



Biomarcadores en cáncer colorrectal: metaloproteinasa 7 en pacientes intervenidos y mutaciones tras progresión a terapias anti-EGFR en enfermedad metastásica

Alejandro Martínez Fernández

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

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

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

**BIOMARCADORES EN CÁNCER COLORRECTAL:
METALOPROTEINASA 7 EN PACIENTES INTERVENIDOS Y
MUTACIONES TRAS PROGRESIÓN A TERAPIAS ANTI-EGFR EN
ENFERMEDAD METASTÁSICA.**

Tesis presentada por

Alejandro Martínez Fernández

para aspirar a la titulación de Doctor en Medicina

Directores de la tesis:

Dr. Joan Albanell Mestres

Dra. Clara Montagut Viladot

Tutora de Tesis

Dr. Pere Gascón Vilaplana

Programa de Oncología Molecular y Translacional

Facultat de Medicina

Universitat de Barcelona

Barcelona, 2014

A Ángel

al que esta tesis y las que se realicen en el futuro llegan
demasiado tarde

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis, Dr. Joan Albanell y Dra. Clara Montagut, por haber depositado en mí su confianza, sus conocimientos y su tiempo para que esta tesis fuera posible. A mi tutor, Prof. Pere Gascón, por haberme ayudado a desarrollarme como médico desde mi periodo de residencia.

Al Dr. Joan Maurel por compartir sus grandes conocimientos en cáncer colorrectal y ser el alma de los estudios realizados en metaloproteínasa 7. Mi agradecimiento por confiar en mí y darme la oportunidad y responsabilidad de llevar a término esta investigación. A la Dra. Begoña Mellado por introducirme como investigador en oncología molecular y contribuir a mi formación como médico oncólogo.

A mis mentores, en especial al Dr. Joaquim Bellmunt y al Dr. Ramesh Shivdasani, ambos actualmente en el Dana-Farber Cancer Institute, por haberme dado la oportunidad de colaborar con ellos y por haberme enseñado y orientado durante este tiempo.

A los colaboradores del Hospital del Mar de Barcelona, del IMIM y del Hospital Clínic por su inestimable ayuda y esfuerzo, con las que completar esta tesis de investigación ha sido una tarea más sencilla.

A mis actuales compañeros del Servicio de Oncología del Hospital del Mar y del Instituto Mar de Investigación Médica, por su apoyo y amistad en el día a día. A mis antiguos compañeros del Servicio de Oncología del Hospital Clínic, que me formaron como médico y como oncólogo.

A las Dras. Mar Iglesias y Beatriz Bellosillo, del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital del Mar por cederme las imágenes utilizadas en este proyecto de tesis doctoral y por su contagioso entusiasmo y generosidad.

A Ana Rovira por su revisión crítica de este documento, por sus sugerencias por hacerlo mejorar y por su ayuda y apoyo en la difícil travesía de investigar y realizar asistencia médica.

A Xabier García de Albéniz, por ser un buen amigo y compañero; y estimularme a mejorar gracias a su gran capacidad de trabajo y sus increíbles aptitudes.

A todos los pacientes que han aceptado colaborar desinteresadamente en este proyecto. A todos los que luchan por superar esta enfermedad y nos recuerdan que cada día debemos continuar trabajando para ser mejores médicos.

A mis padres, por su increíble esfuerzo en darme una educación y por su apoyo incondicional en todo lo que he hecho en la vida. A mi hermano por haber sido siempre el mejor ejemplo y mi modelo a seguir.

A Beatriz, por haber estado siempre a mi lado y acompañarme en todas las empresas que he realizado en los últimos años. Por su cariño y ayuda siempre que la he necesitado. Porque mi esfuerzo y logros siempre han sido en parte suyos.

Los proyectos presentados en esta tesis han sido financiados por:

- CIBEREHD, Centro de Investigación Biomédica en Red. Instituto de Salud Carlos III.
- RD12/0036/0051, Red temática de Investigación cooperativa en salud, ISCIII/FEDER
- RD09/0076/0036, Red temática de Investigación cooperativa en salud, ISCIII/FEDER
- PI12/00680, Instituto Carlos III, Fondo de Investigación Sanitaria, Ministerio de Sanidad
- PI12/00989, Instituto Carlos III, Fondo de Investigación Sanitaria, Ministerio de Sanidad
- 2009 SGR 321, Agència de Gestió Ajuts Universitaris de recerca, Generalitat de Catalunya
- AECC 11964 (C.M.), Asociación Española Contra el Cáncer.
- Xarxa de Bancs de tumors, Pla Director d'Oncologia de Catalunya (XBTC).

El doctorando ha obtenido además financiación para su formación investigadora durante el desarrollo de esta tesis mediante la Beca Post-Grado en el extranjero de la Fundación Caja Madrid (2010-2012) y mediante una generosa donación de la Fundación Cellex (Barcelona).

ÍNDICE

ÍNDICE

I. ANTECEDENTES

I.I INTESTINO GRUESO, ANATOMÍA, HISTOLOGÍA Y FISIOLOGÍA

I.I.I Generalidades	1
I.I.II Vía Wnt/ β -catenina	5
I.I.III Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico(EGFR)	8
I.I.IV Vía de RAS-MAPK	11
I.I.V Vía de PI3K/AKT/mTOR	14

I.II CÁNCER COLORRECTAL

I.II.I Definición y Biología Molecular	20
I.II.II Presentación clínica y tratamiento	25
I.II.III Anticuerpos contra EGFR	27

I.III BIOMARCADORES EN CÁNCER COLORRECTAL

I.III.I Matrilisina	32
I.III-II Biomarcadores del tratamiento con cetuximab	38

II.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II.I HIPÓTESIS	47
II.II OBJETIVOS	48

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.I MMP-7 COMO FACTOR PRONÓSTICO EN CÁNCER

COLORRECTAL RESECABLE

III.I.I Pacientes	53
III.I.II Obtención de muestras y determinación de MMP-7	55
III.I.III Métodos estadísticos	57

III.II DETERMINACIÓN DE EVENTOS GENÉTICOS EN PACIENTES

RESISTENTES A CETUXIMAB

III.II.I Pacientes	60
III.II.II Secuenciación genética	62
III.II.III Hibridación Fluorescente <i>in situ</i> (FISH)	65

IV. RESULTADOS

IV.I MMP-7 COMO FACTOR PRONÓSTICO EN CÁNCER

COLORRECTAL RESECABLE

IV.I.I Pacientes	71
IV.I.II Papel pronóstico de MMP-7	74
IV.I.III Recidiva tumoral y concentración de MMP-7	79

IV.II DETERMINACIÓN DE EVENTOS GENÉTICOS EN PACIENTES

RESISTENTES A CETUXIMAB

IV.II.I Análisis Mutacional	83
IV.II.II Mutaciones de <i>EGFR</i>	88
IV.II.III Mutaciones de <i>RAS</i> , <i>BRAF</i> Y <i>PIK3CA</i>	89
IV.II.IV Amplificación genética	91
IV.II.V Heterogenicidad intratumoral	93
IV.II.VI Detección de las mutaciones en las muestras sanguíneas	98

V.DISCUSIÓN

V.I MMP-7 COMO FACTOR PRONÓSTICO EN CÁNCER	103
---	------------

COLORRECTAL RESECABLE

V.II DETERMINACIÓN DE EVENTOS GENÉTICOS EN PACIENTES	109
---	------------

RESISTENTES A CETUXIMAB

VI. CONCLUSIONES

VI.I MMP-7 COMO FACTOR PRONÓSTICO EN CÁNCER	119
--	------------

COLORRECTAL RESECABLE

VI.II DETERMINACIÓN DE EVENTOS GENÉTICOS EN PACIENTES	121
--	------------

RESISTENTES A CETUXIMAB

VII. BIBLIOGRAFÍA	127
--------------------------	------------

VIII. APÉNDICE

VIII.I LISTADO DE ABREVIATURAS	149
---------------------------------------	------------

VIII.II LISTADO DE FIGURAS	150
-----------------------------------	------------

VIII.III LISTADO DE TABLAS	152
-----------------------------------	------------

VIII.IV PUBLICACIONES	153
------------------------------	------------

I. ANTECEDENTES

I.I INTESTINO GRUESO. ANATOMÍA, HISTOLOGÍA Y FISIOLÓGÍA

I.I.I GENERALIDADES

El intestino grueso es un órgano del aparato digestivo comprendido entre el intestino delgado y el ano. Es una víscera hueca y tubular de aproximadamente 1.5 metros de longitud por cuya luz se transporta el contenido fecal. Anatómicamente se divide en ciego, colon ascendente, colon transverso, colon descendente, sigma y recto (Figura 1).

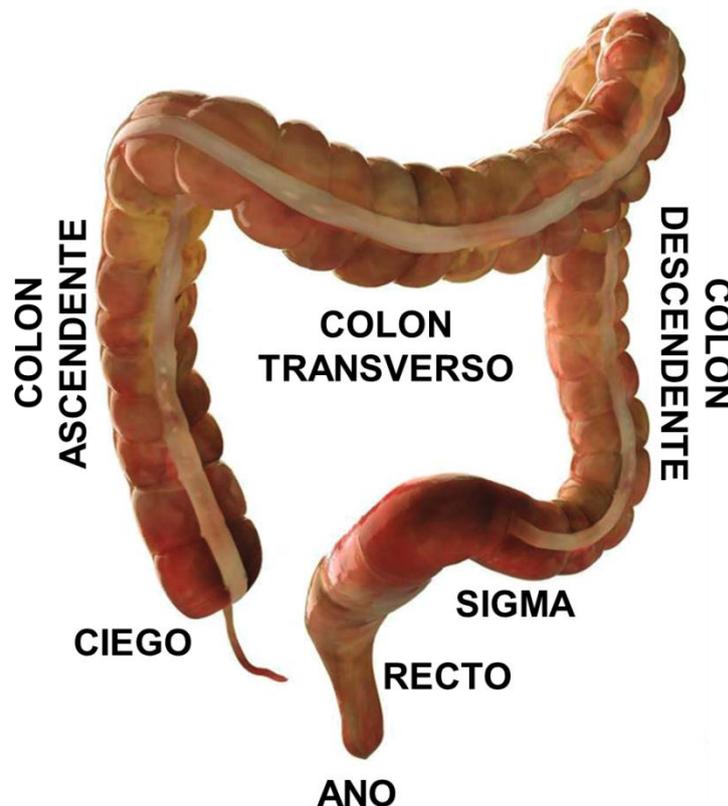


Figura 1: Anatomía del intestino grueso.

Desde el punto de vista histológico está formado por cuatro capas: mucosa, submucosa, muscular y serosa. La capa mucosa consta de un epitelio simple cilíndrico que se dispone formando invaginaciones llamadas criptas de Lieberkühn (Figura 2).

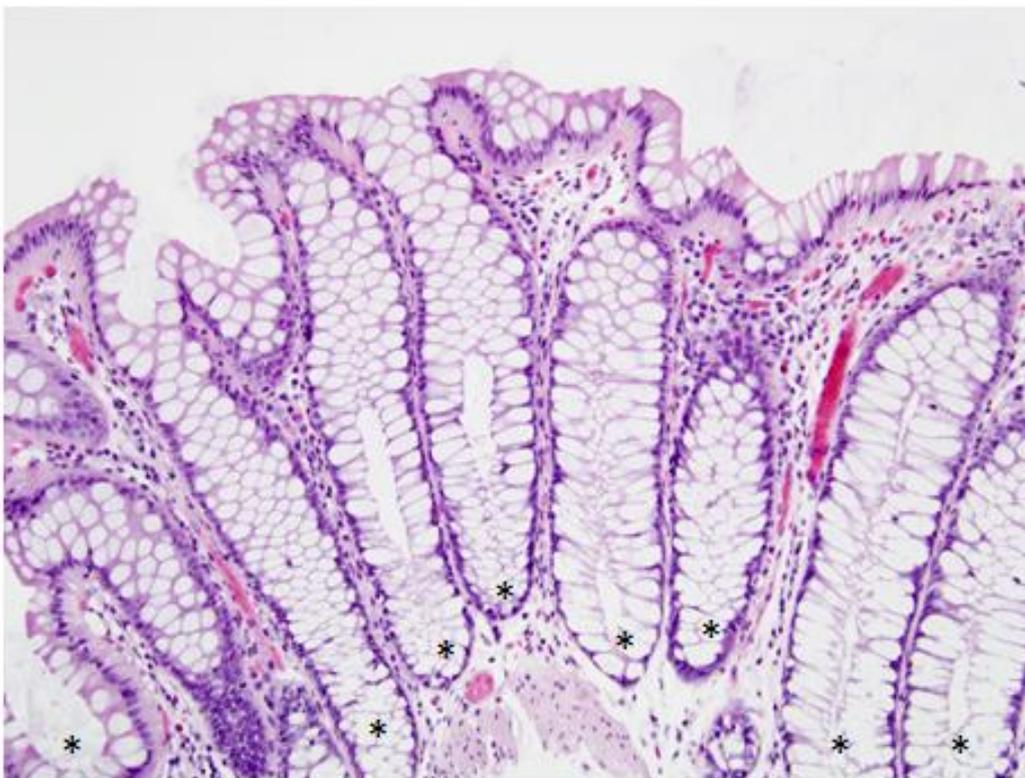


Figura 2: Corte histológico del intestino grueso. * Marca las criptas de Lieberkühn.

El epitelio intestinal está formado en su mayoría por células secretoras de mucina llamadas caliciales o caliciformes, que se disponen formando estructuras glandulares. En menor grado se pueden encontrar enterocitos o

colonocitos, cuya función es absorber agua y sales minerales; células neuroendocrinas, que regulan la motilidad y secreción glandular, y células de Paneth, localizadas mayoritariamente en el ciego, con actividad inmunitaria.

Las células epiteliales se encuentran en continua regeneración debido a la agresión constante a la que se someten por el paso físico del contenido fecal y por la presencia de flora bacteriana intestinal. La regeneración y diferenciación celular está muy regulada y jerarquizada. En la base de las criptas se encuentran células positivas para la proteína de membrana Lgr5 (*Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5*, o *Receptor que contiene repeticiones ricas en leucina acoplado a proteína G 5*) (Figura 3).

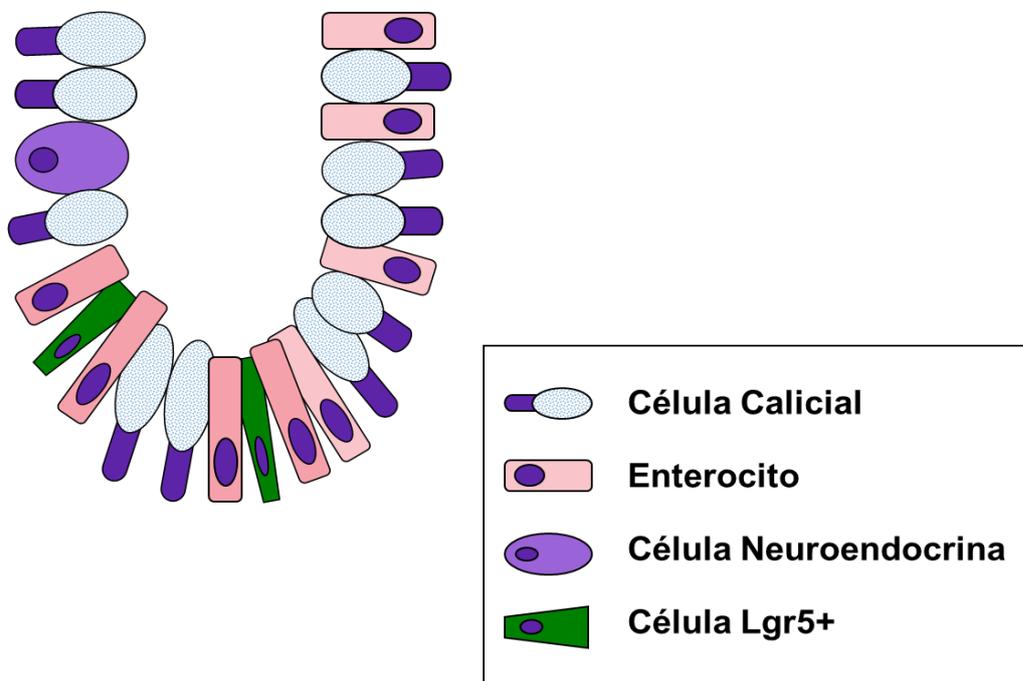


Figura 3: Esquema sobre los tipos celulares del epitelio del intestino grueso.

Las células Lgr5+ son consideradas como las células madre intestinales por su capacidad de originar todos los otros tipos celulares presentes en el epitelio intestinal (Barker et al., 2007). Estas células participan en la regeneración del epitelio intestinal mediante un mecanismo de proliferación y diferenciación celular que concluye con la aparición de las células epiteliales (Snippert et al., 2010).

En el intestino delgado, las células Lgr5+ se encuentran flanqueadas por las células de Paneth, cuya función entre otras es garantizar la viabilidad de las células madre intestinales. En el intestino grueso, únicamente se encuentran células de Paneth en las primeras secciones del ciego, pero las células que flanquean las Lgr5+ en el resto del epitelio mantienen algunas de las características (*Paneth-like*) y son igualmente necesarias para la correcta regulación de las células madre intestinales (Sato et al., 2011).

El epitelio del intestino grueso requiere que el número y tipo de células presentes estén regulados de manera adecuada para un correcto funcionamiento. Los procesos de proliferación y diferenciación están controlados por múltiples vías de señalización celular. De entre ellas destacan la vía de Notch, la vía de wnt/ β -catenina y las vías de señalización celular activadas por los receptores tirosina quinasa de membrana, como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Este proyecto de tesis se centra en aspectos biológicos y clínicos relacionados con los dos últimos mecanismos de señalización celular.

I.I.II VÍA WNT/ β -CATENINA

Esta vía de señalización celular se encuentra conservada en todas las especies eucariotas y es imprescindible para el correcto desarrollo embrionario y para mantener una correcta arquitectura histológica en la vida adulta. En el intestino grueso es indispensable para perpetuar la capacidad multipotencial de las células madre intestinales y para inducir la diferenciación celular hacia un fenotipo secretor (células caliciformes, neuroendocrinas y células de Paneth) (Reya & Clevers, 2005).

Existen varios estímulos que pueden activar esta vía de señalización. La más relevante es la llamada vía canónica, que se inicia por la unión de las glicoproteínas **Wnt** con alguno de sus receptores de membrana. Existen dos familias principales de receptores de membrana de las proteínas Wnt, **Frizzled** (Fzd) y **LRP** (*proteína relacionada a receptores de lipoproteína de baja densidad*) (Tamai et al., 2000). Además de estos receptores específicos, existen proteínas reguladoras de la vía de señalización como la familia **Lgr**, que incluye las proteínas Lgr5 indispensables para el mantenimiento de las células madre intestinales (de Lau et al., 2011). En el intestino grueso, Wnt se sintetiza y se excreta al medio extracelular por las propias células epiteliales o por las células mesenquimales, pudiendo activar la vía de señalización mediante un mecanismo autocrino o paracrino.

El complejo de receptores activados por Wnt induce la activación de la proteína **disheveled (dsh)** y la unión de la proteína **axina** a la membrana celular (Reya & Clevers, 2005) (Figura 4).

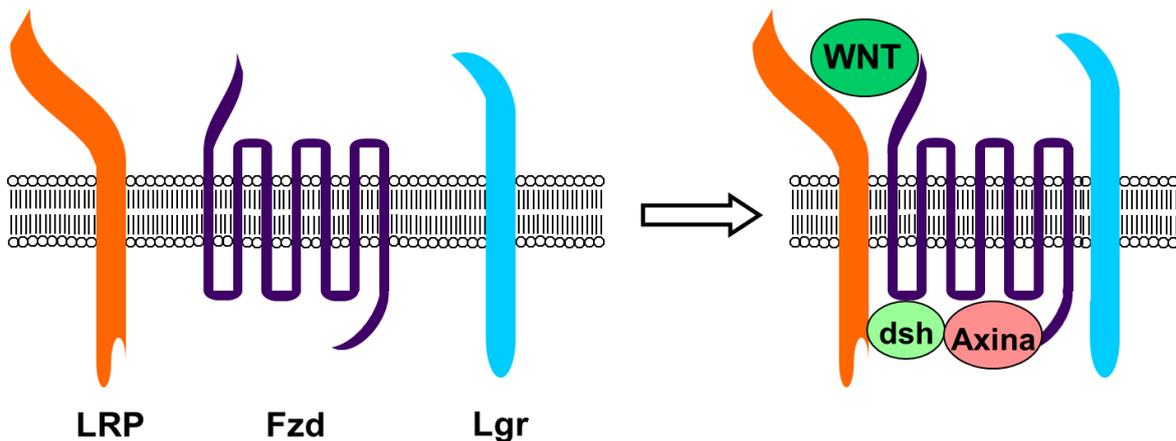


Figura 4: Esquema de la activación de la vía de Wnt. El ligando puede unirse a LRP o Fzd. La activación del receptor recluta las proteínas dsh y Axina.

Cuando la vía de Wnt está inactiva, axina forma un complejo con las proteínas **APC** (*adenomatosis polipósica de colon*), **GSK3** (*Glucógeno sintasa quinasa 3*) y **CK1 α** (*caseína quinasa alfa*). Este complejo tiene como función fosforilar las moléculas de **β -catenina** presentes en el citoplasma y mediante esta modificación inducir su degradación. Cuando se estimula la vía Wnt, axina abandona e inactiva este complejo. En ese momento, la β -catenina no se degrada, se acumula en el citoplasma y se transloca al interior del núcleo celular. En esta localización puede reconocer y unirse a la proteína **TCF** (*Factor de transcripción celular*). El complejo TCF/ β -catenina actúa como factor de transcripción e induce la expresión de genes relevantes para la diferenciación, movilidad y proliferación celular (Reya & Clevers, 2005).

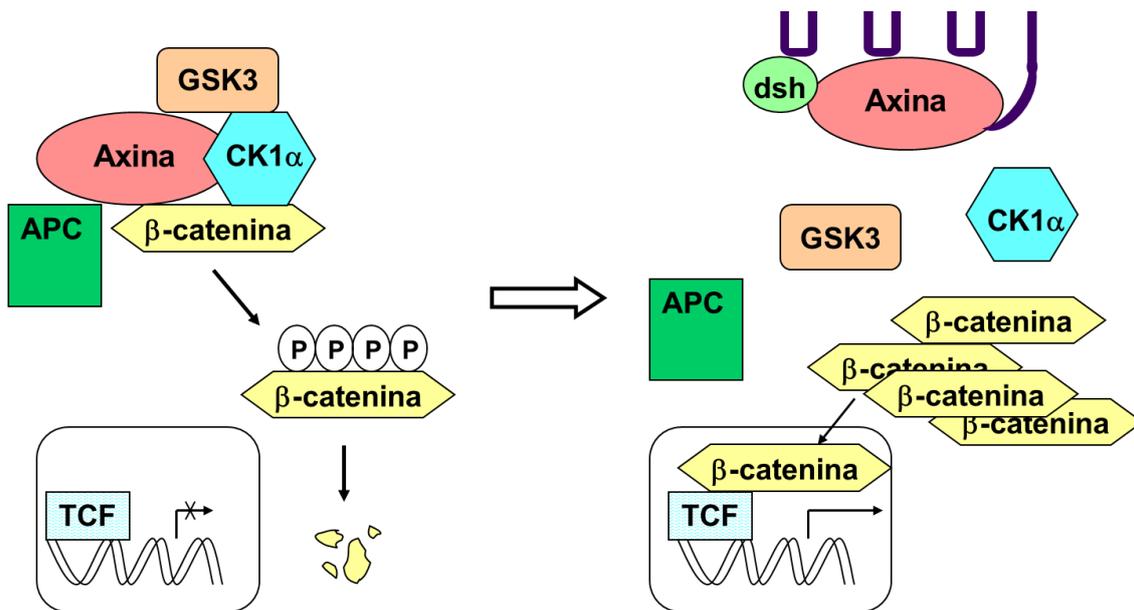


Figura 5: Visión esquemática de la activación de β -catenina mediante la vía canónica. Cuando la vía no está activada, β -catenina es degradada. En el momento que se produce la disrupción del complejo por la unión de axina a los receptores de Wnt, se acumula β -catenina y activa la transcripción proteica.

En modelos animales, el bloqueo de la vía Wnt comporta la desaparición de las criptas de Lieberkühn y la atrofia intestinal. Histológicamente desaparecen las células secretoras y el epitelio resultante queda formado en su totalidad por células absortivas (enterocitos) (Pinto et al., 2003). Por el contrario, la activación excesiva de la vía induce un aumento de la proliferación celular en forma de fenotipo glandular, apareciendo lesiones hiperplásicas polipoides (Pinto & Clevers, 2005).

I.I.III RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGFR)

El crecimiento, metabolismo, motilidad y el ciclo celular del epitelio intestinal está regulado en gran parte por factores de crecimiento presentes en la lámina propia epitelial y en la capa submucosa. Existen muchas familias de receptores cuyo papel es reconocer estos factores de crecimiento y activar vías de señalización celular indispensables para la regulación fisiológica de las células intestinales. De entre ellos destaca la familia HER (HER1-4), la superfamilia receptores de la insulina (IR, IGFR) y la familia de receptores c-met, entre otras.

EGFR (también denominado HER1 o ErbB1) es un receptor transmembrana con capacidad tirosina quinasa perteneciente a la superfamilia HER. Desde el punto de vista estructural, EGFR es una glicoproteína formada por 1210 aminoácidos que se dispone en cuatro dominios: un dominio amino-terminal extracelular, que reconoce los ligandos del receptor (primeros 645 aminoácidos), un dominio hidrofóbico transmembrana (aminoácidos 646 a 668), un dominio citoplasmático con actividad tirosina quinasa (aminoácidos 709 a 977) y un dominio carboxi-terminal, también intracelular, formado por residuos indispensables en la regulación de la actividad enzimática del receptor (aminoácidos 978 a 1210). Dentro del dominio carboxi-terminal se incluyen residuos del aminoácido tirosina que son potencialmente fosforilables (Ferguson, 2008) (Figura 6).

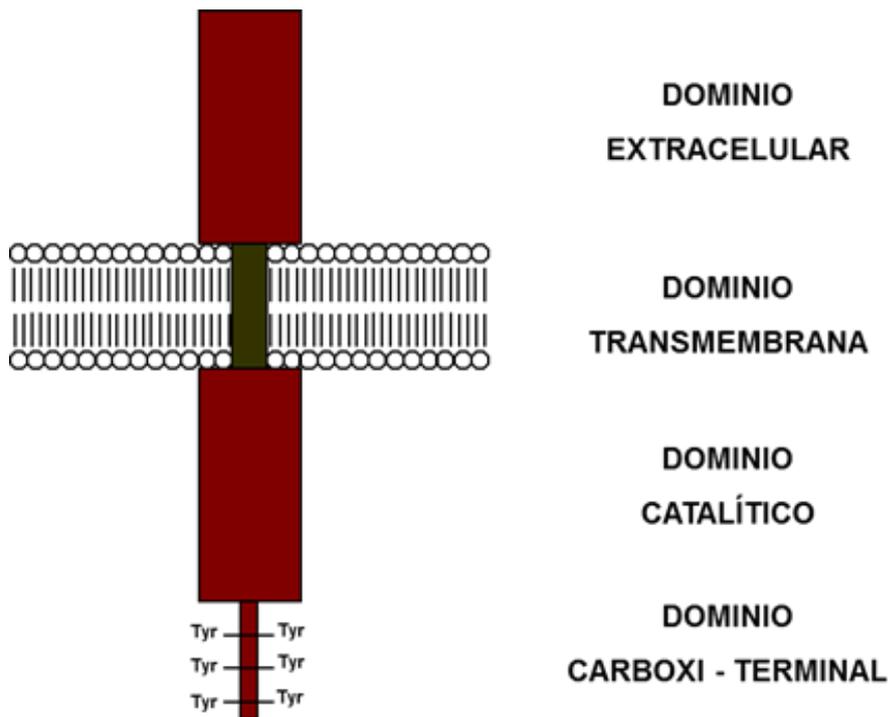


Figura 6: Esquema de la estructura del receptor EGFR.

EGFR tiene la capacidad de reconocer de manera específica diferentes ligandos, como el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), el Factor de Crecimiento Transformador alfa (TGF- α), la epiregulina, la anfiregulina y la betacelulina. Una vez se produce la unión con alguno de estos factores de crecimiento, se produce un fenómeno de dimerización en el que el receptor se une con otro receptor EGFR (homodímero), con otros receptores de la familia HER, o receptores de factores de crecimiento de otra familia (heterodímero). Tras la dimerización, el receptor se activa a través de la fosforilación cruzada de las tirosinas del dominio carboxi-terminal e decir, un receptor fosforila los residuos del otro receptor que conforma el dímero). Estos residuos fosforilados sirven como zonas de acoplamiento de proteínas transductoras y adaptadoras que poseen unos dominios específicos llamados SH (dominio homólogo a Src)

y PTB (dominio de unión a fosfotirosinas). Entre estas proteínas se encuentran **Src** (*proto-oncogen tirosina quinasa del sarcoma Rous*), **Grb2** (*proteína de unión a receptor de factores de crecimiento 2*) y **SOS1/SOS2** (*Son of sevenless 1/2*).

Estos adaptadores activan varias rutas de señalización celular que finalizan con la regulación de la transcripción de proteínas claves para la proliferación, la migración celular y la resistencia de la muerte celular programada (Arteaga, 2001). EGFR puede activar varias vías de señalización celular: las más relevantes son la de **RAS-MAP Quinasa** y la vía **PI3K/AKT/mTOR** (Figura 7).

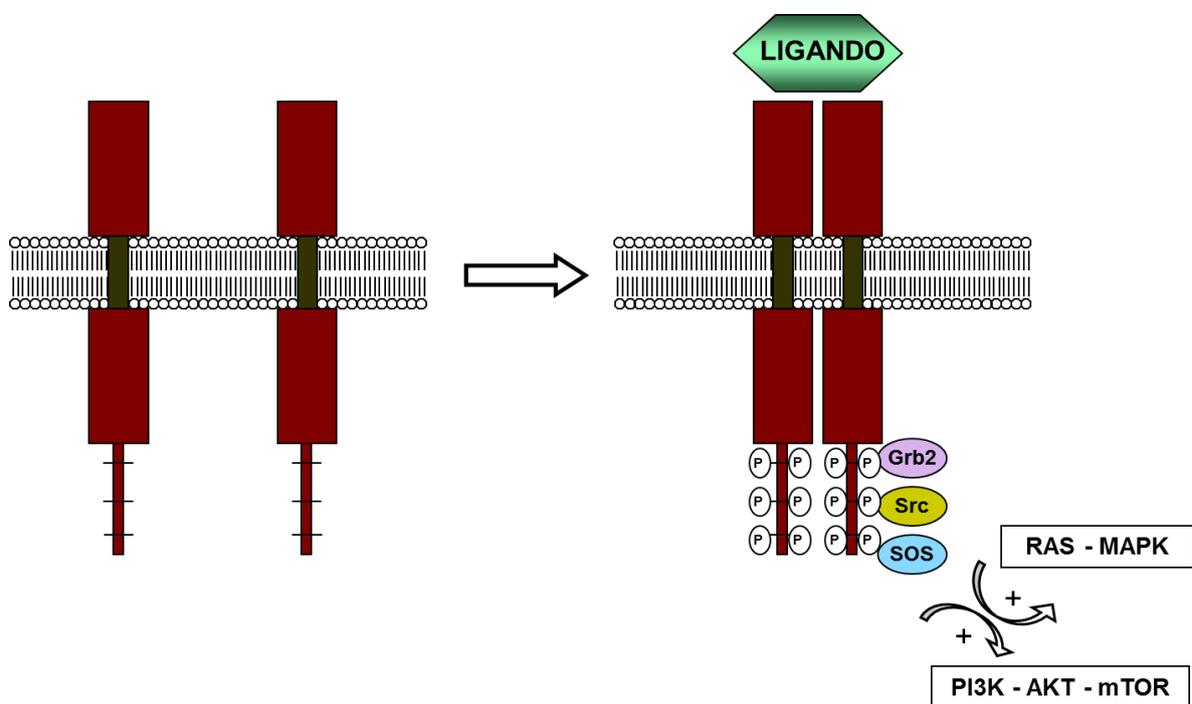


Figura 7: Activación de EGFR y reclutamiento de proteínas adaptadoras.

I.I.IV VÍA DE RAS-MAPK

La vía de RAS-MAP quinasa (también llamada RAS-RAF-MEK-ERK, por ser sus elementos más relevantes) se inicia a raíz de la fosforilación de los receptores tirosina quinasa y la posterior activación de las proteínas adaptadoras. Estos adaptadores son entonces capaces de reconocer la familia de proteínas **SOS** (principalmente SOS1 y SOS2), cambiando su conformación y estimulando su activación. Además de este mecanismo, EGFR también tiene la capacidad de activar directamente SOS1 y SOS2 de manera específica y sin la necesidad de proteínas intermediarias.

La principal función de SOS en esta vía de señalización es regular la actividad de una familia de proteínas G llamadas **Ras** (de v-ras, *virus del sarcoma de rata*). De entre ellas, las más relevantes por su importancia en el epitelio intestinal son las proteínas K-Ras, N-Ras y H-Ras.

Ras se encuentra anclada a la membrana celular a través de estructuras lipoproteicas. En su estado inactivo, la proteína está asociada a una molécula de GDP (guanina difosfato). La presencia de Sos induce el recambio del GDP por GTP (guanina trifosfato), provocándose la activación de la proteína Ras. En este momento adquiere la capacidad de unirse y modificar la conformación de sus sustratos específicos y, finalmente, induce la activación de estas dianas (Figura 8).

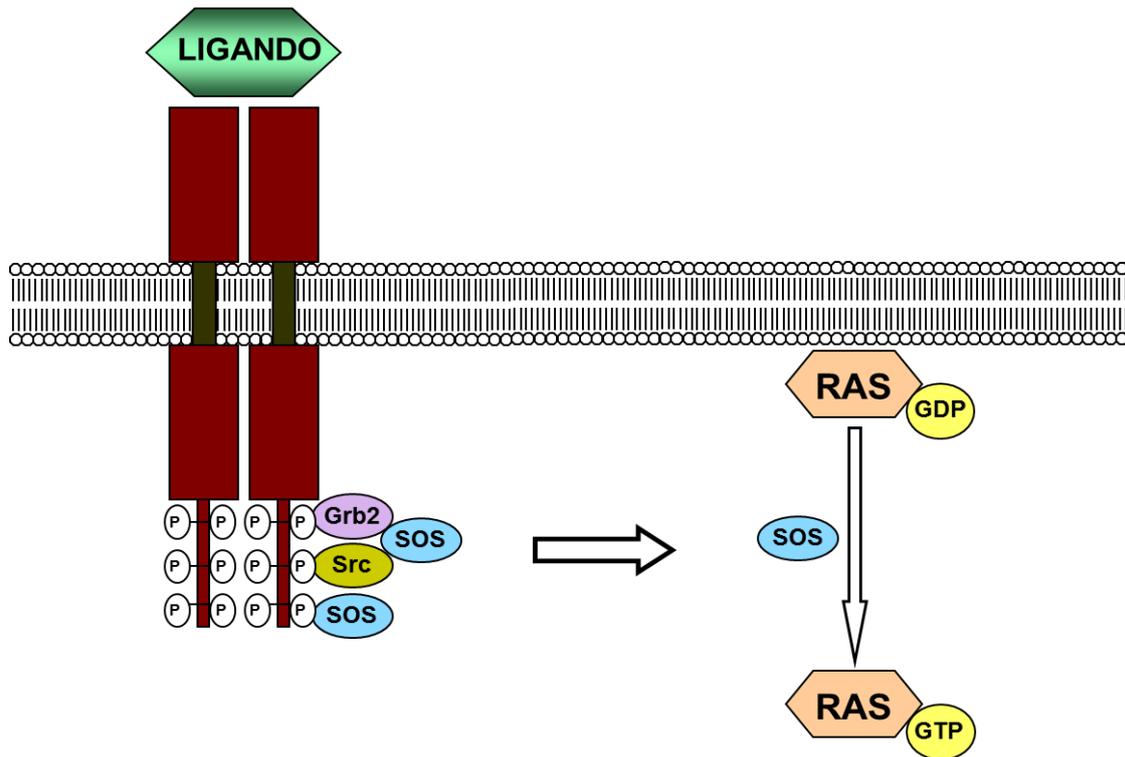


Figura 8: Activación de las proteínas Ras a través de la familia SOS.

La primera diana identificada de Ras fue la familia proteica **Raf**: Raf-1, A-Raf y B-Raf (de *v-raf*, *virus del Fibrosarcoma Rápidamente Acelerado*). Estas proteínas son serina/treonina quinasas, que se encuentran unidas a la membrana celular en una conformación inactiva. En el momento que interactúan con el complejo Ras-GTP, se liberan al citoplasma y se activan adquiriendo la capacidad enzimática. El principal sustrato de Raf son las proteínas de la familia MAP2K (*MAPK-ERK quinasa*), principalmente la proteína **MEK**. Éstas fosforilan y activan a su vez las proteínas **MAPK** (*proteínas quinasas activadas por mitógenos*), siendo uno de los principales miembros de este grupo ERK1 y ERK2 (*quinasas reguladas por señal extracelular 1 y 2*). Estas proteínas, una vez fosforiladas, son transportadas al núcleo celular, donde se unen directamente a la cromatina como factores de

transcripción, o regulan otros factores de transcripción (FT) mediante fosforilación. El resultado final es la regulación de los genes necesarios para mantener el ciclo celular, resistir la señal de apoptosis o inducir la migración celular (Tidyman & Rauen, 2009) (Figura 9).

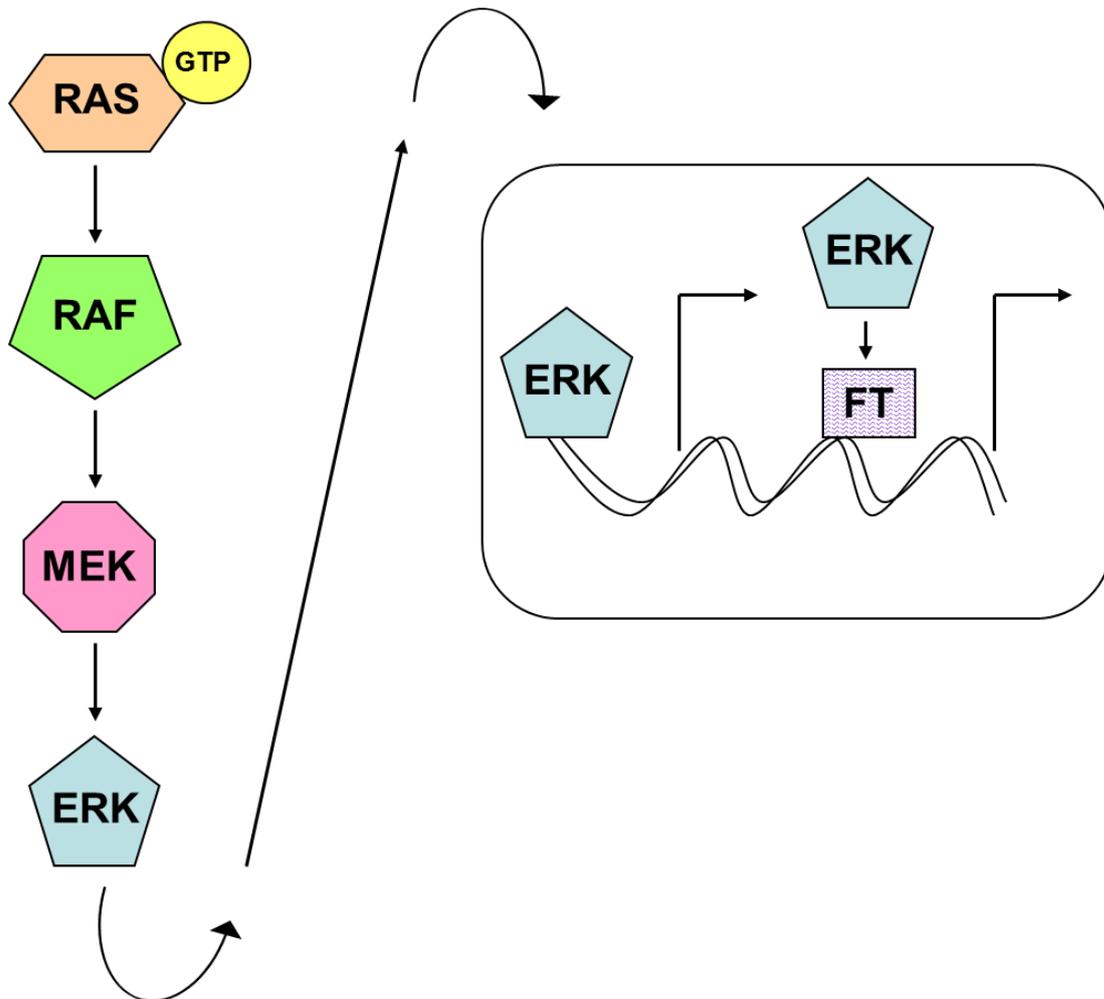


Figura 9: Vía de RAS-MAPK. La activación de Ras desencadena una cascada de fosforilaciones que concluye con el transporte de ERK al núcleo celular. Se regula la transcripción proteica directamente o a través de Factores de Transcripción.

I.I.V VÍA DE PI3K/AKT/mTOR

Al igual que la vía RAS-MAPK, esta ruta de señalización se inicia tras la fosforilación de los receptores tirosina quinasa y la activación de sus sustratos adaptadores. Las proteínas Grb2 y Src activan a su vez otras proteínas adaptadoras llamadas **Gab1/Gab2** (*proteínas de unión asociadas a Grb 1 y 2*). Esta familia de proteínas transmite la señal de la ruta celular activando los enzimas **PI3K** (*fosfatidil-inositol 3 quinasa*).

Existen tres subgrupos de PI3K (I, II y III). El subtipo I es el que presenta mayor implicación en la homeostasis de las células intestinales y el que está directamente regulado por la actividad de los receptores tirosina quinasa. Las PI3K tipo I están conformadas por dos subunidades: una subunidad catalítica llamada **p110** (que a su vez puede presentar diferentes isoformas, siendo la principal p110 α), y una subunidad reguladora que inhibe y bloquea la actividad de la subunidad catalítica. Dentro de las subunidades reguladoras, la principal recibe el nombre de **p85 α** . Cuando Gab1 y Gab2 son activadas, pueden unirse y secuestrar la subunidad reguladora de PI3K. En ese momento, la subunidad catalítica queda liberada y ejerce su capacidad enzimática (Courtney et al., 2010).

La actividad enzimática de PI3K es la transferencia de grupos fosfato al glucolípido de membrana fosfatidil-inositol. Las enzimas del tipo I catalizan la transformación de fosfatidil-inositol difosfato (PIP2) a fosfatidil-inositol trifosfato

(PIP3). Además de PI3K, existen otros enzimas relacionados para mantener una correcta regulación de la concentración de PIP3 a nivel celular. La principal es la fosfatasa **PTEN** (*fosfatidil inositol trifosfato fosfatasa*), que cataliza la reacción inversa, es decir, el paso de PIP3 a PIP2.

La importancia del número de residuos fosfatos presentes en fosfatidil-inositol radica en que algunas de estas formas pueden actuar como cofactores enzimáticos. En relación a esta ruta de señalización celular, Fosfatidil-inositol trifosfato (PIP3) activa la proteína con actividad quinasa **PDK1** (*quinasa dependiente de fosfoinositol 1*), que a su vez fosforila la proteína **Akt/PKB** (*proteína quinasa B*) en la treonina 308 e induce su activación.

PI3K también es capaz de activar el complejo **mTORC2** mediante un mecanismo desconocido por el momento. Este complejo, formado por varias proteínas entre las que se encuentra **mTOR** (*diana de la rapamicina en mamíferos*), también puede activar la proteína Akt mediante la fosforilación de un residuo serina localizado en la posición 473. Ambas fosforilaciones activadoras son suficientes para que Akt ejerza su función enzimática, pero su actividad es máxima cuando ambos residuos se encuentran fosforilados (Alessi & Cohen, 1998) (Figura 10).

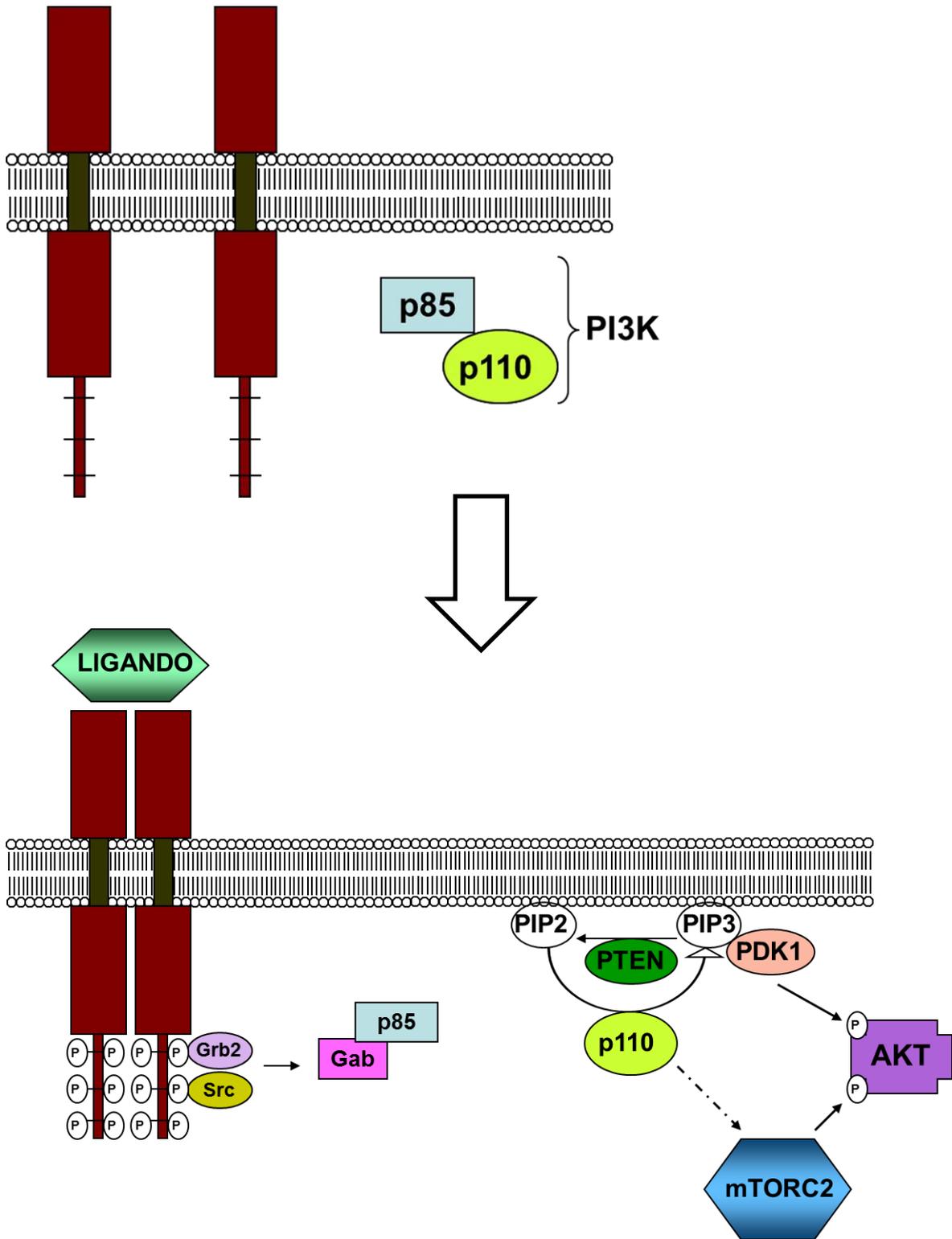


Figura 10: Activación de la subunidad catalítica de PI3K (p110) y fosforilación de Akt mediante mTORC2 y PDK1. PIP2 = Fosfatidil inositol difosfato. PIP3 = Fosfatidil inositol trifosfato.

La proteína Akt es una serina/treonina quinasa capaz de actuar sobre una gran cantidad de sustratos y regular de manera directa varias funciones celulares.

Akt es una proteína reguladora del metabolismo, motilidad, supervivencia y diferenciación celular (Fayard et al., 2005). Al igual que lo descrito previamente sobre la vía de MAPK, Akt posee la capacidad de regular la transcripción genética mediante su acción sobre varios factores de transcripción. Esta regulación la ejerce bien directamente o bien a través del complejo **mTORC1**.

Akt es capaz de inhibir la proteína **TSC1** (*Esclerosis Tuberosa 1*), la cual inhibe junto a **TSC2** la acción del complejo mTORC1 a través de la proteína **Rheb**; es decir, la inhibición de este inhibidor provoca la activación del complejo.

mTORC1 tiene capacidad quinasa y activa mediante fosforilación varias proteínas. Entre ellas se encuentran la quinasa S6 (**S6K**) o el factor de transcripción **4EBP1**. S6K es asimismo capaz de fosforilar otros factores de transcripción, induciendo su activación y de este modo, regulando la transcripción génica (Figura 11).

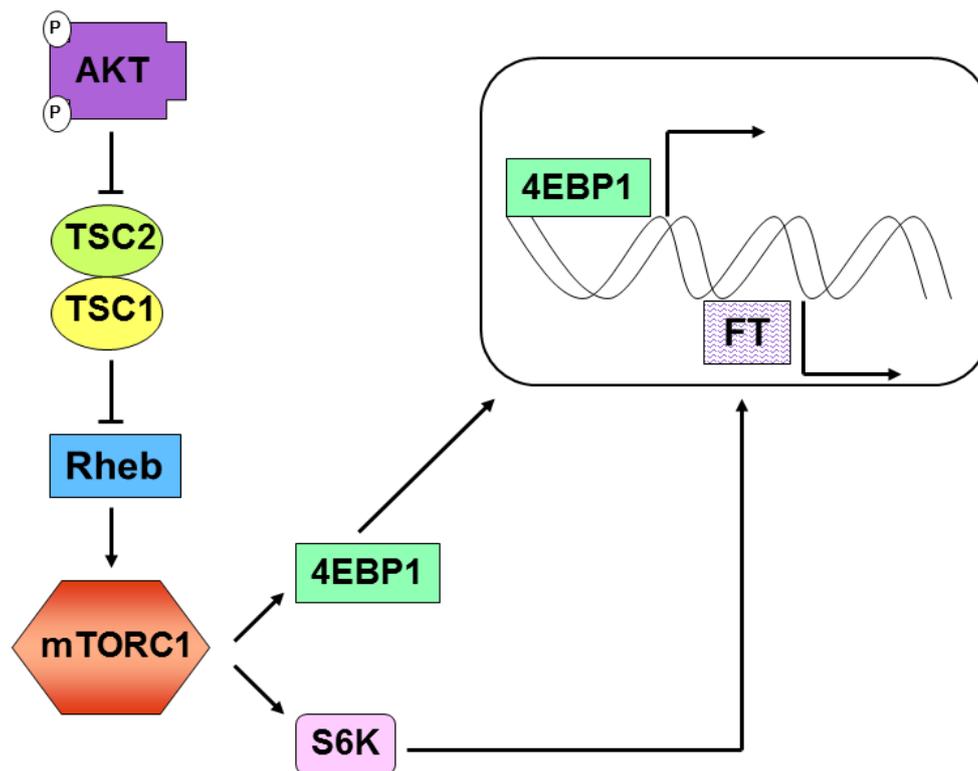


Figura 11: Activación de mTORC1 mediante acción de Akt.

Además de tener un mismo origen en forma del receptor EGFR, tanto la vía de RAS/MAPK como la vía PI3K/AKT/mTOR se encuentran entrelazadas y se regulan entre ellas. La principal relación entre ambas vías se produce mediante las proteínas Ras. Éstas pueden unirse directamente a la subunidad catalítica de PI3K (p110) y activarla. Por lo tanto, la activación de Ras puede provocar directamente la activación en la vía de PI3K/AKT/mTOR (Figura 12).

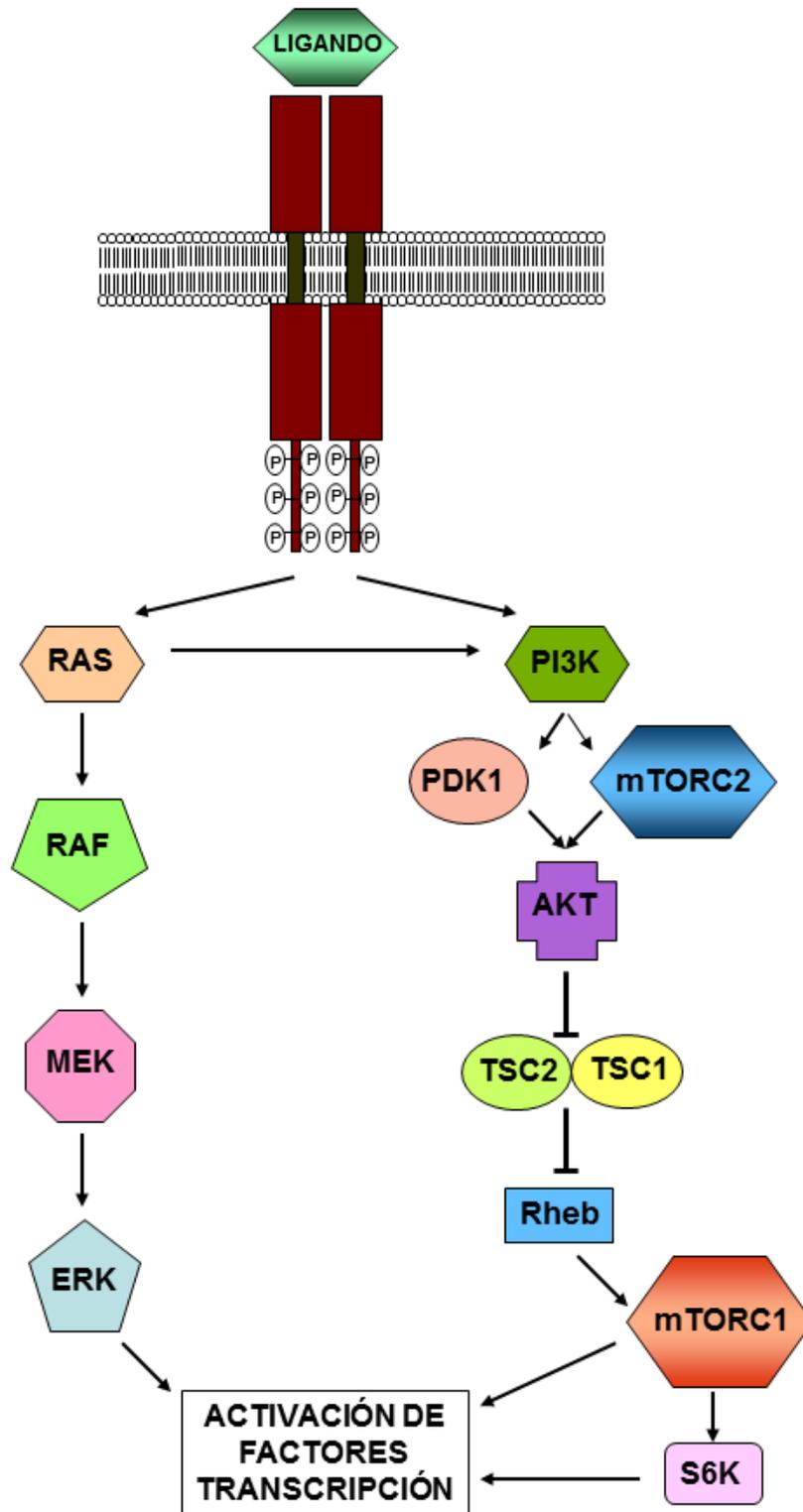


Figura 12: Visión general de las principales vías activadas por EGFR.

I.II CÁNCER COLORRECTAL

I.II.I DEFINICIÓN Y BIOLOGÍA MOLECULAR

El cáncer colorrectal (CCR) se produce tras la degeneración maligna de las células localizadas en el intestino grueso. La práctica totalidad de tumores (alrededor del 95-98%) (Kang et al., 2007) corresponden a adenocarcinomas al poseer rasgos histológicos glandulares. Además, existen otros tipos histológicos que pueden aparecer también en el intestino grueso con mucha menor frecuencia: tumores neuroendocrinos, linfomas, sarcomas y melanomas (Cuffy et al., 2006). En la literatura médica la nomenclatura de cáncer colorrectal abarca normalmente únicamente a los adenocarcinomas. El resto de tipos histológicos no suelen estar representados bajo esta terminología por su muy escasa frecuencia y porque poseen características pronósticas y terapéuticas específicas. Este proyecto de tesis doctoral está dedicado exclusivamente a los tumores con rasgos de adenocarcinoma, y de este modo, el término de cáncer colorrectal se referirá únicamente a aquellos tumores que presentan rasgos histológicos glandulares.

El cáncer colorrectal, por su alta frecuencia y mortalidad, es uno de los principales problemas de salud en nuestro medio. Se trata del tumor que presenta la mayor incidencia en Catalunya, con aproximadamente tres mil nuevos casos anuales en varones y dos mil en mujeres (Cleries et al., 2014). Además, cada año se producen en Catalunya más de dos mil defunciones por

tumores colorrectales, siendo la segunda causa de muerte por cáncer, superado únicamente por el cáncer de pulmón. Estos datos epidemiológicos de nuestro medio son semejantes a los descritos en el resto del continente europeo (Malvezzi et al., 2013).

El adenocarcinoma colorrectal aparece tras un largo proceso de degeneración del epitelio intestinal. Inicialmente aparecen lesiones premalignas en el epitelio, como son los pólipos intestinales. Estas lesiones adquieren progresivamente nuevos cambios morfológicos y moleculares hasta, finalmente, presentar las características de malignidad y degenerar en cáncer colorrectal (Markowitz & Bertagnolli, 2009).

Cada neoplasia presenta una evolución genética y molecular única, pero algunos eventos moleculares son comunes a la gran mayoría de tumores. Estas alteraciones suelen ser vitales en la generación de las neoplasias y en el mantenimiento de las características celulares que les confieren los rasgos de malignidad. De entre todas ellas, la alteración biológica que aparece más frecuentemente en el cáncer colorrectal es la activación descontrolada de la **vía de Wnt**.

La alteración genética más frecuente en el cáncer colorrectal es la **mutación del gen APC**, estando presente en el 85% de los pacientes. Además es uno de los primeros eventos que se producen en el epitelio normal en el proceso de

malignización. La alteración genética conlleva que la proteína APC pierda su funcionalidad, siendo entonces incapaz de regular correctamente la concentración intracelular de β -catenina. Esto induce su acumulación, la translocación al núcleo de este exceso de proteína y la activación de los elementos finales de la vía de señalización de Wnt (Pinto & Clevers, 2005)

Las mutaciones del gen APC no son los únicos eventos de esta vía que están relacionados con la carcinogénesis. Existen otras alteraciones genéticas con efectos similares, de las que destacan las mutaciones que aparecen en el propio gen de la β -catenina (llamado *CTNNB1*) (Anastas & Moon, 2012), o las que se producen en el gen que codifica la axina (Liu et al., 2000).

Cuando estas mutaciones aparecen en las células madre intestinales (Lgr5+) provocan una proliferación anormal del epitelio intestinal dando lugar a la aparición de pólipos (Schepers et al., 2012). Estos pólipos van adquiriendo progresivamente nuevas mutaciones que otorgan mayor viabilidad celular o incrementa la motilidad y capacidad de invadir el tejido adyacente. El acúmulo de todas estas mutaciones causa finalmente la degeneración del epitelio intestinal en forma ya de un cáncer invasivo (Figura 13).

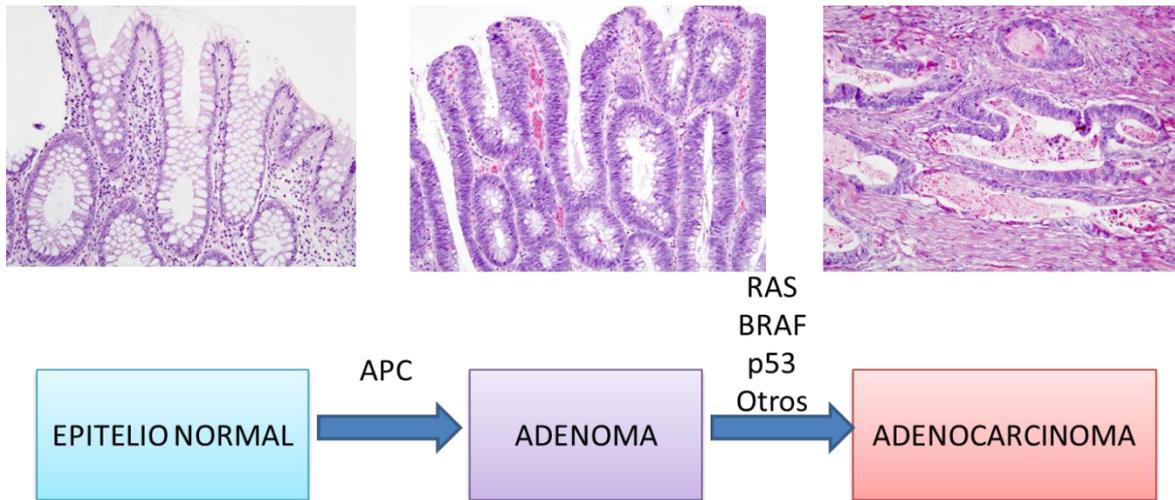


Figura 13: Evolución del epitelio intestinal hacia la aparición de adenocarcinoma. La mutación del gen *APC* provoca la aparición del adenoma. Otras muchas mutaciones se van añadiendo sobre las células del adenoma hasta inducir su malignización.

Gran parte de las mutaciones que pueden aparecer en el proceso de carcinogénesis tienen como acción la activación mantenida y desregulada de las vías de señalización de **RAS-MAPK** (como las mutaciones de *KRAS*, *NRAS* o *BRAF*) o de la vía **PI3K/AKT/mTOR** (mutaciones que aparecen en los genes *PIK3CA* que codifica para la proteína p110 α ; *AKT* o *PTEN*).

La mutación en el gen ***KRAS*** es el evento genético más frecuente de estas vías de señalización celular, estando presente en el 40-50% de todos los tumores colorrectales (Cancer-Genome-Atlas-Network, 2012; De Roock et al., 2010). Las mutaciones aparecen en zonas relevantes en la regulación de la proteína e inducen una sobreactivación de la misma. La región más frecuentemente afectada es el exón 2, y dentro de ésta, son más frecuentes las

mutaciones en los codones 12 y 13. Con menor frecuencia se encuentran mutados los exones 3 y 4.

Además de las mutaciones en el gen *KRAS* se han descrito mutaciones en otros genes que, de manera análoga a *KRAS*, provocan la activación no regulada de las proteínas que codifican. El gen *PIK3CA* (que codifica la subunidad catalítica p110 α de la proteína PI3K) se encuentra mutado en el 18% de los pacientes; el gen *BRAF* en un 3-10%, y el gen *NRAS* en un 2-5%. Este último presenta mutaciones en los mismos codones que su homólogo *KRAS* (Figura 14).

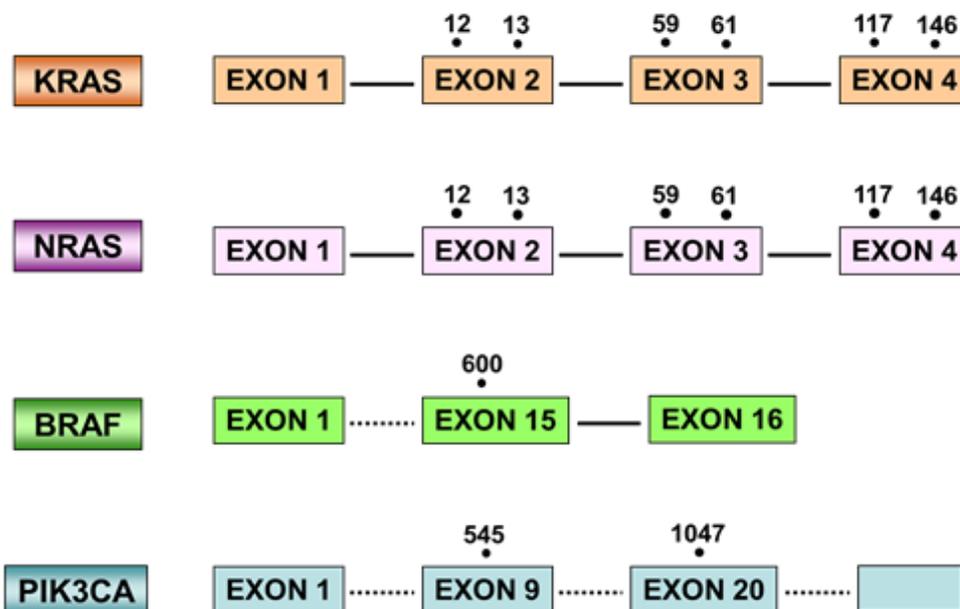


Figura 14: Algunos genes frecuentemente mutados en el cáncer colorrectal. Se señalan los codones y exones más frecuentemente mutados.

I.II.II PRESENTACIÓN CLÍNICA Y TRATAMIENTO

Clínicamente, el cáncer colorrectal es una enfermedad muy heterogénea. Dependiendo de la localización, la extensión y la biología intrínseca de la enfermedad los enfermos presentan una evolución y unas opciones terapéuticas muy diferentes.

Existen varias clasificaciones del cáncer colorrectal. La más utilizada, por su información pronóstica y su utilidad para las decisiones terapéuticas, es la clasificación de la *Unión Internacional Contra el Cáncer* (UICC) (Sobin et al., 2009). Esta clasificación registra el grado de infiltración local (T), la afectación de ganglios linfáticos regionales (N) y la afectación a distancia (M), agrupando las neoplasias en estadios (Tabla 1 y 2).

T0	No evidencia de tumor primario en la mucosa intestinal
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> : tumor intraepitelial o invasión de la lámina propia
T1	Invasión de la capa submucosa
T2	Invasión de la capa muscular propia
T3	Invasión de la subserosa o adventicia
T4	T4a: Perforación de la adventicia T4b: Invasión de otros órganos o estructuras
N0	Ausencia de ganglios linfáticos regionales afectados
N1	N1a: Afectación de 1 ganglio linfático regionales N1b: Afectación 2-3 ganglios linfáticos regionales N1c: Depósito satélite alejado del tumor primario, con ausencia de ganglios afectados
N2	N2a: Afectación de 4-6 ganglios linfáticos regionales N2b: Afectación de 7 o más ganglios linfáticos regionales
M0	Ausencia de metástasis a distancia
M1	M1a: Presencia de metástasis a distancia confinada en un solo órgano, a excepción del peritoneo M1b: Metástasis a distancia en varios órganos o afectando al peritoneo

Tabla 1: Clasificación TNM del cáncer colorrectal (7ª Edición de la UICC).

Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio I	T1-T2	N0	M0
Estadio IIA	T3	N0	M0
Estadio IIB	T4a	N0	M0
Estadio IIC	T4b	N0	M0
Estadio IIIA	T1-T2	N1	M0
	T1	N2a	M0
Estadio IIIB	T3-T4a	N1	M0
	T2-T3	N2a	M0
	T1-T2	N2b	M0
Estadio IIIC	T4a	N2a	M0
	T3-T4a	N2b	M0
	T4b	N1-N2	M0
Estadio IVA	Cualquier T	Cualquier N	M1a
Estadio IVB	Cualquier T	Cualquier N	M1b

Tabla 2: Clasificación en estadios del cáncer colorrectal según la 7ª edición de la UICC.

El tratamiento del CCR depende de muchas variables, principalmente del estadio de la enfermedad. La complejidad de cada paciente provoca que siempre el tratamiento sea individualizado; pero en rasgos generales y de manera simplificada se puede describir la actitud terapéutica como sigue a continuación. Las lesiones que aparecen en el colon y no presentan metástasis a distancia se tratan mediante resección quirúrgica siempre que sea posible. En caso de corresponder a un estadio II o III, se puede administrar quimioterapia tras la resección quirúrgica con intención adyuvante para reducir el riesgo de recidiva (Andre et al., 2004). El beneficio en los pacientes con estadio III está bien definido, pero en los pacientes que corresponden a un

estadio II la necesidad de tratamiento adyuvante es controvertida (Labianca et al., 2013). En el caso de presentar lesiones tumorales a distancia, el tratamiento está basado en quimioterapia y/o terapias biológicas con intención paliativa. Existen excepciones en los que pacientes con enfermedad metastásica se someten a tratamiento quirúrgico con intención curativa cuando es posible realizar una resección completa de las lesiones (Van Cutsem et al., 2013).

Existe una diferencia entre las neoplasias de recto y los tumores del resto del intestino grueso. En el caso de corresponder a lesiones T3 o T4, o presentar lesiones sospechosas de corresponder a afectación ganglionar, es recomendable realizar tratamiento con quimioterapia y radioterapia para reducir el riesgo de recidiva local. Este tratamiento es preferible realizarlo antes de la cirugía para reducir la toxicidad. Para el resto de situaciones clínicas, el tratamiento es equivalente a los tumores localizados en el colon (Glimelius et al., 2013).

I.II.III ANTICUERPOS CONTRA EGFR

El receptor EGFR se encuentra en el inicio de múltiples señales celulares que conllevan la activación de vías de proliferación, motilidad y resistencia a apoptosis. Por este motivo, es una diana terapéutica atractiva para el tratamiento del cáncer colorrectal. En esta enfermedad, EGFR suele estar hiperactivado ya sea por sobreexpresión de los receptores o por el incremento

de los factores de crecimiento que actúan como ligando (Normanno et al., 1998). Existen dos estrategias para bloquear el receptor EGFR: el uso de fármacos inhibidores del dominio tirosina quinasa y la utilización de anticuerpos específicos contra el dominio extracelular de EGFR. Con estos últimos se logra bloquear el contacto entre el receptor y su ligando e inhibir la dimerización de los receptores (Figura 15).

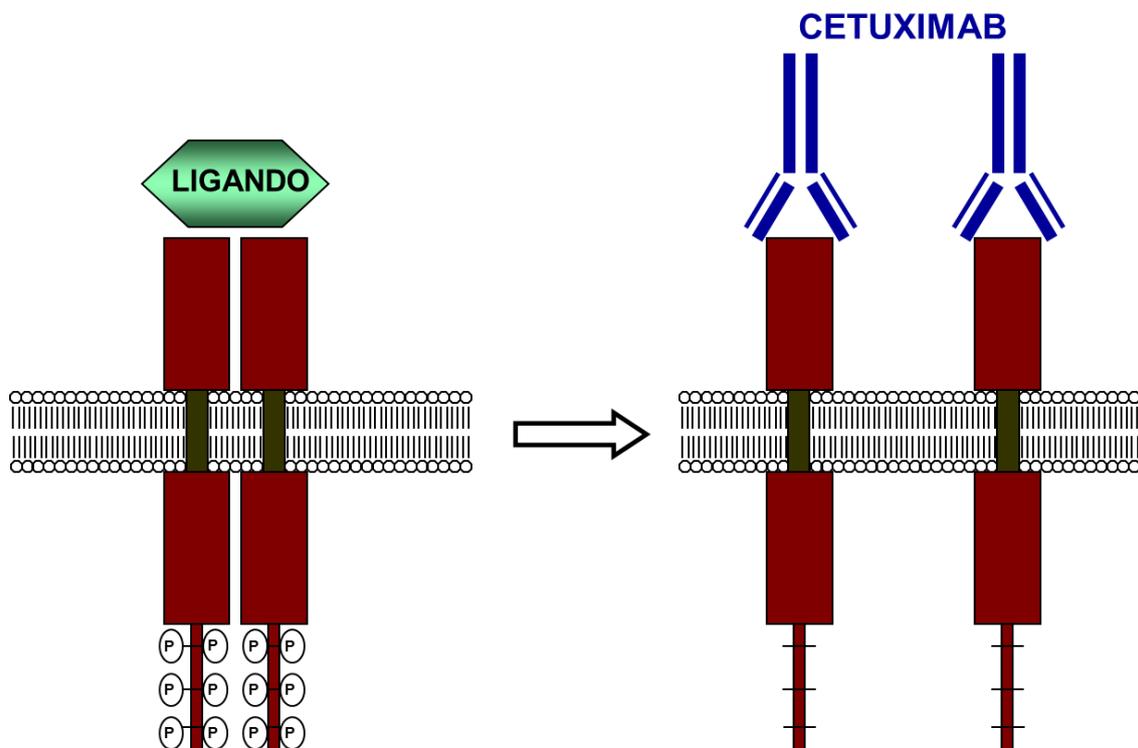


Figura 15: Acción inhibitoria de los anticuerpos anti-EGFR, como cetuximab. Bloqueo de EGFR que impide que adquiera la conformación adecuada para formar dímeros y activar la señal celular.

Existen dos anticuerpos terapéuticos contra EGFR aprobados para el tratamiento del cáncer colorrectal: Cetuximab (C225; Erbitux; Merck & Corp.) y Panitumumab (ABX-EGF; Vectibix, Amgen Inc.). El primero fue obtenido a principio de los años 80 tras la administración de péptidos purificados de EGFR en ratones y el posterior aislamiento específico de las células plasmáticas que sintetizaban anticuerpos como respuesta a la inmunización. De entre todos los anticuerpos evaluados, la clona 225 mostró la mayor actividad (Masui et al., 1984). Debido a las reacciones de hipersensibilidad cruzada entre especies, este anticuerpo podía producir reacciones anafilácticas graves cuando era administrado a pacientes, y fue necesario esperar al desarrollo de la tecnología de quimerización para su uso clínico y su posterior comercialización (Goldstein et al., 1995). En la actualidad, el anticuerpo utilizado con fines terapéuticos es una estructura quimérica, mayoritariamente de origen humano pero con un fragmento procedente de ratón. Panitumumab fue desarrollado a inicios del siglo XXI mediante un proceso de inmunosensibilización murina equivalente al realizado con cetuximab (Yang et al., 2001). A diferencia de cetuximab, los ratones inmunizados estaban modificados genéticamente para expresar una cadena pesada de inmunoglobulina totalmente humana. De este modo, se obtuvo un anticuerpo con una estructura totalmente humanizada.

El primer estudio fase III aleatorizado publicado que mostró la eficacia de estos fármacos fue el estudio BOND en 2004. En este estudio se evaluó la eficacia de cetuximab combinado con irinotecán contra cetuximab en monoterapia. Un total de 329 pacientes previamente tratados con oxaliplatino, fluoropirimidinas, y que recientemente habían progresado a un tratamiento basado en irinotecán,

fueron aleatorizados a recibir cetuximab en monoterapia o combinado con irinotecán. La administración de cetuximab se realizó según los datos obtenidos de los ensayos fase I y II: mediante una administración semanal, iniciándose una dosis de carga de 400 mg/m² y posteriormente administrando 250 mg/m². Los resultados mostraron un beneficio en tasa de respuestas tumorales (22.9 versus 10.8%, $P=0.007$) y un incremento en supervivencia libre de progresión (Hazard Ratio (HR) 0.54, $P<0.0001$) (Cunningham et al., 2004).

Progresivamente cetuximab se fue aplicando al resto de opciones terapéuticas. El tratamiento en monoterapia mostró beneficio en supervivencia global en el ensayo CO.17 (Jonker et al., 2007). Un total de 572 pacientes fueron aleatorizados a recibir cetuximab o placebo. La supervivencia global fue significativamente superior en los pacientes tratados con cetuximab (mediana supervivencia 6.1 meses) respecto a placebo (mediana de 4.6 meses; HR 0.77 $P=0.005$). Además, cetuximab fue evaluado en otros estudios en combinación con quimioterapia. Entre ellos, destaca el estudio EPIC, donde cetuximab asociado a irinotecán se comparaba con irinotecán en monoterapia como segunda línea de tratamiento (tras progresión a un tratamiento previo) (Sobrero et al., 2008) o el estudio CRYSTAL, en el que se evaluaba el esquema de quimioterapia FOLFIRI administrado junto cetuximab o placebo como tratamiento de primera línea (primer esquema administrado contra la enfermedad) (Van Cutsem et al., 2009). En ambos estudios se demostró un aumento en la supervivencia libre de enfermedad y en la tasa de respuestas obtenidas sobre el tratamiento quimioterápico habitual, pero no se demostró un aumento estadísticamente significativo en la supervivencia de los pacientes. La

causa de no objetivar estos beneficios se atribuyó a que los pacientes que fueron tratados en el brazo control recibían cetuximab en los tratamientos que se administraban posteriormente.

I.III BIOMARCADORES EN CÁNCER COLORRECTAL

Los pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal tienen una evolución muy heterogénea. Los factores pronósticos y predictivos conocidos en la actualidad sólo son capaces de explicar parte estas diferencias. A pesar de todos los intentos de clasificar los pacientes en grupos pronósticos y de individualizar los tratamientos en base a los factores conocidos, no es posible predecir de manera fidedigna la evolución clínica o el pronóstico de cada individuo.

Existen algunos biomarcadores que ofrecen información como factores pronósticos o predictivos. Estos biomarcadores son de ayuda en la práctica clínica para administrar el tratamiento más adecuado según la sensibilidad del tumor y su potencial riesgo evolutivo.

I.III.I MATRIZ-METALOPROTEINASA 7 (MATRILISINA, MMP-7)

Las matriz-metaloproteinasas son una familia de proteínas endopeptidasas capaces de digerir los elementos que componen la matriz extracelular y la membrana basal bajo condiciones fisiológicas. Su función está relacionada con los procesos de fibrosis, cicatrización, motilidad celular e inflamación; y con la remodelación tisular como la resorción ósea o la involución uterina (Massova et al., 1998). Las metaloproteinasas se sintetizan en forma de zimógenos

inactivos para evitar la degradación de estructuras proteicas intracelulares. Una vez entra en contacto con la matriz extracelular, la región reguladora es degradada por otras metaloproteinasas u otras peptidasas, quedando la enzima activa para degradar sus sustratos (Tallant et al., 2010).

Hasta la actualidad se han identificado 28 proteínas dentro de este subgrupo, clasificadas desde el tipo 1 (MMP-1) a 28 (MMP-28). Todas las metaloproteinasas poseen en común un dominio catalítico con el motivo proteico “*HEXGH*”. Esta secuencia tiene la capacidad de ligar iones de zinc y utilizarlo como cofactor. Esta actividad es indispensable para la actividad enzimática de la proteína. Además de este dominio, existen otros dominios adicionales que permiten que cada proteína tenga una actividad específica, como reconocimiento y unión a determinados sustratos o adhesión a membrana (Tallant et al., 2010) (Figura 16).

La matriz-metaloproteinasas 7 (MMP-7) también llamada matrilisina, es una peptidasa dependiente de calcio y zinc. El enzima activo es capaz de degradar no sólo proteínas de la matriz extracelular (colágeno, laminina, fibronectina o gelatina); sino que además es capaz de digerir proteínas de membrana (Almendro et al., 2009; Davies et al., 2001; Lynch et al., 2005). Las estructuras resultantes son receptores truncados y fragmentos solubles, que pueden tener un papel importante en la desregulación celular de las células neoplásicas. Además, MMP-7 es capaz de digerir y activar directa o indirectamente algunos factores de crecimiento, como TNF- α o IGF (Li et al., 2006). Por último, MMP-7

activa directamente a otros miembros de la familia de metaloproteinasas, como MMP-2 o MMP-9 mediante la degradación de su región reguladora. Esta influencia sobre otros miembros de la familia MMP amplifica el efecto de la MMP-7 sobre la regulación de los elementos de la matriz extracelular, afectando muchos más sustratos de manera indirecta (Tallant et al., 2010).

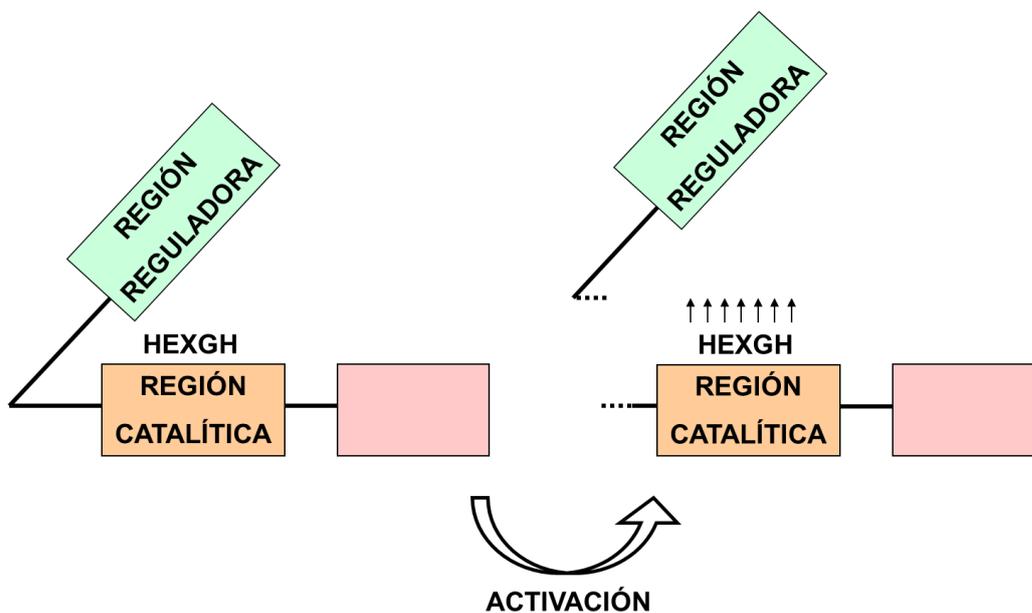


Figura 16: Representación de las MMP. La región reguladora bloquea el dominio HEXGH en el zimógeno. MMP queda activa cuando se pierde esta región reguladora.

La mayoría de las metaloproteinasas son secretadas por células estromales, pero en el caso de MMP-7, su síntesis y excreción son exclusivas de las células epiteliales. El gen que codifica MMP-7 está directamente regulado por la vía de señalización Wnt/ β -catenina (Brabletz et al., 1999), pudiéndose utilizar la expresión de MMP-7 como marcador subrogado de la actividad de

esta vía (He et al., 2012). Las células de Paneth son las encargadas de sintetizar MMP-7 en el intestino sano. Sus funciones principales en este órgano son regular citoquinas inflamatorias, como las defensinas, así como mantener la correcta estructura intestinal (Wilson et al., 1995).

La hiperactividad de la vía de Wnt/ β -catenina en el cáncer colorrectal provoca una desregulación en la síntesis de MMP-7 (Kolligs et al., 2002). Ésta es la única metaloproteinasa que es sintetizada exclusivamente por las células tumorales en vez de por el estroma. MMP-7 facilita la migración celular gracias a la degradación de la membrana basal y de la matriz extracelular, ayudando a los procesos de invasión y de metástasis (Li et al., 2006). Además, la digestión de proteínas estructurales aumenta la accesibilidad de factores de crecimiento atrapados en la matriz extracelular, como el factor de crecimiento relacionado con la Insulina (IGF) (Miyamoto et al., 2007) o el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (Ito et al., 2009). Mediante este último proceso, MMP-7 contribuye a la aparición de la angiogénesis tumoral. Además, Matrilisina es capaz de truncar proteínas celulares de adhesión y de regulación celular, como son la E-cadherina (Lynch et al., 2010) o la proteína RANK (Lynch et al., 2005). Por todo ello, MMP-7 juega un papel muy importante en regular y mantener los procesos básicos para la supervivencia y migración de las células tumorales (Zucker & Vacirca, 2004), incluyendo los procesos de transición epitelio-mesénquima (Gu et al., 2014; Yin et al., 2010). Otro dato destacable sobre la potencial importancia de MMP-7 en el cáncer colorrectal es que el polimorfismo A/G -181, presente en el promotor del gen que codifica

MMP-7, se asocia a un mayor riesgo de cáncer del tracto digestivo, incluyendo intestino grueso (Li et al., 2013).

Desde hace 20 años se ha estado estudiando la posible relación existente entre MMP-7 y el pronóstico de los pacientes diagnosticados de cáncer colorrectal. En 1995, se publicó un trabajo que evaluó la cantidad de ARN mensajero de MMP-7 en tejido sano, tumores primarios y lesiones metastásicas. Los resultados mostraron que las muestras tumorales presentaban mayor ARN respecto al tejido sano. Además, estos valores se asociaban con el estadio de la enfermedad, presentando una concentración mayor en las lesiones metastásicas (Mori et al., 1995). Un año más tarde, se publicó un trabajo independiente que confirmaba estos resultados mediante la misma metodología (Ishikawa et al., 1996). En 1999, un equipo liderado por Adachi evaluó la presencia de la proteína de MMP-7 mediante técnicas inmunohistoquímicas, observando que la presencia de la proteína era también directamente proporcional al estadio tumoral (Adachi et al., 1999), siendo significativamente superior en tumores más avanzados con la máxima presencia en las lesiones metastásicas.

Estos datos demuestran que la expresión de MMP-7 está directamente relacionada con la presencia de invasión a capas profundas o metástasis a ganglios linfáticos u órganos a distancia. En cambio, no se demuestra que la presencia de MMP-7 favorezca estos procesos, o que sea un factor pronóstico de esta enfermedad. En 2001, Masaki publicó un trabajo en el que se evaluó la presencia por inmunohistoquímica de MMP-7 en tumores T1N0M0 resecados,

y se correlacionó la intensidad de MMP-7 con la evolución clínica de los pacientes (Masaki et al., 2001). Con este trabajo se demostró que MMP-7 podría ser un factor pronóstico independiente, asociándose su presencia con la aparición de metástasis y recidivas en este subgrupo de pacientes de buen pronóstico.

Además de la detección en muestras tumorales, que requieren de biopsias y su posterior procesamiento, MMP-7 puede ser analizado en líquidos biológicos mediante técnicas como el análisis cuantitativo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Esta técnica permite realizar medidas seriadas de la concentración de MMP-7 y evaluar la evolución de su expresión sin necesidad de realizar procedimientos invasivos. Esta metodología fue utilizada en un trabajo previo a este proyecto en el que se determinó la concentración plasmática de MMP-7 en pacientes con carcinoma colorrectal (Maurel et al., 2007). Se compararon los valores en controles sanos, pacientes con enfermedad localizada y pacientes con enfermedad metastásica. En este trabajo se demostró que la concentración de MMP-7 era significativamente superior en pacientes con enfermedad metastásica. En este grupo, además los valores en sangre periférica de MMP-7 eran además un factor pronóstico independiente de supervivencia en estos pacientes.

I.III.II BIOMARCADORES DEL TRATAMIENTO CON CETUXIMAB

De manera paralela al desarrollo clínico y comercial de los anticuerpos anti-EGFR, se comenzaron a estudiar los posibles biomarcadores que podrían asociarse a una mayor respuesta o resistencia a estos fármacos. Inicialmente se planteó la sobreexpresión de EGFR como el potencial predictor de respuesta en analogía a los datos clínicos disponibles de otros anticuerpos terapéuticos, como los anti-HER2 (Slamon et al., 2001). Por este motivo, en los primeros ensayos clínicos se reclutaron únicamente pacientes en los que EGFR era detectable mediante técnicas inmunohistoquímicas en el tumor (Baselga et al., 2000).

Conforme el uso de este fármaco fue extendiéndose en la práctica clínica, comenzaron a publicarse casos de pacientes EGFR-negativo que presentaban buena respuesta al tratamiento (Chung et al., 2005), mientras que era patente que una gran proporción de los pacientes EGFR-positivos incluidos en los ensayos clínicos no recibían beneficio de este fármaco. Por lo tanto, la expresión de EGFR como biomarcador presentaba muchas limitaciones al no predecir de manera fidedigna la respuesta y evolución de los pacientes tratados con cetuximab.

Estudios preclínicos y clínicos señalaban que las **mutaciones de KRAS** en el exón 2 conferían resistencia al tratamiento con anticuerpos anti-EGFR (Amado et al., 2008). Por este motivo, los ensayos clínicos concluidos y publicados en

los que se evaluaba la eficacia de cetuximab fueron reanalizados nuevamente, añadiéndose la determinación de las mutaciones de *KRAS*. Los resultados obtenidos mostraron que únicamente los pacientes no mutados podían beneficiarse del tratamiento con cetuximab. En el caso de presentar mutaciones, los resultados eran equivalentes entre el brazo experimental y control. Por ejemplo, en el ensayo CO.17, no existe ninguna diferencia entre los tratamientos en el caso de existir mutación en el gen *KRAS* (mediana supervivencia 4.5 meses versus 4.6 meses, HR 0.99, $p=0.98$), pero en el caso de no presentar mutaciones la diferencia de supervivencia global entre ambos brazos es significativamente superior en el caso de recibir cetuximab (mediana de 9.5 meses) respecto a recibir placebo (mediana 4.8 meses; HR 0.55, $p<0.0001$) (Karapetis et al., 2008).

Éste y otros estudios definieron la presencia de mutaciones en el gen *KRAS* como un marcador predictor de resistencia al tratamiento con anticuerpos anti-EGFR, tanto para cetuximab como para panitumumab. Los organismos estatales regulatorios del medicamento implementaron la obligación de analizar el exón 2 de *KRAS*, y que éste fuera nativo, como requisito previo a la administración de estos fármacos. De esta manera, la determinación del estado mutacional de *KRAS* fue el primer biomarcador validado para la práctica clínica universal en el tratamiento del cáncer colorrectal.

A pesar de la clasificación según el estado del gen *KRAS*, existía un importante número de pacientes sin mutaciones en el exón 2 que no se beneficiaban del

tratamiento con cetuximab. Este hecho hacía prever que probablemente otras proteínas relacionadas con las vías de señalización activadas por EGFR podían estar involucradas. En 2013 se publicó un re-análisis de un ensayo clínico que evaluaba el efecto de panitumumab añadido al esquema de quimioterapia FOLFOX como tratamiento en primera línea (Sidhu et al., 2013). Los resultados iniciales de este estudio mostraron beneficio en los pacientes *KRAS* nativos para el exón 2 (Douillard et al., 2010). En esta actualización, se decidió ampliar el análisis de mutaciones a otros exones de ***KRAS*** y sobre el gen ***NRAS***. El 4% de pacientes clasificados como *KRAS* nativo presentaban mutaciones en el exón 3, y un 6% en el exón 4. Además, otro 7% mostraba mutaciones en el gen *NRAS*: el 3% en el exón 2, el 4% en el exón 3, y no se observaron mutaciones en el exón 4. Añadiendo en el análisis de supervivencia los datos de las mutaciones en los exones 2, 3 y 4 de los genes *KRAS* y *NRAS*, se objetivó que esta ampliación era mejor biomarcador que la detección exclusiva del exón 2 de *KRAS*. Los pacientes que presentaban *NRAS* o *KRAS* nativo se beneficiaban significativamente del tratamiento con panitumumab; objetivándose beneficio en tasa de respuestas, supervivencia libre de progresión y en supervivencia global (en éste último: 26 versus 20.2 meses; HR =0.78; IC 95%= 0.62–0.99; *P*=0.04). Por el contrario, los que presentaban alguna mutación, no sólo no se beneficiaban sino que el tratamiento con panitumumab era pernicioso, presentando peor supervivencia cuando se añadía el anticuerpo al tratamiento (para supervivencia global, mediana de 15.6 meses en los tratados con quimioterapia más panitumumab, contra 19.2 meses en los tratados con quimioterapia exclusivamente; HR=1.25; IC95%=1.02–1.55; *P*= 0.03).

Ante estos resultados obtenidos con panitumumab, se ha iniciado el análisis de los pacientes incluidos en los ensayos clínicos de cetuximab para evaluar si estas mutaciones pueden ser también factor predictivo de resistencia al tratamiento con este fármaco. Los datos obtenidos hasta el momento confirman que las mutaciones en los exones 2, 3 y 4 de *KRAS* como de *NRAS* confieren resistencia al tratamiento con cetuximab (Ciardiello et al., 2014; Tejpar et al., 2014). En la actualidad, las agencias reguladoras sólo permiten el tratamiento de anticuerpos contra EGFR en pacientes que tengan *KRAS* y *NRAS* nativo, obligando a la detección de estas mutaciones previamente a administrar el tratamiento.

A pesar de los avances sobre la correcta selección de los pacientes que reciben tratamiento con cetuximab, y de que este fármaco actúa sobre una diana biológica necesaria para la supervivencia del tumor, en algún momento la enfermedad adquiere resistencia al tratamiento. El mecanismo por el cual las células tumorales se hacen insensibles al bloqueo de EGFR es en gran parte desconocido. Entre la heterogeneidad celular que existe en las neoplasias es posible que exista alguna clona resistente en el momento de iniciarse el tratamiento, y que esta clona se seleccione por la presión selectiva que se realiza con la terapia anti-EGFR, se expanda y provoque la resistencia. O bien, que estas resistencias aparezcan de manera espontánea y se seleccionen las células que las presentan al estar en contacto continuo con el fármaco.

La identificación y detección de los eventos involucrados en la adquisición de resistencia sería de gran importancia en el tratamiento de estos pacientes. Un diagnóstico precoz de estas resistencias podría permitir realizar un tratamiento dirigido sobre ellas o, al menos, modificar la estrategia terapéutica antes de que la progresión del tumor tenga repercusión clínica o radiológica.

A pesar de la importancia que revestiría conocer estos biomarcadores, existen muy pocos datos sobre los mecanismos de resistencia adquirida a cetuximab. Una aproximación experimental es la realización de biopsias tumorales para así poder realizar un estudio mutacional de los tumores antes y después de progresar a un tratamiento basado en cetuximab, y comparar los eventos moleculares para detectar aquéllos específicos de la resistencia al tratamiento (Montagut et al., 2012).

Mediante esta estrategia experimental se describió la mutación S492R de *EGFR* como mecanismo de resistencia adquirida al cetuximab. Este evento molecular induce un cambio de conformación en el receptor EGFR capaz de bloquear la unión a cetuximab, pero mantiene intacta su capacidad para reconocer el sustrato y dimerizar con otros receptores. En el momento de evaluar la actividad de panitumumab en líneas celulares que poseían esta mutación, se objetivó que el fármaco podía todavía reconocer y bloquear EGFR. Esta sensibilidad farmacológica diferenciada no sólo se confirmó en modelos *in vitro*, sino que también fue aplicado con éxito en los propios

pacientes cuyos tumores habían adquirido la mutación S492R al hacerse resistente a cetuximab.

La mutación de S492R aparece en el 5-10% de los casos de resistencia adquirida a cetuximab (Montagut et al., 2012; Morelli et al., 2013), por lo que es necesario ampliar el estudio de otros potenciales mecanismos moleculares involucrados. La adquisición de mutaciones o amplificación de los genes de RAS, importantes en la resistencia primaria al fármaco, es otro de los eventos que podrían estar involucrados en la resistencia tras el tratamiento con cetuximab (Diaz et al., 2012; Misale et al., 2012).

Por otro lado, las técnicas de secuenciación actuales, como la ultrasecuenciación, presentan una gran sensibilidad respecto las técnicas tradicionales y permiten detectar mutaciones presentes en una población minoritaria del tumor. Mediante esta metodología es posible incluso detectar las mutaciones tumorales en el ADN circulante en la sangre del propio paciente y determinar el estatus mutacional del tumor. La aplicación de estas novedosas técnicas en el estudio de eventos moleculares en el cáncer sería de gran interés para determinar posibles mecanismos de resistencia adquirida a cetuximab.