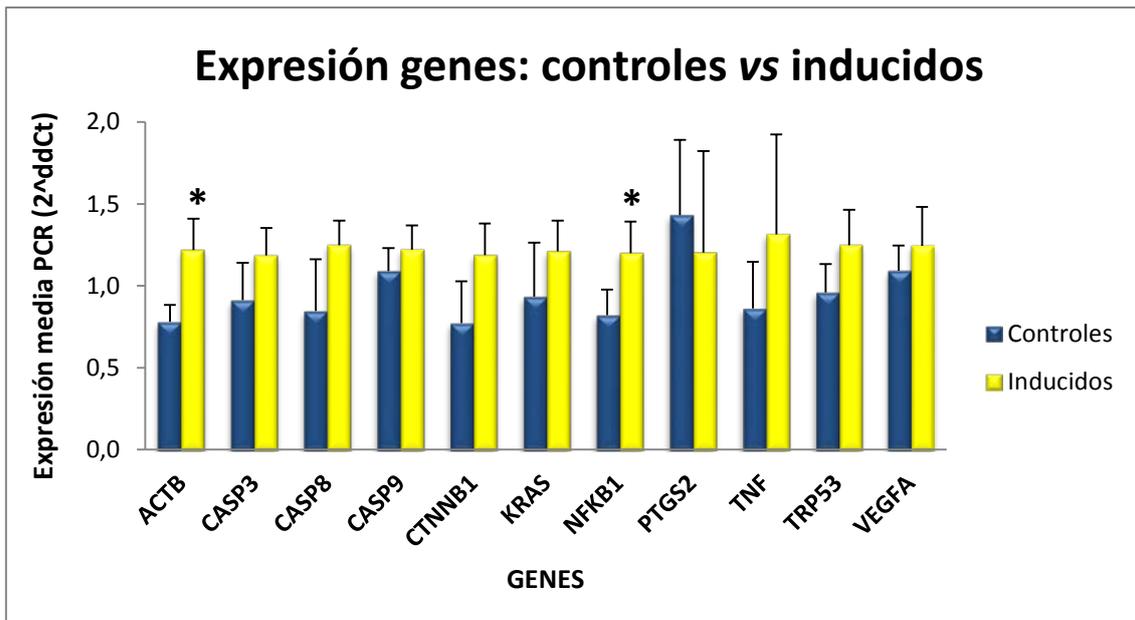


Figura 4.30. Gráfica comparativa de expresión genes de ratones control vs inducidos

En la tabla y figuras siguientes se recogen los resultados de la expresión de los genes en los distintos grupos de tratamiento.

		ACTB	CASP3	CASP8	CASP9	CTNNB1	KRAS	NFKB1	PTGS2	TNF	TRP53	VEGFA
<b>Tmto.</b>	<b>Nº</b>	<b>MEDIA</b>										
INDUC.	4	1,218	1,185	1,248	1,221	1,188	1,210	1,200	1,204	1,313	1,247	1,243
X	4	1,854	1,391	1,939	1,829	1,496	1,544	1,625	12,528	1,785	2,152	1,928
X+Y	6	0,981	1,084	1,360	1,187	1,023	1,054	1,006	1,779	1,380	1,165	1,104
X+Y/2	4	1,527	0,992	2,175	1,243	1,278	1,040	1,356	5,147	2,264	1,206	1,200
X/2	6	1,141	1,056	1,066	0,997	0,891	0,941	0,934	1,769	0,746	0,881	1,016
X/2+Y	5	1,136	1,026	1,006	1,081	0,971	1,083	1,001	2,243	0,791	1,016	0,956
X/2+Y/2	6	1,051	1,034	1,278	0,956	1,029	1,033	1,008	1,688	1,223	1,128	0,999
		<b>DESV EST</b>										
INDUC.	4	0,192	0,167	0,150	0,147	0,191	0,188	0,192	0,618	0,610	0,218	0,239
X	4	0,893	0,341	0,309	0,451	0,132	0,162	0,385	15,668	0,767	0,646	0,362
X+Y	6	0,272	0,152	0,224	0,268	0,129	0,139	0,246	1,483	0,858	0,230	0,352
X+Y/2	4	0,429	0,163	1,307	0,283	0,441	0,221	0,195	4,612	0,372	0,240	0,255
X/2	6	0,532	0,348	0,303	0,404	0,228	0,213	0,467	1,061	0,397	0,317	0,215
X/2+Y	5	0,229	0,233	0,208	0,278	0,264	0,306	0,138	1,143	0,496	0,301	0,203
X/2+Y/2	6	0,240	0,160	0,398	0,518	0,205	0,251	0,266	0,831	0,819	0,412	0,155

Tabla 4.12. Datos de expresión génica en tejido colónico de los ratones inducidos y de los correspondientes a los distintos grupos de tratamiento.

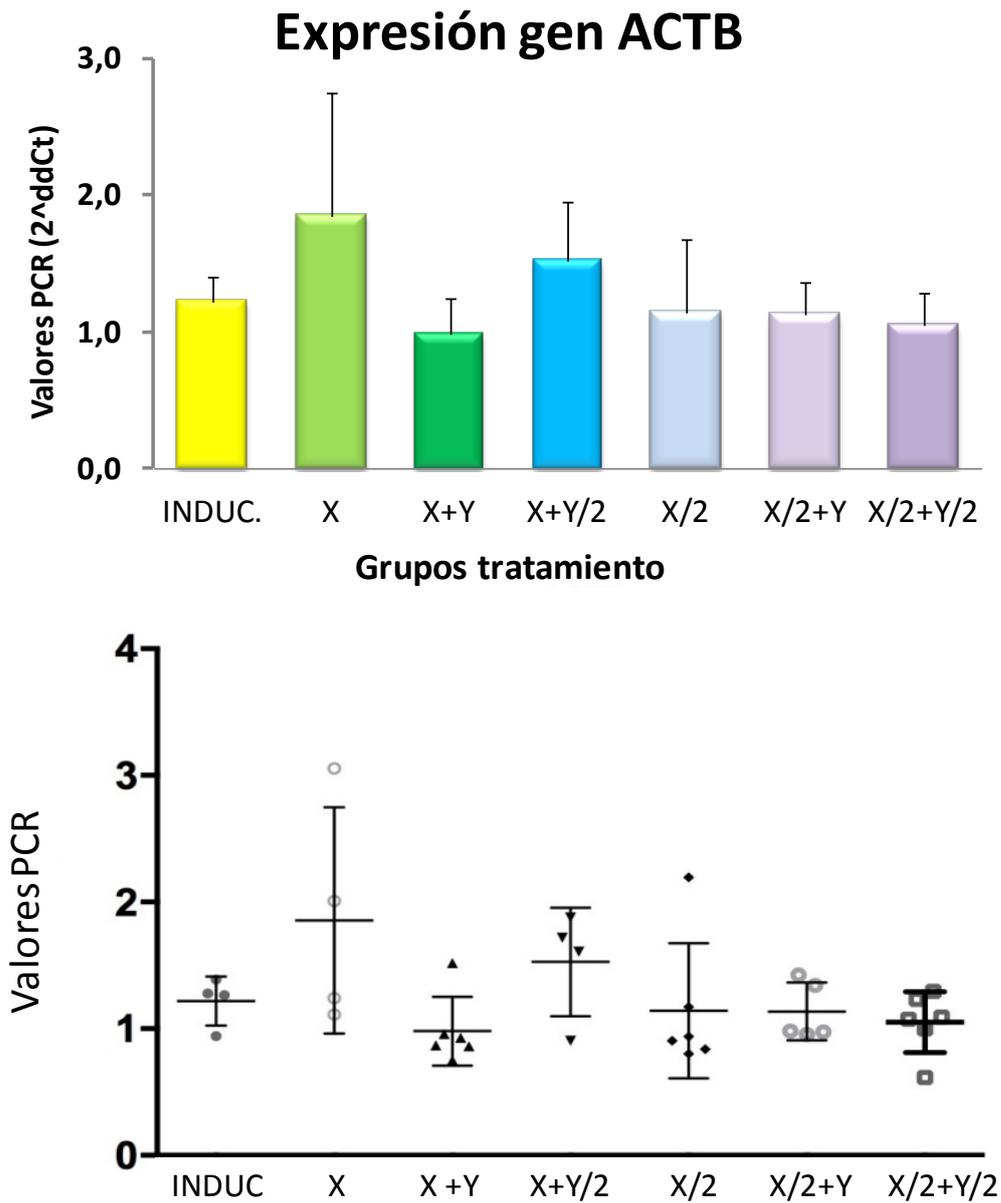


Figura 4.31. En el gráfico superior se representan los valores medios y la desviación estándar de los valores de expresión del gen **ACTB** en los distintos grupos experimentales. En el gráfico inferior se muestran los valores individuales de cada ratón, así como la mediana y el rango intercuartílico.

## Expresión gen CASP3

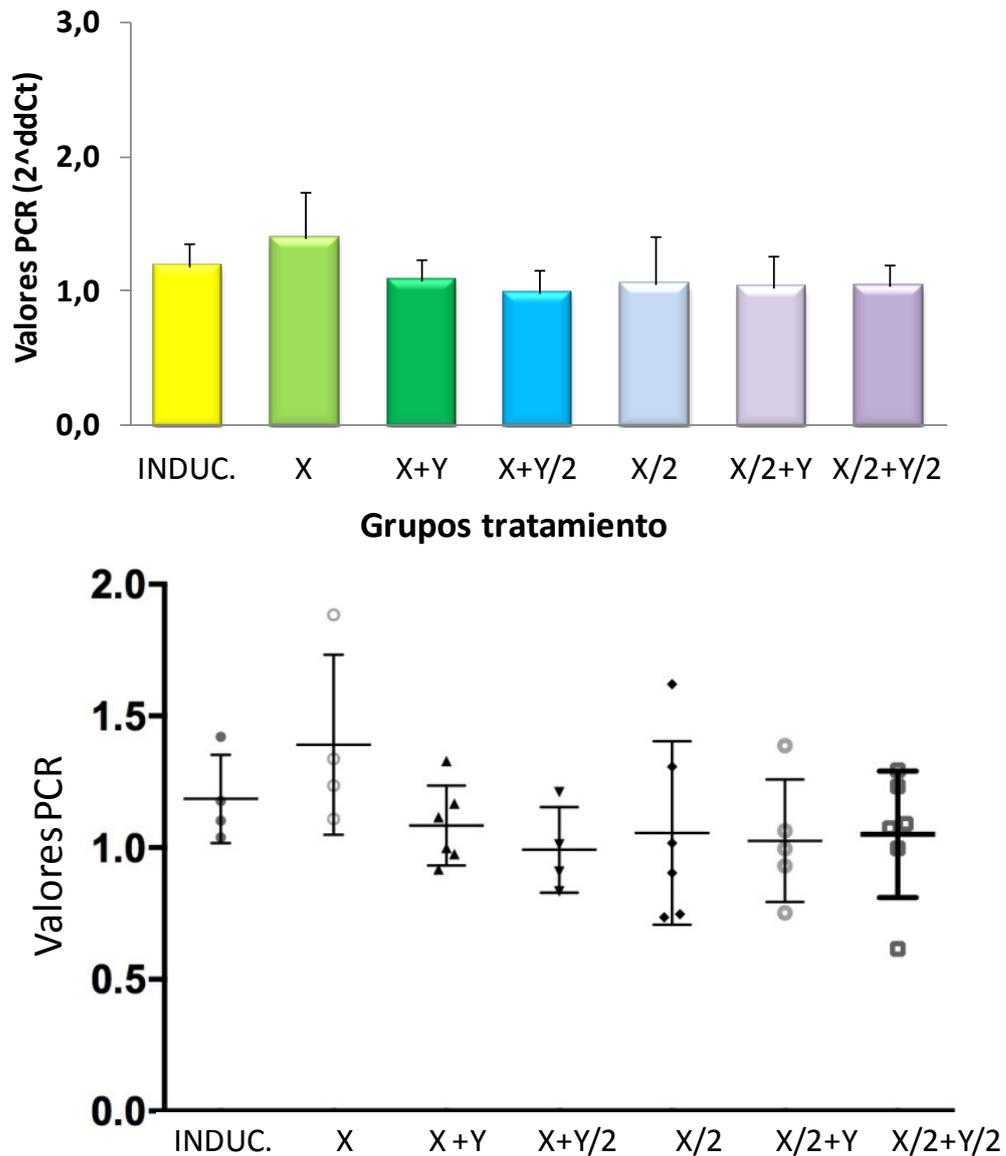


Figura 4.32. En el gráfico superior se representan los valores medios y la desviación estándar de los valores de expresión del gen **CASP3** en los distintos grupos experimentales. En el gráfico inferior se muestran los valores individuales de cada ratón, así como la mediana y el rango intercuartílico.

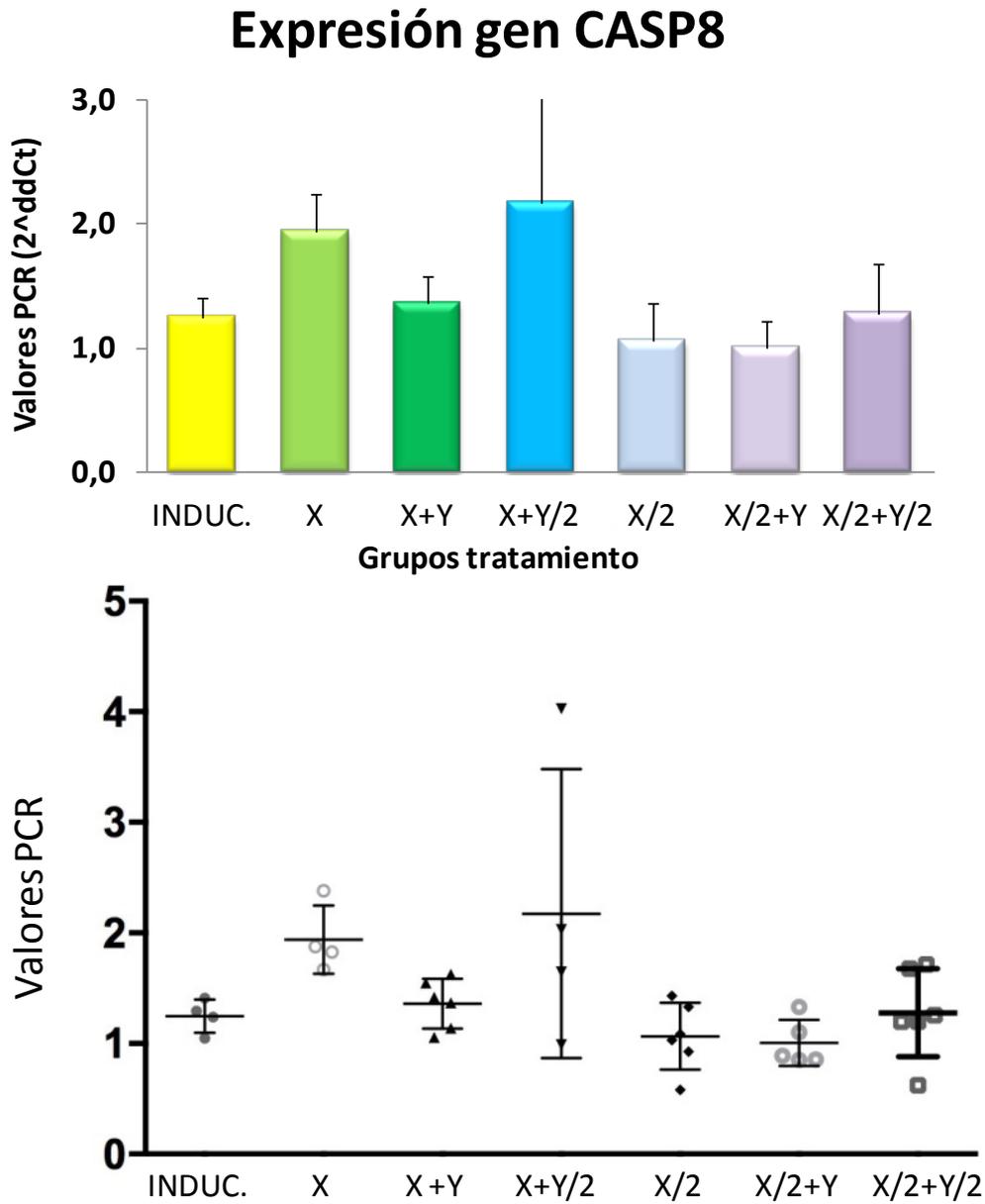


Figura 4.33. En el gráfico superior se representan los valores medios y la desviación estándar de los valores de expresión del gen **CASP8** en los distintos grupos experimentales. En el gráfico inferior se muestran los valores individuales de cada ratón, así como la mediana y el rango intercuartílico.

## Expresión gen CASP9

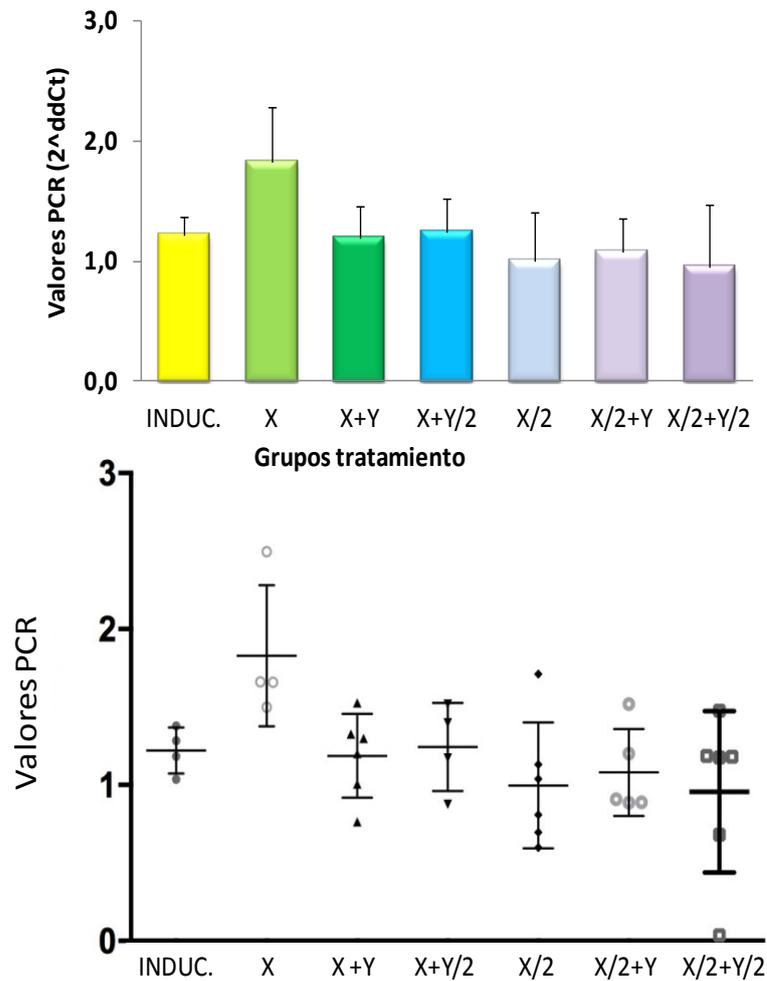


Figura 4.34. En el gráfico superior se representan los valores medios y la desviación estándar de los valores de expresión del gen **CASP9** en los distintos grupos experimentales. En el gráfico inferior se muestran los valores individuales de cada ratón, así como la mediana y el rango intercuartílico.

## Expresión gen CTNNB1

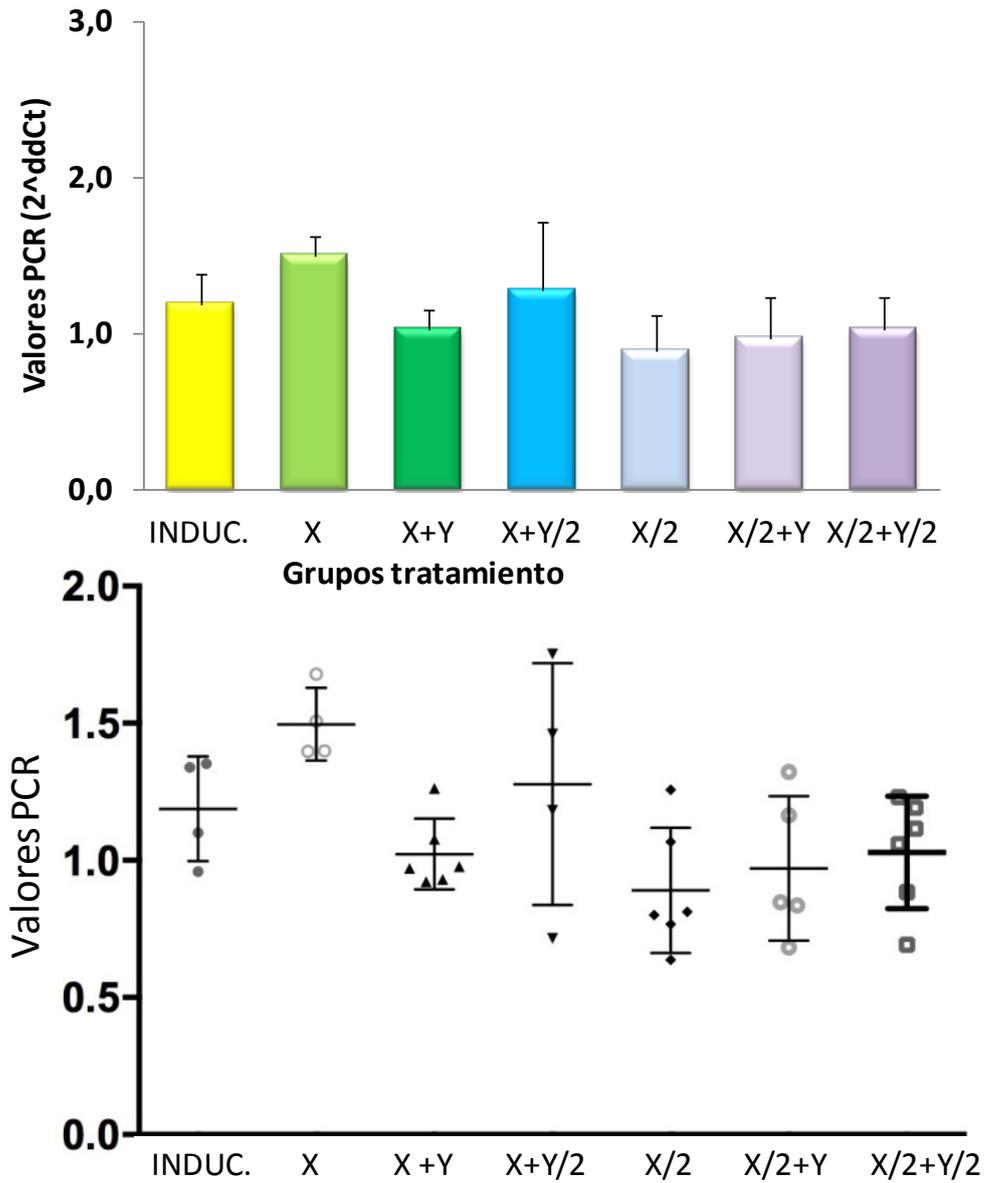


Figura 4.35. En el gráfico superior se representan los valores medios y la desviación estándar de los valores de expresión del gen **CTNNB1** en los distintos grupos experimentales. En el gráfico inferior se muestran los valores individuales de cada ratón, así como la mediana y el rango intercuartílico.

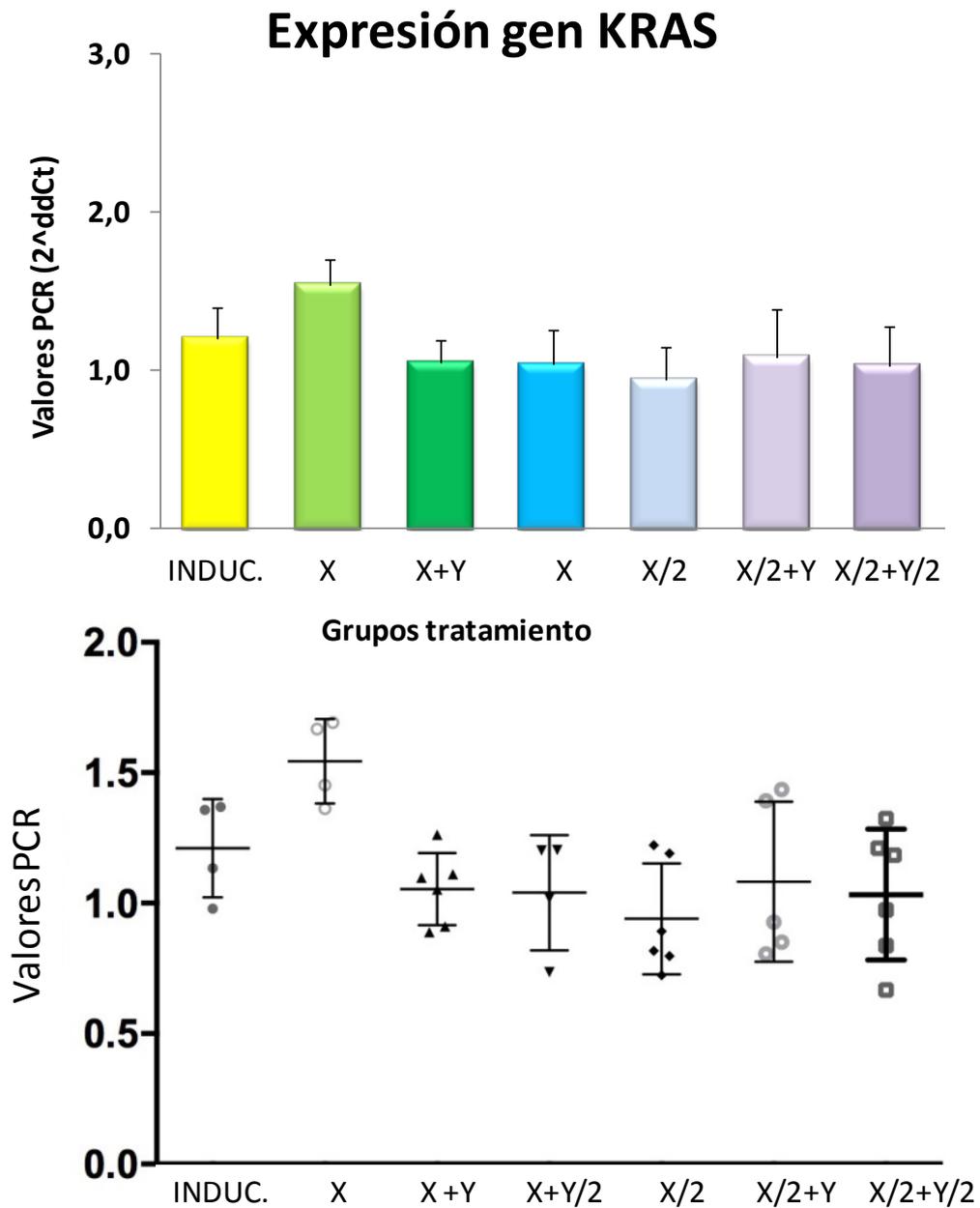


Figura 4.36. En el gráfico superior se representan los valores medios y la desviación estándar de los valores de expresión del gen **KRAS** en los distintos grupos experimentales. En el gráfico inferior se muestran los valores individuales de cada ratón, así como la mediana y el rango intercuartílico.

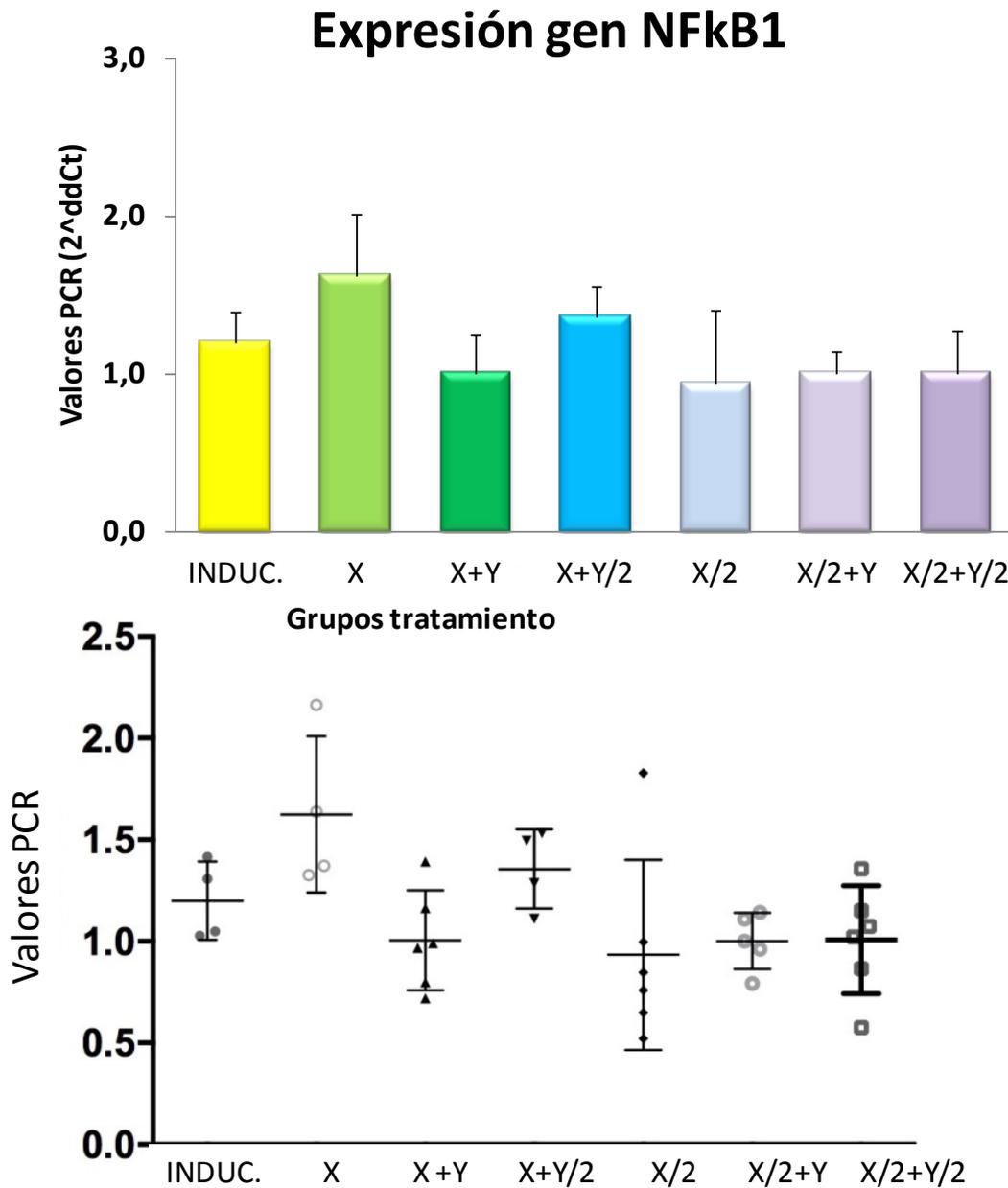


Figura 4.37. En el gráfico superior se representan los valores medios y la desviación estándar de los valores de expresión del gen **NFkB1** en los distintos grupos experimentales. En el gráfico inferior se muestran los valores individuales de cada ratón, así como la mediana y el rango intercuartílico.

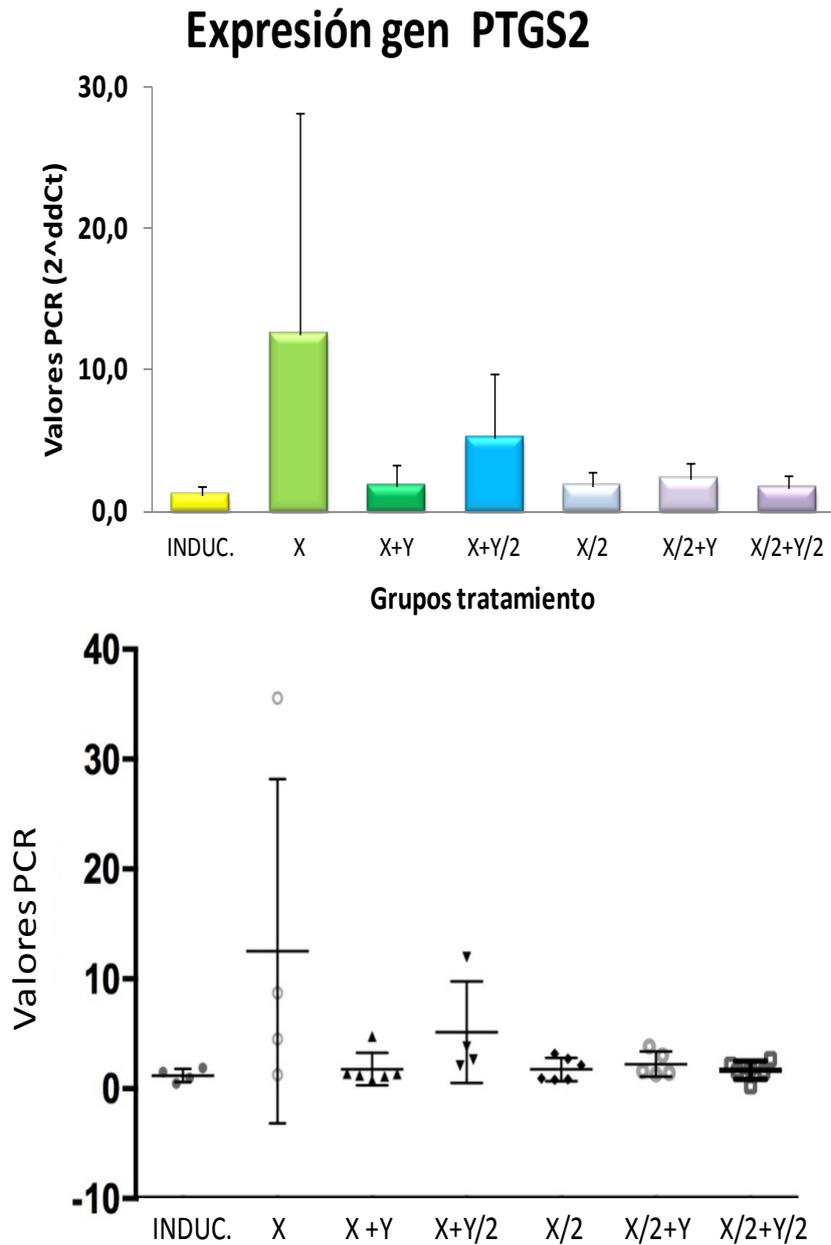


Figura 4.38. En el gráfico superior se representan los valores medios y la desviación estándar de los valores de expresión del gen **PTGS2** en los distintos grupos experimentales. En el gráfico inferior se muestran los valores individuales de cada ratón, así como la mediana y el rango intercuartílico.

## Expresión gen TNF

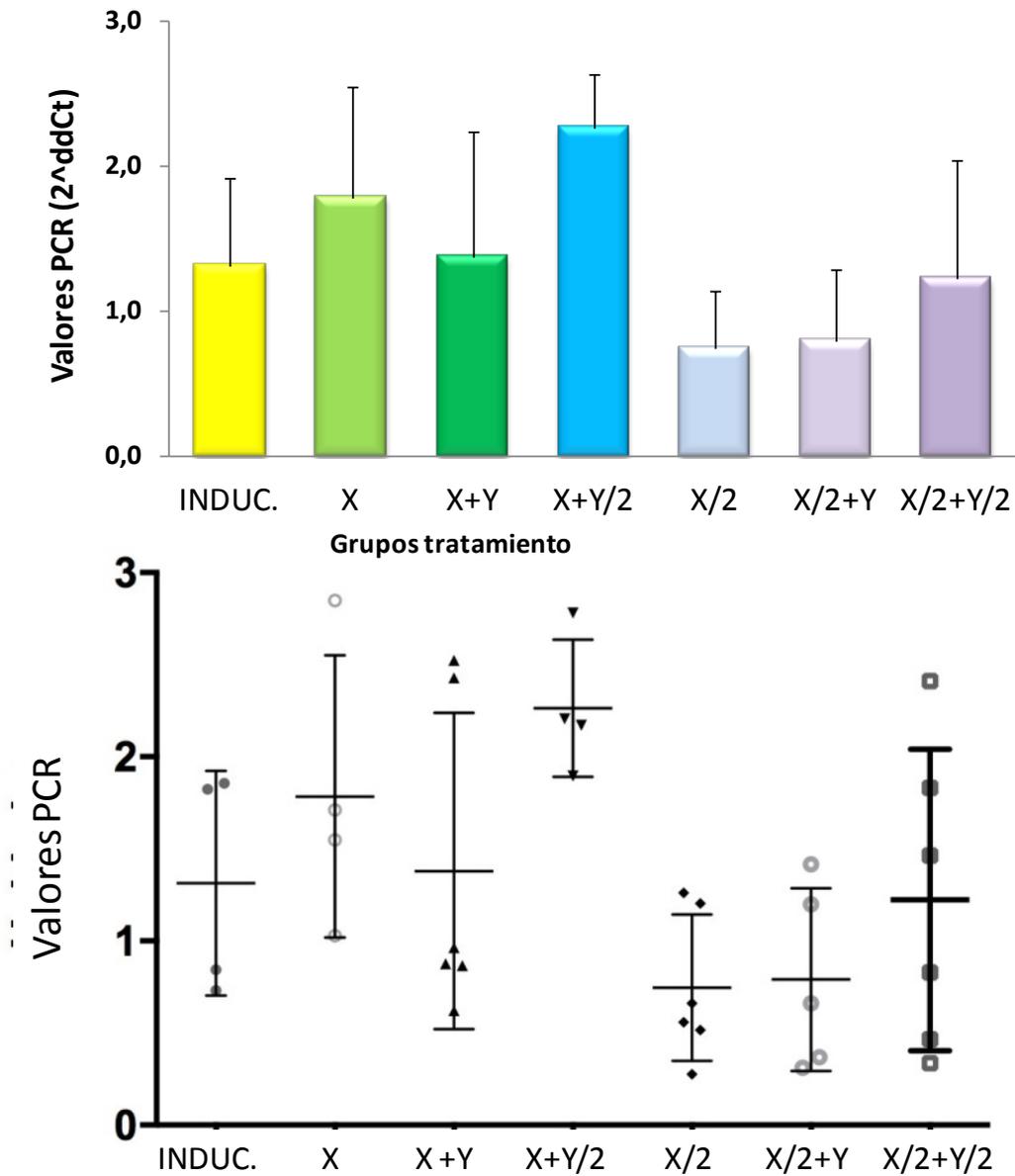


Figura 4.39. En el gráfico superior se representan los valores medios y la desviación estándar de los valores de expresión del gen **TNF** en los distintos grupos experimentales. En el gráfico inferior se muestran los valores individuales de cada ratón, así como la mediana y el rango intercuartílico.

## Expresión gen TRP53

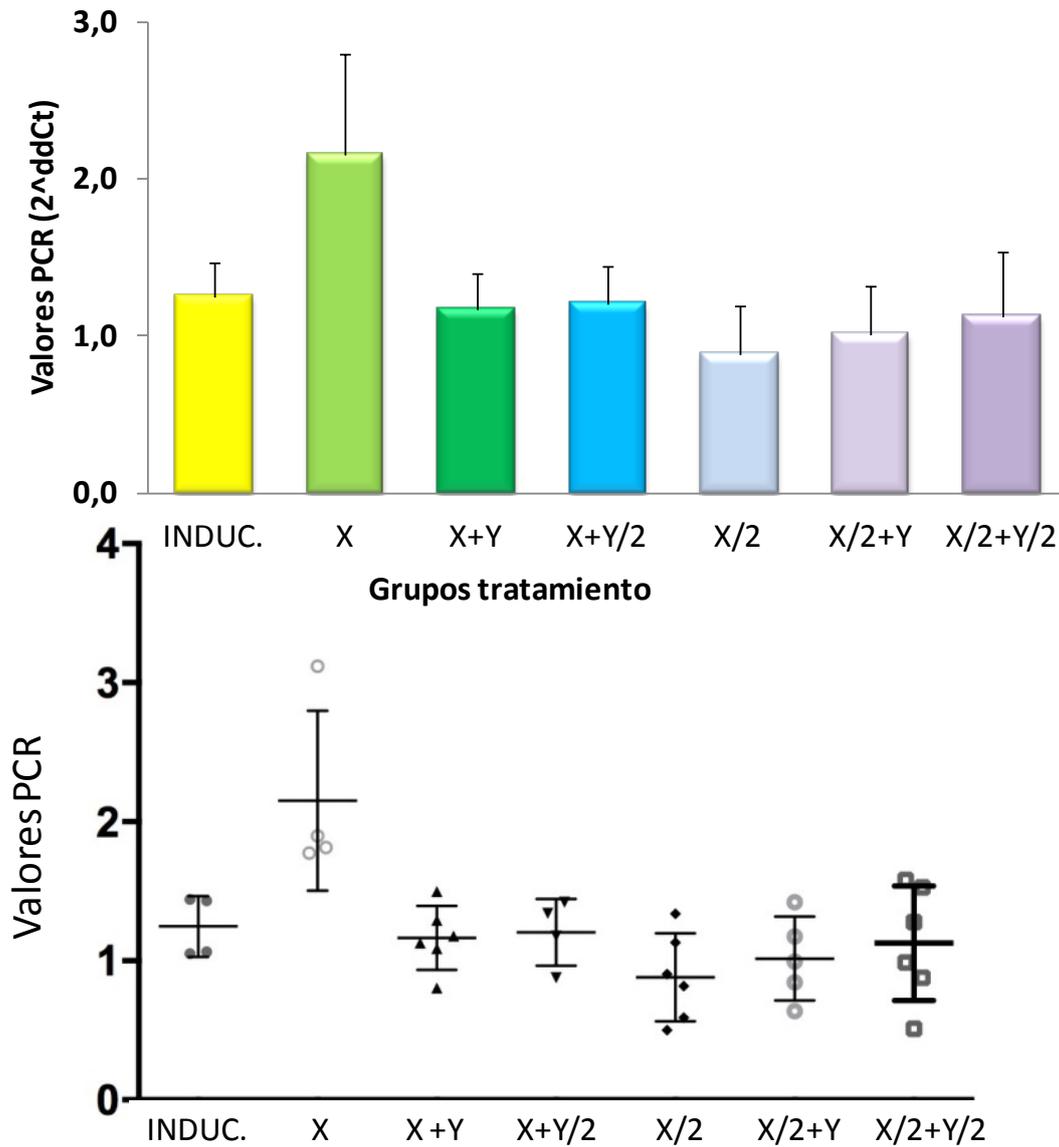


Figura 4.40. En el gráfico superior se representan los valores medios y la desviación estándar de los valores de expresión del gen **TRP53** en los distintos grupos experimentales. En el gráfico inferior se muestran los valores individuales de cada ratón, así como la mediana y el rango intercuartílico.

## Expresión gen VEGFA

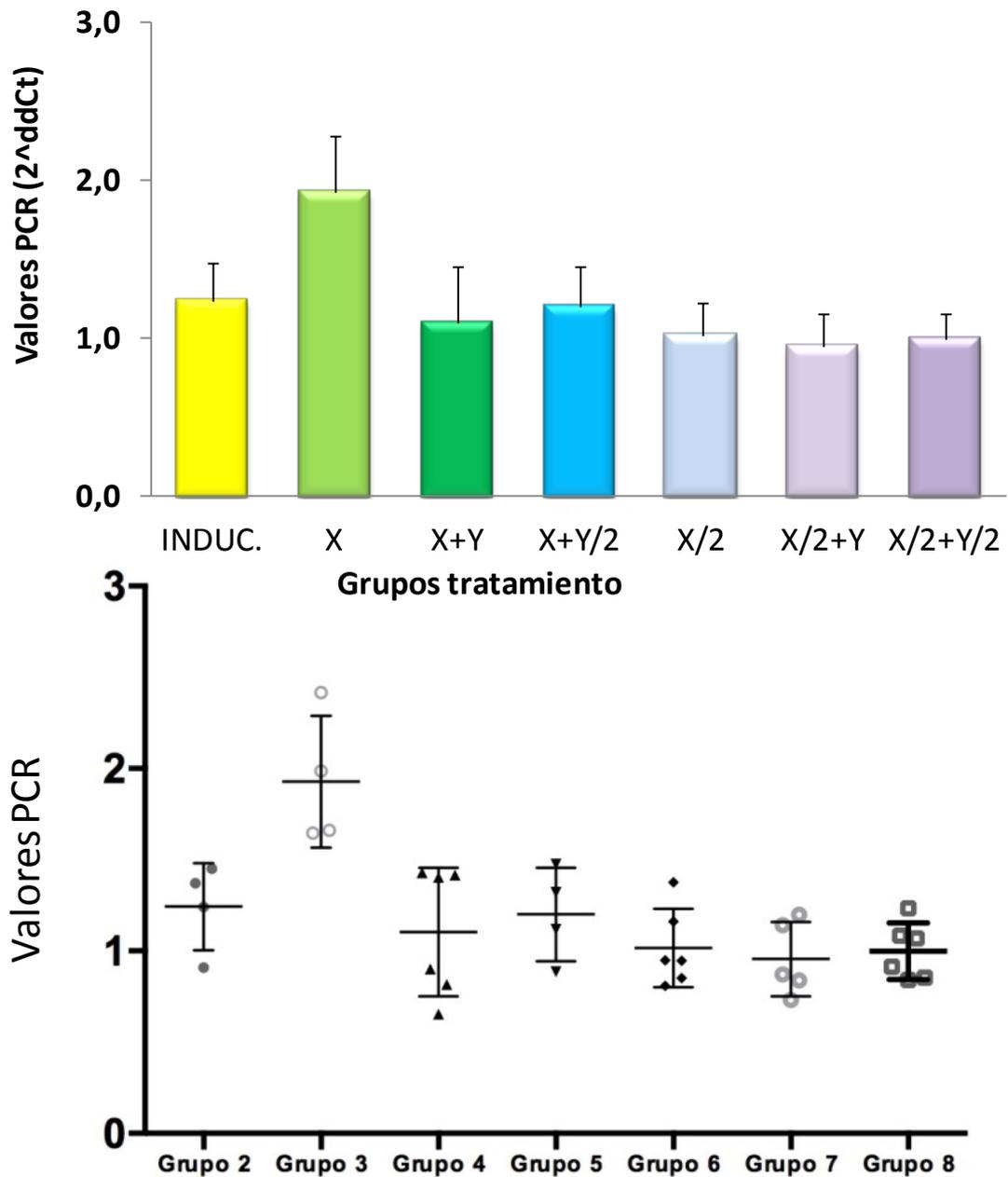


Figura 4.41. En el gráfico superior se representan los valores medios y la desviación estándar de los valores de expresión del gen **VEGFA** en los distintos grupos experimentales. En el gráfico inferior se muestran los valores individuales de cada ratón, así como la mediana y el rango intercuartílico.

**4.4.1.1. Potencia estadística.**

El test de potencia estadística "post-hoc" para detectar diferencias se calculó entre las medias del grupo inducidos con la dosis mitad de cetuximab (1,25mg/ratón), la dosis mitad de cetuximab con hialuronidasa (50U/ratón) y ambos compuestos a sus dosis mitad, con un nivel de significación  $\alpha = 0.05$  (dos colas) a partir de ecuación descrita por *Ellis (2010)*. De la misma manera se estimó el tamaño muestral para obtener una potencia estadística del 85% para detectar diferencias entre las medias de cada grupo con un nivel de significación  $\alpha = 0.05$  (dos colas).

	ACTB	CASP3	CASP8	CASP9	CTNNB1	KRAS	NFKB1	PTGS2	TNF	TRP53	VEGFA
Pot X/2 vs induc	5,20%	11,90%	24,00%	23,10%	61,30%	56,00%	24,20%	18,70%	36,60%	58,20%	31,10%
Pot X/2+Y vs induc	8,20%	22,30%	51,50%	15,80%	31,00%	11,80%	42,00%	41,40%	27,90%	26,30%	46,40%
Pot X/2+Y/2 vs induc	23,80%	32,00%	3,60%	21,00%	23,50%	25,20%	25,60%	18,60%	3,90%	8,70%	41,90%

Tabla 4.13. En la tabla se muestran los porcentajes referidos a la potencia estadística, comparando distintos grupos de tratamiento.

	ACTB	CASP3	CASP8	CASP9	CTNNB1	KRAS	NFKB1	PTGS2	TNF	TRP53	VEGFA
Pot X/2 vs induc	202	62	24	16	14	18	18	42	42	12	42
Pot X/2+Y vs induc	202	40	14	42	26	76	32	12	50	32	26
Pot X/2+Y/2 vs induc	44	40	898	12	50	40	36	58	1650	120	36

Tabla 4.14. Tamaño muestral requerido para la obtención de una potencia estadística  $\geq 85\%$  capaz de detectar diferencias entre las medias obtenidas ( $\alpha = 0.05$ ).

Se puede observar que el tratamiento X/2, en cuanto a la potencia estadística, podría ser el más eficaz a la hora de revertir la inducción de la expresión de los genes CASP8, CASP9, CTNNB1, KRAS, NFKB1 y TRP53. En este caso, a la vista de los datos, se alcanzaría una significación estadística con una potencia estadística de al menos el 85% si la muestra tuviera <25 individuos.

Respecto a la expresión de los genes VEGFA se puede ver que los tratamientos que contienen hialuronidasa (X/2+Y, X/2+Y/2) serían los más eficaces moderando la misma, ya que son los que menos individuos requerirían para alcanzar la significación estadística.

#### **4.4.1.2. Test de potencia estadística y marcadores en CCR.**

El test de potencia estadística (tabla) muestra una tendencia reseñable en cuanto a la posible o potencial existencia de diferencias significativas cuando se comparan los menores valores de la expresión génica de ciertos marcadores de cáncer colorrectal de los animales tratados con cetuximad a la dosis mitad (X/2) respecto a los animales en los que se indujo el cáncer colorrectal. Estos marcadores son:

-**TRP53** (Transformation related protein 53 → tumor protein p53 (tp53)).

-**CTNNB1** (Catenin-cadherin associated protein-beta 1).

-**KRAS** (*v-Ki-ras2, Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*).

-**NFKB1** (Nuclear Factor Of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer In B-Cells 1)

-**CASPASAS** (cysteinylyl aspartate proteases) en concreto las Caspasas 8 y 9.

El gen TRP53 (Transformation related protein 53 → tumor protein p53 (tp53)), codifica a una proteína supresora de tumores que responde a diversos tipos de estrés celular para regular la expresión de genes diana, induciendo con ello la detención del ciclo celular, *la apoptosis*, senescencia, reparación del ADN o cambios en el metabolismo. Mutaciones en este gen están asociados con una variedad de cánceres humanos. CTNNB1 (Catenin-cadherin associated protein-beta 1) interviene en procesos de *adhesión* y *crecimiento celular*, este gen codifica a una proteína que forma parte de un complejo de proteínas que constituyen uniones adherentes (AJs), en concreto, la proteína codificada ancla el citoesqueleto de actina que puede ser responsable de transmitir la señal de inhibición por contacto, que hace que las células dejen de dividirse una vez que la lámina epitelial se ha completado. Las mutaciones en este gen son una causa de cáncer colorrectal. El gen KRAS (*v-Ki-ras2, Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) vinculado al cancer colorectal como predictor de la eficacia de la inhibición del factor de crecimiento epidérmico (*Raponi y cols., 2008; Baynes y Gansert, 2009*) juega un

importante papel en la regulación de la *proliferación celular*, mutaciones del gen aparecen en varias neoplasias, que incluyen adenocarcinoma de pulmón, adenoma mucinoso, carcinoma ductal del páncreas y carcinoma colorrectal. El gen NFKB1 (Nuclear Factor Of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer In B-Cells 1). Este gen codifica una proteína de 105 kD, la proteína NFkB que está presente en casi todos los tipos celulares y es el punto final de una serie de eventos de transducción de señales que son iniciados por una amplia gama de estímulos relacionados con muchos procesos biológicos tales como la *inflamación*, la inmunidad, la diferenciación, el crecimiento celular, la tumorigénesis y la apoptosis. Procesos en los que interviene: inflamación, proliferación celular. Recientemente se ha descrito que este gen esta involucrado en tumores gástricos ( *Hua y cols.*, 2014). Las CASPASAS (cysteinyll aspartate proteases) están involucradas en las vías de transducción de señales de apoptosis, necrosis e inflamación. La activación secuencial de las caspasas desempeña un papel central en la fase de ejecución de la apoptosis celular En concreto las caspasas 8 y 9 se consideran iniciadoras de los procesos. Las caspasas 8, pueden ser activadas directamente por receptores de muerte como FasR. La caspasa 9 es reclutada al apoptosoma. Recientemente se ha descrito que la caspasa 9 participa en el desbloqueo de la apoptosis inducido en el cáncer de colon ( *Xu y cols.*, 2013).

El tratamiento de cetuximab a las dosis X/2 (1,25mg/ratón) podría interferir con factores implicados en el aumento de la expresión de proteínas que intervienen en la proliferación celular, adhesión y crecimiento, inflamación y apoptosis asociados al cáncer colorrectal.

Otro aspecto a destacar, observando la tabla 4.13 correspondiente al test de potencia estadística, es la tendencia observada en los tratamientos con hialuronidas y el cetuximab a la dosis X/2. Esta tendencia está relacionada con VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor A), gen que codifica a una proteína que interviene en la angiogénesis y en la apoptosis y que es un mitógeno glicosilado que actúa específicamente en las células con varios efectos, como el aumento de la permeabilidad vascular, la inducción de la angiogénesis, la vasculogénesis y crecimiento celular endotelial, la promoción de la migración celular y la inhibición de la apoptosis.

Cabe destacar los niveles alcanzados de expresión génica de PTGS2 (Figura 4.38) por el grupo tratado con cetuximab a la dosis superior (X).

PTGS2 codifica una ciclooxigenasa clave en la biosíntesis de prostanoídes implicados en respuesta inflamatoria y en mitosis. Se ha observado que la expresión del gen PTGS2 queda desregulada en ciertos tumores epiteliales, y de forma análoga es lo que puede estar ocurriendo en nuestros animales. Ciertos autores (*Lewitowich y cols., 2014*) señalan el papel relevante del uso como biomarcador implicado en la quimioprevención del COX2.

**4.4.2. Sangre (test ELISA).**

En la tabla siguiente se muestran los valores correspondientes al ELISA realizado, para la determinación de IL6 y TNF, en muestras de sangre de los distintos grupos experimentales.

Tratamiento	IL6		TNF	
	Media	Desv. Est.	Media	Desv. Est.
CTRL	1,34	0,78	2,36	1,23
INDUC.	43,87	38,24	7,52	3,34
X	105,00	147,64	9,39	6,73
X+Y	24,83	23,20	6,90	3,40
X+Y/2	133,23	106,92	23,25	4,62
X/2	59,52	64,65	12,22	8,24
X/2+Y	18,07	15,79	7,03	5,84
X/2+Y/2	18,15	11,05	10,06	8,40

Tabla 4.15. Expresión de IL6 y TNF circulantes, en los distintos grupos de ratones (determinación por método ELISA).

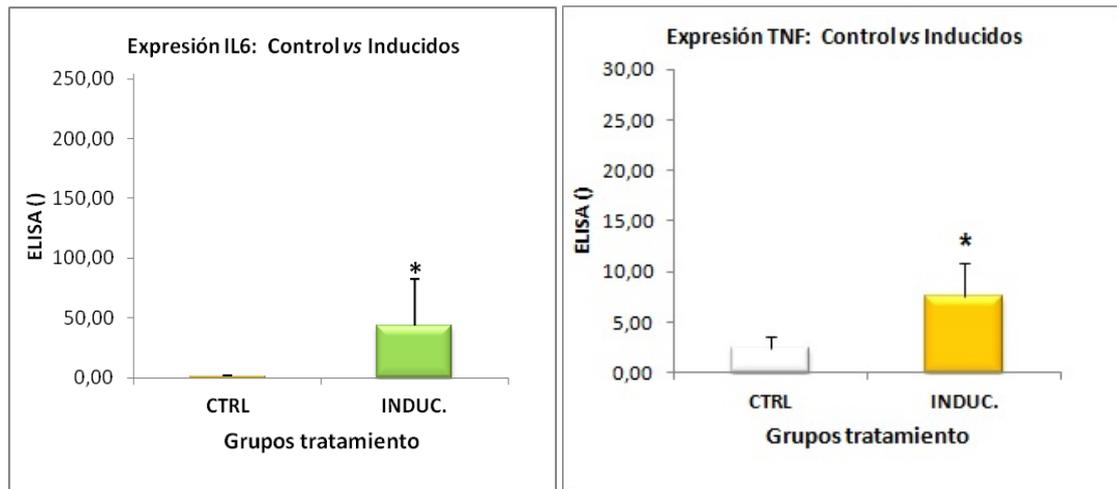


Figura 4.42. Gráficas comparativas de los niveles de expresión (valores medios  $\pm$  DS) de IL6 y TNF circulantes, en los ratones control frente a los inducidos (\*  $p < 0,05$ )

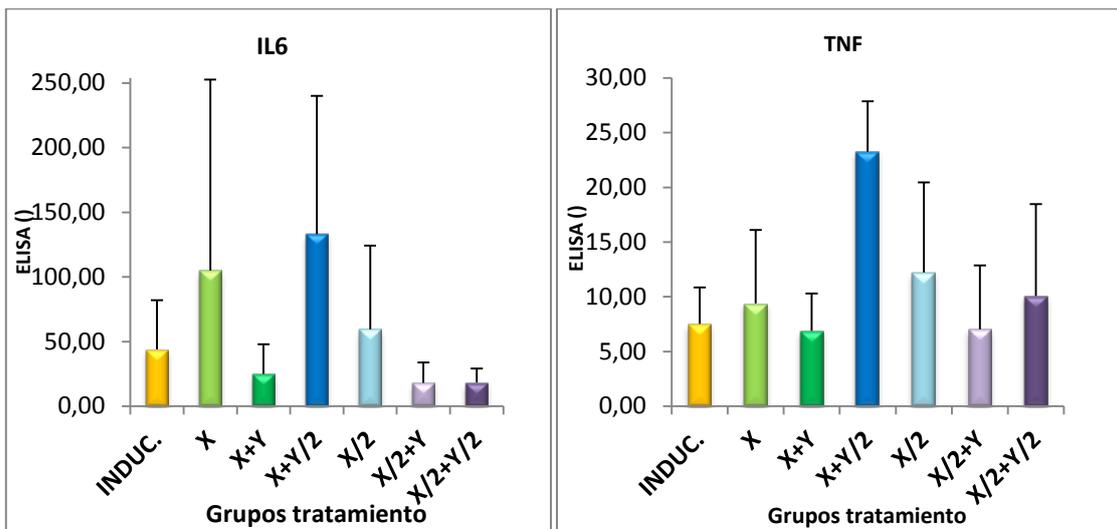


Figura 4.43 . Gráficas comparativas de los niveles de expresión (valores medios  $\pm$  DS) de IL6 y TNF circulantes, en los ratones pertenecientes a los distintos grupos experimentales en relación con los ratones inducidos.

En cuanto a los resultados del test ELISA relativos a los datos de la expresión génica en células sanguíneas de los marcadores IL6 y TNF, la existencia de diferencias entre los animales controles e inducidos respecto al gen de la IL6 ( Fig. 4.42), que está implicado en una amplia variedad de estados patológicos asociados a inflamación, actuando sobre los linfocitos-B,

linfocitos-T, hepatocitos, células progenitoras hematopoyéticas, confirma la existencia de un estado inflamatorio que parece disminuir en los animales tratados con el cetuximab a las dosis X/2 (Fig. 4.43) en presencia de hialuronidasas, aunque no se obtuvieron diferencias significativas. El valor de TNF (Tumor Necrosis Factor), que codifica una citokina pro-inflamatoria multifuncional, implicada en multitud de procesos biológicos que incluyen la proliferación celular, diferenciación, apoptosis, metabolismo lipídico y coagulación, estando relacionada con una variedad de enfermedades, incluyendo el cáncer, también se mostró significativamente elevado en los animales inducidos frente a los controles (Fig. 4.42), observándose la misma tendencia que en la IL6, en cuanto al efecto de los tratamientos (Fig. 4.43).

## **5. CONCLUSIONES**



- 1- Los modelos elegidos para la inducción de CCR en rata y ratón mediante agentes carcinogénicos químicos: dimetilhidrazina y azoximetano respectivamente, mostraron resultados positivos, como fué observado mediante colonoscopia y análisis histológicos que fueron realizados previamente al tratamiento con el antitumoral cetuximab. Los análisis detectaron la presencia de un adenocarcinoma intestinal tubulopapilar. La realización de las colonoscopias es una metodología que ha permitido controlar el desarrollo del CCR sin necesidad de sacrificar animales; es una técnica pionera en este contexto y poco reseñada en la bibliografía.
  
- 2- Los estudios inmunohistoquímicos del índice de proliferación celular, Ki67, en rata indicaron que cetuximab, a las dosis estudiadas, actúa inhibiendo, en parte, esta proliferación respecto al grupo no tratado, observándose que la dosis de cetuximab de 2,5 mg (X/2) muestra una disminución más acusada del índice Ki67, que la dosis de 5 mg (X). En el caso de la adición de las dosis de hialuronidasa al cetuximab, no se ha detectado ningún efecto. En ratón la gran variabilidad en la expresión de Ki67 en los distintos grupos de animales tratados, frente a los inducidos, no permitió observar ninguna diferencia en la expresión del marcador.
  
- 3- En el CCR el ácido hialurónico, se encuentra formando parte de una capa pericelular alrededor de las células de la masa tumoral. Analizada su expresión por técnicas inmunohistoquímicas se ha podido observar una disminución de dicha expresión cuando se compara el grupo de animales inducidos, con el grupo de animales tratados, en los distintos grupos de tratamiento, tanto en células epiteliales como en el estroma extracelular.
  
- 4- El ensayo ELISA es el mejor método para determinar el ácido hialurónico debido a su sensibilidad y especificidad, en comparación con el método colorimétrico del carbazol, aunque el protocolo desarrollado para el método anterior ha servido para la preparación de las muestras en las determinaciones por ELISA.

- 5- Las muestras procedentes de carcinoma de colon de rata, analizadas en este estudio, presentan una mayor concentración de glicosaminoglicanos tras su determinación por el método de carbazol y del ELISA, confirmándose que el GAG mayoritario es el ácido hialurónico.
- 6- La elevada variabilidad inter-individual de los niveles de ácido hialurónico, obtenidos por el ELISA en las muestras tumorales de rata tras el tratamiento con las dosis utilizadas de cetuximab (5mg y 2,5mg), no permiten obtener diferencias significativas entre ellos, aunque si lo hacen frente a las muestras control. Los resultados obtenidos con el tratamiento conjunto de cetuximab y la enzima hialuronidasa no muestran un aumento significativo de la eficacia del antitumoral.
- 7- El tratamiento de cetuximab a la dosis 1,25mg en ratón (X/2) podría interferir con factores implicados en el aumento de la expresión de proteínas que intervienen en proliferación celular, adhesión y crecimiento, inflamación y apoptosis asociados al cáncer colorrectal tales como CASP8, CASP9, CTNNB1, KRAS, NFKB1 y TRP53.
- 8- Los resultados del test ELISA para IL6 y TNF relativos a la expresión génica en células sanguíneas, muestran diferencias significativas entre los animales controles e inducidos para ambos marcadores. Dichos resultados confirman la existencia de un estado inflamatorio, en los animales inducidos, que parece disminuir en los animales tratados con el cetuximab, sobre todo a las dosis X/2. Nuestros resultados muestran un papel relevante de la hialuronidasa a la dosis "Y" (50 U), tanto con concentraciones X como X/2 de cetuximab, si bien no se ha llegado a una significación estadística.

## **6. BIBLIOGRAFÍA**



- Adamia, S., Maxwell, C.A. & Pilarski, L.M. 2005, "Hyaluronan and hyaluronan synthases: potential therapeutic targets in cancer", *Current drug targets. Cardiovascular & haematological disorders*, vol. 5, no. 1, pp. 3-14.
- Aizu, W., Guda, K., Nambiar, P., Xin, T., Thibodeau, M., Rosenberg, D.W. & Giardina, C. 2003, "P53 and its Co-Activator P300 are Inversely Regulated in the Mouse Colon in Response to Carcinogen", *Toxicology letters*, vol. 144, no. 2, pp. 213-224.
- Alfaro M. Efecto de los probióticos *Bifidobacterium bidifum* y *Lactobacillus gasseri* sobre las acciones de la quercetina en cultivos celulares de cáncer de colon [tesis doctoral]. Pamplona: Universidad Pública de Navarra, Departamento de Ciencias del Medio Natural; 2013.
- Alizadeh, A.M., Khaniky, M., Azizian, S., Mohaghheghi, M.A., Sadeghizadeh, M. & Najafi, F. 2012, "Chemoprevention of azoxymethane-initiated colon cancer in rat by using a novel polymeric nanocarrier-curcumin.", *European J Pharmacol*, vol. 689, pp. 226-232.
- Amado, N.G., Predes, D., Fonseca, B.F., Cerqueira, D.M., Reis, A.H., Dudenhoeffer, A.C., Borges, H.L., Mendes, F.A. & Abreu, J.G. 2014, "Isoquercitrin suppresses colon cancer cell growth in vitro by targeting the Wnt/beta-catenin signaling pathway", *The Journal of biological chemistry*, vol. 289, no. 51, pp. 35456-35467.
- Amado, R.G., Wolf, M., Peeters, M., Van Cutsem, E., Siena, S., Freeman, D.J., Juan, T., Sikorski, R., Suggs, S., Radinsky, R., Patterson, S.D. & Chang, D.D. 2008, "Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer", *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, vol. 26, no. 10, pp. 1626-1634.
- Anderson, J.C., Swede, H., Rustagi, T., Protiva, P., Pleau, D., Brenner, B.M., Rajan, T.V., Heinen, C.D., Levine, J.B. & Rosenberg, D.W. 2012, "Aberrant crypt foci as predictors of colorectal neoplasia on repeat colonoscopy", *Cancer causes & control : CCC*, vol. 23, no. 2, pp. 355-361.

- Arias JL, Cerpa C, Pérez L, Muñoz L, Pozo V, González E. Composición relativa de glicosaminoglicanos en algunas neoplasias del canino. *Avances en ciencias veterinarias* 1989; 4(1):49-56.
- Artman, L., Dormoy-Raclet, V., von Roretz, C. & Gallouzi, I.E. 2014, "Planning your every move: the role of beta-actin and its post-transcriptional regulation in cell motility", *Seminars in cell & developmental biology*, vol. 34, pp. 33-43.
- Aviello, G., Romano, B., Borrelli, F., Capasso, R., Gallo, L., Piscitelli, F., Di Marzo, V. & Izzo, A.A. 2012, "Chemopreventive effect of the non-psychoactive phytocannabinoid cannabidiol on experimental colon cancer", *J Mol Med (Berl)*, vol. 90, no. 8, pp. 925-934.
- Ayuso Colella, J.R., Pages Llinas, M. & Ayuso Colella, C. 2010, "Staging rectal cancer", *Radiologia*, vol. 52, no. 1, pp. 18-29.
- Barbacid, M., Ortega, S., Sotillo, R., Odajima, J., Martin, A., Santamaria, D., Dubus, P. & Malumbres, M. 2005, "Cell cycle and cancer: genetic analysis of the role of cyclin-dependent kinases", *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, vol. 70, pp. 233-240.
- Bartold PM, Page RC. A microdetermination method for assaying glycosaminoglycans and proteoglycans. *Anal. Biochem* 1985; 150: 320-324.
- Baynes, R.D. & Gansert, J. 2009, "KRAS mutational status as a predictor of epidermal growth factor receptor inhibitor efficacy in colorectal cancer", *American Journal of Therapeutics*, vol. 16, no. 6, pp. 554-561.
- Belting, M. 2014, "Glycosaminoglycans in cancer treatment", *Thromb Res*, vol. 133 Suppl 2, pp. S95-101.
- Berns, A. & Barbacid, M. 2013, "Mouse models of cancer", *Molecular oncology*, vol. 7, no. 2, pp. 143-145.
- Bertotti, A. & Sassi, F. 2015, "Molecular Pathways: Sensitivity and Resistance to Anti-EGFR Antibodies", *Clin Cancer Res*, .

- Bissahoyo, A., Scott Pearsall, R., Hanlon, K., Amann, V., Hicks, D., Godfrey, V.L. & Threadgill, D.W. 2005, "Azoxymethane is a genetic background-dependent colorectal tumor initiator and promoter in mice: effects of dose, route and diet.", *Toxicol Sci*, vol. 88, no. 2, pp. 340-345.
- Bitter T, Muir HM. A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal. Biochem.* 1962; 4:330-334.
- Blanco-Calvo, M., Concha, A., Figueroa, A., Garrido, F. & Valladares-Ayerbes, M. 2015, "Colorectal Cancer Classification and Cell Heterogeneity: A Systems Oncology Approach", *International journal of molecular sciences*, vol. 16, no. 6, pp. 13610-13632.
- Boregowda, R.K., Appaiah, H.N., Siddaiah, M., Kumarswamy, S.B., Sunila, S., Thimmaiah, K.N., Mortha, K., Toole, B. & Banerjee, S. 2006, "Expression of hyaluronan in human tumor progression", *J Carcinog*, vol. 5, pp. 2.
- Bosman, F.T. 2009, "Predictive biomarkers in colorectal cancer", *Revue medicale suisse*, vol. 5, no. 211, pp. 1513-1518.
- Bouga, H., Tsouros, I., Bounias, D., Kyriakopoulou, D., Stavropoulos, M.S., Papageorgakopoulou, N., Theocharis, D.A. & Vynios, D.H. 2010, "Involvement of hyaluronidases in colorectal cancer", *BMC cancer*, vol. 10, pp. 499-506.
- Bouziges F, Simon-Assmann P, Simo P, Kedinger M. Changes in glycosaminoglycan expression in the rat developing intestine. *Cell Biol. Int. Rep.* 1991; 15(2):97-106.
- Brenner, H., Stock, C. & Hoffmeister, M. 2015, "Colorectal cancer screening: the time to act is now", *BMC medicine*, vol. 13, no. 1, pp. 262-315.
- Buchner, F.L., Bueno-de-Mesquita, H.B., Ros, M.M., Kampman, E. *et al.* 2011, "Variety in vegetable and fruit consumption and risk of bladder cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition", *International journal of cancer. Journal international du cancer*, vol. 128, no. 12, pp. 2971-2979.

- Burn, J., Mathers, J. & Bishop, D.T. 2013, "Genetics, inheritance and strategies for prevention in populations at high risk of colorectal cancer (CRC)", *Recent Results Cancer Res*, vol. 191, pp. 157-183.
- Caderni, G., Femia, A.P., Giannini, A., Favuzza, A., Luceri, C., Salvadori, M. & Dolara, P. 2003, "Identification of mucin-depleted foci in the unsectioned colon of azoxymethane-treated rats: correlation with carcinogenesis", *Cancer Res*, vol. 63, no. 10, pp. 2388-2392.
- Campion, J., Milagro, F.I., Goyenechea, E. & Martinez, J.A. 2009, "TNF-alpha promoter methylation as a predictive biomarker for weight-loss response", *Obesity (Silver Spring, Md.)*, vol. 17, no. 6, pp. 1293-1297.
- Carraro, J.C., Hermsdorff, H.H., Puchau, B., Zulet, M.A., Milagro, F.I., Bressan, J. & Martinez, J.A. 2015, "Interleukin-6 is a better metabolic biomarker than interleukin-18 in young healthy adults", *Journal of physiology and biochemistry*, vol. 71, no. 3, pp. 527-535.
- Chang, D.Z., Kumar, V., Ma, Y., Li, K. & Kopetz, S. 2009, "Individualized therapies in colorectal cancer: KRAS as a marker for response to EGFR-targeted therapy", *Journal of hematology & oncology*, vol. 2, pp. 18-8722-2-18.
- Chen, J. & Huang, X.F. 2009, "The signal pathways in azoxymethane-induced colon cancer and preventive implications", *Cancer Biol Ther*, vol. 8, no. 14, pp. 1313-1317.
- Chihara, T., Shimpo, K., Kaneko, T., Beppu, H., Mizutani, K., Higashiguchi, T. & Sonoda, S. 2010, "Inhibition of 1, 2-dimethylhydrazine-induced mucin-depleted foci and O(6)-methylguanine DNA adducts in the rat colorectum by boiled garlic powder", *Asian Pac J Cancer Prev*, vol. 11, no. 5, pp. 1301-1304.
- Colomer MC. Cetuximab. Inhibidor del crecimiento del cáncer colorrectal. *Offarm* 2005; 24(6):126-130.
- Cooper, K., Squires, H., Carroll, C., Papaioannou, D., Booth, A., Logan, R.F., Maguire, C., Hind, D. & Tappenden, P. 2010, "Chemoprevention of

- colorectal cancer: systematic review and economic evaluation", *Health technology assessment (Winchester, England)*, vol. 14, no. 32, pp. 1-206.
- Corpet, D.E. & Pierre, F. 2005, "How good are rodent models of carcinogenesis in predicting efficacy in humans? A systematic review and meta-analysis of colon chemoprevention in rats, mice and men", *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, vol. 41, no. 13, pp. 1911-1922.
- Crujeiras, A.B., Parra, D., Milagro, F.I., Goyenechea, E., Larrarte, E., Margareto, J. & Martinez, J.A. 2008, "Differential expression of oxidative stress and inflammation related genes in peripheral blood mononuclear cells in response to a low-calorie diet: a nutrigenomics study", *Omics : a journal of integrative biology*, vol. 12, no. 4, pp. 251-261.
- Cunningham, D., Atkin, W., Lenz, H.J., Lynch, H.T., Minsky, B., Nordlinger, B. & Starling, N. 2010, "Colorectal cancer", *Lancet (London, England)*, vol. 375, no. 9719, pp. 1030-1047.
- Cunningham, R.E. 2010, "Deparaffinization and processing of pathologic material", *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, vol. 588, pp. 345-349.
- Cutsem EV, Köhne C-H, Hitre E, Zaluski J, Chien C-RC, Makhson A, *et al.* Cetuximab and Chemotherapy as Initial Treatment for Metastatic Colorectal Cancer. *N Engl J Med* 2009; 360:1408-17.
- Dicker KT, Gurski LA, Pradhan-Bhatt S, Witt RL, Farach-Carson MC, Jia X. Hyaluronan: A simple polysaccharide with diverse biological functions. *Acta Biomater.* 2014; 10:1558-1570.
- Douillard, J.Y., Siena, S., Cassidy, J., Tabernero, J. *et al.* 2010, "Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study", *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, vol. 28, no. 31, pp. 4697-4705.

- Drosten, M., Dhawahir, A., Sum, E.Y., Urosevic, J., Lechuga, C.G., Esteban, L.M., Castellano, E., Guerra, C., Santos, E. & Barbacid, M. 2010, "Genetic analysis of Ras signalling pathways in cell proliferation, migration and survival", *The EMBO journal*, vol. 29, no. 6, pp. 1091-1104.
- Drosten, M., Sum, E.Y., Lechuga, C.G., Simon-Carrasco, L., Jacob, H.K., Garcia-Medina, R., Huang, S., Beijersbergen, R.L., Bernards, R. & Barbacid, M. 2014, "Loss of p53 induces cell proliferation via Ras-independent activation of the Raf/Mek/Erk signaling pathway", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 111, no. 42, pp. 15155-15160.
- Echelon Biosciences Incorporated (EBI) [Homepage on the Internet]. Salt Lake City: Echelon Biosciences Inc; c2015 [actualizado enero 2015; <http://echelon-inc.com/index.php?module=Products&func=detail&id=230> citado 20 junio 2015]. [2 pantallas].
- Elez, E., Kocakova, I., Hohler, T., Martens, U.M. *et al.* 2015, "Abituzumab combined with cetuximab plus irinotecan versus cetuximab plus irinotecan alone for patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: the randomised phase I/II POSEIDON trial", *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, vol. 26, no. 1, pp. 132-140.
- Etxeberria, U., Fernandez-Quintela, A., Milagro, F.I., Aguirre, L., Martinez, J.A. & Portillo, M.P. 2013, "Impact of polyphenols and polyphenol-rich dietary sources on gut microbiota composition", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 61, no. 40, pp. 9517-9533.
- Farr, C., Menzel, J., Seeberger, J. & Schweigle, B. 1997, "Clinical pharmacology and possible applications of hyaluronidase with reference to Hylase "Dessau"", *Wiener medizinische Wochenschrift (1946)*, vol. 147, no. 15, pp. 347-355.
- Femia, A.P. & Caderni, G. 2008, "Rodent models of colon carcinogenesis for the study of chemopreventive activity of natural products", *Planta Med*, vol. 74, no. 13, pp. 1602-1607.

- Femia, A.P., Bendinelli, B., Giannini, A., Salvadori, M., Pinzani, P., Dolara, P. & Caderni, G. 2005, "Mucin-depleted foci have beta-catenin gene mutations, altered expression of its protein, and are dose- and time-dependent in the colon of 1,2-dimethylhydrazine-treated rats", *Int J Cancer*, vol. 116, no. 1, pp. 9-15.
- Femia, A.P., Caderni, G., Vignali, F., Salvadori, M., Giannini, A., Biggeri, A., Gee, J., Przybylska, K., Cheynier, V. & Dolara, P. 2005, "Effect of polyphenolic extracts from red wine and 4-OH-coumaric acid on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in rats", *Eur J Nutr*, vol. 44, no. 2, pp. 79-84.
- Femia, A.P., Dolara, P., Salvadori, M. & Caderni, G. 2013, "Expression of LGR-5, MSI-1 and DCAMKL-1, putative stem cell markers, in the early phases of 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis: correlation with nuclear beta-catenin", *BMC Cancer*, vol. 13, pp. 48.
- Femia, A.P., Luceri, C., Bianchini, F., Salvadori, M., Salvianti, F., Pinzani, P., Dolara, P., Calorini, L. & Caderni, G. 2012, "Marie Menard apples with high polyphenol content and a low-fat diet reduce 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in rats: effects on inflammation and apoptosis", *Mol Nutr Food Res*, vol. 56, no. 8, pp. 1353-1357.
- Femia, A.P., Luceri, C., Soares, P.V., Lodovici, M. & Caderni, G. 2015, "Multiple mucin depleted foci, high proliferation and low apoptotic response in the onset of colon carcinogenesis of the PIRC rat, mutated in *Apc*", *Int J Cancer*, vol. 136, no. 6, pp. E488-95.
- Femia, A.P., Luceri, C., Toti, S., Giannini, A., Dolara, P. & Caderni, G. 2010, "Gene expression profile and genomic alterations in colonic tumours induced by 1,2-dimethylhydrazine (DMH) in rats", *BMC Cancer*, vol. 10, pp. 194.
- Femia, A.P., Tarquini, E., Salvadori, M., Ferri, S., Giannini, A., Dolara, P. & Caderni, G. 2008, "K-ras mutations and mucin profile in preneoplastic lesions and colon tumors induced in rats by 1,2-dimethylhydrazine", *Int J Cancer*, vol. 122, no. 1, pp. 117-123.

- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D. & Bray, F. 2015, "Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012", *International journal of cancer. Journal internationale du cancer*, vol. 136, no. 5, pp. E359-86.
- Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J.W.W., Comber, H., Forman, D. & Bray, F. 2013, "Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012", *European journal of cancer*, vol. 49, no. 6, pp. 1374-1403.
- Frazier SB, Roodhouse KA, Hourcade DE, Zhang L. The quantification of glycosaminoglycans: a comparison of HPLC, carbazole and alcian blue methods. *Open Glycosci* 2008; 1:31-39.
- Fukushima, T. & Takenoshita, S. 2001, "Colorectal carcinogenesis", *Fukushima journal of medical science*, vol. 47, no. 1, pp. 1-11.
- Gaffney, J., Matou-Nasri, S., Grau-Olivares, M. & Slevin, M. 2010, "Therapeutic applications of hyaluronan", *Mol Biosyst*, vol. 6, no. 3, pp. 437-443.
- Ganesh, S., Gonzalez-Edick, M., Gibbons, D., Van Roey, M. & Jooss, K. 2008, "Intratatumoral coadministration of hyaluronidase enzyme and oncolytic adenoviruses enhances virus potency in metastatic tumor models", *Clin Cancer Res*, vol. 14, no. 12, pp. 3933-3941.
- Girish, K.S. & Kemparaju, K. 2007, "The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview", *Life Sciences*, vol. 80, no. 21, pp. 1921-1943.
- Girish, K.S., Kemparaju, K., Nagaraju, S. & Vishwanath, B.S. 2009, "Hyaluronidase inhibitors: a biological and therapeutic perspective", *Current medicinal chemistry*, vol. 16, no. 18, pp. 2261-2288.
- Grady, W.M. & Pritchard, C.C. 2014, "Molecular alterations and biomarkers in colorectal cancer", *Toxicologic pathology*, vol. 42, no. 1, pp. 124-139.

- Graham, J.S. & Cassidy, J. 2012, "Adjuvant therapy in colon cancer", *Expert review of anticancer therapy*, vol. 12, no. 1, pp. 99-109.
- Gryfe, R., Swallow, C., Bapat, B., Redston, M., Gallinger, S. & Couture, J. 1997, "Molecular biology of colorectal cancer", *Curr Probl Cancer*, vol. 21, no. 5, pp. 233-300.
- Guda, K., Upender, M.B., Belinsky, G., Flynn, C., Nakanishi, M., Marino, J.N., Ried, T. & Rosenberg, D.W. 2004, "Carcinogen-induced colon tumors in mice are chromosomally stable and are characterized by low-level microsatellite instability", *Oncogene*, vol. 23, no. 21, pp. 3813-3821.
- Guedan, S., Rojas, J.J., Gros, A., Mercade, E., Cascallo, M. & Alemany, R. 2010, "Hyaluronidase expression by an oncolytic adenovirus enhances its intratumoral spread and suppresses tumor growth", *Mol Ther*, vol. 18, no. 7, pp. 1275-1283.
- Haserodt S, Aytekin M, Dweik RA. A comparison of the sensitivity, specificity, and molecular weight accuracy of three different commercially available Hyaluronan ELISA-like assays. *Glycobiology* 2011; 21(2):175-183.
- Heijstek, M.W., Kranenburg, O. & Borel Rinkes, I.H. 2005, "Mouse models of colorectal cancer and liver metastases", *Digestive surgery*, vol. 22, no. 1-2, pp. 16-25.
- Heinemann, V. & Stintzing, S. 2014, "FOLFIRI with cetuximab or bevacizumab: FIRE-3–Authors' reply", *The Lancet Oncology*, vol. 15, no. 13, pp. e583-e584.
- Hua, T., Qinsheng, W., Xuxia, W., Shuguang, Z., Ming, Q., Zhenxiong, L. & Jingjie, W. 2014, "Nuclear factor-kappa B1 is associated with gastric cancer in a Chinese population", *Medicine*, vol. 93, no. 28, pp. e279.
- Itano, N., Sawai, T., Atsumi, F., Miyaishi, O., Taniguchi, S., Kannagi, R., Hamaguchi, M. & Kimata, K. 2004, "Selective expression and functional characteristics of three mammalian hyaluronan synthases in oncogenic malignant transformation", *The Journal of biological chemistry*, vol. 279, no. 18, pp. 18679-18687.

- Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E. & Forman, D. 2011, "Global cancer statistics", *CA: a cancer journal for clinicians*, vol. 61, no. 2, pp. 69-90.
- Jiang, D., Liang, J. & Noble, P.W. 2011, "Hyaluronan as an immune regulator in human diseases", *Physiological Reviews*, vol. 91, no. 1, pp. 221-264.
- Jiang, Y., Mackley, H., Cheng, H. & Ajani, J.A. 2010, "Use of K-Ras as a predictive biomarker for selecting anti-EGF receptor/pathway treatment", *Biomarkers in medicine*, vol. 4, no. 4, pp. 535-541.
- Jiang, Z., Li, C., Li, F. & Wang, X. 2013, "EGFR gene copy number as a prognostic marker in colorectal cancer patients treated with cetuximab or panitumumab: a systematic review and meta analysis", *PloS one*, vol. 8, no. 2, pp. e56205.
- Jung, A. 2015, "Extended KRAS and NRAS Mutation Profiling by Pyrosequencing((R))", *Methods Mol Biol*, vol. 1315, pp. 49-61.
- Kanagalingam, K. & Balis, M.E. 1975, "In vivo repair of rat intestinal DNA damage by alkylating agents", *Cancer*, vol. 36, no. 6 Suppl, pp. 2364-2372.
- Karbownik MS, Nowak JZ. Hyaluronan: Towards novel anti-cancer therapeutics. *Pharmacol. Rep.* 2013; 65:1056-1074.
- Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. 1996, "Lessons from hereditary colorectal cancer", *Cell*, vol. 87, no. 2, pp. 159-170.
- Knelson EH, Nee JC, Blobe GC. Heparan sulfate signaling in cancer. *Trends Biochem. Sci.* 2014; 39(6):277-288.
- Kobaek-Larsen, M., Fenger, C. & Ritskes-Hoitinga, J. 2004, "Secondary effects induced by the colon carcinogen azoxymethane in BDIX rats", *APMIS : Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, vol. 112, no. 6, pp. 319-329.
- Kobaek-Larsen, M., Thorup, I., Diederichsen, A., Fenger, C. & Hoitinga, M.R. 2000, "Review of colorectal cancer and its metastases in rodent models:

- comparative aspects with those in humans", *Comparative medicine*, vol. 50, no. 1, pp. 16-26.
- Koksal, U.I., Pilanci, K.N., Ordu, C., Okutur, K., Saglam, S. & Demir, G. 2015, "Trichomegaly Induced by Cetuximab: Case Series and Review the Literature", *Am J Ther*, .
- Kolliopoulos, C., Bounias, D., Bouga, H., Kyriakopoulou, D., Stavropoulos, M. & Vynios, D.H. 2013, "Hyaluronidases and their inhibitors in the serum of colorectal carcinoma patients", *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, vol. 83, pp. 299-304.
- Kumar, M., Nagpal, R., Hemalatha, R., Verma, V., Kumar, A., Singh, S., Marotta, F., Jain, S. & Yadav, H. 2012, "Targeted cancer therapies: the future of cancer treatment", *Acta bio-medica : Atenei Parmensis*, vol. 83, no. 3, pp. 220-233.
- Laurent-Puig, P., Blons, H. & Cugnenc, P.H. 1999, "Sequence of molecular genetic events in colorectal tumorigenesis", *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, vol. 8 Suppl 1, pp. S39-47.
- Laurent-Puig, P., Cayre, A., Manceau, G., Buc, E. *et al.* 2009, "Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wild-type KRAS metastatic colon cancer", *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, vol. 27, no. 35, pp. 5924-5930.
- Lepperdinger, G., Mullegger, J. & Kreil, G. 2001, "Hyal2--less active, but more versatile?", *Matrix Biol*, vol. 20, no. 8, pp. 509-514.
- Lewitowicz, P., Koziel, D., Gluszek, S., Matykiewicz, J., Wincewicz, A., Horecka-Lewitowicz, A. & Nasierowska-Guttmejer, A. 2014, "Is there a place for practical chemoprevention of colorectal cancer in light of COX-2 heterogeneity?", *Polish Journal of Pathology : official journal of the Polish Society of Pathologists*, vol. 65, no. 4, pp. 276-282.

- Li, X.X., Liang, L., Huang, L.Y. & Cai, S.J. 2015, "Standard chemotherapy with cetuximab for treatment of colorectal cancer", *World J Gastroenterol*, vol. 21, no. 22, pp. 7022-7035.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. 2001, "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method", *Methods (San Diego, Calif.)*, vol. 25, no. 4, pp. 402-408.
- Lopez-Chavez, A., Carter, C.A. & Giaccone, G. 2009, "The role of KRAS mutations in resistance to EGFR inhibition in the treatment of cancer", *Current opinion in investigational drugs (London, England : 2000)*, vol. 10, no. 12, pp. 1305-1314.
- Lun S, Irvine SM, Johnson KD, Fisher NJ, Floden EW, Negron L, *et al.* *Biomaterials* 2010; 31: 4517-4529.
- Maltzman, T., Whittington, J., Driggers, L., Stephens, J. & Ahnen, D. 1997, "AOM-induced mouse colon tumors do not express full-length APC protein", *Carcinogenesis*, vol. 18, no. 12, pp. 2435-2439.
- Malumbres, M. & Barbacid, M. 2005, "Mammalian cyclin-dependent kinases", *Trends in biochemical sciences*, vol. 30, no. 11, pp. 630-641.
- Malumbres, M. & Barbacid, M. 2007, "Cell cycle kinases in cancer", *Current opinion in genetics & development*, vol. 17, no. 1, pp. 60-65.
- Malumbres, M. & Barbacid, M. 2009, "Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm", *Nature reviews.Cancer*, vol. 9, no. 3, pp. 153-166.
- Marisa, L., de Reynies, A., Duval, A., Selves, J. *et al.* 2013, "Gene expression classification of colon cancer into molecular subtypes: characterization, validation, and prognostic value", *PLoS Med*, vol. 10, no. 5, pp. e1001453.
- Marques-Rocha, J.L., Milagro, F.I., Mansego, M.L., Zulet, M.A., Bressan, J. & Martinez, J.A. 2015, "Expression of inflammation-related miRNAs in white blood cells from subjects with metabolic syndrome after 8 wk of following a Mediterranean diet-based weight loss program", *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, .

- Marques-Rocha, J.L., Samblas, M., Milagro, F.I., Bressan, J., Martinez, J.A. & Marti, A. 2015, "Noncoding RNAs, cytokines, and inflammation-related diseases", *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 29, no. 9, pp. 3595-3611.
- Matallanas, D., Romano, D., Al-Mulla, F., O'Neill, E., Al-Ali, W., Crespo, P., Doyle, B., Nixon, C., Sansom, O., Drosten, M., Barbacid, M. & Kolch, W. 2011, "Mutant K-Ras activation of the proapoptotic MST2 pathway is antagonized by wild-type K-Ras", *Molecular cell*, vol. 44, no. 6, pp. 893-906.
- McAtee, C.O., Barycki, J.J. & Simpson, M.A. 2014, "Emerging roles for hyaluronidase in cancer metastasis and therapy", *Adv Cancer Res*, vol. 123, pp. 1-34.
- Mendoza, G., Prieto, J.G., Real, R., Perez, M., Merino, G. & Alvarez, A.I. 2009, "Antioxidant profile of hyaluronan: physico-chemical features and its role in pathologies", *Mini reviews in medicinal chemistry*, vol. 9, no. 13, pp. 1479-1488.
- Menzel, E.J. & Farr, C. 1998, "Hyaluronidase and its substrate hyaluronan: biochemistry, biological activities and therapeutic uses", *Cancer letters*, vol. 131, no. 1, pp. 3-11.
- Milagro, F.I. & Martinez, J.A. 2013, "Epigenetics of obesity and weight loss", *Endocrinología y nutrición : organo de la Sociedad Espanola de Endocrinología y Nutrición*, vol. 60 Suppl 1, pp. 12-14.
- Milagro, F.I., Miranda, J., Portillo, M.P., Fernandez-Quintela, A., Campion, J. & Martinez, J.A. 2013, "High-throughput sequencing of microRNAs in peripheral blood mononuclear cells: identification of potential weight loss biomarkers", *PloS one*, vol. 8, no. 1, pp. e54319.
- Misra, S., Hascall, V.C., Markwald, R.R. & Ghatak, S. 2015, "Interactions between Hyaluronan and Its Receptors (CD44, RHAMM) Regulate the Activities of Inflammation and Cancer", *Frontiers in immunology*, vol. 6, pp. 201.

- Modjtahedi, H. & Essapen, S. 2009, "Epidermal growth factor receptor inhibitors in cancer treatment: advances, challenges and opportunities", *Anti-Cancer Drugs*, vol. 20, no. 10, pp. 851-855.
- Mukaratirwa S, van Ederen AM, Gruys E, Nederbragt H. Versican and Hyaluronan Expression in Canine Colonic Adenomas and Carcinomas: Relation to Malignancy and Depth of Tumour Invasion. *J. Comp. Pathol.* 2004; 131:259-270.
- Mussnich, P., Rosa, R., Bianco, R., Fusco, A. & D'Angelo, D. 2015, "MiR-199a-5p and miR-375 affect colon cancer cell sensitivity to cetuximab by targeting PHLPP1", *Expert Opin Ther Targets*, , pp. 1-10.
- Nandan, M.O. & Yang, V.W. 2010, "Genetic and Chemical Models of Colorectal Cancer in Mice", *Current colorectal cancer reports*, vol. 6, no. 2, pp. 51-59.
- Nandan, M.O. & Yang, V.W. 2011, "An Update on the Biology of RAS/RAF Mutations in Colorectal Cancer", *Current colorectal cancer reports*, vol. 7, no. 2, pp. 113-120.
- Naor, D., Sionov, R.V. & Ish-Shalom, D. 1997, "CD44: structure, function, and association with the malignant process", *Advances in Cancer Research*, vol. 71, pp. 241-319.
- Navas, C., Hernandez-Porrás, I., Schuhmacher, A.J., Sibilía, M., Guerra, C. & Barbacid, M. 2012, "EGF receptor signaling is essential for k-ras oncogene-driven pancreatic ductal adenocarcinoma", *Cancer cell*, vol. 22, no. 3, pp. 318-330.
- Noble, P.W. 2002, "Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair", *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, vol. 21, no. 1, pp. 25-29.
- Noble, P.W., Liang, J. & Jiang, D. 2011, "Hyaluronan as an Immune Regulator in Human Diseases", *Physiol Rev.*, vol. 91(1), pp. 221-264.

- Pandurangan, A.K. & Esa, N.M. 2013, "Dietary non-nutritive factors in targeting of regulatory molecules in colorectal cancer: an update", *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, vol. 14, no. 10, pp. 5543-5552.
- Pendyala, S., Neff, L.M., Suarez-Farinas, M. & Holt, P.R. 2011, "Diet-induced weight loss reduces colorectal inflammation: implications for colorectal carcinogenesis", *Am J Clin Nutr*, vol. 93, no. 2, pp. 234-242.
- Peñalver IB. Efecto de una dieta suplementada con microcápsulas de probióticos y quercetina en ratones APC<sup>Min/+</sup> [tesis doctoral]. Pamplona: Universidad Pública de Navarra, Departamento de Ciencias del Medio Natural; 2013.
- Perse, M. & Cerar, A. 2011, "Morphological and molecular alterations in 1,2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats", *J Biomed Biotechnol*, vol. 2011, pp. 473964.
- Piard, F., Martin, L., Chapusot, C., Ponnelle, T. & Faivre, J. 2002, "Genetic pathways in colorectal cancer: interest for the pathologist", *Annales de Pathologie*, vol. 22, no. 4, pp. 277-288.
- Pierre, F., Freeman, A., Tache, S., Van der Meer, R. & Corpet, D.E. 2004, "Beef meat and blood sausage promote the formation of azoxymethane-induced mucin-depleted foci and aberrant crypt foci in rat colons", *J Nutr*, vol. 134, no. 10, pp. 2711-2716.
- Pietrantonio, F., Cremolini, C., Petrelli, F., Di Bartolomeo, M. *et al.* 2015, "First-line anti-EGFR monoclonal antibodies in panRAS wild-type metastatic colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis", *Crit Rev Oncol Hematol*, .
- Pizzini, S., Bisognin, A., Mandruzzato, S., Biasiolo, M. *et al.* 2013, "Impact of microRNAs on regulatory networks and pathways in human colorectal carcinogenesis and development of metastasis", *BMC Genomics*, vol. 14, pp. 589.
- Plätzer M, Ozegowski JH, Neubert RHH. Quantification of hyaluronan in pharmaceutical formulations using high performance capillary

- electrophoresis and the modified uronic acid carbazole reaction. *J. Pharm. Biomed. Anal* 1999; 21:491-496.
- Plesec, T.P. & Hunt, J.L. 2009, "KRAS mutation testing in colorectal cancer", *Advances in Anatomic Pathology*, vol. 16, no. 4, pp. 196-203.
- Pulciani, S., Santos, E., Lauver, A.V., Long, L.K., Aaronson, S.A. & Barbacid, M. 1982, "Oncogenes in solid human tumours", *Nature*, vol. 300, no. 5892, pp. 539-542.
- Raponi, M., Winkler, H. & Dracopoli, N.C. 2008, "KRAS mutations predict response to EGFR inhibitors", *Current opinion in pharmacology*, vol. 8, no. 4, pp. 413-418.
- Rashid, A., Zahurak, M., Goodman, S.N. & Hamilton, S.R. 1999, "Genetic epidemiology of mutated K-ras proto-oncogene, altered suppressor genes, and microsatellite instability in colorectal adenomas", *Gut*, vol. 44, no. 6, pp. 826-833.
- Real Farmacopea Española en Internet [Página principal en Internet]. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios; c2009 [actualizado enerode2009;<https://extranet.boe.es/index.php?referer=/farmacopea/doc.php> citado 20 junio 2015].
- Ribic, C.M., Sargent, D.J., Moore, M.J., Thibodeau, S.N. *et al.* 2003, "Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer", *The New England journal of medicine*, vol. 349, no. 3, pp. 247-257.
- Rogers, K.J. & Pegg, A.E. 1977, "Formation of O6-methylguanine by alkylation of rat liver, colon, and kidney DNA following administration of 1,2-dimethylhydrazine", *Cancer research*, vol. 37, no. 11, pp. 4082-4087.
- Rosenberg, D.W., Giardina, C. & Tanaka, T. 2009, "Mouse models for the study of colon carcinogenesis", *Carcinogenesis*, vol. 30, no. 2, pp. 183-196.
- Ross, S.A. 2010, "Evidence for the relationship between diet and cancer", *Experimental oncology*, vol. 32, no. 3, pp. 137-142.

- Roussel, F., Laumonier, R. & Tayot, J. 1980, "1-2 Dimethylhydrazine induced colonic tumours in rats", *Biomedicine / [publiee pour l'A.A.I.C.I.G.]*, vol. 32, no. 1, pp. 41-45.
- Ruff, P., Ferry, D.R., Lakomy, R., Prausova, J. *et al.* 2015, "Time course of safety and efficacy of aflibercept in combination with FOLFIRI in patients with metastatic colorectal cancer who progressed on previous oxaliplatin-based therapy", *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, vol. 51, no. 1, pp. 18-26.
- Rügheimer L, Olerud J, Johnsson C, Takahashi T, Shimizu K, Hansell P. Hyaluronan synthases and hyaluronidases in the kidney during changes in hydration status. *Matrix Biol* 2009; 28: 390-395.
- Saif, M.W. & Chu, E. 2010, "Biology of colorectal cancer", *Cancer J*, vol. 16, no. 3, pp. 196-201.
- Sakai, E., Morioka, T., Yamada, E., Ohkubo, H. *et al.* 2012, "Identification of preneoplastic lesions as mucin-depleted foci in patients with sporadic colorectal cancer", *Cancer Sci*, vol. 103, no. 1, pp. 144-149.
- Salih, B.A., Guzin, Z. & Bayyurt, N. 2013, "A study on the effect of Helicobacter pylori infection on p53 expression in gastric cancer and gastritis tissues", *Journal of infection in developing countries*, vol. 7, no. 9, pp. 651-657.
- Schmaus, A., Bauer, J. & Sleeman, J.P. 2014, "Sugars in the microenvironment: the sticky problem of HA turnover in tumors", *Cancer Metastasis Rev*, vol. 33, pp. 1059-1079.
- Shaw, P.H. & Adams, R.A. 2011, "Where now for anti-EGF receptor therapies in colorectal cancer?", *Expert review of anticancer therapy*, vol. 11, no. 10, pp. 1543-1553.
- Shih, Y.H., Peng, C.L., Lee, S.Y., Chiang, P.F., Yao, C.J., Lin, W.J., Luo, T.Y. & Shieh, M.J. 2015, "111In-cetuximab as a diagnostic agent by accessible epidermal growth factor (EGF) receptor targeting in human metastatic colorectal carcinoma", *Oncotarget*, .

- Singh, J., Kulkarni, N., Kelloff, G. & Reddy, B.S. 1994, "Modulation of azoxymethane-induced mutational activation of ras protooncogenes by chemopreventive agents in colon carcinogenesis", *Carcinogenesis*, vol. 15, no. 7, pp. 1317-1323.
- Singh, S., Arcaroli, J., Chen, Y., Thompson, D.C., Messersmith, W., Jimeno, A. & Vasiliou, V. 2015, "ALDH1B1 Is Crucial for Colon Tumorigenesis by Modulating Wnt/beta-Catenin, Notch and PI3K/Akt Signaling Pathways", *PloS one*, vol. 10, no. 5, pp. e0121648.
- Singha NC, Nekoroski T, Zhao C, Symons R, Jianq P, Frost GI, et al. Tumor-associated hyaluronan limits efficacy of monoclonal antibody therapy. *Mol. Cancer Ther.* 2015; 14(2):523-32.
- Sinicrope, F.A. & Shi, Q. 2012, "Combining molecular markers with the TNM staging system to improve prognostication in stage II and III colon cancer: are we ready yet?", *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 104, no. 21, pp. 1616-1618.
- Sironen, R.K., Tammi, M., Tammi, R., Auvinen, P.K., Anttila, M. & Kosma, V.M. 2011, "Hyaluronan in human malignancies", *Exp Cell Res*, vol. 317, no. 4, pp. 383-391.
- Song, L., Li, Y., He, B. & Gong, Y. 2015, "Development of Small Molecules Targeting the Wnt Signaling Pathway in Cancer Stem Cells for the Treatment of Colorectal Cancer", *Clinical colorectal cancer*, vol. 14, no. 3, pp. 133-145.
- Steliarova-Foucher, E., O'Callaghan, M., Ferlay, J., Masuyer, E., Rosso, S., Forman, D., Bray, F. & Comber, H. 2015, "The European Cancer Observatory: A new data resource", *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, vol. 51, no. 9, pp. 1131-1143.
- Stern, R. 2005, "Hyaluronan metabolism: a major paradox in cancer biology", *Pathol Biol (Paris)*, vol. 53, no. 7, pp. 372-382.
- Stern, R. 2008, "Hyaluronidases in cancer biology", *Semin Cancer Biol*, vol. 18, no. 4, pp. 275-280.

Stern R, Asari AA, Sugahara KN. Hyaluronan fragments: an information-rich system. *Eur. J. Cell Biol* 2006; 85:699-715.

Stintzing, S. 2014, "Management of colorectal cancer", *F1000Prime Rep*, vol. 6, pp. 108.

Stintzing, S., Zhang, W., Heinemann, V., Neureiter, D. *et al.* 2015, "Polymorphisms in Genes Involved in EGFR Turnover Are Predictive for Cetuximab Efficacy in Colorectal Cancer", *Molecular cancer therapeutics*, vol. 14, no. 10, pp. 2374-2381.

Sugahara KN, Hirata T, Hayasaka H, Stern R, Murai T, Miyasaka M. Tumor cells enhance their own CD44 cleavage and motility by generating hyaluronan fragments. *J. Biol. Chem* 2006; 281:5861-5868.

Suzui, M., Okuno, M., Tanaka, T., Nakagama, H. & Moriwaki, H. 2002, "Enhanced colon carcinogenesis induced by azoxymethane in min mice occurs via a mechanism independent of beta-catenin mutation", *Cancer Lett*, vol. 183, no. 1, pp. 31-41.

Takami, K., Yana, I., Kurahashi, H. & Nishisho, I. 1995, "Multistep carcinogenesis in colorectal cancers", *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, vol. 26 Suppl 1, pp. 190-196.

Takayama, T., Ohi, M., Hayashi, T., Miyanishi, K. *et al.* 2001, "Analysis of K-ras, APC, and beta-catenin in aberrant crypt foci in sporadic adenoma, cancer, and familial adenomatous polyposis", *Gastroenterology*, vol. 121, no. 3, pp. 599-611.

Teraoka, N., Mutoh, M., Takasu, S., Ueno, T. *et al.*, 2011, "High susceptibility to azoxymethane-induced colorectal carcinogenesis in obese KK-Ay mice", *International journal of cancer. Journal international du cancer*, vol. 129, no. 3, pp. 528-535.

Thomsen, R., Solvsten, C.A., Linnet, T.E., Blechingberg, J. & Nielsen, A.L. 2010, "Analysis of qPCR data by converting exponentially related Ct values into linearly related X0 values", *Journal of bioinformatics and computational biology*, vol. 8, no. 5, pp. 885-900.

- Timar, J., Hegedus, B. & Raso, E. 2010, "KRAS mutation testing of colorectal cancer for anti-EGFR therapy: dogmas versus evidence", *Current cancer drug targets*, vol. 10, no. 8, pp. 813-823.
- Tomlinson, I., Ilyas, M., Johnson, V., Davies, A., Clark, G., Talbot, I. & Bodmer, W. 1998, "A comparison of the genetic pathways involved in the pathogenesis of three types of colorectal cancer", *The Journal of pathology*, vol. 184, no. 2, pp. 148-152.
- Tong, Y., Yang, W. & Koeffler, H.P. 2011, "Mouse models of colorectal cancer", *Chinese journal of cancer*, vol. 30, no. 7, pp. 450-462.
- Toole, B.P. 2009, "Hyaluronan-CD44 Interactions in Cancer: Paradoxes and Possibilities", *Clin Cancer Res*, vol. 15, no. 24, pp. 7462-7468.
- Umar, A. 2014, "Cancer immunoprevention: a new approach to intercept cancer early", *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)*, vol. 7, no. 11, pp. 1067-1071.
- Umar, A. & Srivastava, S. 2004, "The promise of biomarkers in colorectal cancer detection", *Disease markers*, vol. 20, no. 2, pp. 87-96.
- Umar, A., Boland, C.R., Terdiman, J.P., Syngal, S. *et al.* 2004, "Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability", *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 96, no. 4, pp. 261-268.
- Umar, A., Dunn, B.K. & Greenwald, P. 2012, "Future directions in cancer prevention", *Nature reviews.Cancer*, vol. 12, no. 12, pp. 835-848.
- Umar, A., Richmond, E. & Kramer, B.S. 2015, "Colorectal cancer prevention and fishful thinking", *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 107, no. 4, pp. 10.1093/jnci/djv052. Print 2015 Apr.
- Van Cutsem, E., Cervantes, A., Nordlinger, B., Arnold, D. & ESMO Guidelines Working Group 2014, "Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up", *Annals of*

*Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, vol. 25 Suppl 3, pp. iii1-9.

Van Cutsem, E., Oliveira, J. & ESMO Guidelines Working Group 2009, "Advanced colorectal cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up", *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, vol. 20 Suppl 4, pp. 61-63.

Vasen, H.F., van der Meulen-de Jong, A.E., de Vos Tot Nederveen Cappel, W.H., Oliveira, J. & ESMO Guidelines Working Group 2009, "Familial colorectal cancer risk: ESMO clinical recommendations", *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, vol. 20 Suppl 4, pp. 51-53.

Voet D, Voet JG. Azúcares y Polisacáridos. En: Voet D y Voet JG editores. Bioquímica. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana S.A.; 2006. p. 265-292.

Vogelstein, B., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Kern, S.E. *et al.*, 1988, "Genetic alterations during colorectal-tumor development", *The New England journal of medicine*, vol. 319, no. 9, pp. 525-532.

Wainberg, Z.A. & Drakaki, A. 2015, "The importance of optimal drug sequencing in metastatic colorectal cancer: biological rationales for the observed survival benefit conferred by first-line treatment with EGFR inhibitors", *Expert Opin Biol Ther*, , pp. 1-16.

Wang C, Tammi M, Guo H, Tammi R. Hyaluronan Distribution in the Normal Epithelium of Esophagus, Stomach, and Colon and Their Cancers. *Am. J. Pathol.* 1996; 148(6):1861-1869.

Wang, F., Cheng, J., Liu, D., Sun, H., Zhao, J., Wang, J., Chen, J., Su, Y. & Zou, Z. 2014, "P53-participated cellular and molecular responses to irradiation are cell differentiation-determined in murine intestinal epithelium", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 542, pp. 21-27.

- Wang, F., Grigorieva, E.V., Li, J., Senchenko, V.N. *et al.*, 2008, "HYAL1 and HYAL2 inhibit tumour growth in vivo but not in vitro", *PLoS One*, vol. 3, no. 8, pp. e3031.
- Ward, J.M., Yamamoto, R.S. & Brown, C.A. 1973, "Pathology of intestinal neoplasms and other lesions in rats exposed to azoxymethane", *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 51, no. 3, pp. 1029-1039.
- Ward, J.M., Yamamoto, R.S., Benjamin, T., Brown, C.A. & Weisburger, J.H. 1974, "Experimentally induced cancer of the colon in rats and mice", *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 164, no. 7, pp. 729-732.
- Wegrowski Y, Maquart FX. Chondroitin Sulfate Proteoglycans in Tumor Progression. *Adv Pharmacol* 2006; 53:297-321.
- Winder, T. & Lenz, H.J. 2010, "Vascular endothelial growth factor and epidermal growth factor signaling pathways as therapeutic targets for colorectal cancer", *Gastroenterology*, vol. 138, no. 6, pp. 2163-2176.
- Xu, D., Wang, C., Shen, X., Yu, Y., Rui, Y., Zhang, D. & Zhou, Z. 2013, "Apoptotic block in colon cancer cells may be rectified by lentivirus mediated overexpression of caspase-9", *Acta Gastro-Enterologica Belgica*, vol. 76, no. 4, pp. 372-380.
- Zhang, W., Zhang, H., Wang, N., Zhao, C. *et al.* 2013, "Modulation of beta-catenin signaling by the inhibitors of MAP kinase, tyrosine kinase, and PI3-kinase pathways", *International journal of medical sciences*, vol. 10, no. 13, pp. 1888-1898.
- Zoller, M. 2015, "CD44, Hyaluronan, the Hematopoietic Stem Cell, and Leukemia-Initiating Cells", *Frontiers in immunology*, vol. 6, pp. 235.