



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Uso de tumoroides y "orthoxenografts" para la identificación de nuevas terapias en cáncer de colon con inestabilidad de microsatélites

Juan Francisco Martín Tejera

**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](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://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](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://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](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://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.

# TESIS DOCTORAL

## USO DE TUMOROIDES Y *ORTHOXENOGRAFTS* PARA LA IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS TERAPIAS EN CÁNCER DE COLON CON INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES

JUAN FRANCISCO MARTÍN TEJERA



UNIVERSITAT<sup>DE</sup>  
BARCELONA

DICIEMBRE 2022, BARCELONA





UNIVERSITAT DE BARCELONA  
FACULTAD DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA

# **USO DE TUMOROIDES Y ORTHOXENOGRAFTS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS TERAPIAS EN CÁNCER DE COLON CON INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES**

Memoria presentada por Juan Francisco Martín Tejera para optar al  
grado de Doctor por la Universitat de Barcelona

Dr. Alberto Villanueva Garatachea  
Director

Dr. Ramón Salazar Soler  
Director

Dr. Francesc Viñals Canals  
Tutor



---

**ÍNDICE**

<b>ÍNDICE</b> .....	<b>1</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS</b> .....	<b>5</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>11</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	<b>13</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>15</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>21</b>
1.1.    Epidemiología y estadiaje.....	23
1.2.    Biología molecular.....	26
1.2.1.    Carcinogénesis.....	28
1.2.2.    Clasificación CMS.....	30
1.3.    Biomarcadores de respuesta y resistencia al tratamiento .....	33
1.3.1.    Inestabilidad de Microsatélites.....	33
1.3.2.    Mutaciones en <i>KRAS/NRAS</i> .....	36
1.3.3.    Mutaciones en <i>BRAF</i> .....	37
1.4.    Tratamiento.....	39
1.4.1.    Cirugía.....	39
1.4.2.    Quimioterapia.....	39
1.4.3.    Agentes biológicos .....	42
1.4.3.1. Inhibidores de EGFR.....	43
1.4.3.2. Inhibidores de BRAF.....	45
1.4.3.3. Inhibidores de la angiogénesis.....	45
1.4.4.    Inmunoterapia.....	47
1.4.5.    Terapia múltiple de dosis bajas (MLD) .....	48
1.5.    Modelos de estudio .....	50
1.5.1.    Modelos <i>in vitro</i> .....	50
1.5.2.    Modelos <i>in vivo</i> .....	53
<b>PREMISAS E HIPÓTESIS</b> .....	<b>55</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>59</b>

<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>63</b>
2.1. Pacientes.....	65
2.2. Generación de modelos <i>orthoxenografts</i> .....	66
2.2.1. Animales y condiciones.....	66
2.2.2. Generación de los modelos <i>orthoxenografts</i> a partir de biopsias humanas de CCR.....	66
2.2.3. Recolección de tumores y órganos.....	67
2.2.4. Inclusión en parafina.....	67
2.2.5. Tinción con hematoxilina-eosina (H&E) .....	67
2.2.6. Extracción de componentes celulares .....	68
2.2.6.1. Extracción de ADN de tejido congelado.....	68
2.2.6.2. Extracción de ADN de tejido en parafina.....	68
2.2.6.3. Cuantificación de ADN .....	70
2.2.6.4. Extracción de proteínas de tejido congelado.....	70
2.2.6.5. Cuantificación del lisado de proteínas.....	71
2.2.7. Análisis moleculares.....	71
2.2.7.1. Inmunohistoquímica .....	71
2.3. Cultivo de organoides tumorales (tumoroides).....	73
2.3.1. Generación de tumoroides a partir de PDOX .....	73
2.3.2. Mantenimiento de líneas de tumoroides.....	75
2.3.3. Pase del cultivo de tumoroides.....	78
2.3.4. Obtención de células individuales de cultivos de tumoroides.....	78
2.3.5. Criopreservación y descongelación de tumoroides .....	79
2.3.6. Identificación y separación de poblaciones humanas y murinas de un cultivo de tumoroides proveniente de PDOX .....	80
2.3.6.1. Extracción de ADN de precipitado celular .....	80
2.3.6.2. Separación de poblaciones celulares humana y murina .....	81
2.3.6.3. Identificación de las poblaciones humanas y murinas por citometría .....	82
2.3.6.4. Identificación de las poblaciones humanas y murinas por PCR .....	82
2.3.7. Inclusión y tinción con H&E de los tumoroides .....	83
2.4. Cultivo de líneas celulares en monocapa .....	84
2.4.1. Generación de líneas celulares en monocapa a partir de tumoroides.....	84

---

2.4.2.	Pase y mantenimiento de las líneas celulares .....	84
2.4.3.	Test de contaminación por micoplasma .....	85
2.5.	Caracterización morfológica y genética de tumoroides y tejidos tumorales.....	85
2.5.1.	Análisis de microscopía.....	85
2.5.2.	Análisis de inestabilidad de microsátélites .....	86
2.5.3.	Análisis genético de mutaciones .....	88
2.6.	Generación de la librería de fármacos .....	89
2.7.	Experimentos <i>in vitro</i> .....	92
2.7.1.	Ensayos de viabilidad celular contra fármacos .....	92
2.8.	Experimentos <i>in vivo</i> .....	94
2.8.1.	Experimento de terapia combinada en tumores PDOX008 y PDOX010.....	94
2.8.2.	Experimento de monoterapia en tumores PDOX008 (PDOX008_MT) .....	95
2.8.3.	Recolección de tumores y órganos y determinación de la carga tumoral .....	96
2.9.	Análisis estadísticos.....	96
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>97</b>
3.1.	Los organoides tumorales conservan la identidad genética e histopatológica de los tumores <i>in vivo</i> .....	99
3.1.1.	Información clínica.....	99
3.1.2.	Generación y caracterización de los modelos <i>in vivo</i> .....	100
3.1.3.	Generación y caracterización de los modelos <i>in vitro</i> .....	107
3.1.3.1.	Arquitectura de los organoides.....	111
3.1.3.2.	Caracterización genética de las líneas celulares establecidas...116	
3.1.3.3.	Generación de cultivos 2D.....	117
3.1.4.	Comparación modelos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	119
3.2.	Los modelos de tumoroides reproducen la quimiorresistencia observada en los pacientes con ccr metastásico .....	121
3.3.	El uso de tumoroides permite evaluar la eficacia de un gran número de fármacos .....	124
3.3.1.	Ensayos de viabilidad farmacológica en tumoroides.....	124
3.4.	Las combinaciones de fármacos propuestas muestran mejores resultados que la terapia combinada estándar.....	135

---

3.5.	Los tumoroides reproducen la respuesta observada en los experimentos <i>in vivo</i> al tratamiento combinado .....	149
<b>4.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>151</b>
4.1.	PDOX y organoides derivados de tumores como sistema para la investigación oncológica.....	153
4.1.1.	Los tumoroides se generaron de forma satisfactoria directamente de los tumores crecidos en PDOX.....	154
4.1.2.	Los tumoroides mantienen las características de los tumores PDOX y representan la heterogeneidad existente en el CCR. ....	157
4.2.	Los tumoroides como herramienta para el cribado farmacológico .....	160
4.2.1.	Respuesta a la quimioterapia estándar.....	161
4.2.2.	Respuestas a terapias dirigidas .....	163
4.2.2.1.	Inhibidores de ALK .....	163
4.2.2.2.	Respuesta a inhibidores de EGFR.....	166
4.2.2.3.	Respuesta a otros inhibidores RTK (VEGFR, FGFR, PDGFR) .....	168
4.2.2.4.	Respuesta a inhibidores CHK1/2 (Prexasertib).....	172
4.3.	Gran completariedad de los modelos de tumoroides y PDOX .....	174
4.4.	Limitaciones del estudio .....	174
	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>179</b>
	<b>COLABORACIONES.....</b>	<b>183</b>
	<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>185</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

<b>®</b>	Marca registrada
<b>°C</b>	Grados centígrados
<b>µg</b>	Microgramo
<b>µL</b>	Microlitro
<b>µm</b>	Micrómetro
<b>µM</b>	Micromolar
<b>2D</b>	2 dimensiones
<b>3D</b>	3 dimensiones
<b>5-FU</b>	5-Fluorouracilo
<b>AAALAC</b>	<i>Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care</i>
<b>ADMEM</b>	Medio Eagle modificado de Dulbecco avanzado
<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>AJCC</b>	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
<b>AKT</b>	<i>AKT serine/threonine kinase</i>
<b>ALK</b>	Receptor de tirosina quinasa ALK
<b>AP</b>	Anatomía patológica
<b>APC</b>	Poliposis adenomatosa coli
<b>ARN</b>	Ácido Ribonucleico
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>BAX</b>	Proteína X asociada a Bcl-2
<b>BME</b>	<i>Basement Membrane Extract</i>
<b>BMP</b>	Proteína morfogenética ósea
<b>BRAF</b>	Serina / treonina-proteína quinasa B-Raf
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino
<b>CAFs</b>	Fibroblastos asociados a cáncer
<b>CAP</b>	Capecitabina
<b>CAPIRI</b>	Capecitabina + irinotecan
<b>CAPOX</b>	Capecitabina + oxaliplatino
<b>CCR</b>	Cáncer colorrectal
<b>CCRHNP</b>	Cáncer colorrectal hereditario no asociado a poliposis
<b>CCRm</b>	Cáncer colorrectal metastásico
<b>CERIT</b>	Ceritinib
<b>CHK1</b>	<i>checkpoint kinase 1</i>
<b>CIMP</b>	Fenotipo metilador de islas CpG

<b>CIN</b>	Inestabilidad Cromosómica ( <i>Chromosomal instability</i> )
<b>c-MET</b>	<i>MET proto-oncogene</i>
<b>CMSs</b>	Subtipos moleculares consenso ( <i>Consensus Molecular Subtypes</i> )
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>CpG</b>	Citocina-fosfato-Guanina
<b>CRISC</b>	<i>CRC Subtyping Consortium</i>
<b>CRIZO</b>	Crizotinib
<b>CTLA-4</b>	<i>cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4</i>
<b>CTNNB1</b>	β-catenina 1
<b>DFS</b>	Supervivencia libre de enfermedad
<b>dMMR</b>	Deficiencia del sistema de reparación de errores de emparejamiento
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>dNTPs</b>	Desoxinucleótido trifosfato
<b>DPBS</b>	Solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EGFR</b>	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
<b>EMA</b>	Agencia Europea del Medicamento
<b>EMT</b>	Transición epitelio-mesénquima
<b>FAP</b>	Poliposis adenomatosa familiar
<b>FBS</b>	Suero bovino fetal
<b>FDA</b>	Administración de Alimentos y Medicamentos
<b>FdUTP</b>	5-fluorodesoxiuridíntrifosfato
<b>FGFR</b>	Receptor del factor de crecimiento fibroblástico
<b>FLT1 (VEGFR1)</b>	Receptor de factor de crecimiento endotelial 1
<b>FLT4 (VEGFR3)</b>	Receptor de factor de crecimiento endotelial 3
<b>FOLFIRI</b>	5-Fluorouracilo + irinotecan
<b>FOLFOX</b>	5-Fluorouracilo + Oxaliplatino
<b>Frameshift</b>	Desplazamiento del marco de lectura
<b>g</b>	Gramo
<b>GEF</b>	Gefitinib
<b>GTPasa</b>	Guanosina trifosfatasa
<b>h</b>	hora
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina-eosina
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Agua oxigenada
<b>H<sub>2</sub>O<sub>d</sub></b>	Agua destilada
<b>HCl</b>	Ácido clorhídrico

<b>hEGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico humano
<b>HEPES</b>	Ácido 4-(2-hidroxietil) piperazin-1-iletanosulfónico
<b>HER-2 (ERBB2)</b>	Receptor tirosina-proteína quinasa erbB-2
<b>HNF4A</b>	Factor nuclear 4 alfa de hepatocito
<b>HRAS</b>	<i>HRAS proto-oncogene, GTPase</i>
<b>HUB</b>	Hospital Universitario de Bellvitge
<b>IC50</b>	Concentración inhibidora media máxima
<b>ICIs</b>	Inhibidores de los puntos de control inmunitario
<b>ICO</b>	Instituto Catalán de Oncología
<b>IDIBELL</b>	Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge
<b>IDO</b>	<i>indoleamine 2,3-dioxygenase 1</i>
<b>IGF2</b>	Factor de crecimiento insulínico tipo 2
<b>IHQ</b>	Inmunohistoquímica
<b>IL-6</b>	Interleuquina 6
<b>iPSC</b>	Células madre pluripotentes inducidas
<b>IRI</b>	Irinotecan
<b>IRS2</b>	Sustrato del receptor de insulina 2
<b>KDR (VEGFR2)</b>	Receptor de factor de crecimiento endotelial 2
<b>Kg</b>	Kilogramo
<b>KIT (CD117)</b>	<i>KIT proto-oncogene</i>
<b>KRAS</b>	<i>KRAS proto-oncogene, GTPase</i>
<b>LAG-3</b>	<i>Lymphocyte-activation gene 3</i>
<b>LAPAT</b>	Lapatinib
<b>LOH</b>	Pérdida de heterocigosidad
<b>LV</b>	Leucovorina
<b>M</b>	Molar
<b>MAPK</b>	Proteínas quinasa activadas por mitógeno
<b>MDL</b>	Terapia múltiple de dosis bajas
<b>MEK (MAP2K)</b>	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
<b>Mg<sub>2</sub>Cl</b>	Cloruro de magnesio
<b>MHC-1</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad
<b>min</b>	minuto
<b>mL</b>	Mililitro
<b>MLH1</b>	<i>mutL homolog 1</i>
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mm<sup>3</sup></b>	milímetros cúbicos

<b>MMR</b>	Reparación de errores de emparejamiento ( <i>MisMatch Repair</i> )
<b>MSH2</b>	<i>mutS homolog 2</i>
<b>MSH6</b>	<i>mutS homolog 6</i>
<b>MSI</b>	Inestabilidad de microsatélites ( <i>MicroSatellite Instability</i> )
<b>MSI-H</b>	Inestabilidad de microsatélites alta
<b>MSS</b>	Estabilidad de microsatélites
<b>n</b>	Tamaño muestral
<b>NAC</b>	N-Acetil-L-cisteína
<b>NaCl</b>	Cloruro de sodio
<b>NAM</b>	Nicotinamida
<b>ng</b>	Nanogramo
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>NRAS</b>	<i>NRAS proto-oncogene, GTPase</i>
<b>ns</b>	No significativo
<b>NSCLC</b>	Cáncer de pulmón de células no pequeñas
<b>O/N</b>	toda la noche ( <i>overnight</i> )
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>ORT</b>	Ortotópico
<b>OXA</b>	Oxaliplatino
<b>P/E</b>	Penicilina-estreptomicina
<b>PARP1/2</b>	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase 1/2</i>
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBMC</b>	Células mononucleares de sangre periférica
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PD-1</b>	<i>Programmed cell death 1</i>
<b>PDGFR</b>	Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas
<b>PD-L1</b>	<i>Programmed cell death 1 ligand 1</i>
<b>PDO</b>	Organoides derivados de pacientes ( <i>Patient derived organoids</i> )
<b>PDOX</b>	Xenoinjerto ortotópico derivados del paciente ( <i>Patient Derived Orthotopic Xenografts</i> )
<b>PDOXT</b>	Tumoroide derivado de xenoinjerto ortotópico derivado del paciente ( <i>Patient Derived Orthotopic Xenografts Tumoroids</i> )
<b>PDX</b>	Xenoinjerto derivado de paciente ( <i>Patient Derived Xenografts</i> )
<b>PEG2</b>	Prostaglandina E2
<b>PFS</b>	Supervivencia libre de progresión
<b>PhD</b>	<i>Doctor of Philosophy</i>
<b>PI3KCA</b>	Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinasa, subunidad catalítica alfa
<b>PMS2</b>	<i>PMS1 Homolog 2, Mismatch Repair System Component</i>

<b>PREX</b>	Prexasertib
<b>r.p.m.</b>	Revoluciones por minuto
<b>Ref.</b>	Referencia
<b>REGO</b>	Regorafenib
<b>RET</b>	<i>ret proto-oncogene</i>
<b>RIPA</b>	<i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
<b>ROCK</b>	Proteína quinasa asociada a Rho
<b>RTK</b>	Receptor tirosina quinasa
<b>screening</b>	cribado
<b>SD</b>	Desviación estándar
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>SG</b>	Supervivencia global
<b>SMAD2/3</b>	<i>SMAD family member 2 / SMAD family member 2</i>
<b>SMAD4</b>	<i>SMAD family member 4</i>
<b>SORA</b>	Sorafenib
<b>SPF</b>	Condición libre de patógenos
<b>T.A.</b>	Temperatura ambiente
<b>Taq</b>	polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
<b>TBE</b>	Tris, borato y EDTA
<b>TGFB</b>	Factor de crecimiento transformante $\beta$
<b>TGFBR2</b>	Receptor del factor de crecimiento transformante $\beta$ 2
<b>Tis</b>	Tumor <i>in situ</i>
<b>TK</b>	Tirosina quinasa
<b>TKI</b>	Inhibidor tirosina quinasa
<b>TNM</b>	Tumor-nódulo-metástasis
<b>TP53</b>	<i>Tumor protein p53</i>
<b>TS</b>	Timidilato sintasa
<b>TSC</b>	Tumor subcutáneo
<b>™</b>	Marca comercial
<b>U</b>	Unidades
<b>V600E</b>	Sustitución de valina por ácido glutámico
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento endotelial
<b>VEGFR</b>	Receptor del factor de crecimiento endotelial
<b>VEH</b>	Vehículo
<b>VEMU</b>	Vemurafenib
<b>wt o WT</b>	<i>wild-type</i> (salvaje o nativo)



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema general desarrollado durante la tesis doctoral.....	19
Figura 2. Incidencia del CCR.....	23
Figura 3. Modelo de progresión tumoral de Fearon y Vogelstein.....	28
Figura 4. Resumen de las características de los grupos de clasificación CMS .....	32
Figura 5. Efecto de la mutación <i>BRAF</i> (V600E) en la vía de las MAPK.....	38
Figura 6. Esquema para la generación de tumoroides y la elaboración de los ensayos de viabilidad celular.....	92
Figura 7. Metástasis en <i>orthoxenografts</i> .....	101
Figura 8. Patrones histológicos de las muestras de CCR PDOX001 y PDOX002 ..	103
Figura 9. Patrones histológicos de las muestras de CCR PDOX003, PDOX004 y PDOX005.....	104
Figura 10. Patrones histológicos de las muestras de CCR PDOX006, PDOX007 y PDOX008.....	105
Figura 11. Patrones histológicos de las muestras de CCR PDOX009 y PDOX010. .....	106
Figura 12. PCR Humano/ratón .....	108
Figura 13. Análisis de los resultados de citometría de flujo .....	109
Figura 14. Estructura de los tumoroides iPDOXT001 .....	112
Figura 15. Estructura de los tumoroides iPDOXT002 .....	113
Figura 16. Estructura de los tumoroides iPDOXT004 .....	114
Figura 17. Estructura de los tumoroides iPDOXT008 .....	114
Figura 18. Estructura de los tumoroides iPDOXT009 .....	115
Figura 19. Estructura de los tumoroides iPDOXT010 .....	116
Figura 20. Comparación de los cultivos 3D y los 2D .....	118
Figura 21. Comparativa histológica de la muestra PDOX001 y iPDOXT001 .....	120
Figura 22. Comparativa histológica de la muestra PDOX002 y iPDOXT002 .....	121
Figura 23. Ensayos de viabilidad farmacológica con la terapia estándar en tumoroides.....	123
Figura 24. Inhibidores de ALK .....	125
Figura 25. Inhibidores de EGFR.....	126

Figura 26. Ensayo de viabilidad celular tras el tratamiento con lapatinib .....	127
Figura 27. Inhibidores de receptores tirosina quinasa (RTK).....	129
Figura 28. Ensayo de viabilidad celular tras el tratamiento con regorafenib.....	130
Figura 29. Fármacos inhibidores del ciclo celular (CDK4/6) y MEK1/2 .....	131
Figura 30. Fármacos inhibidores del mecanismo de reparación del ADN .....	132
Figura 31. Fármacos sin efecto sobre los tumoroides de CCR 1 .....	133
Figura 32. Fármacos sin efecto sobre los tumoroides de CCR 2 .....	134
Figura 33. Fármacos sin efecto sobre los tumoroides de CCR 3 .....	135
Figura 34. Resultados del tratamiento en tumores PDOX008 y PDOX010 .....	137
Figura 35. Análisis histopatológicos tras la respuesta a tratamientos en PDOX010 .....	140
Figura 36. Análisis histopatológicos tras la respuesta a tratamientos en PDOX008 .....	143
Figura 37. Resultados del tratamiento en monoterapia en tumores PDOX008 ..	145
Figura 38. Análisis histopatológicos tras la respuesta a tratamientos en monoterapia en PDOX008. ....	147
Figura 39. Evaluación de la proliferación mediante IHQ para Ki67.....	148
Figura 41. Respuesta celular en iPDOXT008 a los tratamientos combinados.....	150
Figura 42. Respuesta celular en iPDOXT010 a los tratamientos combinados.....	150
Figura 43. Vía de señalización de ALK.....	165
Figura 44. Vía de señalización de la familia ErbB.....	168

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Estadiaje del CCR con la clasificación basada en el sistema TNM.....	26
Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados para la detección de proteínas por inmunohistoquímica.....	72
Tabla 3. Preparación mezcla enzimática del “Tumor Dissociation Kit, human” .....	74
Tabla 4. Diluciones recomendadas para sembrar la suspensión celular .....	75
Tabla 5. Lista de factores y reactivos para el cultivo de tumoroides .....	76
Tabla 6. Volúmenes de los factores necesarios para preparar el medio DMEM/F- 12+++ .....	77
Tabla 7. Volúmenes de los factores necesarios para preparar el Medio Completo .....	77
Tabla 8. Cebadores para la identificación de las poblaciones humanas y murinas .....	83
Tabla 9. Cebadores para la detección de la contaminación por micoplasma.....	85
Tabla 10. Cebadores para la amplificación de los microsatélites.....	86
Tabla 11. Condiciones de las PCR para la amplificación de los microsatélites.....	87
Tabla 12. Cebadores para la amplificación de los genes <i>BRAF</i> y <i>KRAS</i> .....	88
Tabla 13. Condiciones de las PCR para la amplificación de los genes <i>BRAF</i> y <i>KRAS</i> .....	88
Tabla 14. Biblioteca de fármacos elaborada para los experimentos en tumoroides .....	90
Tabla 15. Fármacos utilizados y las concentraciones empleadas en los ensayos de viabilidad celular.....	93
Tabla 16. Esquema de los experimentos en <i>orthoxenografts</i> con tumores implantados de la muestra PDOXT008 .....	94
Tabla 17. Esquema de los experimentos en <i>orthoxenografts</i> con tumores implantados de la muestra PDOXT010 .....	95
Tabla 18. Esquema de los experimentos con monoterapia en <i>orthoxenografts</i> con tumores implantados de la muestra PDOXT008.....	95
Tabla 19. Información clinicopatológica de interés de las muestras recibidas ...	100

Tabla 20. Resultados de la caracterización genética de los tumores en <i>orthoxenografts</i> .....	107
Tabla 21. Información y correlación de las identificaciones en los pacientes, <i>orthoxenografts</i> y tumoroides .....	110
Tabla 22. Resultados de la caracterización genética de los tumoroides .....	117
Tabla 23. Características de las líneas control.....	119
Tabla 24. Peso de los ratones al inicio y final del experimento de terapia combinada con el tumor PDOX010 .....	138
Tabla 25. Tratamiento de los inhibidores de receptores tirosina quinasas angiogénicos.....	170

# **RESUMEN**



En las últimas décadas se ha producido una tendencia a la estabilización en la mortalidad del cáncer colorrectal (CCR) atribuido, en mayor parte, a la disponibilidad de terapias más efectivas y sensibles para la enfermedad tanto en estadios tempranos como avanzados. Los programas de detección ayudan a reducir la incidencia del CCR, pero casi una cuarta parte de los casos se diagnostican en etapas avanzadas, con presencia de metástasis (CCRm). En CCRm sólo un 10-15% de los tumores tratados en primera línea con 5-Fluorouracilo (5-FU) responden de forma satisfactoria. Hoy en día, se sigue sin saber exactamente la causa de la quimioresistencia de los tratamientos de primera línea, provocando una recaída principalmente de los pacientes con inestabilidad de microsatélites (MSI), reduciendo su tasa de supervivencia. En los últimos años, la llegada de las inmunoterapias ha demostrado ser muy prometedora para mejorar la supervivencia de los pacientes de CCR con genotipo MSI.

En los tumores colorrectales avanzados, la MSI representa alrededor del 3-5% de los casos, asociándose a un mal pronóstico y a un factor predictivo de la falta de respuesta a la quimioterapia basada en 5-FU. Por tanto, la presencia de MSI aporta información importante para decidir la administración de terapias adyuvantes ya que se considera únicamente un factor de buen pronóstico en enfermedad localizada, pero no en enfermedad metastásica. Por otro lado, la presencia de mutaciones en el gen *BRAF* se da de forma mayoritaria en este tipo de tumores, siendo la supervivencia global (SG) muy inferior para estos pacientes en comparación con los que no presentan la mutación. Las alteraciones de este gen se considera un factor de mal pronóstico en CCRm, siendo tema de debate en enfermedad localizada.

Así, en este contexto, es importante profundizar en el conocimiento de los mecanismos de resistencia a las diferentes terapias en este subgrupo de tumores inestables. Para lo cual, en este estudio se ha combinado la generación de modelos preclínicos avanzados, como son el uso de sistemas *in vivo* (*orthoxenografts*) o PDOX (*Patient Derived Orthotopic Xenografts*) con la generación de modelos *in vitro* de organoides tumorales (tumoroides). Ambos modelos reproducen con éxito las características histopatológicas y genéticas de

los tumores primarios de los pacientes de los que proceden. El establecimiento de un pequeño biobanco de tumoroides ha permitido evaluar la efectividad de una librería de 42 compuestos entre los que se encuentran, además de los quimioterápicos 5-FU, oxaliplatino e irinotecan, inhibidores de las principales vías involucradas en el desarrollo del cáncer: EGFR/HER-2, VEGFR/FGFR/PDGFR, ALK, BRAF, MEK, entre otros. De todos ellos, para los tratamientos que se obtuvieron resultados significativos se evaluó su efectividad terapéutica *in vivo* en los modelos *orthoxenografts*. Una alta correlación positiva se ha observado entre los dos sistemas. La combinación de la terapia dirigida con los fármacos resultantes, y la terapia estándar basada en 5-FU e irinotecan, ofrece buenos resultados en estos pacientes, independientemente de su estado de MSI.

Nuestro estudio de una forma global, y a pesar de la gran heterogeneidad característica de las muestras de CCRm/MSI, puede abrir nuevas perspectivas sobre la administración de otras terapias en estos pacientes y su posible integración en la medicina personalizada con el uso coordinado de tumoroides/PDOX.

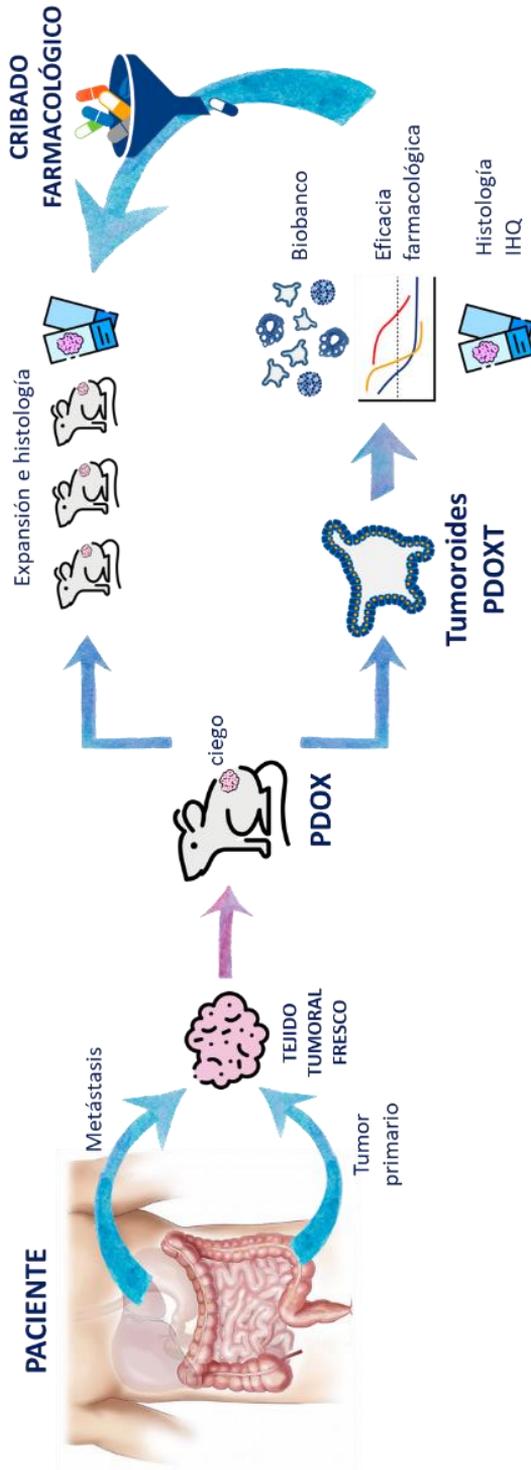


Figura 1. Esquema general desarrollado durante la tesis doctoral.

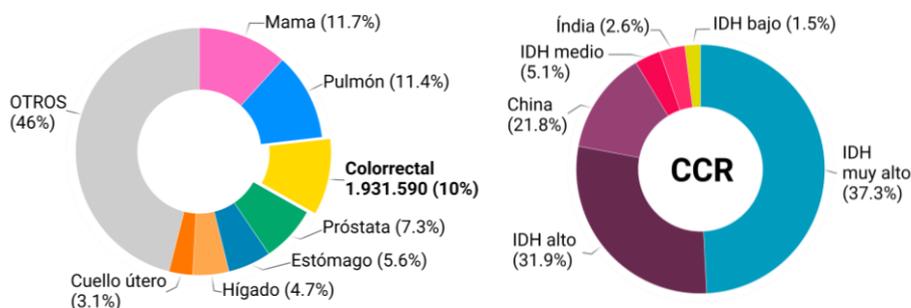


# **1. INTRODUCCIÓN**



## 1.1. EPIDEMIOLOGÍA Y ESTADIAJE

El **cáncer colorrectal (CCR)** es la tercera causa más frecuente de cáncer en el mundo y la segunda causa de mortalidad por cáncer. En 2020, se estimó que ocurrieron más de 1.9 millones de nuevos casos, y se reportaron 935.000 muertes, lo que representa aproximadamente uno de cada 10 casos de cáncer y muertes en todo el mundo, según la Organización Mundial de la Salud (OMS). En cuanto a la prevalencia por sexo, el CCR es el segundo cáncer más común diagnosticado en mujeres y el tercero en hombres, siendo la incidencia y mortalidad en mujeres aproximadamente un 25% más bajas que en hombres. Estas tasas también varían geográficamente, con incidencias cuatro veces más elevadas en los países desarrollados en comparación con los países en vías de desarrollo (Figura 2). Sin embargo, esta variación no es tal cuando se trata de mortalidad, ya que es muy superior en los países que se encuentran en vías de desarrollo [1].



**Figura 2. Incidencia del CCR.** Número de casos estimados de CCR en 2020 en ambos sexos y todos los rangos de edad. A la izquierda el número total de casos con relación a todos los tipos de cánceres y a la derecha, la distribución de la incidencia del CCR respecto al Índice de Desarrollo Humano (IDH). GLOBOCAN 2020.

En las últimas décadas se ha producido una tendencia a la estabilización y disminución en la mortalidad del CCR, dándose principalmente en los países altamente desarrollados. Esto se ha atribuido en mayor parte a los programas de *screening* poblacionales a nivel nacional, la estandarización de la atención preoperatoria y postoperatoria, mejores técnicas quirúrgicas y a la disponibilidad

de terapias cada vez más efectivas y sensibles, tanto para la enfermedad en estadio temprano como avanzado [2], [3]. A pesar de la aparición de los programas de *screening* para la detección precoz del CCR, casi una cuarta parte de los casos se siguen diagnosticando en etapas avanzadas, con presencia de metástasis, y el 20-25% de los casos restantes pueden desarrollarlas durante el transcurso de la enfermedad. Hecho éste que resulta en dificultades en el control quirúrgico curativo de la enfermedad, aumentando la mortalidad de los pacientes. Mientras que la tasa de supervivencia a 5 años para el CCR es de aproximadamente del 64%, esta cae drásticamente al 12% para el cáncer colorrectal metastásico (CCRm) [4].

En los estudios epidemiológicos, la presencia tanto de factores de riesgo hereditarios como ambientales tienen un papel relevante en el desarrollo del cáncer colorrectal. Los antecedentes familiares son un factor de riesgo importante para esta enfermedad donde parecen intervenir en aproximadamente el 10-20% de todos los pacientes de CCR [5]–[7]. Sin embargo, el riesgo es variable encontrando aumentos de riesgo relativo hasta 2,25 veces para los individuos con un familiar de primer grado con CCR o de 3,87 cuando el familiar es diagnosticado antes de los 45 años [8]. Un subgrupo de en torno al 5-10% de los pacientes de CCR está afectado por los **síndromes de cáncer colorrectal hereditario**. Los síndromes hereditarios se pueden subdividir en síndromes no polipósicos (CCRHNP) (síndrome de Lynch y cáncer colorrectal familiar) y síndromes polipósicos. Los síndromes de poliposis son más fáciles de reconocer, ya que el médico ve alertado por el número de pólipos, es el ejemplo de la poliposis adenomatosa familiar (FAP). Este síndrome está causado por mutaciones en el gen de la poliposis adenomatosa coli (*APC*), que controla la actividad de la vía de señalización Wnt. Por otro lado, el síndrome de Lynch (no polipósico) se puede pasar por alto con cierta frecuencia, ya que estos pacientes tienen pocos adenomas y estos se parecen morfológicamente a lesiones esporádicas. Otro de los factores relevantes en el desarrollo del CCR, son los cambios hacia un estilo de vida más sedentario que llevan a una disminución de la actividad física y, por consiguiente, una mayor prevalencia de exceso de peso

corporal asociándose con un mayor riesgo de padecer CCR. Por último, factores de riesgo adicionales como el consumo excesivo de alcohol, el tabaquismo, el consumo de carne roja y/o procesados, el sexo masculino y la edad podrían contribuir a la incidencia de la enfermedad en la población mundial [9].

A pesar de los múltiples avances que se han hecho en las bases moleculares de la enfermedad, la detección temprana sigue siendo el enfoque más efectivo en los casos de CCR. Tras el diagnóstico, los tumores se estratifican en función de la propagación del cáncer en el paciente, para determinar su gravedad asignándoles un estadio (I-IV). El estadio describe cómo de avanzado está y ayuda a saber qué grave es, así como la mejor manera de tratarlo. El estadiaje en base al TNM (Tumor / Nódulo / Metástasis) del *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) continúa siendo hoy en día el estándar clínico para obtener información sobre el pronóstico y manejo de los pacientes (Tabla 1). Método que se basa en tres puntos: El tamaño del tumor (T), la propagación a los nódulos linfáticos adyacentes (N) y la propagación (metástasis) a sitios distantes (M). Sin embargo, a pesar de que dos pacientes con CCR se encuentren en la misma etapa de la enfermedad, exhiben una variabilidad considerable en el resultado clínico que, probablemente, esté relacionado con la heterogeneidad del tumor a nivel molecular. Por lo tanto, este estadiaje del CCR no analiza ningún aspecto molecular del tumor, haciendo que el sistema actual TNM presente limitaciones para considerarse como la única herramienta para las decisiones terapéuticas [10], [11]. Una correcta clasificación molecular de CCR puede identificar subgrupos de pacientes con riesgo variable de recurrencia y mortalidad, y para quién los enfoques terapéuticos personalizados pueden ser beneficiosos. Por eso, en los últimos años se han establecido diferentes métodos y modelos de clasificación para el CCR agregando información molecular a la clínica basada en TNM que se explicarán con posterioridad.

**Tabla 1. Estadaje del CCR con la clasificación basada en el sistema TNM.** T, tumor. N, nódulo linfático. M, metástasis. Tis, tumor in situ.

Estadio	T	N	M	Descripción
<b>0</b>	Tis	N0	M0	Carcinoma <i>in situ</i> . Las células tumorales se encuentran situadas en la parte más superficial de la mucosa y en ningún caso la traspasa. No afecta a ganglios linfáticos.
<b>I</b>	T1-2	N0	M0	El tumor afecta a la pared del colon o recto sin traspasar la capa muscular. No existe afectación de ganglios linfáticos.
<b>IIA</b>	T3	N0	M0	El tumor ha infiltrado todas las capas de la pared del colon o recto. No se aprecia afectación ganglionar.
<b>IIB</b>	T4	N0	M0	
<b>IIIA</b>	T1-2	N1	M0	El cáncer ha invadido los órganos más próximos y afecta a los ganglios linfáticos.
<b>IIIB</b>	T3-4	N1	M0	
<b>IIIC</b>	T1-4	N2	M0	
<b>IV</b>	T1-4	N0-2	M1	El cáncer se ha diseminado afectando a órganos alejados del colon o recto como hígado, pulmón o huesos.

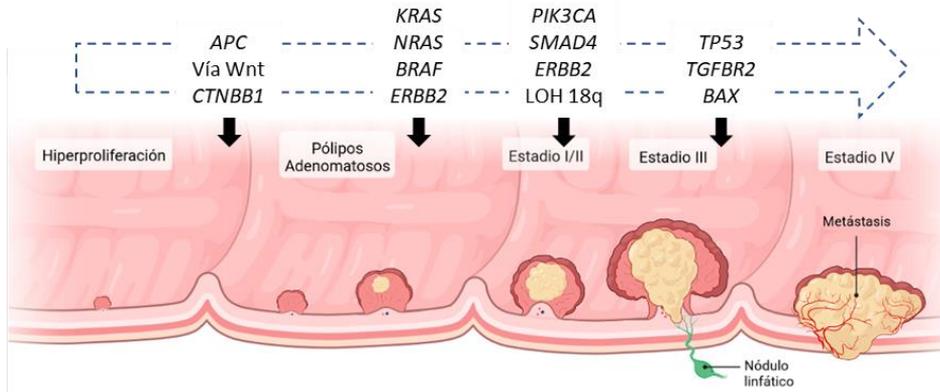
## 1.2. BIOLOGÍA MOLECULAR

El CCR es una enfermedad altamente heterogénea y compleja a nivel clínico y molecular. Se trata de una enfermedad multifactorial que ocurre debido a alteraciones genéticas y epigenéticas secuenciales y acumulativas, que incluyen genes supresores tumorales, genes reguladores del ciclo celular y la vía de **reparación de errores de emparejamiento** (MMR) del ADN. El modelo clásico de progresión tumoral del CCR es el descrito por Fearon y Vogelstein en 1989 [12], [13]. La mayoría de los cánceres colorrectales son adenocarcinomas, que se desarrollan a partir de células epiteliales glandulares de las criptas del colon y

recto. Este modelo propone que los tumores de CCR malignos (carcinomas) evolucionan de tumores benignos preexistentes (adenomas) de forma gradual, es decir a partir de lesiones menos agresivas dan lugar a neoplasmas más letales. Proceso que ocurre por la acumulación secuencial alteraciones genéticas (mutaciones, pérdidas de alélicas...) y epigenéticas y, suele tardar de 10-15 años en producirse. En determinados contextos (p. ej. en pacientes con síndrome de Lynch) este proceso puede progresar de una forma más rápida [7].

La mutación que inicia todo este proceso carcinogénico generalmente ocurre en el gen supresor tumoral *APC*, lo que conduce a una acumulación de  $\beta$ -catenina en el núcleo de las células, dando lugar a la activación constitutiva de la vía de señalización Wnt. Esta vía está alterada en más del 90% de los CCR, incluyendo tanto la inactivación bialélica del gen *APC*, así como la activación de *CTNNB1* ( $\beta$ -catenina). Cambios que conducen a la acumulación nuclear de  $\beta$ -catenina y a una proliferación celular incontrolada. La vía de señalización de Wnt contiene genes implicados en la tumorigénesis y la invasión celular. Las alteraciones posteriores en otros genes, entre las que se encuentran las mutaciones en *KRAS*, *SMAD4*, *SMAD2/3*, *BRAF*, *PI3KCA* y *TP53*, contribuyen a la transición hacia carcinoma, y por tanto a la ganancia de agresividad tumoral (Figura 3) [14]. Este modelo de progresión tumoral sugiere que la genética (p. ej. mutaciones en *APC*) y los cambios epigenéticos (p. ej. metilación del ADN) se acumulan con el tiempo, y es la acumulación secuencial de estos cambios, que ocurren en un orden preferencial, pero no invariable, lo que se asocia con la evolución de las neoplasias de colon [15]. Otra característica relevante de este modelo de progresión es que se requieren al menos de cuatro a cinco mutaciones para la formación de un tumor maligno. Mutaciones que alteran la función de las proteínas, siendo activadoras cuando afectan a oncogenes e inactivadoras en el caso de genes supresores tumorales. Estas mutaciones incluyen cambios en el ciclo celular y en la reparación del ADN. Sin embargo, este concepto de mutaciones "secuenciales" ha sido cuestionado por la observación de que los tumores individuales muestran una gran heterogeneidad en sus patrones de alteraciones genéticas, cambios epigenéticos y expresión génica. Por lo que hoy

en día se cree más que es la acumulación y la cooperación funcional entre los cambios genéticos y epigenéticos, en vez del orden de aparición, lo que realmente impulsa la carcinogénesis [16].



**Figura 3. Modelo de progresión tumoral de Fearon y Vogelstein.** Este modelo molecular de la carcinogénesis y la progresión tumoral del CRC está basado en la acumulación secuencial de eventos genéticos que se asocian a la transición de adenomas a carcinoma. LOH, pérdida de heterocigosidad.

### 1.2.1. Carcinogénesis

Existen tres vías moleculares principales en la carcinogénesis colorrectal: inestabilidad cromosómica (CIN) [17], inestabilidad de microsatélites (MSI) [18] y fenotipo metilador de islas CpG (CIMP) [19].

El más común es la existencia de CIN, presente en aproximadamente el 70-80% de los casos de CCR. Esta vía se caracteriza por la presencia de desequilibrios en el número y en alteraciones en la estructura de los cromosomas. Esto da lugar a tumores con aneuploidías, reordenamientos cromosómicos y/o con pérdida de heterocigosidad (LOH) en los *loci* de oncogenes y genes supresores de tumores. Los mecanismos que subyacen a la CIN incluyen alteraciones en la segregación cromosómica, disfunción de los telómeros y respuesta al daño del ADN, que afectan a genes críticos implicados en el mantenimiento de la correcta función celular, como *APC*, *KRAS*, *BRAF* y *TP53*, entre otros [17], [20]. Estas mutaciones son las que se describen en la secuencia adenoma-carcinoma descrita por Vogelstein cuyos pasos finales incluye la

alteración cromosómica y la inactivación del gen supresor de tumores *TP53*. Las vías más relevantes desde el punto de vista clínico afectadas en los tumores CIN son las vías de Wnt y de las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK).

El segundo mecanismo ocurre por una Inestabilidad epigenética de la metilación del ADN, también llamado fenotipo metilador de islas CpG (CIMP). La principal característica de los tumores CIMP es la hipermetilación generalizada de numerosos *loci* de islas CpG de los promotores de los oncogenes, lo que conduce a un silenciamiento genético y a una pérdida de expresión proteica. Los tumores CIMP se identificaron inicialmente en el 30% al 35% de los CCR, pero el análisis de la metilación del ADN de los promotores específicos de CIMP reveló que la vía únicamente representa el 17% de los CCR [21], [22].

Por último, el tercero es **la inestabilidad de microsatélites (MSI)** o deficiencia del sistema de reparación de errores de apareamiento del ADN (dMMR) que ocurre en aproximadamente en el 15% de los pacientes. La MSI puede ser el resultado de la mutación de uno de los genes de reparación del sistema MMR, como son *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* o *PMS2*, o del silenciamiento génico por hipermetilación del promotor de *MLH1*. Dentro de los tumores con MSI encontramos el síndrome de Lynch. El síndrome de Lynch se asocia con mutaciones en la línea germinal de uno de los genes MMR, y aumenta el riesgo de padecer CCR de forma temprana a lo largo de la vida hasta cerca del 80%. También pueden producirse tumores MSI esporádicos debido a la metilación de la secuencia promotora rica en CpG de *MLH1*. Los tumores MSI con hipermetilación representan tres cuartas partes de los CCR hipermutados, mientras que una cuarta parte eran portadores de mutaciones somáticas en los genes MMR o en la ADN-polimerasa.

Las características que puedan definir estos grupos no son únicas. Aunque las vías CIN y MSI suelen ser excluyentes, la vía CIMP se solapa sustancialmente con la vía MSI.

### 1.2.2. Clasificación CMS

Debido a la poca información molecular que puede aportar el estadiaje TNM, en 2014 se consensuó un nuevo sistema de estratificación generando nuevos subgrupos de CCR basados en una clasificación molecular: consenso de subtipos moleculares (**Consensus Molecular Subtypes - CMSs**). Esta clasificación fue elaborada por el *CRC Subtyping Consortium* (CRCSC) y se hizo para integrar en los algoritmos de estratificación de los patrones expresión de genes existentes entre los subtipos de CCR. A partir de datos de transcriptómica, el comportamiento clínico y las características biológicas clave, se trató de integrar y confrontar todas las demás fuentes de datos disponibles (mutación, número de copias, metilación, microARN, proteómica) y evaluar si la asignación del subtipo correlacionaba con el estado del paciente [3], [23].

La clasificación de los casos de CCR, de acuerdo los criterios del CMS basados en la expresión génica, define cuatro subgrupos clínica y moleculares y clínicamente distintos, y representa un marco de estratificación biológica con gran potencial en el desarrollo de biomarcadores: el subgrupo CMS1 (MSI inmune - 14%) con inestabilidad de microsatélites y los subgrupos CMS2 (canónico - 37%), CMS3 (metabólico - 13%) y CMS4 (mesenquimal - 23%) con inestabilidad cromosómica (Figura 4).

**El subgrupo CMS1** abarca la extensa mayoría de los casos que presentan MSI, con un fenotipo hipermutado e hipermetilado en islas CpG (CIMP). Los tumores que se pueden clasificar dentro de este grupo se localizan mayoritariamente en la parte proximal o izquierda del colon, con mayor frecuencia en mujeres, mostrando un patrón histológico de tipo difuso o mucinoso. Están caracterizados a su vez por una expresión elevada de genes asociados con la infiltración inmune, principalmente de T<sub>H1</sub> y células T citotóxicas, mostrando una fuerte activación de las vías de evasión inmunológicas. Signos de una pronunciada respuesta inmunitaria que se atribuyen a la generación *de novo* de múltiples secuencias peptídicas y epítomos inmunogénicos, consecuencia directa de la deficiencia de sistemas de reparación

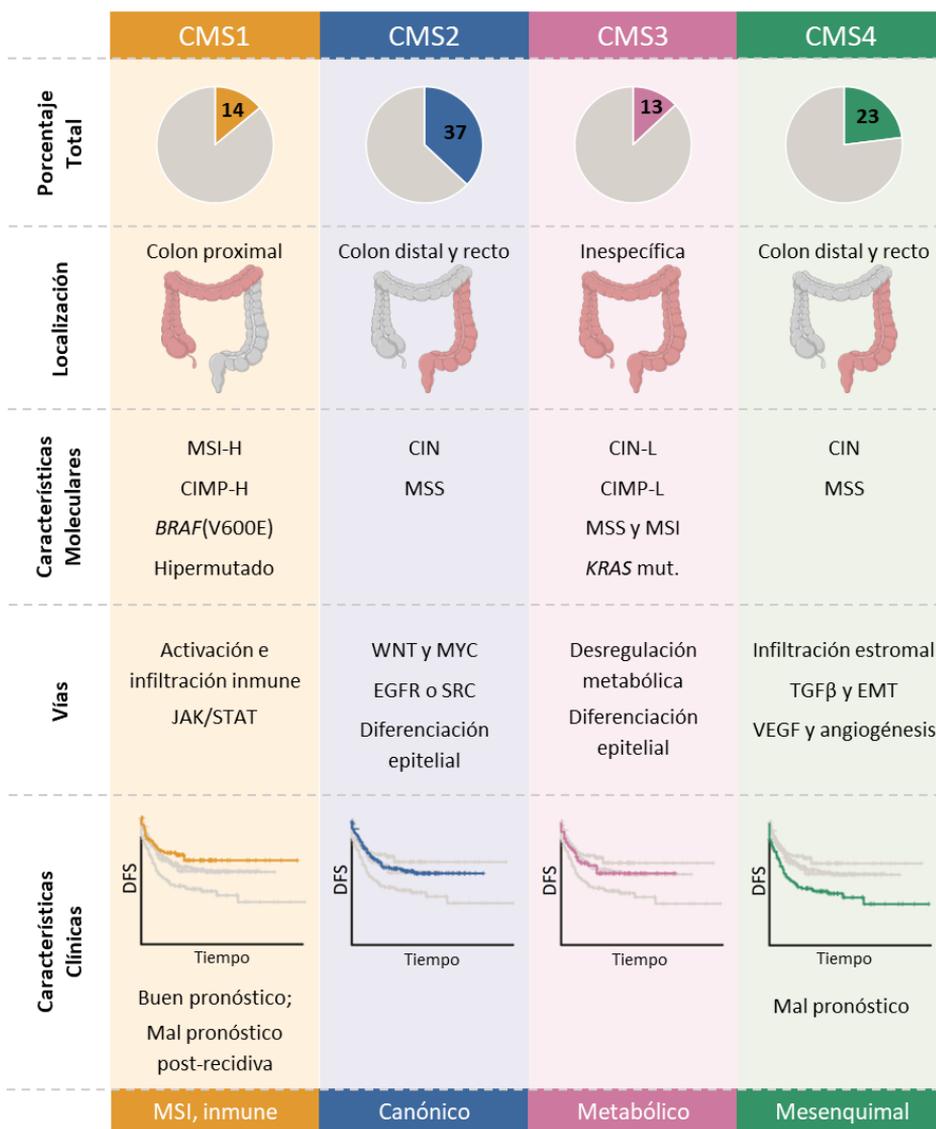
propia de los casos de MSI [24]. Por último, los pacientes con tumores CMS1 presentan tasas de supervivencia muy bajas después de la recidiva. Esta característica puede correlacionar con la alta presencia de mutaciones en el gen *BRAF* en este subgrupo y su mal pronóstico cuando muestran también MSI.

**El subgrupo CMS2** se caracteriza por la presencia de una firma de expresión génica epitelial y una fuerte sobreexpresión de las vías Wnt y Myc, implicadas en la carcinogénesis del CCR. También muestran una mayor expresión de los oncogenes del receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*), *ERBB2* (también conocido como *HER2*), el factor de crecimiento insulínico tipo 2 (*IGF2*), el sustrato del receptor de insulina 2 (*IRS2*) y el factor de transcripción del factor nuclear de los hepatocitos 4 $\alpha$  (*HNF4A*), así como de las ciclinas. A diferencia del anterior, los tumores del subgrupo CMS2 se detectan más frecuentemente en el colon distal o derecho y presentan tasas de supervivencia bastante elevadas tras la recidiva. Del mismo modo, tienen más ganancia en el número de copias de oncogenes y pérdidas de genes supresores de tumores que los otros subtipos, por lo que muestran altos niveles de CIN.

**Los tumores CMS3** tienen un perfil distintivo en comparación con otros grupos CIN, ya que se detectan menos alteraciones en el número de copias. De hecho, hasta un 30% de las muestras de tumores CMS3 presentan MSI, fenotipo hipermutado y niveles medios de hipermetilación génica. A nivel molecular, este subgrupo de tumores está enriquecido con frecuencia por mutaciones activadoras del oncogén *KRAS*, en consonancia con una reprogramación de las vías metabólicas, incluidas la glutaminólisis y la lipogénesis.

Por último, **el subgrupo tumoral CMS4** se caracteriza por la activación de vías relacionadas con la transición epitelio-mesénquima (EMT), como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) e integrinas, y muestran una marcada sobreexpresión de proteínas implicadas en la remodelación de la matriz extracelular y la angiogénesis. Esta característica deriva de la gran infiltración de células estromales como fibroblastos asociados a cáncer (CAFs). También cabe

destacar que este tipo de tumores tienden a diagnosticarse más en etapas avanzadas de la enfermedad y mostrando una peor SG [3], [23], [25]–[27].



**Figura 4. Resumen de las características de los grupos de clasificación CMS.** Los tumores con MSI, en su mayoría el subtipo CMS1, tienen un patrón distintivo asociado a la hipermutación y la hipermetilación, mientras que los tumores con CIN, en su mayoría CMS2-4, se desarrollan según el modelo tradicional propuesto por Vogelstein. Adaptada de Fessler, E. y Medema, J. P. Trends Cancer 2, 505-518 (2016) [28]

Esta nueva clasificación ha representado un paso adelante hacia una mejor comprensión de la biología del CCR desarrollándose un conocimiento más profundo gracias a la integración con datos "ómicos" y nuevos tratamientos.

### **1.3. BIOMARCADORES DE RESPUESTA Y RESISTENCIA AL TRATAMIENTO**

Con los recientes avances en la comprensión de los mecanismos moleculares del desarrollo, diseminación y resistencia a la quimioterapia y la radioterapia en el cáncer, ahora es más sencillo seleccionar la estrategia más adecuada para el tratamiento del CCR. Los estudios clínicos prospectivos y retrospectivos abren la puerta a la utilización de biomarcadores en la práctica clínica para ayudar a seleccionar los mejores fármacos, tanto los tratamientos estándares, como el 5-Fluorouracilo (5-FU), el oxaliplatino (OXA) o irinotecán (IRI), como los fármacos dirigidos a dianas terapéuticas de nueva generación: cetuximab, panitumumab o bevacizumab, entre otros. Estos biomarcadores son la presencia o ausencia de MSI o mutaciones en los genes *BRAF*, *KRAS*, *NRAS*, *PIK3CA* y *TP53*. Por consiguiente, es altamente recomendable combinar la detección de estas mutaciones con el estado de MSI para así poder ofrecer un mejor tratamiento a los pacientes con CCR en estadio II, III y IV [29]. Además, Las pruebas *RAS/RAF* y las pruebas MMR/MSI se analizan como parte de paneles de secuenciación *next-generation* más grandes, lo que permite examinar otras alteraciones de potencial interés.

#### **1.3.1. Inestabilidad de Microsatélites**

Los microsatélites corresponden a secuencias de ADN distribuidas por el genoma, presentes en regiones codificantes o no codificantes, con una estructura repetitiva, es decir, la repetición, un número variable de veces, de un solo nucleótido o de di-, tri- o tetra-nucleótidos. Debido a su longitud y a la presencia de repeticiones en tándem, estas estructuras son especialmente propensas a sufrir errores durante la replicación del ADN en caso de tener deficiencias del sistema MMR. Normalmente, durante la replicación del ADN, los errores de

emparejamiento de pares de bases se corrigen, pero un proceso defectuoso, como consecuencia de la existencia de alteraciones en alguno de estos genes, puede dar lugar a mutaciones de inserción o deleción en los microsatélites, produciéndose la inestabilidad. Siendo de particular relevancia funcional las mutaciones que se dan en los microsatélites situados en las regiones codificantes de los genes, siendo la acumulación de estos fallos los que predisponen a la aparición de tumores malignos [27], [30].

El estado de estabilidad de los microsatélites puede utilizarse como marcador pronóstico en pacientes con CCR, especialmente en los casos en estadio II y III localmente avanzado. Varios estudios han investigado la relación entre la presencia de MSI y la supervivencia en pacientes con CCR y han demostrado que los CCR esporádicos con MSI suelen tener un pronóstico favorable, sobre todo en los tumores en estadio temprano [31], [32]. Por ello, actualmente la OMS clasifica el CCR de tipo mucinoso con MSI alto (MSI-H) como un factor un buen pronóstico para la enfermedad, más que un factor predictivo [33]. Además, en la actualidad, el estado de MSI-H se utiliza para identificar a los pacientes para las pruebas del síndrome de Lynch, para seleccionar a los pacientes con CCR en estadio II de alto riesgo con características adversas para el tratamiento adyuvante y para seleccionar casos de CCR en estadio IV para la inmunoterapia. A pesar de todo ello su utilidad como un robusto biomarcador clínico de supervivencia no ha sido ampliamente adoptada en la práctica clínica a la hora de guiar el pronóstico en el CCR [27].

Las pruebas de MSI se llevan a cabo en el ADN extraído del tejido tumoral y se evalúa analizando los *loci* de los microsatélites, ya sean repeticiones de mononucleótidos o una combinación de repeticiones de di- y mononucleótidos. Existen dos paneles en clínica para el análisis de la estabilidad de los microsatélites. El primer panel de referencia, denominado **panel Bethesda**, consta de dos *loci* mononucleotídicos (BAT-25 y BAT-26) y tres *loci* dinucleotídicos (D2S123, D5S346 y D17S250). Dado que las repeticiones de dinucleótidos son menos sensibles que las repeticiones de mononucleótidos para la detección de MSI, siempre se requiere disponer de ADN no tumoral para poder

comparar. Al utilizar el panel Bethesda, los tumores con inestabilidad en dos o más de estos *loci* se consideran MSI-H y los tumores sin inestabilidad en ninguno de los cinco *loci* se consideran MSS (estabilidad de microsatélites). El segundo es el **panel pentaplex**, que consiste en el análisis de las siguientes cinco repeticiones mononucleotídicas de consenso: BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 y NR-27 o MONO-27. La naturaleza casi monomórfica de estos microsatélites facilita su análisis; tienen varias repeticiones y su tamaño es muy homogéneo en la población caucásica. Utilizando un panel pentaplex, un tumor se considerará MSI si al menos tres de los cinco marcadores son inestables. Un tumor sin inestabilidad, o con un marcador inestable, se clasifica como MSS. Este panel se ha convertido en el nuevo *gold estándar*, en la mayoría de las recomendaciones internacionales para las pruebas MSI; al contrario que el panel Bethesda, no requiere disponer de un tejido no tumoral para la determinación de MSI en el CCR. Ambos paneles de detección de MSI se basan en la amplificación simultánea de cinco marcadores en una PCR multiplex donde los productos generados tras la amplificación migran en la electroforesis capilar, lo que permite la distribución de los marcadores en función de su tamaño [30].

El análisis de la presencia de MSI también puede ser testado por inmunohistoquímica (IHQ) para las 4 principales proteínas MMR (MLH1, MSH2, PMS2 y MSH6). Si todas las proteínas se expresan correctamente en el núcleo, el tumor se considera MSS. La pérdida de la expresión de una o dos proteínas indica que existe dMMR, que está altamente correlacionada con la MSI. Como MLH1/PMS2 y MSH2/MSH6 forman pares funcionales, y MLH1 y MSH2 son necesarios para estabilizar el complejo, cuando se pierden MLH1 o MSH2, también se pierden PMS2 o MSH6. El patrón más común de deficiencia de MMR es la pérdida de MLH1/PMS2 por defecto de MLH1. Sólo un pequeño porcentaje de los tumores con pérdida de MLH1 se debe al síndrome de Lynch, es decir, a una mutación en la línea germinal, mientras que la mayoría de ellos son el resultado del silenciamiento epigenético de la expresión de *MLH1* debido a la hipermetilación del promotor.

### 1.3.2. Mutaciones en *KRAS*/*NRAS*

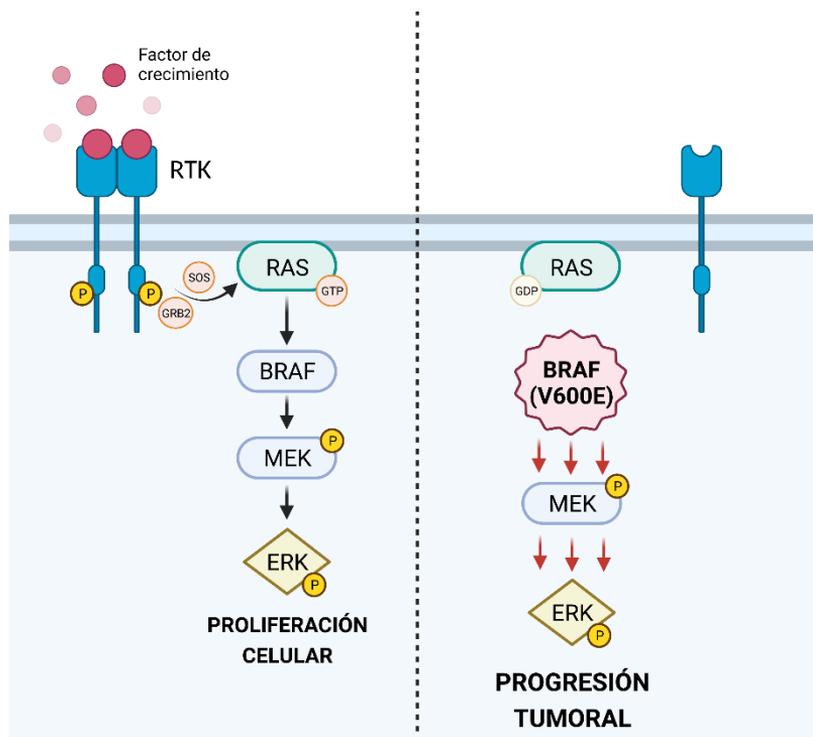
*KRAS* y *NRAS* son miembros de la familia de oncogenes Ras, pequeñas GTPasas importantes en la señalización RAS/MAPK. La activación de esta vía conduce al crecimiento celular, la progresión del ciclo celular, la migración y la supervivencia celular. Las mutaciones en *KRAS* se encuentran en aproximadamente el 40% de todos los casos de CCR, y se localizan con mayor frecuencia en los exones 2 (codón 12, 13) y en menor medida (2-5%) en los exones 3 y 4. Por otro lado, las mutaciones en *NRAS* se encuentran sólo en el 2-5% de todos los casos de CCR y son mutuamente excluyentes con las mutaciones en *KRAS* [34], [35].

La vía de señalización a través de EGFR desempeña un papel importante en el CCR. Se ha demostrado que los anticuerpos monoclonales anti-EGFR se unen al dominio extracelular del receptor bloqueando la señalización descendente, es decir, la vía RAS/RAF/MEK/ERK, aportando un beneficio clínico importante en los pacientes con CCR metastásico [36]. Sin embargo, si una molécula de la vía de señalización está mutada, el anticuerpo anti-EGFR no puede bloquear la vía, lo que provoca resistencia. Las mutaciones de *RAS* conducen a una actividad GTPasa defectuosa, lo que ocasiona una hiperactivación de la cascada de señalización dando como resultado una actividad incontrolada que afecta a las proteínas RAF y las MAPK. Las mutaciones activadoras de *KRAS* afectan con mayor frecuencia al exón 2 [37]. Las primeras pruebas del papel de la mutación del exón 2 de *KRAS* se obtuvieron en pequeñas series retrospectivas [38] y se confirmaron en análisis *post hoc* de ensayos aleatorios de fase III [39]. En 2008 la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos) y la EMA (Agencia Europea del Medicamento) restringieron el uso de los anticuerpos anti-EGFR solo a pacientes con exón 2 “wt” o inalterado para *KRAS*. Años posteriores, tras la finalización en ensayo PRIME [40], que comparaba el uso de 5-FU+OXA (FOLFOX) en combinación o sin panitumumab en pacientes con CCRm, se observó un efecto perjudicial de la adición de panitumumab a la quimioterapia en los pacientes portadores de mutaciones del gen *RAS*. A partir de estos resultados, las agencias reguladoras restringieron el uso de los anti-EFGR a los pacientes sin mutaciones en *KRAS* [41].

Por ello, en la actualidad se recomienda la realización de pruebas mutacionales para los genes de la vía de señalización del EGFR, ya que proporcionan información clínica como predictores negativos del beneficio de las terapias con anticuerpos monoclonales anti-EGFR en CCR [42]. El análisis mutacional debe incluir el estudio de los codones 12 y 13 del exón 2, 59 y 61 del exón 3, y 117 y 146 del exón 4 de *KRAS* y *NRAS*.

### **1.3.3. Mutaciones en *BRAF***

El gen *BRAF* codifica para una proteína serina/treonina quinasa cumpliendo un papel fundamental en la vía de señalización mediada por EGFR. La proteína es activada por *KRAS* y es capaz de controlar el crecimiento, la proliferación y la diferenciación celular a través de la activación de la vía de las MAPK, pero también puede influir en la apoptosis, la migración celular y la supervivencia. Debido a que se encuentra justo debajo de RAS en la vía, las mutaciones en *BRAF* se detectan casi exclusivamente en el tipo salvaje (wt) de *KRAS*, siendo mutuamente excluyentes. La mutación *BRAF* (V600E), que afecta 8-10% de los pacientes con CCRm, genera una proteína constitutivamente activa haciendo que persista la señalización intracelular sin la necesidad de un efector (Figura 5). Los pacientes de CCR que presentan esta mutación tienen un peor pronóstico y una relativa resistencia a la quimioterapia y, tras la progresión, estos pacientes se deterioran clínicamente con rapidez, lo que hace que muchos de ellos no puedan recibir una terapia de segunda línea [43]. Como consecuencia, *BRAF* ha ido adquiriendo un estatus destacado como factor pronóstico negativo en el entorno metastásico, donde los pacientes con mutación *BRAF* muestran una mediana de SG inferior a 12 meses [44], [45].



**Figura 5. Efecto de la mutación *BRAF* (V600E) en la vía de las MAPK.** La presencia de la mutación activadora V600E, provoca una alteración en la proteína que hace que la vía de señalización se mantenga constitutivamente activa sin necesidad de la unión de un ligando a los receptores tirosina quinasa (RTK).

Los datos publicados sugieren que existe un solapamiento significativo entre la presencia de la mutación *BRAF* (V600E) y la presencia de MSI en tumores esporádicos de CCR. En un estudio poblacional sobre el CCR, la mutación *BRAF* (V600E) se ha asociado fuertemente con tumores hipermutados, frecuentemente exhibiendo un fenotipo CIMP o de MSI [46]. Además, los tumores con presencia de mutaciones en este gen tienen características clínicas específicas similares a las ya mencionadas en el subgrupo CMS1 (MSI/dMMR). En un ensayo realizado con 1253 pacientes, donde el 52% de los casos MSI-H eran portadores de la mutación V600E, arrojaron resultados que sugieren que la presencia de esta mutación puede disminuir el buen pronóstico que ofrece el estado MSI-H en el CCR. Sin embargo, no está claro que esta relación se mantenga en los casos avanzados de CCR, en el que los estudios han obtenido resultados contradictorios

[47], [48]. Como se detallará en el siguiente apartado, en el entorno adyuvante, el papel pronóstico de la mutación *BRAF* sigue siendo controvertido, debido a esta fuerte asociación con el genotipo MSI.

## **1.4. TRATAMIENTO**

### **1.4.1. Cirugía**

Por lo general, el tratamiento ideal del CCR es llegar a lograr la extirpación completa del tumor y de las metástasis [7]. Así, la calidad de la resección, la calidad de la estadificación y la selección del tratamiento son hechos cruciales para que el tratamiento resulte eficaz. En general, la cirugía ofrece tasas de supervivencia a 5 años que varían del 44-95%, según el estadio en el que se encuentra la enfermedad [49]. Sin embargo, a pesar de la implementación de diferentes programas de cribado del CCR, casi una cuarta parte de los pacientes se diagnostican en un estadio ya avanzado con presencia de metástasis. Para aquellos pacientes con lesiones no resecables, el objetivo llegar a conseguir una máxima reducción del tumor, siendo la radioterapia y la quimioterapia las principales estrategias para controlar la enfermedad en dichos pacientes [50], [51].

### **1.4.2. Quimioterapia**

A pesar de los avances en la terapia, la supervivencia a los 5 años sigue siendo demasiado baja. Una razón esencial por la que el tratamiento fracasa es la presencia de resistencia innata o adquirida (en el 90% de los pacientes con cáncer metastásico), que sigue siendo uno de los mayores retos en el tratamiento a largo plazo del CCRm [52]. Por tanto, la selección del tratamiento óptimo de primera línea constituye una base crucial de la vía terapéutica para los pacientes con CCRm. En los últimos años, han surgido muchas combinaciones de fármacos como posibles opciones para la terapia de primera línea y la selección del régimen más adecuado representa un reto para los oncólogos médicos. La quimioterapia citotóxica estándar sigue siendo el pilar del tratamiento del CCRm;

sin embargo, la creciente apreciación de los subtipos moleculares del CCR ha dado lugar a recientes avances en la forma de tratar esta enfermedad [43].

El 5-FU es la molécula quimioterapéutica por excelencia que se utiliza actualmente en el tratamiento del CCR. El 5-FU, al ser un análogo del uracilo (FdUTP), se transporta fácilmente al interior de las células, donde la timidilato sintasa (TS) lo convierte en varios metabolitos activos que pueden interferir en la síntesis de nucleótidos, y en consecuencia en la síntesis y función del ADN y el ARN por la incorporación de estas moléculas en las células [53]. El 5-FU forma pares de bases no compatibles, por lo que la incorporación errónea de los FdUTP en las bases del ADN puede desencadenar la activación de las vías de reparación MMR para favorecer su eliminación. Como terapia adyuvante (postoperatoria), la quimioterapia actual para el CCR basada en el 5-FU mejora la supervivencia, de forma general, en pacientes en estadios III tras la resección del tumor, mientras que su papel sigue siendo debatido para la enfermedad en estadio II [54]. Al tratamiento con 5-FU se añade con frecuencia la leucovorina (LV; ácido folínico), un agente que mejora la unión del metabolito activo del compuesto a la TS [55]. La resistencia al 5-FU puede venir dada por diferentes mecanismos que aún siguen sin estar claros en los tumores CCR MSI. Los tumores MSI presentan deficiencias en el sistema de reparación (dMMR), por lo que el daño, al no ser reconocido, no puede ser reparado y se perpetúa. También, se ha descrito que algunas células del CCR se vuelven resistentes al 5-FU debido a una modificación de la unión de la proteína p53 [56]. Por otro lado, los niveles intrínsecos elevados de TS también se han relacionado con la resistencia al 5-FU *in vitro*, *in vivo* y en pacientes, así como alteraciones epigenéticas y genéticas en la glucógeno sintasa quinasa 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), la vía de señalización p38 MAPK y del factor de crecimiento transformador- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y en el microambiente tumoral [52].

Varios estudios de referencia, en los que se incluye el ensayo clínico MOSAIC [57], establecieron que la adición de los regímenes combinados con el OXA, el IRI y la capecitabina (CAP) mejoran la supervivencia en los pacientes en estadio II y III [58]. Aunque hay estudios que sostienen que la terapia de primera línea con monoterapia no es inferior a los regímenes combinados en términos de

SG [59], [60]. Los regímenes de terapia combinada FOLFOX (5-FU+OXA), FOXFIRI (5-FU+IRI), CAPOX (CAP+OXA), y CAPIRI (CAP+IRI) siguen siendo los enfoques principales en el tratamiento de primera línea del CCR, llegando a elevar la SG hasta 20 meses, especialmente en casos metastásicos. El oxaliplatino es un agente alquilante que previene la replicación del ADN y la transcripción, ya que actúa como agente intercalante formando enlaces cruzados entre las bases del ADN. Se ha descrito que su administración amplifica la sensibilidad de los tumores cuando se combina con el 5-FU, en comparación con el uso de estos compuestos de manera individual, en el tratamiento de adyuvancia en CCR [61].

La quimioterapia está asociada a ciertas limitaciones, como la toxicidad sistémica existente, la resistencia innata y adquirida, así como la baja selectividad. La quimioterapia adyuvante se recomienda después de la resección tumoral para todos los pacientes con cáncer de colon en estadio III. Alrededor del 20% de los pacientes que padecen CCR en estadio II y III presentan un fenotipo dMMR/MSI y están asociados con un mejor pronóstico que los tumores MSS. En consecuencia, en vista de un buen pronóstico en estadio II y la alta tasa de curación mediante cirugía, los casos de CCR dMMR/MSI en estadio II no se benefician de la quimioterapia adyuvante con fluoropirimidina [62], [63]. Para los CCR dMMR/MSI en estadio II de alto riesgo con enfermedad localizada con criterios de pronóstico muy pobres, la quimioterapia adyuvante basada en oxaliplatino debe analizarse caso por caso.

Resultados de ensayos clínicos en fase III, y estudios prospectivos muestran resultados contradictorios respecto al valor predictivo del estado MMR y la quimioterapia basada en 5-FU [64]. En algunos estudios se observó un beneficio de supervivencia después del tratamiento con 5-FU en pacientes con MMR positivo, mientras que la dMMR no se asoció con un beneficio de supervivencia después del tratamiento con 5-FU. Por tanto, el tipo de inestabilidad genómica influencia el resultado clínico de los afectados con CCR esporádico debido a que existen diferencias entre las tasas de supervivencia de pacientes con tumores MSI y MSS [65]–[67]. En los casos metastásicos, dMMR/MSI representa solo alrededor del 3-5% de los CCRm y se ha asociado con

mal pronóstico y quimiorresistencia al tratamiento estándar. En estadios avanzados de CCRm sólo un 10-15% de los tumores tratados en primera línea con 5-FU responden de forma satisfactoria [68]. La administración combinada de fluoropirimidinas e irinotecán se ha observado que aumenta la supervivencia libre de enfermedad, y la supervivencia global en estos casos de CCRm. De aquí la necesidad de tomar decisiones terapéuticas en el contexto de las características moleculares de los tumores [69]–[71].

La terapia estándar para el cáncer colorrectal metastásico suele incluir una base de quimioterapia, ya explicada, asociada con un compuesto biológico. Las fluoropirimidinas, el oxaliplatino y el irinotecán forman la columna vertebral de la quimioterapia en varias iteraciones de regímenes de dos o tres fármacos. Los compuestos biológicos, como los anticuerpos anti-VEGF o anti-EGFR, se añaden al régimen de quimioterapia en función de factores específicos del tumor y del paciente.

### **1.4.3. Agentes biológicos**

Las terapias dirigidas o *targeted therapies* con agentes biológicos son una herramienta muy potente que permite actuar sobre las células cancerosas inhibiendo directamente funciones básicas como la proliferación, la diferenciación y la migración celular. El microambiente tumoral, incluidos los vasos sanguíneos locales y las células inmunitarias, también puede ser alterado por los fármacos dirigidos para impedir el crecimiento del tumor y provocar un ataque inmunitario más fuerte y localizado. Las moléculas pequeñas, son actores principales en estas terapias dirigidas. Estas moléculas pequeñas pueden penetrar en las células, actuando en su mayoría dentro de ellas para inactivar enzimas específicas seleccionadas, interfiriendo así en el crecimiento de las células tumorales e incluso desencadenando la apoptosis. Además, en el caso de que las dianas estuvieran situadas fuera de las células, como los receptores de la superficie celular, los anticuerpos monoclonales o los anticuerpos terapéuticos pueden reconocer las células y unirse para regular directamente la progresión del ciclo celular y la muerte [50].

Centrándonos en el cáncer de colon, están los anticuerpos monoclonales dirigidos contra dianas claves de la carcinogénesis colorrectal avanzada como el factor de crecimiento endotelial (VEGF) o el EGFR. Un ejemplo de cada uno de ellos son el bevacizumab (anticuerpo monoclonal anti-VEGF) y el cetuximab (anticuerpo monoclonal anti-EGFR), que fueron los primeros agentes biológicos aprobados por la FDA para el cáncer colorrectal metastásico en 2004. La terapia basada en estos agentes biológicos se usa en estadios avanzados de CCR, y suele combinarse con la quimioterapia. Por ejemplo, diferentes estudios han demostrado que la adición de bevacizumab a otros tratamientos de quimioterapia mejora la supervivencia libre de progresión (PFS), pero no necesariamente la SG [72], [73]. Otros agentes anti-VEGF aprobados para su uso en pacientes con cáncer colorrectal metastásico son el aflibercept (es un receptor señuelo soluble que se une y secuestra al VEGF-A, VEGF-B y PIGF con una mayor afinidad que los receptores endógenos) y el ramucirumab [74]. Al igual que los tratamientos anti-VEGF, los anticuerpos anti-EGFR como el cetuximab o el panitumumab también han demostrado aumentar la PFS en pacientes con CCR metastásico en combinación con 5-FU+OXA o IRI [75], [76].

#### 1.4.3.1. Inhibidores de EGFR

El **receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)** es un receptor de superficie transmembrana ampliamente distribuido en varios tipos celulares que está sobre expresado en muchos tumores malignos. EGFR pertenece a la familia ErbB/HER (receptor del factor de crecimiento epidérmico humano), que consta de cuatro miembros: ErbB1 (EGFR/HER1), ErbB2 (Neu/HER2), ErbB3 (HER3) y ErbB4 (HER4). La activación del EGFR desencadena varias vías de señalización que median en la proliferación y crecimiento celular o el metabolismo, desempeñando papeles vitales en el inicio y la progresión del cáncer. Una vez se ha unido el ligando al dominio extracelular de EGFR, da lugar la activación de las vías RAS/RAF/MEK/ERK y PI3K/AKT/mTOR.

Los métodos dirigidos a la vía del EGFR comprenden típicamente anticuerpos monoclonales anti-EGFR e inhibidores de la tirosina quinasa (TK)

dirigidos a las quinasas intracelulares. Uno de estos fármacos es el mencionado cetuximab. El cetuximab mostró un gran potencial en la mejora de la PFS en pacientes con baja respuesta a la terapia con IRI como único agente. Además, otro estudio demostró que el tratamiento con cetuximab prolongaba la SG y la PFS en pacientes con CCR cuando el tratamiento previo con fluoropirimidinas, IRI y OXA fallaba o estaba contraindicado. Las combinaciones de cetuximab con otras quimioterapias existentes también mostraron resultados prometedores [76]. La eficacia del panitumumab contra el CCR también fue evaluada en el ensayo PRIME cuando se comparó el régimen FOLFOX en combinación con panitumumab o con FOLFOX solo, donde el régimen combinado logró una mejor PFS y SG [40]. Los inhibidores del EGFR, como el cetuximab y el panitumumab han sido objeto de una amplia investigación clínica y han demostrado beneficio en la primera línea en combinación con quimioterapia y en líneas posteriores a través de múltiples investigaciones.

Las mutaciones de *KRAS/NRAS* y *BRAF* conducen a la resistencia primaria a la inhibición del EGFR, además de otras múltiples alteraciones [35]. A diferencia de las mutaciones en *RAS*, las mutaciones en *BRAF*, que comprenden sobre todo la alteración V600E, se han encontrado en el 5-10% de los casos de CCRm y provocan la activación de MAP quinasas independientemente del estado del Ras. Es por ello por lo que los pacientes con mutaciones en *BRAF* muestren resistencia a este tipo de terapias haciendo que su análisis sea relevante para el tratamiento correcto de la enfermedad [77]. Las mutaciones de *BRAF* ocurren de forma independiente de las mutaciones oncogén *KRAS* y están estrechamente relacionadas con una baja respuesta anti-EGFR, por tanto, las directrices actuales recomiendan utilizar cetuximab y panitumumab en los pacientes confirmados sin mutaciones en estos genes. Otros agentes biológicos dirigidos contra EGFR, o la vía relacionada con el EGFR, se están investigando para el tratamiento del CCRm en combinación con regímenes basados en IRI, OXA y 5-FU (erlotinib, gefitinib y sunitinib) [78]. Estos agentes, se diferencian de las terapias basadas en anticuerpos en que entran en las células tumorales e interfieren directamente en

los dominios TK intracelulares del receptor, compitiendo por el sitio de unión al ATP [79].

#### 1.4.3.2. Inhibidores de BRAF

Debido a la alta frecuencia de la presencia de la mutación V600E del gen *BRAF* en CCR, sobre todo en pacientes con MSI, causante de resistencia a terapias contra EGFR ha hecho que diversos estudios hayan buscado terapias alternativas. Unos pocos estudios investigaron el bloqueo de BRAF o de BRAF/MEK utilizando vemurafenib o dabrafenib o mediante inhibidores selectivos de BRAF junto al trametinib. Sin embargo, este inhibidor selectivo de MEK no consiguió mejorar la PFS ni la SG de los pacientes con CCRm, a pesar de que la actividad MAPK descendente se inhibió tras la administración del fármaco. Algunos autores han sugerido que el bloqueo de BRAF/MEK podría desencadenar una reactivación de retroalimentación del EGFR, que pasaría por alto la activación de la MAPK a través del RAS [80]. Las investigaciones preclínicas indicaron que una combinación de inhibidores de BRAF y un inhibidor de la vía ascendente podría ser superior a la inhibición de BRAF por sí sola en términos de control del crecimiento tumoral con mutación de *BRAF* [80], [81]. Al igual que pasaba con los inhibidores de EGFR, el vemurafenib también se ha tratado en combinación con quimioterapia (IRI) e incluso en una triple combinación con cetuximab. Se observaron resultados de supervivencia y tasas de respuesta prometedoras en los ensayos en los que se utilizó esta triple combinación para pacientes con CCR con mutación de *BRAF* [82]. Los regímenes de segunda o tercera línea para el tratamiento del CCRm con mutación *BRAF* (V600E) pueden incluir agentes anti-EGFR combinados con vemurafenib + IRI o dabrafenib + trametinib o encorafenib + binimetinib.

#### 1.4.3.3. Inhibidores de la angiogénesis

La angiogénesis, un proceso fisiológico por el que se forman nuevos vasos o se reforman los ya existentes, desempeña un papel vital en el inicio, el crecimiento y la metástasis de los tumores donde tanto VEGF como su receptor (VEGFR) son los principales responsables de dicho proceso. Sin embargo, existen

otros factores involucrados en la angiogénesis como el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR) y el receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGFR). Los niveles de VEGF y la actividad del VEGFR son elevados en pacientes con CCR y otros cánceres y se considera que están relacionados con un mal pronóstico [83]. La regulación del VEGF es compleja en el CCR donde las mutaciones de *KRAS* y *TP53*, entre otros factores, podrían contribuir a la alteración de la actividad del VEGF-VEGFR, lo que provocaría el crecimiento y la migración del cáncer [50]. Los efectos proangiogénicos del VEGF-VEGFR son importantes tanto en enfermedad localizada donde apoya la progresión tumoral y la migración del tumor como en los sitios metastásicos; por lo tanto, la terapia anti-VEGF/VEGFR podría desarrollarse para atacar ambos pasos en la metástasis del tumor. Los primeros ensayos basados en la terapia antiangiogénica para el CCR confirmaron la superioridad de la quimioterapia (IRI, 5-FU y leucovorina) junto con bevacizumab sobre la quimioterapia en solitario. El bevacizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra VEGF-A que mejora tanto la PFS como la SG en el CCRm haciendo que la FDA aprobara su uso como agente dirigido al VEGF para el CCRm, a pesar de que varios ensayos que investigaban el bevacizumab junto a regímenes de quimioterapia en monoterapia o FOLFOX/FOXIRI sólo mostraron una mejora significativa parcial en la SG o la PFS [84]. Se ha observado resistencia al anti-VEGF en varios tipos de cáncer, incluido el CCR, lo que puede explicarse por la activación de otras vías de señalización y la excreción alternativa de proteínas relacionadas con la angiogénesis.

Además del bevacizumab, otros nuevos agentes están surgiendo y algunos de ellos ya han sido aprobados para el tratamiento en segunda línea; es el ejemplo del aflibercept o el ramucirumab. Otra opción de tratamiento cada vez más extendida en otros cánceres, pero aún con poca relevancia en CCR, son los inhibidores de receptores de tirosina quinasa (RTKs) que, aparte de bloquear VEGFR, también pueden inhibir otras dianas como FGFR, PDGFR y BRAF. El único aprobado para el CCRm en la clínica es el regorafenib. El regorafenib es un inhibidor oral de multiquinasas que es activo contra varias RTK angiogénicas

(VEGFR-1-3), RTK oncogénicas (c-KIT, RET), RTK estromales (PDGFR-B, FGFR1) y quinasas de señalización intracelular (c-RAF/RAF-1, BRAF, BRAF (V600E)) [85]. En 2012, el regorafenib fue aprobado por la FDA el tratamiento de pacientes con CCRm que han progresado con las quimioterapias estándar, detectándose en los ensayos clínicos beneficios en la SG y la PFS [86].

#### **1.4.4. Inmunoterapia**

Los tumores malignos que albergan diversas alteraciones genéticas y epigenéticas pueden ser identificados y obliterados por el sistema inmunitario del huésped mediante la expresión de antígenos anormales. Sin embargo, en varios tipos de cáncer se ha detectado con frecuencia un escape inmunitario de las células cancerosas haciendo que no sean detectadas por el reconocimiento y la respuesta inmunitaria del huésped [87]. La secreción de factores inmunosupresores, como el TGF- $\beta$  y la IL-6, el reclutamiento de células inmunosupresoras o la pérdida de inmunogenicidad mediante la regulación a la baja del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC-1) podrían contribuir a este escape inmunitario. Otra explicación importante es la inactivación y el agotamiento de las células T relacionadas con el tumor a través de la activación de los receptores coinhibitorios, los llamados receptores de punto de control o *checkpoint* inmunitario, en la superficie de las células T, que incluyen la muerte programada-1 (PD-1) y el antígeno linfocítico T citotóxico 4 (CTLA-4). La activación de PD-1 conduce a la inhibición de las vías descendentes, como la vía PI3K/AKT, lo que da lugar a la anulación de la proliferación de las células T. Al igual que otros cánceres enriquecidos con mutaciones, las lesiones metastásicas del CCR expresan niveles más altos de PD-L1 que las lesiones primarias, lo que sienta las bases para interferir en la respuesta inmunitaria del huésped. Merecen una especial atención los tumores de CCR del subgrupo CMS1 (dMMR/MSI), ya que presentan expresión elevada de genes asociados con la infiltración inmune, principalmente de T<sub>H</sub>1 y células T citotóxicas, mostrando una fuerte activación de las vías de evasión inmunológicas. Esto provocó que en los primeros estudios con CCRm diera como resultado que sólo una pequeña proporción de pacientes con

CCR, los recién mencionados, respondían a la terapia de puntos de control inmunitarios [88].

Los **inhibidores de puntos de control inmunitarios**, como los anti-PD1 o PDL1, son un campo emergente para la terapia oncológica. En 2015, se demostró que los pacientes con tumores MSI/dMMR se beneficiaban del bloqueo de los puntos de control inmunitarios con pembrolizumab [89]. Basándose en este y otros estudios del mismo grupo, la FDA aprobó el pembrolizumab para los tumores sólidos MSI-H no resecables o metastásicos en 2017. Los casos de CCR MSI/dMMR se caracterizan por una alta carga mutacional tumoral (fenotipo hipermutado), con neoantígenos altamente inmunogénicos que surgen de mutaciones de tipo *frameshift*. Estos tumores están asociados con una regulación positiva de los puntos de control inmunes (PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG-3, IDO, etc.) que protege a las células cancerosas MSI de su microambiente inmunitario hostil. El nivolumab, otro anticuerpo monoclonal humanizado contra el PD-1, obtuvo la aprobación de la FDA para el CCRm dMMR o MSI-H en 2017. La terapia combinada con nivolumab e ipilimumab (anti-CTLA-4) ayudó a los pacientes con CCR dMMR o MSI-H que habían recibido previamente quimioterapia a alcanzar una PSF del 71% y una SG del 85% a 1 año [90]. Estas pruebas hicieron que el régimen de doblete con nivolumab e ipilimumab obtuviera la aprobación de la FDA como terapia para pacientes con CCRm refractario a la quimioterapia.

A medida que estos nuevos agentes avanzan en las fases de desarrollo clínico, los nuevos marcadores predictivos específicos de estos agentes pueden ser importantes para seleccionar de forma óptima a los pacientes con más probabilidades de beneficiarse de ellos. En este sentido, los estados MSI y dMMR han surgido como biomarcadores predictivos importantes para la eficacia de los inhibidores de los puntos de control inmunitario (ICIs) especialmente para pacientes con CCRm [71], [91].

#### **1.4.5. Terapia múltiple de dosis bajas (MLD)**

Como se ha podido comprobar, en los casos de CCR avanzado, la terapia combinada de quimioterapia FOLFOX o FOLFIRI junto a tratamientos en primera

y segunda línea con agentes biológicos contra EGFR, VEGF/R, BRAF, MEK, c-MET, CHK1 y ALK muestran una mayor respuesta, en contextos generales de PFS y SG, que su uso como agentes únicos. Esto puede ocasionar un mayor número de efectos adversos asociados a la toxicidad de cada uno de los fármacos. Además, los últimos estudios apuntan a que la resistencia a los fármacos dirigidos contra el cáncer es el resultado de la presión selectiva ejercida por una dosis elevada del fármaco. Para evitar todas las posibles contraindicaciones, un estudio de 2020 dirigido por René Bernards, PhD, y en colaboración con investigadores del ICO/IDIBELL, sugirió que la utilización de lo que denominan la “Multiple low dose therapy” (MLD) [92]. El concepto se basa en que la inhibición parcial de múltiples componentes en la misma vía de señalización oncogénica puede sumarse a la inhibición completa de la vía, al tiempo que disminuye la presión selectiva sobre cada componente para adquirir una mutación de resistencia. En el estudio demuestran que en el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) con mutación en EGFR, tan sólo utilizando un 20% de las dosis efectivas individuales de cada fármaco es suficiente para bloquear completamente la señalización MAPK y la proliferación celular cuando se utiliza combinaciones de inhibidores con 3 agentes (RAF + MEK + ERK) o 4 (EGFR + RAF + MEK + ERK). Todo ello sin que las células de NSCLC mutadas lleguen a desarrollar ningún tipo resistencia ni detectar toxicidad elevada en los experimentos con ratones. Estos datos apoyan la idea de que la terapia MLD podría aportar un beneficio clínico, incluso para aquellos que han adquirido resistencia a la terapia con inhibidores del EGFR.

A pesar de todos los avances en el tratamiento contra el cáncer colorrectal avanzado, se sigue sin saber exactamente la causa de la quimioresistencia a los tratamientos de primera línea que se usan actualmente en la clínica. La presencia de MSI aporta información importante para la administración de terapias adyuvantes, mientras que el estado mutacional de *BRAF* se asocia con el pronóstico de la enfermedad, pero su valor predictivo de la resistencia contra terapias anti-EGFR permanece en entredicho [9]. Así, en todo este contexto, es importante profundizar en el conocimiento de los mecanismos de resistencia a las terapias de este subgrupo de tumores inestables. Para lo cual

es muy relevante la generación de modelos preclínicos avanzados tanto *in vivo* como son los *Patient Derived Orthotopic Xenografts* (PDOX) u *orthoxenografts*, así como la generación de modelos *in vitro* tridimensionales de organoides.

## 1.5. MODELOS DE ESTUDIO

Disponer de buenos modelos preclínicos, tanto *in vitro* como *in vivo*, es importante a la hora de seleccionar y luego evaluar potenciales tratamientos. El desarrollo de fármacos implica una serie de fases preclínicas donde evaluar la efectividad, en las que se incluyen la utilización de modelos celulares *in vitro* y modelos de animales *in vivo*, antes de recibir las aprobaciones de las agencias regulatorias para iniciar las fases clínicas.

### 1.5.1. Modelos *in vitro*

Históricamente, uno de los modelos principales y más utilizados para el cribado de fármacos contra el cáncer han sido el uso de líneas celulares cancerosas establecidas en cultivo bidimensional (2D). Dichas líneas celulares establecidas suelen obtenerse fácilmente de los bancos de células y pueden mantenerse mediante un método de cultivo estandarizado. Dado que las células tienen su origen en el tejido humano, proporcionan una gran fidelidad y permiten realizar varios tipos de análisis relevantes para la enfermedad humana con un bajo coste de mantenimiento. Además, su preparación en grandes cantidades con una calidad uniforme es necesaria para el cribado de fármacos de alto rendimiento. Este modelo permite imitar/replicar el comportamiento de las células tumorales en cultivo como: agregación, migración, formación de colonias, capacidad de respuesta a la terapéutica, e incluso medir la producción de mensajeros intercelulares. También es posible evaluar parámetros como el estrés oxidativo, la viabilidad y la apoptosis, el análisis del ciclo celular y la determinación de antígenos de superficie [93]. Sin embargo, muchos inconvenientes dificultan el uso de estos modelos para su uso clínico. Uno de ellos es que presentan una morfología aplanada y redes de señalización alteradas en comparación con las células cancerosas del tejido tumoral *in vivo*, lo que afecta de

forma no deseada a su respuesta a los fármacos. De la misma manera, los cultivos de líneas celulares en 2D no reproducen la interacción célula tumoral/entorno por lo que muestran su incapacidad para simular algunos aspectos presentes en sistemas más complejos, como el sistema inmunitario, el microambiente tumoral y los compartimentos estromales [94]. Asimismo, puede presentarse una falta de heterogeneidad genética de los tumores originales después de muchos pases de las líneas celulares, provocando una pérdida de las características del tumor parental [95]. A pesar de estos inconvenientes, el cultivo celular en 2D es un modelo muy utilizado y es un gran complemento de otros modelos.

Las características de las células se ven afectadas en gran medida por la arquitectura de la población celular, por ejemplo, el contacto célula-célula, el contacto célula-matriz y la polaridad. Estas propiedades no se ven bien reflejadas en el cultivo tradicional bidimensional.

Para intentar mejorar estas condiciones ofrecidas por los cultivos en monocapa, en las últimas décadas surge la tecnología de los cultivos en tres dimensiones (3D) y se convierte en una potente herramienta para la investigación oncológica. En un cultivo de tipo 3D el oxígeno y los nutrientes se difunden a lo largo de un gradiente de concentración hacia el interior de la arquitectura 3D. Por ello, se está aceptando ampliamente que los cultivos celulares en 3D reflejan mejor las características fisiológicas de las células en comparación con los cultivos en 2D [96].

La arquitectura 3D más sencilla es un agregado esférico de células, denominado esferoide. Algunas líneas celulares convencionales en 2D pueden ser inducidas a formar esferoides simplemente sembrándolas en placas de fondo redondo tratadas para que la superficie tenga una baja adherencia y potenciar así la unión célula-célula. También existen sistemas relativamente fáciles para el cultivo de células en 3D que incluyen matrices de colágeno o laminina para la formación de estructuras más complejas. Estos “andamios” biológicos o sintéticos proporcionan anclaje a las células para poder estructurarse como lo harían en la matriz extracelular en el tejido humano original, dando lugar a arquitecturas 3D

llamadas organoides [97]–[99]. Los organoides se definen como "una estructura tridimensional desarrollada o cultivada a partir de células madre y compuesta por tipos celulares específicos de órganos que se autoorganizan espacialmente por clasificación celular y linaje de forma similar a la de un organismo *in vivo*" [100], [101]. Los organoides pueden desarrollarse a partir de células madre embrionarias, células madre pluripotentes inducidas (iPSC), células madre somáticas y células cancerosas en un sistema de cultivo 3D específico [102]. El cultivo de organoides se ha logrado establecer con éxito para múltiples tipos de órganos incluyendo el colon [103], hígado [104], páncreas [105], próstata [106] y útero, además de células cancerosas de los mismos. El establecimiento de organoides consiste en el uso de una membrana basal o Matrigel® como sustitutos de la matriz extracelular y un medio de cultivo específico. Los componentes del medio de cultivo incluyen principalmente medio de cultivo *advanced Dulbecco's Modified Eagle's Medium (ADMEM)/F-12*, primocina y factores potenciadores como GlutaMAX, HEPES, B-27, N-2, hEGF, FGF10, FGF7, Wnt3A, Noggin, R-spondina-1, gastrina, prostaglandina E2, nicotinamida, N-acetilcisteína, Y27632 (inhibidor de Rock), A 83-01 (inhibidor de Alk) y SB 202190 (inhibidor de p38). Estos factores pueden variar mínimamente dependiendo del órgano de origen de las células cultivadas.

Basándose en estos avances en los sistemas de cultivo, el cultivo en 3D de células cancerosas primarias en forma de esferoides u organoides es ahora un modelo práctico de enfermedad ampliamente aceptado. En comparación con las líneas celulares cultivadas en 2D o 3D, los organoides cancerosos primarios tienen la ventaja de conservar las características de las células cancerosas del tejido original de los pacientes, incluyendo su morfología diferenciada y sus respuestas a los fármacos. Es por ello por lo que los organoides derivados del paciente (PDO) de CCR predicen, entre otras cosas, respuestas más exactas a la quimioterapia y, por lo tanto, ofrecen un enorme potencial para la evaluación de la eficacia y la toxicidad de los fármacos, así como para investigar los mecanismos detrás del beneficio limitado del tratamiento [100], [107].

La tecnología de los organoides ha sido ampliamente aceptada en los últimos años, ya que estos cultivos en 3D recapitulan fielmente el genotipo, el fenotipo y los comportamientos celulares de los tejidos madre. Por lo que esta poderosa e incipiente tecnología pretende tender un puente entre los modelos convencionales 2D *in vitro* y los modelos *in vivo*, y tienen un gran potencial para el desarrollo de futuras aplicaciones clínicas [108].

### 1.5.2. Modelos *in vivo*

Los ratones son unos de los mejores modelos para estudiar el cáncer ya que su genética y su fisiología son muy parecidas a las de los humanos. Un modelo animal ideal de CCR debe permitir el desarrollo de tumores de forma local, debe replicar todas las etapas de la evolución del CCR, permitir la evaluación de la progresión de la enfermedad con métodos radiológicos y endoscópicos, comprender las toxicidades relacionadas con los procedimientos terapéuticos. Además, ha de ser manejable a nivel de laboratorio y ha de ser replicable [109]. A lo largo del tiempo se han desarrollado múltiples modelos de CCR en ratones, desde los modelos generados por exposición a diferentes agentes carcinógenos (ej. uso crónico de sulfato sódico de dextrano, que recrea las condiciones de una enfermedad intestinal inflamatoria), así como múltiples modelos transgénicos y *knock out*. Muchos de estos modelos, a pesar de su utilidad para estudiar los primeros pasos de la carcinogénesis tumoral, son extremadamente limitados porque tienen un bajo desarrollo tumoral, ya que sólo una fracción de los ratones que experimentaron esas condiciones desarrollaron tumores, y cuando éstos se desarrollan, revelan una amplia variabilidad en la localización, difusión y diferenciación [110].

En vez de generar un tumor murino de CCR, otras aproximaciones experimentales se basan en la implantación y perpetuación del tumor de CCR del paciente en los ratones. Aproximaciones que van desde la inyección directa de células tumorales en la cavidad peritoneal, la implantación de los tumores humanos para generar los *Patient Derived Xenografts* (PDX) en el tejido subcutáneo del ratón, hasta la inyección/implantación de las células tumorales

humanas en el colon del ratón, generando así los *Patient Derived Orthotopic Xenografts* (PDOX). [94]. Los modelos que se generan en ratones pueden tener diferentes grados de inmunosupresión [111]. El modelo de xenoinjerto subcutáneo permite la detección de células madre cancerosas, pero carece de la relación directa con la invasión local y las metástasis, por lo que también falla a la hora de simular la interacción entre el tumor y el microambiente original del que procede. A pesar de ello, este tipo de modelo ha tenido un gran éxito, y hoy en día es ampliamente utilizado por investigadores de todo el mundo para inducir el CCR en ratones para el estudio de la carcinogénesis y, principalmente, para evaluar la respuesta farmacológica.

En los PDOX el tumor o las células tumorales del propio paciente, se implantan o inyectan directamente en la posición anatómica de interés [93], [112], [113]. Los modelos PDOX permiten una fuerte preservación de la arquitectura tumoral y estromal, con un alto grado de fidelidad al tumor donante tanto microscópica, genética y funcional. Modelos que aumentan la posibilidad de diseminación metastásica a distancia en comparación con los modelos subcutáneos siendo estos modelos los más similares para reproducir las características del cáncer en humanos [114]. A pesar de todas las características favorables, el modelo presenta algunas limitaciones importantes: las muestras suelen tomarse de pacientes con tumores muy avanzados, y de pacientes que ya habían sido sometidos a ciclos de quimioterapia y la heterogeneidad intratumoral, ya que dependiendo del trozo implantado puede haber diferencias en las células cancerosas y, por tanto, en el modo de desarrollarse.

No obstante, cada modelo animal tiene sus pros y sus contras y, en algunos casos, es necesaria la asociación de más de un modelo de CCR para dar una respuesta más precisa a las necesidades de la clínica y de cada paciente. El modelo debe elegirse en función de las expectativas y el objetivo del estudio, maximizando así su potencial.

# **PREMISAS E HIPÓTESIS**



## PREMISAS

- En las últimas décadas se ha producido un enorme avance en el conocimiento de las bases moleculares que subyacen, tanto a la génesis, como a la evolución de los tumores colorrectales.
- Estudios que además han permitido establecer una nueva clasificación de los tumores colorrectales, integrando en los sistemas de clasificación sus características moleculares (definidos como CMS1, 2, 3 y 4).
- La integración en los algoritmos de diagnóstico del conocimiento de las características mutacionales de un tumor ya sea mediante el estudio de paneles de genes o de genes individuales (*K-, N-, H-RAS, PI3KCA, BRAF, EGFR*, etc.), ha abierto la puerta a individualizar/personalizar el tratamiento de los pacientes.
- En paralelo a estos conocimientos, ha habido un impresionante desarrollo farmacológico de nuevos inhibidores o *terapias dirigidas*, más específicas que la quimioterapia convencional, y que tienen como diana muchas de las proteínas celulares relevantes para el desarrollo de un tumor. Y ya en los últimos años, la llegada de la inmunoterapia (*Immune Check Point inhibitors, ICIs*) ha cambiado totalmente el panorama terapéutico para muchos tipos tumorales.
- Pero a pesar de todos estos avances, en el cáncer colorrectal no se han traducido en grandes novedades terapéuticas, siendo los regímenes FOLFOX (5-FU+oxaliplatino) y FOLFIRI (5-FU+Irinotecan) la base del tratamiento de una gran mayoría de los tumores colorrectales.
- La incorporación de algunas terapias dirigidas a los esquemas clásicos ha representado una mejora notable en algunos subgrupos de pacientes (anticuerpos anti-EGFR, bevacizumab, aflibercept, vemurafenib, MEKin., etc.). Sin embargo, todavía hay un amplio recorrido que hacer a la hora de mejorar el tratamiento de otros muchos grupos de pacientes.

## **HIPÓTESIS**

La generación de *Patient Derived Orthotopic Xenografts (PDOX)* u *orthoxenografts* a partir de biopsias frescas obtenidas de los tumores de los pacientes, e implantados en el ciego de ratones inmunosuprimidos, nos ha de permitir derivar a partir de estos PDOX los tumoroides (*PDOXT*) *in vitro*. Siendo los tumoroides, sistemas más sencillos donde evaluar e identificar de una forma eficiente potenciales nuevas aproximaciones terapéuticas.

Pensamos que generar estos binomios PDOX/tumoroides (PDOXT) para tumores concretos nos ha de permitir avanzar a la hora de identificar potenciales terapias efectivas que ayuden a mejorar el tratamiento del subgrupo de pacientes de CCR con MSI.

# **OBJETIVOS**



El objetivo global de esta tesis es usar el sistema PDOX/tumoroides para identificar y validar alguna nueva aproximación terapéutica que pueda ser útil para mejorar el tratamiento de los pacientes afectados de cáncer colorrectal con fenotipo MSI.

Objetivos específicos de esta tesis:

1. Generación y caracterización de *Patient Derived Orthotopic Xenografts* (PDOX)/*orthoxenografts*) a partir de biopsias en fresco de tumores de pacientes con cáncer colorrectal que presenten inestabilidad de microsatélites (MSI), con o sin mutación en el gen *BRAF*. Modelos preclínicos que se generaran tras la implantación ortotópica (en el ciego o hígado) de ratones atímicos o inmunosuprimidos.
2. Generación y caracterización de tumoroides o PDOXT (modelos 3D) *in vitro* a partir de los PDOX/*orthoxenografts* generados y perpetuados en ratón. Tumoroides que se usaran para evaluar la efectividad terapéutica de una pequeña librería de unos 50 fármacos seleccionados.
3. Evaluación preclínica *in vivo*, en varios PDOX/*orthoxenografts*, de la efectividad terapéutica de los mejores fármacos o combinaciones identificadas en los estudios de cribado realizados con los tumoroides.



## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**



## **2.1. PACIENTES**

Entre inicios del 2018 y mediados de 2022 se incluyeron en la tesis 12 pacientes con adenocarcinoma colorrectal avanzado diagnosticados en el Hospital Universitario de Bellvitge (HUB) y el Hospital de San Joan Despí Moisès Broggi. Todos los pacientes recibieron tratamiento previo con una fluoropirimidina en combinación con irinotecán u oxaliplatino y en el ámbito adyuvante o de la enfermedad avanzada. Los pacientes en enfermedad avanzada también recibieron tratamientos con bevacizumab, cetuximab, encorafenib, binimetinib, aflibercept o panitumumab. No se ha podido acceder a toda la información clínica deseada. Principalmente, a todos los pacientes no se les realizó el mismo tipo de pruebas o los resultados de dichas pruebas fueron aportadas por los pacientes y realizadas en clínicas privadas.

Para facilitar el desarrollo del estudio, se generó un circuito interconectado de recogida y procesamiento de muestras en el servicio de Anatomía Patológica (AP) del hospital, en el que trabajan de forma conjunta oncólogos y patólogos del Instituto Catalán de Oncología (ICO) e investigadores de nuestro grupo. Piezas quirúrgicas colorrectales, de origen primario o metastásico, fueron recogidas siguiendo con todas las recomendaciones del Comité Ético del Hospital de procedencia. Todos los pacientes firmaron su correspondiente consentimiento informado previa recolección. Los tumores se recolectaron en medio de recogida Eagle modificado de Dulbecco suplementado con GlutaMAX (DMEM, GIBCO Ref. 31966047), 10% de suero bovino fetal (FBS, GIBCO Ref. 10099-141) y 5% de Penicilina-estreptomicina (P/E, Merck Ref. P0781-100ML). Las muestras fueron codificadas conforme la fecha de llegada al laboratorio (P01-10).

## 2.2. GENERACIÓN DE MODELOS *ORTHOXENOGRAFTS*

### 2.2.1. Animales y condiciones

Todos los estudios con animales de experimentación se llevaron a cabo en el Estabulario del Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge (IDIBELL) (unidad 1155 de la AAALAC) y fueron aprobados por el Comité de Ética para la Experimentación Animal del propio IDIBELL y la Generalitat de Catalunya. Se realizaron siguiendo las directivas europeas sobre el uso ético de roedores para la investigación animal (aprobación DARP #4899) y bajo el marco del Real Decreto 1386/2018 (España).

Los ratones utilizados para la generación de los modelos ortotópicos fueron ratones atímicos machos de 4-6 semanas de la cepa *nu/nu* (Charles River). Estos se alojaron en jaulas ventiladas individualmente en condición libre de patógenos (SPF) a temperatura constante (+20-25 °C) y con una humedad del 60%. Los animales estaban sometidos a un ciclo circadiano artificial de 12 horas de luz/oscuridad y recibían una dieta de alimento balanceado comercial para roedores y agua *ad libitum*. Todos los experimentos se realizaron dentro de una cabina de flujo laminar vertical.

### 2.2.2. Generación de los modelos *orthoxenografts* a partir de biopsias humanas de CCR

Para generar los modelos *orthoxenografts* (PDOX), los tumores recolectados se implantan quirúrgicamente en el ciego de los ratones. Previa anestesia con isoflurano inhalado, las piezas tumorales de 6 mm<sup>3</sup>, se implantan en el colon de los animales usando el hilo de sutura Prolene 7.0. El crecimiento de los tumores se monitoriza por palpación. Una vez confirmado el crecimiento, los tumores se recolectan y se cortan en pequeños fragmentos para su reimplantación en 2 o más ratones con el fin de garantizar la perpetuación de estos a lo largo de los pases consecutivos. Se practica la eutanasia cuando la supervivencia del animal se ve comprometida, así como cuando los tumores alcanzan un volumen de 1000 mm<sup>3</sup>.

Para los experimentos *in vivo* se realiza un pase intermedio de expansión de los tumores seleccionados, donde estos se implantan ortotópicamente a 4-5 ratones con el fin de disponer de suficiente cantidad del tumor a testar. En una segunda fase, los tumores así obtenidos se reimplantan de manera ortotópica en 30-40 ratones, garantizando la presencia de un mínimo de 4 animales por condición experimental durante los ensayos *in vivo* con los fármacos escogidos.

### **2.2.3. Recolección de tumores y órganos**

A los ratones se les practica la eutanasia por dislocación cervical y se recogen los tumores y otros órganos para su posterior análisis. Los tumores que crecen adheridos al colon se fragmentan en varias partes dependiendo del tamaño final de la muestra. Una parte del tumor y el resto de los órganos se fijan con formaldehído (pH 7.4) al 4% toda la noche (*overnight* u O/N) para ser incluidos en parafina y realizar estudios histológicos. Las otras partes del tumor se congelan directamente en tubos criogénicos Nunc™ (VWR International Ref. 479-6841) y se mantienen a -80 °C para estudios genéticos y moleculares.

### **2.2.4. Inclusión en parafina**

Los tejidos se fijan en formaldehído al 4% O/N. Al día siguiente, se enjuagan con agua del grifo y se deshidratan mediante una batería de alcoholes: 1 hora (h) en etanol al 70%, 2 h en etanol al 96% en dos pasos, nuevamente etanol 96% O/N, 4h etanol absoluto en tres pasos y, finalmente 1 h 30 min en xileno. Finalmente, los tejidos se dejan embeber en parafina líquida a +65 °C O/N y, al día siguiente se incluyen en bloques.

### **2.2.5. Tinción con hematoxilina-eosina (H&E)**

Los bloques de parafina se cortan en secciones de 3 µm de grosor utilizando un micrótopo (ThermoScientific) y se depositan en portaobjetos STAR FROST® tratados (deltalab Ref. A100018). Las secciones se desparafinan e hidratan sometiéndolas a una batería compuesta por 4 xilenos (10 min cada uno), 3 etanoles absolutos, 3 etanoles al 96%, 1 etanol al 70%, 1 etanol al 50% y, agua destilada (H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>) (5 min cada uno).

A continuación, los tejidos se tiñen durante 10 min en hematoxilina de Harris y se enjuagan en agua del grifo para eliminar el exceso de tinción. El viraje de la hematoxilina se hace usando consecutivamente HCl al 1% y agua amoniacal al 2%. Finalmente, las secciones se contratiñen en eosina 0.25% durante 1 min, se deshidratan en una serie de alcoholes (2 etanoles al 96%, 2 etanoles absolutos y hasta 4 xilenos; 3 minutos en cada uno de ellos). Y, se montan usando cubreobjetos y medio de montaje DPX (Merck).

### **2.2.6. Extracción de componentes celulares**

#### **2.2.6.1. Extracción de ADN de tejido congelado**

Con una cuchilla estéril se cortan y se digieren mecánicamente un fragmento de tejido congelado en una placa de Petri. La extracción del ADN comienza sumergiendo y homogeneizando la muestra en una solución de digestión compuesta por: 600  $\mu$ L de 10-10-0,15 TEN (10 mM Tris-acetato pH 7.5, 10 mM ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y 0.15 M NaCl), 12  $\mu$ L de proteinasa K (20 mg/ml) y 48  $\mu$ L de dodecilsulfato sódico (SDS) al 10%. Tras incubar la muestra a +56 °C durante 3 h en agitación, se añaden 600  $\mu$ L de 10-10-0.65 TEN (10 mM Tris-acetato pH 7.5, 10 mM EDTA y 0.65 M NaCl) y el mismo volumen de alcohol fenol-cloroformo-isoamilo. Se agita vigorosamente hasta que se mezclen todas las fases y se centrifuga 10 min a 12000 r.p.m. (revoluciones por minuto). La fase acuosa se conserva y se precipita el ADN añadiendo un 10% de acetato de sodio 3 M a pH 5.2 y dos volúmenes de etanol absoluto. En caso de observarse agregado de ADN éste se recupera, se hacen varios lavados con etanol 70% y finalmente se resuspende en H<sub>2</sub>O. En caso de no observar agregado debido a la baja cantidad de ADN obtenido se deja precipitar O/N a -20 °C. Al día siguiente las muestras se centrifugan (5 min 12000 r.p.m.) para recuperar todo el ADN y, se lavan con etanol 70% y se resuspenden en H<sub>2</sub>O.

#### **2.2.6.2. Extracción de ADN de tejido en parafina**

Cuando se está intentado establecer las líneas tumorales en los *orthoxenografts* es esencial la no pérdida del tumor, por lo que de ciertos países se prioriza la implantación del tejido en varios ratones y no tanto guardar

fragmentos para su congelación. En los casos en los que haya poco material disponible, después de implantar el resto del tumor, se prima la inclusión en parafina. De aquellas muestras de las que no se tiene material biológico congelado, se realiza la extracción de ADN de los tejidos embebidos en bloques de parafina.

Primero, se realizan entre 3-5 cortes de los bloques en el micrótopo de unos 10  $\mu\text{m}$  de grosor y se introducen en un tubo Eppendorf. Para la extracción se usa el kit "QIAamp DNA FFPE Tissue Kit" (QUIAGEN Ref. 56404). Este kit está especialmente diseñado para purificar el ADN de secciones de tejido fijadas con formaldehído e incluidas en parafina. El kit utiliza condiciones especiales de lisis para liberar el ADN de las secciones de tejido y para superar los efectos inhibidores causados por el entrecruzamiento de los ácidos nucleicos con el formaldehído.

Cuando se disponga de los cortes en los tubos de 1,5 mL o 2 mL, se añade 320  $\mu\text{L}$  de la solución de desparafinización (QUIAGEN Ref. 19093), se agita energicamente durante 10 s y se realiza una breve centrifugación para concentrar la muestra en el fondo del tubo. Posteriormente, se incuba la muestra a +56 °C durante 3 min, y luego se deja enfriar a temperatura ambiente (T.A.). Se añaden 180  $\mu\text{L}$  del tampón ATL y se mezcla mediante vórtex. Tras una centrifugación de 1 min a 10000 r.p.m., se añaden 20  $\mu\text{L}$  de proteinasa K a la fase inferior y clara pipeteando suavemente pipeteando. En este punto se incuba la muestra a +56 °C durante 1 h (o hasta que la muestra se haya lisado completamente); y posteriormente a +90 °C durante otra hora para la inactivación de la proteinasa K. Es de importancia saber que tiempos de incubación más largos o temperaturas de incubación más elevadas pueden dar lugar a una mayor fragmentación del ADN. A continuación, se recupera la muestra que se encuentra en la parte inferior del tubo y se transfiere el contenido a uno limpio y se añaden 200  $\mu\text{L}$  de tampón AL a la muestra mezclándola bien mediante un vórtex. Se añaden 200  $\mu\text{L}$  de etanol (96-100%) y se mezcla nuevamente.

En este punto se transfiere con cuidado todo el lisado a la columna QIAamp MinElute (en un tubo de recogida de 2 mL) sin mojar el borde y se centrifuga a 8000 r.p.m. durante 1 min. Pasamos la columna QIAamp MinElute a un tubo de recogida limpio de 2 mL y se desecha el tubo de recogida que contiene el fluido. Si el lisado no ha pasado completamente a través de la membrana después de la centrifugación, se centrifuga de nuevo a mayor velocidad hasta que la columna esté vacía. Después, se abre cuidadosamente la columna y se añaden 500  $\mu$ L de tampón AW1, sin mojar el borde. La muestra se centrifuga nuevamente a 8000 r.p.m. por 1 min y repetimos el cambio de columna a un tubo de recogida limpio de 2 mL. El proceso se realiza otra vez, pero con 500  $\mu$ L del tampón AW2. Se centrifuga a máxima velocidad (14000 r.p.m.) durante 3 min para secar la membrana completamente y transferimos la columna a un tubo de microcentrífuga limpio de 1.5 mL.

Para finalizar, se abre con cuidado la tapa de la columna y se aplica en el centro de la membrana 20-100  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O de atemperada a 56 °C para facilitar la elución del ADN, se incuba a T.A. durante 5 min y se centrifuga a máxima velocidad durante 1 min.

#### 2.2.6.3. Cuantificación de ADN

La cuantificación del ADN se efectúa sometiendo el ADN a luz ultravioleta a una longitud de onda de 260 nanómetros (nm) haciendo uso de un espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 (ThermoScientific Ref. ND-2000) y su *software* operativo. Una vez obtenido los valores, el ADN de todas las muestras fue diluido en H<sub>2</sub>O hasta tener una concentración final de 100 ng/ $\mu$ L.

#### 2.2.6.4. Extracción de proteínas de tejido congelado

Con una cuchilla estéril se corta un fragmento de tejido congelado en una placa de Petri sobre hielo. Para la digestión química, se sumerge el fragmento en 500  $\mu$ L de una mezcla compuesta por tampón de extracción y de lisis RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7.5, NaCl de 150 mM, 1% NP-40, SDS al 0,10% y desoxicolato de sodio al 0.5%) suplementado con inhibidores de fosfatasa y proteasas (Merck) 1x se disgrega mecánicamente con la ayuda de un *TissueLyser II* (QUIAGEN Ref.

85300) y se incuba en hielo durante 30 min. Una vez pasado este tiempo, se centrifuga a 13000 r.p.m. durante 15 min en frío (+4 °C). El lisado de proteínas se dispone en la parte del sobrenadante, el cual se recoge y se guarda a -80 °C.

#### 2.2.6.5. Cuantificación del lisado de proteínas

Para cuantificar los lisados de proteínas se utiliza el kit colorimétrico *Pierce BCA Protein Assay* (ThermoScientific Ref. 23225). En primer lugar, se realiza una curva estándar de concentraciones crecientes de 0 a 2 mg/mL diluyendo la albúmina de suero bovino (BSA) en tampón RIPA. Las muestras de interés se diluyen también a 1:20. A continuación, se cargan 10 µL de la curva estándar y de las muestras de interés en una placa de 96 pocillos de fondo plano. Para proseguir, se añaden 200 µL del reactivo de trabajo BCA (50:1, reactivo A:B) a cada pocillo y se mezcla cuidadosamente para evitar la aparición de burbujas. La placa se incuba durante 30 min. a +37 °C. La absorbancia se mide a 560 nm de longitud de onda por espectrofotometría (Power Wave XS, BIO-TEK) utilizando el software KCJrWin. La concentración de proteínas se calcula por extrapolación en la curva estándar en el *software* "Microsoft Excel".

### 2.2.7. Análisis moleculares

#### 2.2.7.1. Inmunohistoquímica

Para determinar la expresión y la localización de las proteínas en los tumores, se cortan bloques embebidos en parafina en secciones de 3-5 µm de grosor. Para fijar el tejido se incuban durante 10 min a +80 °C. Se desparafinan mediante una batería de 4 xilenos (10 min cada uno), 3 etanoles absolutos, 3 etanoles al 96%, 1 etanol al 70% y 1 etanol al 50% (5 min cada uno). Se finaliza la rehidratación de las secciones en H<sub>2</sub>O. A continuación, es necesario recuperar los antígenos enmascarados durante el proceso de fijación. El desenmascaramiento de los antígenos se lleva a cabo calentando los tejidos fijados durante 15 min a +110 °C en una solución de desenmascaramiento antigénico dependiendo del anticuerpo (*Citric Acid Based*, pH 6, Vector Laboratories Ref. H-3300; o *Dako Target Retrieval Solution*, pH 9, Dako Ref.

S2367) utilizando una olla a presión (*Decloaking Chamber™ NxGen*, Biocare Medical).

La actividad de la peroxidasa endógena se bloquea incubando las secciones histológicas durante 15 min en una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% con 30% de metanol. A continuación, se sumergen durante 10 min en PBS-T (solución salina tamponada con fosfato 0.05% TWEEN® 20, pH 7.4) para permeabilizar las membranas celulares. Después, se bloquean las uniones inespecíficas incubando las muestras con suero de cabra al 5% en PBS-T durante 1 h a T.A. en una cámara húmeda. Se añade el anticuerpo primario deseado con la dilución adecuada sobre las muestras y se mantiene O/N a +4 °C (Tabla 2).

**Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados para la detección de proteínas por inmunohistoquímica.**

Anticuerpo	Referencia	Especie	Dilución	Marca
Ki67 [SP6]	ab21700	Conejo	Prediluido	abcam
ALK (D5F3®) XP®	3633	Conejo	1/50	Cell Signaling technology
p-ALK (Tyr1640)	PA5-104565	Conejo	1/40	Invitrogen

Al segundo día, las muestras se atemperan durante 30 minutos a T.A. y posteriormente se lavan con PBS-T durante 10 min dos veces. Para continuar, se incuban las secciones con los anticuerpos secundarios anti-ratón o anti-conejo *EnVision+ System-HRP* (Dako Ref. K4001 o K4003, respectivamente) durante 1 h a T.A. en la cámara húmeda. Pasado este tiempo, los tejidos se lavan primero con PBS-T 10 min tres veces. Los anticuerpos se detectan tras el revelado con el sustrato cromogénico DAB+ (*EnVision™ Kit*, Dako Ref. K3468), con una incubación entre los 30 s a los 10 min a T.A., según el anticuerpo y la muestra de tejido, hasta la aparición de un precipitado marrón. Finalmente, las secciones se enjuagan en agua del grifo para detener la reacción.

Para observar las células, las secciones se contratiñen con hematoxilina y se enjuagan en agua del grifo para eliminar el exceso de tinción. Posteriormente,

se deshidratan en una batería de alcoholes compuesta por: 1 etanol al 70%, 3 etanoles al 96%, 3 etanoles absoluto (estos pasos a 5 min) y 4 xilenos (10 min). Finalmente, las muestras se montan usando cubreobjetos y medio de montaje DPX (Merck).

Los tejidos se visualizaron con el microscopio *Nikon Eclipse 80i* y se tomaron imágenes con una cámara digital *Nikon DS-Ri1* utilizando el *software NIS-Elements BR 3.2* (64 bits). Los análisis se llevaron a cabo con el *software ImageJ*.

## **2.3. CULTIVO DE ORGANOIDES TUMORALES (TUMOROIDES)**

### **2.3.1. Generación de tumoroides a partir de PDOX**

Tras practicar la eutanasia al ratón, una vez extraído el tumor, se sumerge en una solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco 1x (DPBS, GIBCO Ref. 14190-169) suplementado con 5% de P/E durante 30 min a T.A. Tras este periodo, se realizan un par de lavados con DPBS para eliminar el antibiótico. A continuación, se hace uso del *Tumor Dissociation Kit, human* (Miltenyi Biotec Ref. 130-095-929) para disgregar los tumores y obtener las células individuales. El kit de disociación de tumores ha sido desarrollado para la óptima disgregación de una amplia gama de tipos de tumores, como el cáncer de mama, páncreas, próstata, colon y el adenocarcinoma de pulmón, entre otros.

Primero, para facilitar la digestión de la muestra, se corta el tumor en pequeños fragmentos de aproximadamente 0.5 cm de diámetro con la ayuda de un escalpelo estéril. Posteriormente, se prepara la mezcla de enzimas añadiendo los siguientes componentes en un tubo gentleMACS C (Miltenyi Biotec Ref. 130-093-237) según la Tabla 3.

**Tabla 3. Preparación mezcla enzimática del “Tumor Dissociation Kit, human”.** Las letras H, R y A corresponden a la nomenclatura de la casa comercial.

Tamaño de la muestra tumoral	Mezcla enzimática			
	DMEM	enzima H	enzima R	enzima A
0.05-0.2 g	2.2 mL	100 µL	50 µL	12.5 µL
0.2-1.0 g	4.7 mL	200 µL	100 µL	25 µL

El tejido a digerir se transfiere al tubo gentleMACS C que contiene la mezcla de enzimas preparadas y se coloca del revés en el soporte del Disociador gentleMACS (Miltenyi Biotec Ref. 130-093-235). Tras la finalización del programa, se incuba la muestra durante 30 min a +37 °C bajo una continua rotación. Una vez finalizado el tiempo, se vuelve a colocar el tubo C boca abajo en el soporte del disociador y posteriormente se incuba 30 min a +37 °C en rotación. Finalmente, se coloca el tubo C boca abajo en el soporte del disociador por última vez y se ejecuta el programa.

Tras un breve paso de centrifugación (1000 r.p.m. por 5 min) para recoger el material biológico en el fondo del tubo, se resuspende la muestra con 5 mL de DMEM suplementado con 10% de FBS, inactivado previamente calentándolo a +55 °C durante 30 min, y 1% de P/S. Seguidamente, se pasa la suspensión celular a través de un filtro con una malla porosa de 70 µm (Corning Ref. 352350) colocado en un tubo de 50 mL. Después, se lava el filtro con otros 20 mL de DMEM y se sedimenta la suspensión celular por centrifugación a 1000 r.p.m. durante 7 min. Para terminar, se aspira el sobrenadante completamente y se resuspende con 1 mL de DMEM/F-12<sup>+++</sup> (Tabla 6). En este momento la muestra está lista para ser cultivada.

Se preparan las diluciones adecuadas de la suspensión celular en función del *pellet* de células que obtuvimos antes de resuspender la muestra. Siempre se suelen hacer 3 diluciones para sembrar. Las diluciones más comunes son 1/5, 1/10 y 1/20. Sin embargo, si existe mucha cantidad de *pellet* se pueden hacer

más diluidas: 1/20, 1/40 y hasta 1/80 o 1/160. Para hacer todas las diluciones se parte de 1 mL y seguimos la Tabla 4.

**Tabla 4. Diluciones recomendadas para sembrar la suspensión celular.**

Dilución	Volumen de muestra	Centrifugar	Sembrar
1/5	400 µL	1000 r.p.m.	2 pocillos
1/10	200 µL	1000 r.p.m.	2 pocillos
1/20	100 µL	1000 r.p.m.	2 pocillos
1/40	50 µL	No necesario	2 pocillos
1/80	25 µL	No necesario	2 pocillos

Una vez preparadas las diluciones, se añaden 100 µL de Matrigel® (Corning Ref. 356231) (50 µL por cada pocillo) en el tubo Eppendorf y se homogeniza suavemente la suspensión con una punta de pipeta de 200 µL con filtro con el tubo en contacto permanente con hielo. Es de extrema importancia que se haga con suma delicadeza para evitar generar burbujas. Para sembrar, se coloca una gota justo en el medio del pocillo de una placa de 24 pocillos con fondo plano (Merck/TPP, Z707791-126EA) y se deja reposar la placa 1-2 min a T.A. para que se comience a solidificar el Matrigel®. Por último, se incuba la placa 10-20 min a +37 °C para que la gota se solidifique totalmente y se añaden 450 µL de Medio Completo (Tabla 7) dejándolo caer suavemente por la pared del pocillo. Mantenemos la placa en un incubador a +37 °C en aire humidificado con un contenido de CO<sub>2</sub> del 5%.

### 2.3.2. Mantenimiento de líneas de tumoroides

Para el mantenimiento del cultivo de tumoroides se necesita disponer de medio DMEM/F-12<sup>+++</sup> y Medio Completo. Estos medios requieren una serie de factores que están listados en la Tabla 5. Por otro lado, la preparación de los medios se realiza siguiendo los volúmenes indicados en la Tabla 6 para el medio DMEM/F-12<sup>+++</sup> y la Tabla 7 para el Medio Completo. El medio completo puede conservarse un máximo de 2 semanas a +4 °C. El medio de cultivo de los

tumoroides se refresca cada 72 h para mantener siempre una concentración adecuada de los factores necesarios para su establecimiento y crecimiento. El medio se elimina con una pipeta de vidrio y se añaden 450 µL de Medio Completo fresco previamente atemperado, manteniendo intacto la gota de Matrigel®. El crecimiento del cultivo de tumoroides se monitoriza al microscopio.

**Tabla 5. Lista de factores y reactivos para el cultivo de tumoroides.** hEGF, Factor de crecimiento epidérmico humano

FACTORES	MARCA	REFERENCIA
DMEM/F-12	Biological Industries	01-170-1A
L-Glutamina	Merck	G7513-100ML
Primocina	Invivogen	ant-pm-1
Suplemento B-27	GIBCO	0080085SA
Suplemento N-2	Life Technologies	17502048
Noggin	PeptoTech	120-10C
R-Spondina-1	PeptoTech	120-38
hEGF	Merck	E9644-.5MG
Y-27632 dihidrocloruro	Merck	Y0503-5MG
Nicotinamida	Merck	72340-250G
N-Acetil-L-cisteína	Merck	A7250-25G
A 83-01	Merck	SML0788-5MG
SB 202190	Merck	S7067-5MG
Prostaglandina E2	Tocris Bioscience	2296
Gastrina I	Tocris Bioscience	3006

**Tabla 6. Volúmenes de los factores necesarios para preparar el medio DMEM/F-12<sup>+++</sup>. U, unidades.**

FACTORES	VOLUMEN	[STOCK]	[FINAL]
DMEM/F-12	50 mL	1x	1x
P/S	500 µL	100 U/mL	1 U/mL
L-Glutamina	500 µL	100x	1x
Primocina	100 µL	50 mg/mL	100 µg/mL

**Tabla 7. Volúmenes de los factores necesarios para preparar el Medio Completo.** Entre paréntesis, la dilución del reactivo tras la reconstitución. NAM, Nicotinamida. NAC, N-Acetil-L-cisteína. PEG2, Prostaglandina E2.

FACTORES	MEDIO COMPLETO			[STOCK]	[FINAL]
	5 mL		40 mL		
B-27	100 µL		800 µL	50x	1x
N-2	50 µL		400 µL	100x	1x
Noggin	5 µL		40 µL	100 µg/mL	100 ng/mL
R-Spondina-1	5 µL		40 µL	100 µg/mL	100 ng/mL
hEGF	0,5 µL		4 µL	500 µg/mL	50 ng/mL
Y-27632	1,25 µL		10 µL	40 mM	10 µM
NAM	100 µL		800 µL	500 mM	10 mM
NAC	10 µL		80 µL	500 mM	1 mM
A 83-01 (1/10)	2,5 µL		20 µL	1 mM	500 nM
SB 202190	1 µL		8 µL	15 mM	3 µM
PGE2 (1/1000)	1 µL		8 µL	50 µM	10 nM
Gastrina I (1/10)	1 µL		8 µL	≈50 µM	≈10 nM

### **2.3.3. Pase del cultivo de tumoroides**

Cuando el cultivo de tumoroides alcanza una densidad elevada se debe realizar un pase y la ampliación del cultivo. En primer lugar, se resuspende el Matrigel® con puntas de filtro de 1 mL mezclando el Matrigel® con el medio, evitando la formación de burbujas. Una vez homogeneizado, se transfiere a un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Para realizar una disgregación mecánica de la matriz, se pasa la suspensión celular entre 4-6 veces por una aguja hipodérmica de 30G y se centrifuga a 1000 r.p.m. durante 5 min. Se descarta el sobrenadante dejando aproximadamente 50 µL y se resuspende el sedimento celular. A continuación, se realizan las diluciones adecuadas, dependiendo de la densidad y la tasa de crecimiento observada en cada línea de tumoroides. Normalmente se pasa de 1 pocillo a 2-4 pocillos. Se añaden 50 µL de Matrigel® por pocillo que se desea sembrar colocando una gota justo en el medio del pocillo de la placa de 24. Se deja reposar la placa 1-2 min a T.A. y se incuba 10-20 min a +37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Finalmente, se añaden 450 µL de Medio Completo dejándolo caer suavemente por la pared del pocillo. Mantenemos la placa a +37 °C en aire humidificado con 5% de CO<sub>2</sub>.

### **2.3.4. Obtención de células individuales de cultivos de tumoroides**

Si se desea plaquear un número concreto de células por pocillo es necesario digerir el Matrigel® y romper las estructuras tridimensionales formadas por las células. Para ello, se comienza lavando los pocillos con DPBS + 5% P/S. Si se puede eliminar el medio sin despegar la gota de Matrigel®, se descarta y se añaden directamente 400µl del DPBS. Si la gota de Matrigel® está en mal estado, es necesario resuspender el Matrigel® con el medio, traspasar la suspensión a un tubo Eppendorf de 1,5 mL, centrifugar a 1000 r.p.m. por 5 min y eliminar el sobrenadante. Ahora se puede resuspender la muestra con 1 mL de DPBS + 5% P/S frío. Si se desea, se pueden juntar varios pocillos en un tubo Eppendorf (máximo 3 pocillos). Pasados 5 min de incubación, centrifugar por 5 min a 1000 r.p.m. y, posteriormente, eliminar todo el DPBS que se pueda.

Para la disgregación de la muestra, ésta se resuspende en un volumen de 150  $\mu\text{L}$  de Tripsina-EDTA (0,05%) (GIBCO Ref. 25300062) por contenido de pocillo que se haya introducido previamente en el tubo. Si se obtiene un *pellet* demasiado grande se puede aumentar un poco más el volumen de tripsina. Se incuba a +37 °C durante 15 min. Pasado este tiempo, se añade el doble de volumen de medio DMEM/F-12 + 10% FBS que tripsina se haya utilizado. Tras una centrifugación de 5 min a 500 r.p.m. se resuspende la muestra con 1 mL de DMEM/F-12<sup>+++</sup>. Para una correcta disgregación, se pasa la suspensión celular entre 3-4 veces por una aguja hipodérmica de 30G. Para finalizar, se realiza el recuento de células en cámaras de Neubauer con azul de tripano.

Una vez determinado el número de células por mL de solución se siembran las células con Matrigel®. Dependiendo de si se quiere sembrar en placas de 24 o de 96 el número de células varía de media entre 15000 y 4000, respectivamente. Para realizar los cálculos se necesita saber cuántos pocillos se desea sembrar y el número de células que se quiere por pocillo. Para calcular el volumen final hay que tener en cuenta que el volumen de Matrigel® tiene que representar como mínimo un 75% del volumen total. Si se desea utilizar placas de 24 pocillos, sembrar 50  $\mu\text{L}$ /pozo, si es en placa de 96 pocillos sembrar 10  $\mu\text{L}$ /pozo. Una vez depositada la gota en el centro del pocillo, se deja reposar la placa a T.A. y se incuba 10 min a +37 °C con 5% CO<sub>2</sub>. Finalmente, se añaden 450  $\mu\text{L}$  (24 pocillos) o 100  $\mu\text{L}$  (96 pocillos) de Medio Completo previamente atemperado y se mantiene la placa en un incubador a +37 °C en aire humidificado con 5% de CO<sub>2</sub>.

### **2.3.5. Criopreservación y descongelación de tumoroides**

Para la criopreservación de tumoroides, se elimina primero el medio de cultivo del pocillo y se añaden 400  $\mu\text{L}$  de DPBS frío. Se resuspende y homogeneiza la muestra hasta que la gota no sea visible. Tras un paso de centrifugación a 1000 r.p.m. por 5 min, se elimina el sobrenadante y se añade y resuspende el sedimento con 1 mL de medio de congelación compuesto por FBS con 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). Este volumen se transfiere un criovial y se guarda a -80

°C durante 24 h en un recipiente *Mr. Frosty™* (-1 °C/min, ThermoScientific). Transcurrido este periodo, el criovial se almacena en un tanque de nitrógeno líquido.

Para la descongelación, el criovial se descongela parcialmente durante 1-2 min en un baño a +37 °C. A continuación, la suspensión se transfiere a un tubo Falcon de 15 mL con 5 mL de medio DMEM/F-12<sup>+++</sup> y se centrifuga a 1000 r.p.m. por 5 min. Una vez eliminado el sobrenadante, el sedimento se resuspende en 50 µL de Medio Completo y se añaden 150 µL de Matrigel®, y se plaquea una gota en el centro de un pocillo de una placa de 24 pocillos. La placa se incuba en la estufa a +37 °C para que el Matrigel® solidifique y se añaden 450 µL del medio correspondiente, previamente atemperado a +37 °C.

### **2.3.6. Identificación y separación de poblaciones humanas y murinas de un cultivo de tumoroides proveniente de PDOX**

#### **2.3.6.1. Extracción de ADN de precipitado celular**

Antes de empezar con la extracción del ADN, se debe tener un precipitado o *pellet* celular de la muestra con la que se pretende trabajar. Para ello, se sigue el protocolo explicado en el apartado 2.3.4 hasta la centrifugación posterior a la disgregación con tripsina. Una vez obtenido el *pellet* celular se puede congelar a -80 °C hasta el inicio del protocolo de extracción.

La extracción del ADN de *pellet* celular se realiza del mismo modo que en el apartado 2 pero esta vez con menos volumen al contar con menos muestra. Se comienza homogeneizando el *pellet* con 250 µL de 10-10-0,15 TEN, 3 µL de proteinasa K (20 mg/ml) y 15 µL de SDS al 10%. Tras incubar la muestra a +56 °C durante 2h en agitación, se añaden 250 µL de 10-10-0.65 TEN y el mismo volumen de alcohol fenol-cloroformo-isoamilo. De aquí en adelante sigue el mismo protocolo que en el apartado mencionado. La cuantificación del ADN de las muestras se realiza según se explica en el apartado 2.2.6.3.

### 2.3.6.2. Separación de poblaciones celulares humana y murina

Durante la fase de crecimiento *in vivo*, el tejido xenoinjertado se vasculariza y es infiltrado por células de origen murino, incluyendo subpoblaciones heterogéneas de linfocitos, fibroblastos y células endoteliales. Además, el cultivo de células tumorales humanas se ve frecuentemente obstaculizado por los fibroblastos murinos que sobrecrecen las células objetivo. Por ello, se hace uso del *Mouse Cell Depletion Kit* (Miltenyi Biotec Ref. 130-104-694) que ha sido diseñado para el enriquecimiento de células humanas intactas tras el xenotransplante.

Seguimos el protocolo explicado en el apartado 2.3.4 hasta la determinación del número de células que hay en la suspensión. Una vez preparada la muestra se comienza con el marcaje magnético. Para ello se centrifuga la suspensión celular a 600 r.p.m. durante 10 min y se aspira el sobrenadante completamente. A continuación, se resuspende el *pellet* de células añadiendo, por cada  $2 \times 10^6$  de células tumorales o  $10^7$  células totales (incluidos los glóbulos rojos), 80  $\mu\text{L}$  de tampón frío (DPBS y 0,5% BSA) y 20  $\mu\text{L}$  del cóctel de eliminación de células de ratón. Tras mezclar bien la solución, se incuba durante 15 min en el frigorífico (+2-8 °C). Finalizada la incubación, se ajusta el volumen a 500  $\mu\text{L}$  utilizando el tampón.

Llegados a este punto, se procede a la separación magnética. Se coloca la columna LS (Miltenyi Biotec Ref. 130-042-401) en el campo magnético de un Separador MACS (Miltenyi Biotec Ref. 130-042-302) y se prepara la columna enjuagándola con 3 mL de tampón frío. Se pueden procesar hasta  $1 \times 10^7$  células tumorales o hasta  $5 \times 10^7$  células totales en una columna LS. En este momento, se aplica la suspensión celular en la columna. Una vez comience a efluir el volumen, se recoge el flujo que contiene células no marcadas, que representan el enriquecimiento de las células tumorales. Se lava la columna con  $2 \times 1$  mL de tampón y se sigue recogiendo las células no marcadas que pasan, que siguen siendo las células tumorales humanas enriquecidas. Ya obtenidas las células humanas, se procede a la recolección de las células de ratón. Se retira la columna del separador y se coloca en un tubo de 10 mL. Para extraerlas, se pipetea 3 mL

de tampón en la columna e inmediatamente, se efluyen las células de ratón marcadas magnéticamente, empujando firmemente el émbolo en la columna.

Los tubos obtenidos, tanto de las células tumorales humanas como las células murinas, se centrifugan 5 min a 600 r.p.m. y se realizan lavados con PBS para eliminar posibles restos de los componentes del kit. Se realiza un conteo de las células tumorales humanas con azul de tripano y, en este momento, están listas para ser sembradas.

#### 2.3.6.3. Identificación de las poblaciones humanas y murinas por citometría

Las células de carcinoma de colon humano positivas para EpCAM se aislaron de una población celular heterogénea utilizando el kit de depleción de células de ratón, por una columna LS, después de que el tejido fuera disociado utilizando el Kit de disociación de tumores humanos. Para comprobar que la separación se había realizado correctamente, se analizaron las muestras por citometría de flujo usando un citómetro Gallios™ (Beckman Coulter). Se usó el anticuerpo anti-humano CD326 (EpCAM)-PE (Miltenyi Biotec Ref. 130-113-826) para la detección de células humanas y el *Labeling Check Reagent*-APC (Miltenyi Biotec Ref. 130-122-219) para las células de ratón. Los datos se recogieron y analizaron usando el *software* Kaluza (Beckman Coulter).

#### 2.3.6.4. Identificación de las poblaciones humanas y murinas por PCR

Una vez extraído (2.3) y cuantificado (2.2.6.3) el ADN de las células tumorales humanas y murinas, se realizaron experimentos de PCR con cebadores específicos de las especies *Homo sapiens* (MW506798.1 *Homo sapiens haplogroup U1a1a1 mitochondrion, complete genome*) y *Mus musculus* (KY018919.1 *Mus musculus mitochondrion, complete genome*) para la identificación de las poblaciones celulares (Tabla 8). Como controles positivos se utilizaron muestras extraídas de tejido de ratón y de tejido humano.

**Tabla 8. Cebadores para la identificación de las poblaciones humanas y murinas.** pb, pares de bases.

Cebadores	Secuencia	Tamaño
HUMAN_FW	5' - GGTGCAGCCGCTATTTAAAGG - 3'	448 pb
HUMAN_RV	5' - CGTCAGCGAAGGGTTGTAGT - 3'	
MOUSE_FW	5' - CATAGCCTGGCAGACGAACA - 3'	397 pb
MOUSE_RV	5' - GGACTGGAATGCTGGTTGGT - 3'	

Las reacciones se realizaron de forma independiente con los cebadores humanos y murinos en un volumen final de 30  $\mu$ L con 0.2  $\mu$ M de cada cebador con el resto de los componentes necesarios: 1.25 U de la polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq, 5 U/ $\mu$ L, Invitrogen), 2.5 mM de Mg<sub>2</sub>Cl, 0.2 mM de dNTPs, tampón 1x y H<sub>2</sub>Od. Además, se añadieron 100 ng de ADN y la reacción se llevó a cabo utilizando un termociclador *SimpliAmp*<sup>™</sup> (Applied Biosystems). Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: +95 °C durante 5 min; 30 ciclos de +95 °C durante 30 s, +60 °C durante 30 s y +72 °C durante 30 s; y +72 °C durante 7 min. Los productos finales fueron separados electroforéticamente en un gel de TBE (Tris, borato y EDTA) con agarosa al 2% y visualizadas usando una tinción de gel de ADN *SYBR Safe* (Invitrogen Ref. S33102). Este protocolo será el estándar para la identificación de las poblaciones y no la citometría de flujo.

### 2.3.7. Inclusión y tinción con H&E de los tumoroides

Debido al pequeño tamaño de los organoides, a la hora de hacer su inclusión en bloques de parafina, se hace necesario la encapsulación de estos usando la matriz en gel Histogel® (EpreDia Ref. HG-4000-012), ampliamente usada en el servicio de anatomía patología durante la inclusión de pequeñas biopsias.

Para preparar los tumoroides, se elimina el medio de un mínimo de dos pocillos y se recogen las esferas con 500  $\mu$ L de DPBS frío en un tubo Falcon de 15 mL. Los pocillos se lavan con 500  $\mu$ L adicionales de DPBS frío y se recogen en el

mismo tubo. Se centrifuga la muestra a 1000 r.p.m. durante 5 min a +4 °C y se elimina el sobrenadante. Posteriormente, se añade 1 mL de formaldehído al 4%, se resuspende y se incuba 1 h a T.A. A continuación, se calienta una alícuota de Histogel® en un termobloque, precalentado a 80 °C, durante 1-2 min, o hasta que estuviese líquido. El tubo con los tumoroides fijados se centrifuga a 1000 r.p.m. durante 5 min y se desecha el sobrenadante. La alícuota de Histogel se atempera durante 1 min y se añaden lentamente entre 2-4 gotas de Histogel sobre el sedimento de esferas utilizando una punta de pipeta de 1 mL con filtro. Inmediatamente, tras resuspender la muestra con sumo cuidado, la suspensión se transfiere a un molde desechable *Tissue-Tek® Cryomold®* (Sakura Ref. SA62534-10) y se coloca sobre una placa fría para su solidificación. Posteriormente, el bloque de Histogel se extrae del molde, se transfiere a un casete de histología y se comienza con la inclusión siguiendo las instrucciones indicadas en el apartado 2.2.4. Finalmente, se enfría y se corta el bloque en secciones de 3 µm en un microtomo y se montan en cristales portaobjetos; estos portaobjetos se secan a +37 °C durante toda la noche y al día siguiente se realiza la tinción con H&E (apartado 2.2.5).

## **2.4. CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES EN MONOCAPA**

### **2.4.1. Generación de líneas celulares en monocapa a partir de tumoroides**

Tras la disgregación de los tumoroides y la obtención de células individuales (apartado 2.3.4), el volumen de la suspensión celular no utilizado se siembra en placas de Petri tratadas (TPP, Ref. 93100) y se añaden 13 mL de DMEM suplementado con 20% de FBS y 1% de P/S. Se mantienen las placas en un incubador a +37 °C en aire humidificado con un contenido de CO<sub>2</sub> del 5% y se va observando su crecimiento por microscopía.

### **2.4.2. Pase y mantenimiento de las líneas celulares**

El medio de cultivo se refresca cada 3-5 días para mantener siempre unas condiciones adecuadas de crecimiento. El medio se elimina con una pipeta de

vidrio, se realizan lavados con 5 mL de DPBS y se añaden aproximadamente 13 mL de medio fresco DMEM + 10% FBS + 1% P/S previamente atemperado.

Cuando exista una confluencia alta de células en los cultivos, se realizan los pases para ampliar la muestra. Las células adheridas a la placa se desprenden por incubación con tripsina-EDTA 0.05% precalentada a +37 °C durante 1-2 min. A continuación, se inactiva la tripsina utilizando DMEM suplementado con 10% de FBS. Las células se centrifugan durante 5 min a 1000 r.p.m., se resuspenden con un medio fresco nuevo y se siembran en un número variable de placas de Petri dependiendo del tamaño del precipitado celular.

### 2.4.3. Test de contaminación por micoplasma

Todas las líneas celulares fueron sometidas a pruebas rutinarias de contaminación por micoplasma mediante PCR (Tabla 9). Para ello se recogieron los medios de las células incubadas en exceso y en ausencia de antibióticos durante al menos 5 días. Todas las pruebas fueron negativas.

**Tabla 9. Cebadores para la detección de la contaminación por micoplasma.**

Cebadores	Secuencia
MICO-1	5'- GGCGAATGGGTGAGTAACACG - 3'
MICO-2	5'- CGGATAACGCTTGCGACTATG - 3'

## 2.5. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y GENÉTICA DE TUMOROIDES Y TEJIDOS TUMORALES

### 2.5.1. Análisis de microscopía

El crecimiento de las células en monocapa y los tumoroides se monitorizaron por microscopía y se tomaron fotografías con distintos aumentos a lo largo de los pases para comprobar su morfología. A su vez, se tomaron fotografías del efecto de los tratamientos tras la administración de los compuestos.

Por otro lado, también se visualizaron microscópicamente los tejidos y tumores obtenidos a partir de los *orthoxenografts* y los tumoroides tras la tinción con H&E. Se tomaron fotografías de dichas muestras para su posterior evaluación histológica por parte del patólogo.

### 2.5.2. Análisis de inestabilidad de microsatélites

Para evaluar el grado de inestabilidad de las muestras tumorales se analizaron 5 microsatélites BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 y NR-27. Los cambios en la longitud de las repeticiones de mononucleótidos de estos se evaluaron por amplificación de PCR a partir del ADN extraído de las muestras de tejido y de los cultivos de tumoroides. Los cebadores que se utilizaron para los experimentos de PCR son los siguientes (Tabla 10):

**Tabla 10. Cebadores para la amplificación de los microsatélites.** pb, pares de bases.

Cebadores	Secuencia	Tamaño
BAT-25_FW	5' - ACCAGGGAAGTGATCTGCCT - 3'	445 pb
BAT-25_RV	5' - CAAAGAGACAGCAGTTGGAACA - 3'	
BAT-26_FW	5' - TCATCACTGTCTGCGGTAATCA - 3'	363 pb
BAT-26_RV	5' - GAACAAGTGAGACTCTGACT - 3'	
NR-21_FW	5' - GGTGAAGGGAAATCCAGGCT - 3'	372 pb
NR-21_RV	5' - GCCTCCCTTTCTAAATGCGT - 3'	
NR-24_FW	5' - ATAAGCCAGAACCCAGCACC - 3'	709 pb
NR-24_RV	5' - TCCAGACAGCCTTTCAGAACC - 3'	
NR-27_FW	5' - GGGCTGTTACCGCTGAGAAT - 3'	453 pb
NR-27_RV	5' - TTCAACAGCAGAGACCTTGTC - 3'	

Las reacciones se realizaron en un volumen final de 30 µL con 0.2 µm de cada cebador y 100 ng de ADN utilizando un termociclador *SimpliAmp™* (Applied Biosystems). El resto de los componentes de la mezcla son los mismos que en el apartado 2.3.6.4. Las condiciones de las PCRs fueron las siguientes:

**Tabla 11. Condiciones de las PCR para la amplificación de los microsatélites.** min, minutos. s, segundos

Cebadores	Condiciones
BAT25_FW y BAT25_RV	+95 °C - 5 min; 40 ciclos de +95 °C - 30 s, +55 °C - 30 s y +72 °C - 30 s; y +72 °C - 10 min.
BAT26_FW y BAT26_RV NR21_FW y NR21_RV NR27_FW y NR27_RV	+95 °C - 5 min; 35 ciclos de +95 °C - 30 s, +58 °C - 30 s y +72 °C - 30 s; y +72 °C - 10 min.
NR24_FW y NR24_RV	+95 °C - 5 min; 35 ciclos de +95 °C - 45 s, 60 °C - 45 s y +72 °C - 45 s; y +72 °C - 10 min.

Los productos finales fueron separados electroforéticamente en un gel de TBE con agarosa al 2% y visualizadas con *SYBR Safe*.

Para poder secuenciar las muestras en un servicio de secuenciación externo (StabVida, Portugal), primero se tienen que purificar los productos obtenidos de las PCRs. Para tal fin, se hace uso del kit de limpieza de productos de PCR *ExoSAP-IT™* (Applied Biosystems Ref. 78201.1.ML). Este kit se utiliza para la limpieza enzimática del producto PCR amplificado hidrolizando el exceso de cebadores y nucleótidos. Únicamente se tiene que mezclar 5 µL del producto posterior a la PCR con 2 µL de *ExoSAP-IT™* para obtener un volumen de reacción combinado de 7 µL. Incubar a +37 °C durante 15 min para degradar los cebadores y nucleótidos restantes e incubar nuevamente a +80 °C durante 15 min para inactivar el reactivo *ExoSAP-IT™*. Los productos de PCR tratados pueden almacenarse a -20 °C hasta que se necesiten.

El análisis de microsatélites se llevó a cabo tras la secuenciación Sanger y la recepción y análisis de los resultados en el *software* SnapGene ([www.snapgene.com](http://www.snapgene.com)).

### 2.5.3. Análisis genético de mutaciones

Las secuencias de los genes *BRAF* (exón 15) y *KRAS* (exón 2) se evaluaron por amplificación de PCR a partir del ADN extraído de las muestras de tejido y de los cultivos de tumoroides para la detección de las mutaciones más frecuentes en estos genes. Los cebadores y las condiciones de las PCRs que se utilizaron se exponen en la Tabla 12 y Tabla 13:

**Tabla 12. Cebadores para la amplificación de los genes *BRAF* y *KRAS*.** pb, pares de bases.

Diana	Secuencia	Tamaño
BRAF_FW	5' - ATGAGATCTACTGTTTTTCCTT - 3'	244 pb
BRAF_RV	5' - AGTTGAGACCTTCAATGACT - 3'	
KRAS_FW	5' - GGTGGAGTATTTGATAGTGTA - 3'	243 pb
KRAS_RV	5' - ATGGTCCTGCACCAGTAATATGCA - 3'	

**Tabla 13. Condiciones de las PCR para la amplificación de los genes *BRAF* y *KRAS*.** min, minutos. s, segundos.

Cebadores	Condiciones
BRAF_FW y BRAF_RV	+95 °C - 5 min; 40 ciclos de +95 °C - 45 s, +58 °C - 45 s y +72 °C - 45 s; y +72 °C - 10 min.
KRAS_FW y KRAS_RV	+95 °C - 5 min; 40 ciclos de +95 °C - 45 s, +53 °C - 45 s y +72 °C - 45 s; y +72 °C - 10 min.

Los productos finales fueron separados electroforéticamente en un gel de TBE con agarosa al 2% y visualizadas con *SYBR Safe*.

La purificación de los productos de PCR, el envío de las muestras para secuenciar por Sanger y la recepción y análisis de los resultados se hizo del mismo modo que se detalla en el final del apartado anterior (2.5.2).

## **2.6. GENERACIÓN DE LA LIBRERÍA DE FÁRMACOS**

La lista de 42 fármacos se elaboró tras una extensa búsqueda bibliográfica de artículos de investigación y ensayos clínicos de pacientes que padecen CCR, así como información clínica de interés aportada por los oncólogos de nuestro grupo. Adicionalmente, se han incluido otros fármacos que no tienen aparente relevancia en el tratamiento de esta enfermedad, pero si en otros tipos de cáncer, teniendo en común vías de señalización afectadas. Todos los fármacos, menos el 5-FU, OXA e IRI, han sido disueltos con DMSO a una concentración final de 10 mM (Tabla 14).

**Tabla 14. Biblioteca de fármacos elaborada para los experimentos en tumoroides.** Los diferentes colores agrupan a fármacos que actúan sobre la misma vía molecular. nd, no hay datos.

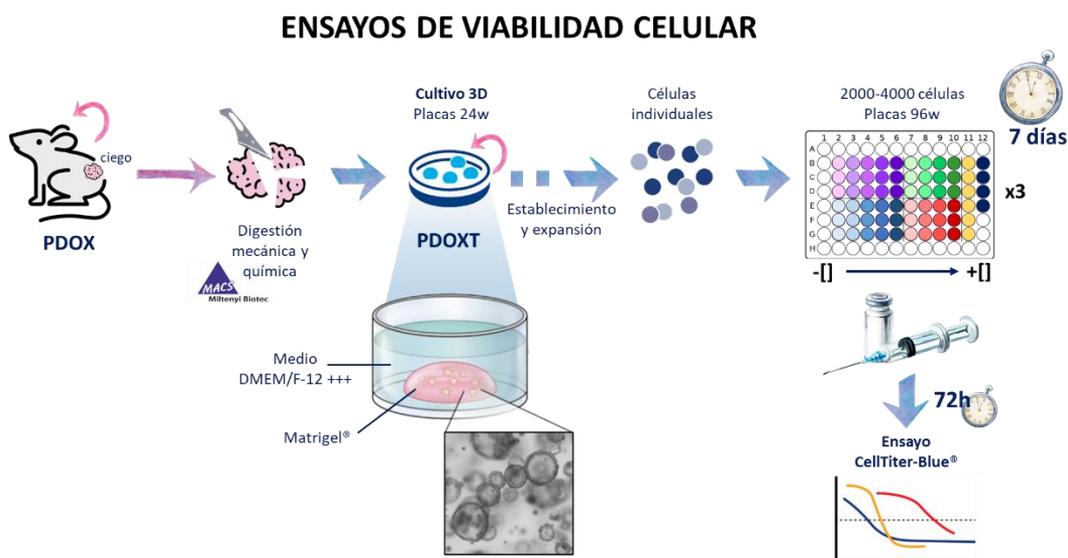
FÁRMACO	INHIBICIÓN
<b>QUIMIOTERAPIA ESTÁNDAR</b>	
<b>5-Fluorouracilo</b>	Síntesis de AND/ARN
<b>Oxaliplatino</b> (NSC 266046)	Síntesis de ADN por la formación de aductos
<b>Irinotecan</b> (CPT-11)	Topoisomerasa I
<b>Capecitabine</b> (RO 09-1978)	<i>tumor-selective fluoropyrimidine carbamate</i>
<b>REPARACIÓN ADN</b>	
<b>CCT245737</b>	CHEK2
<b>Prexasertib HCl</b> (LY2606368)	CHEK1/2
<b>AZD0156</b>	ATM quinasa
<b>Adavosertib</b> (MK-1775)	Wee1
<b>Olaparib</b> (AZD2281)	PARP1/2
<b>Niraparib</b> (MK-4827)	PARP1/2
<b>CICLO CELULAR</b>	
<b>Ribociclib</b> (LEE011)	CDK4 y CDK6
<b>Palbociclib</b> (PD-0332991)	CDK4 y CDK6
<b>RECEPTORES ErbB</b>	
<b>Erlotinib</b> (OSI-774)	EGFR
<b>Osimertinib</b> (AZD9291)	EGFR (mutante selectivo)
<b>Gefitinib</b> (ZD1839)	EGFR (Tyr1173, Tyr992, Tyr1173)
<b>Afatinib</b> (BIBW2992)	EGFR, HER2, ErbB3 y ErbB4
<b>Lapatinib</b> (GW-572016)	EGFR y HER2
<b>MEK</b>	
<b>Selumetinib</b> (AZD6244)	MEK1/2
<b>Binimetinib</b> (MEK162)	MEK1/2
<b>Trametinib</b> (GSK1120212)	MEK1/2

<b>ALK</b>	
<b>Crizotinib</b> (PF-02341066)	ALK y c-Met
<b>Brigatinib</b> (AP26113)	ALK y ROS1
<b>Ceritinib</b> (LDK378)	ALK (+ IGF-1R, InsR, STK22D y FLT3)
<b>RECEPTORES MULTIQUINASAS (RTK)</b>	
<b>Dovitinib</b> (TKI-258)	RTK (FLT3/c-Kit, FGFR1/3 y VEGFR1-4)
<b>Sunitinib</b> (SU11248)	RTK (VEGFR1-3 y PDGFR $\beta$ y c-KIT)
<b>Pazopanib</b> (GW786034)	RTK (VEGFR1-3, PDGFR $\alpha/\beta$ y Kit)
<b>Regorafenib</b> (BAY 73-4506)	RTK (VEGFR1-3, PDGFR $\beta$ , Kit, RET, RAF-1 y BRAF)
<b>Sorafenib</b> (BAY 43-9006)	RTK (PDGFR- $\beta$ , VEGFR2, c-KIT, RAF-1 y BRAF)
<b>Nintedanib</b> (BIBF 1120)	RTK (VEGFR1-3, FGFR1-3 y PDGFR $\alpha/\beta$ )
<b>Lenvatinib</b> (E7080)	RTK (VEGFR2-3, FGFR1-4, PDGFR, KIT y RET)
<b>OTROS INHIBIDORES</b>	
<b>Barasertib</b> (AZD1152-HQPA)	Aurora B
<b>Perifosine</b> (KRX-0401)	AKT
<b>Vemurafenib</b> (PLX4032)	BRAF (V600E)
<b>Defactinib</b> (VS-6063)	FAK
<b>DL-Threo-PDMP</b>	glucosiltransferasa
<b>Bafilomicyn A1</b> (Baf-A1)	H <sup>+</sup> -ATPasa
<b>Dactolisib</b> (BEZ235)	PI3K y mTOR
<b>LGK-974</b>	PORCN
<b>LB-100</b>	PP2A
<b>SHP099</b>	SPH2
<b>Galunisertib</b> (LY2157299)	TGF $\beta$ receptor I (T $\beta$ RI)
<b>STF-62247</b>	VHL

## 2.7. EXPERIMENTOS *IN VITRO*

### 2.7.1. Ensayos de viabilidad celular contra fármacos

En este estudio se han utilizado ensayos de viabilidad para analizar la respuesta a los fármacos (Tabla 14) de las diferentes líneas de tumoroides. Los tumoroides se disgregan mediante tripsinización hasta la obtención de células individuales como se ha descrito en el apartado 2.3.4. A continuación, tras un conteo con azul de tripano en una cámara Neubauer, se siembran entre 2000-4000 células con un 80% de Matrigel® en un volumen final de 10  $\mu$ L por pocillo en placas de 96 de fondo plano. Además, se añaden 100  $\mu$ L de Medio Completo por pocillo. El cultivo se mantiene durante 7 días en incubación a +37 °C para permitir la formación de nuevos tumoroides antes del tratamiento con los fármacos (Figura 6).



**Figura 6. Esquema para la generación de tumoroides y la elaboración de los ensayos de viabilidad celular.** Una vez disgregado el tumor proveniente de los modelos PDOX, las células se cultivan en placas de 24 pocillos embebidas en Matrigel®. Una vez establecida y expandida la línea, se disgrega el Matrigel® para la obtención de células individuales. Tras su conteo, se siembran en placas de 96 pocillos con matrigel durante 7 días. Pasado este tiempo, se tratan los tumoroides con los fármacos deseados con una curva de concentración creciente. A las 72h de tratamiento, se realiza el ensayo CellTiter Blue®.

Para el tratamiento de los tumoroides con la librería de fármacos generada, se retira el medio de cultivo de cada pocillo y se añaden 100  $\mu\text{L}$  de Medio Completo suplementado con la droga de estudio a diferentes concentraciones durante 72 horas. Las concentraciones utilizadas para generar la curva de viabilidad se ven reflejadas en la Tabla 15.

**Tabla 15. Fármacos utilizados y las concentraciones empleadas en los ensayos de viabilidad celular.**

Fármacos	Concentraciones
5-FU, OXA e IRI	3.125 $\mu\text{M}$ , 6.25 $\mu\text{M}$ , 12.5 $\mu\text{M}$ , 25 $\mu\text{M}$ , 50 $\mu\text{M}$ , 100 $\mu\text{M}$ y 200 $\mu\text{M}$
Resto de fármacos de la librería	1 $\mu\text{M}$ , 10 $\mu\text{M}$ , 30 $\mu\text{M}$ y 60 $\mu\text{M}$

Al finalizar el tiempo del ensayo, se evalúa la viabilidad celular mediante el kit de CellTiter-Blue® (Promega Ref. G8081). Se añaden 20  $\mu\text{L}$  por pocillo del reactivo y se incuban las placas a +37 °C con 5% de  $\text{CO}_2$  durante 2 h. Acabado el tiempo, se cuantifica la fluorescencia utilizando un lector de placas VICTOR™ X5 2030 (PerkinElmer).

En todos los experimentos se realizaron tres réplicas experimentales independientes, con un mínimo de triplicado biológico en cada una de las diferentes concentraciones. En todos los ensayos se incluyeron pocillos control de tumoroides “tratados” con Medio Completo y el vehículo en el que está disuelto cada fármaco (DMSO a una concentración máxima de 1%).

Los datos recogidos se normalizan con los pocillos control (sin tratamiento), dando a estos el valor del 100% de la viabilidad y restando la fluorescencia base de los pocillos con Medio Completo sin el reactivo CellTiter-Blue®. Las medidas normalizadas se analizaron mediante el *software* GraphPadPrism V8.0.1 (GraphPad Software, San Diego, California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

## 2.8. EXPERIMENTOS *IN VIVO*

### 2.8.1. Experimento de terapia combinada en tumores PDOX008 y PDOX010

Los tumores PDOX008 y PDOX010 se expandieron de forma ortotópica en el ciego de ratones atímicos para realizar pruebas de fármacos *in vivo*. Cuando los tumores eran detectables por palpación (5-6 semanas), los animales se adscribieron aleatoriamente a los distintos grupos de tratamiento, asegurando la presencia de un mínimo de 4-5 ratones por condición experimental. También se incluyó en cada experimento un grupo control que sólo recibieron el vehículo como tratamiento. Todos los fármacos fueron administrados por vía oral siguiendo las dosis y días de suministro expuestos en la Tabla 16 para los tumores PDOX008 y la Tabla 17 para los tumores PDOX010. Los compuestos fueron resuspendidos siguiendo las instrucciones del fabricante para cada caso.

Los fármacos 5-FU e IRI siempre se probaron en combinación tanto entre ellos mismos como con el crizotinib (CRIZO), gefitinib (GEF) y prexasertib (PREX). En el caso de los ratones con implantación ortotópica de los tumores PDOX008 se trató, además de las combinaciones mencionadas, en monoterapia con los fármacos CRIZO, GEFIT y PREX.

**Tabla 16. Esquema de los experimentos en *orthoxenografts* con tumores implantados de la muestra PDOXT008.**

PDOX008		
Fármaco	Dosis	Administración
5-FU	50 mg/Kg	Dos dosis
Irinotecan	20 mg/Kg	Dos a la semana
Crizotinib	50 mg/Kg	Diario
Gefitinib	50 mg/Kg	Diario
Prexasertib	10 mg/Kg	Tres a la semana

**Tabla 17. Esquema de los experimentos en *orthoxenografts* con tumores implantados de la muestra PDOXT010.**

PDOX010		
Fármaco	Dosis	Administración
5-FU	50 mg/Kg	Dos dosis
Irinotecan	20 mg/Kg	Dos a la semana
Oxaliplatino	8 mg/Kg	Una dosis
Crizotinib	50 mg/Kg	Diario
Gefitinib	50 mg/Kg	Diario
Prexasertib	10 mg/Kg	Tres a la semana

Tras 21 días de tratamiento, se practicó la eutanasia a los ratones y se recogieron, fotografiaron, midieron y pesaron los tumores.

### 2.8.2. Experimento de monoterapia en tumores PDOX008 (PDOX008\_MT)

Finalizado y analizado los resultados del experimento anterior (2.8), se realizó un segundo experimento con el tumor PDOX008 para realizar pruebas de más fármacos *in vivo* únicamente en monoterapia. Tras 3 semanas de crecimiento, los animales se adscribieron aleatoriamente a los distintos grupos de tratamiento. Todos los fármacos fueron administrados por vía oral siguiendo las dosis y días de suministro expuestos en la Tabla 18. Los compuestos fueron resuspendidos siguiendo las instrucciones del fabricante para cada caso.

**Tabla 18. Esquema de los experimentos con monoterapia en *orthoxenografts* con tumores implantados de la muestra PDOXT008.**

PDOXT008_MT		
Fármaco	Dosis	Administración
Vemurafenib	50 mg/Kg	Diario
Sorafenib	54 mg/Kg	Diario
Lapatinib	100 mg/Kg	Diario
Ceritinib	40 mg/Kg	Diario
Regorafenib	30 mg/Kg	Diario

Tras 17 días de tratamiento, se practicó la eutanasia a los ratones y se recogieron, fotografiaron, midieron y pesaron los tumores.

### **2.8.3. Recolección de tumores y órganos y determinación de la carga tumoral.**

Una vez llegados al punto final de la experimentación animal, los tumores y los órganos (pulmón e hígado) se recolectaron siguiendo las instrucciones del apartado 2.2.3, así como la inclusión en parafina de los tejidos (2.2.4).

El tamaño del tumor ( $\text{mm}^3$ ) se midió en el momento de la eutanasia con un calibre o pie de rey. La masa del tumor (g) se determinó con una balanza de precisión.

## **2.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

Los parámetros estadísticos, incluido el número de eventos cuantificados, la media y la desviación estándar (SD) y la significación estadística, se indican en las figuras o en los pies de figura. En la mayoría de los casos, debido al pequeño tamaño de la muestra y a la falta de distribución normal, se utilizó una prueba no paramétrica adecuada para cada situación. El análisis estadístico se ha realizado con el *software* GraphPadPrism V8.0.1 (GraphPad Software, San Diego, California EE. UU., [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). La significación estadística se definió como un valor p inferior a 0.05 (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

## **3. RESULTADOS**



### **3.1. LOS ORGANOIDES TUMORALES CONSERVAN LA IDENTIDAD GENÉTICA E HISTOPATOLÓGICA DE LOS TUMORES *IN VIVO*.**

#### **3.1.1. Información clínica**

Todos los casos recibidos proceden de pacientes con CCR que mostraron resistencias a tratamientos en primera línea con regímenes basados en FOLFOX o FOLIRI, principalmente en estadio IV. Las muestras proceden de pieza quirúrgica o de biopsias que se obtuvieron principalmente del colon. En algunos casos, las biopsias provenían de metástasis hepáticas (P004), así como de metástasis cerebral (P002, 7 y 10). A parte de los tratamientos de quimioterapia, algunos pacientes también recibieron tratamientos en segunda y, en ocasiones, en tercera línea con diferentes agentes biológicos aprobados para el CCR. Pacientes que fueron tratados en el Hospital de Bellvitge; Instituto Catalán de Oncología (ICO), y Hospital Moises Brogi. La información de interés recopilada para esta tesis se muestra en la Tabla 19.

**Tabla 19. Información clinicopatológica de interés de las muestras recibidas. wt, nativo.**

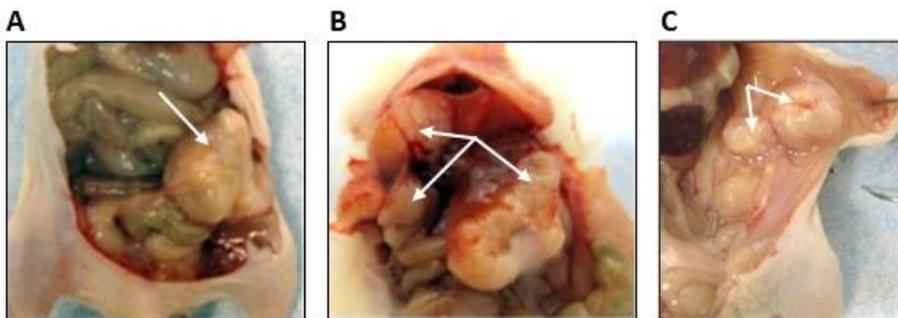
ID	MSI	<i>KRAS/BRAF</i>	Secuencia tratamientos	Otros datos
P001	MSI-H	<i>KRAS (G12D)</i> <i>BRAF</i> desconocido	1. FOLFOX adyuvante 2. FOLFIRI-Aflibercept	Implante peritoneal
P002	MSS	<i>KRAS (A146P/T/V)</i>	1. FOLFOX 2. FOLFIRI	Metástasis cerebral
P003	MSS	<i>BRAF (V600E)</i>	1. FOLFOX	Implante peritoneal
P004	MSI-H	<i>BRAF (V600E/D)</i>	1. CAPOX adyuvante 2. FOLFIRI	Metástasis hepática
P005	MSS	<i>KRAS (WT)</i> <i>BRAF (WT)</i>	1. FOLFOX	Implante peritoneal
P006	MSI-H	<i>BRAF (V600E)</i>	1. FOLFOX 2. FOLFOX	Metástasis hepática
P007	MSS	<i>KRAS (G12D)</i> <i>BRAF</i> desconocido	1. FOLFOX 2. Bevacizumab	Metástasis cerebral
P008	MSS	<i>BRAF (V600E)</i>	1. FOLFOX 2. Encorafenib-Cetuximab-Binimetinib 3. FOLFIRI-Aflibercept	Implante peritoneal
P009	MSI-H	<i>BRAF (V600E)</i>	1. FOLFIRI	Implante peritoneal
P010	MSI-H	<i>KRAS (WT)</i> <i>BRAF (WT)</i>	1. FOLFOX-Panitumumab	Metástasis cerebral

### 3.1.2. Generación y caracterización de los modelos *in vivo*

Durante el periodo de esta tesis hemos podido implantar un total de 12 casos de cáncer colorrectal esporádico, obteniendo una tasa de implantación para los PDOX del 83% (10/12 casos). Los tumores/biopsias de los pacientes fueron todas implantadas en ratones atímicos o inmunosuprimidos de forma ortotópica en el ciego, al igual que los casos metastásicos. De forma adicional a los casos de estudio de esta tesis, he generado otros 5 modelos de CCR a partir de tumor primario que están siendo útiles en el grupo: i) tres de ellos se han tratado de forma iterativa con 5-FU *in vivo* en el ratón para generar tumores resistentes a la

quimioterapia; ii) los dos restantes se generaron a partir de muestras de pacientes de CCR y genotipo MSI y con mutaciones de línea germinal en los genes *MLH1* y *PMS2*.

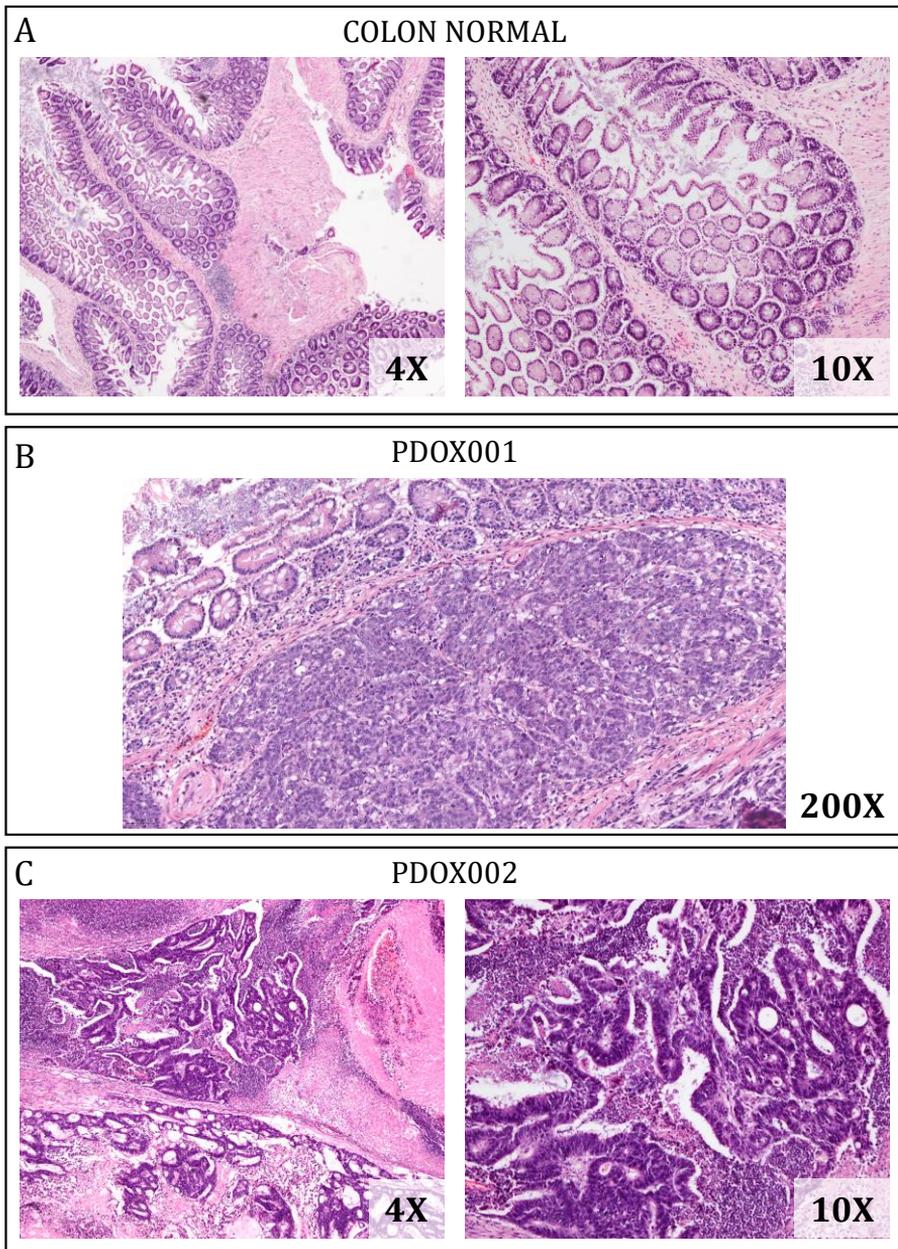
Una vez implantados los tumores/biopsias, los modelos *orthoxenografts* mayoritariamente simularon el comportamiento biológico del tumor en el paciente, respecto a su patrón de diseminación. En la imagen se observa un caso de un PDOX derivado a partir de una metástasis hepática de un paciente, implantado en el ciego del ratón (Figura 7A) y que ha diseminado a hígado (Figura 7B) y ha generado también implantes peritoneales (Figura 7C). Al sacrificio, en todos los modelos tanto el tumor primario, las metástasis macroscópicas y otros órganos como el hígado, pulmón y diafragma se recogieron y se incluyeron en formol para generar los bloques de parafina, para realizar futuros estudios de histología.



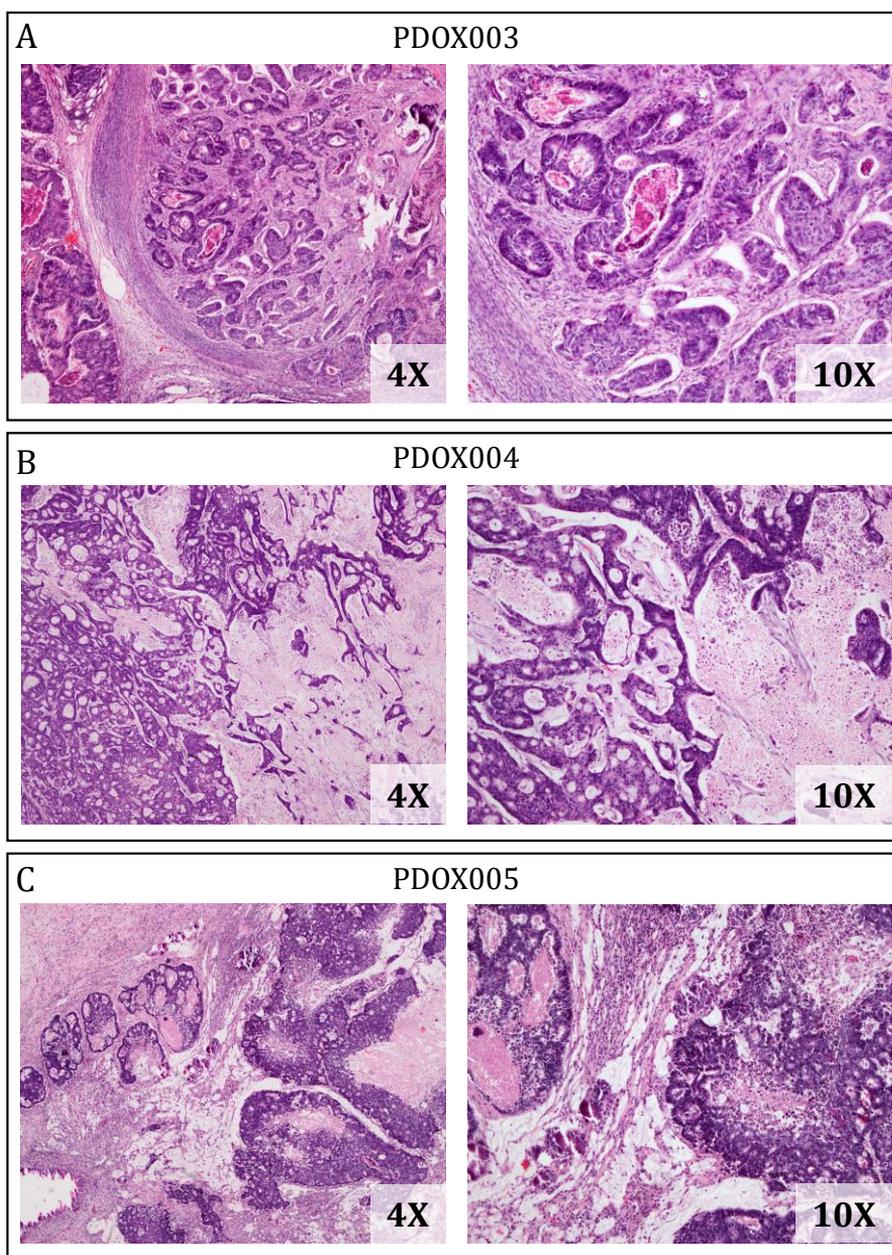
**Figura 7. Metástasis en *orthoxenografts*.** Los modelos *orthoxenografts* permiten la dispersión del tumor al igual que ocurre en los pacientes de CCR en estadio IV. A parte del tumor primario implantado en el colon (A), aparecen implantes hepáticos (B) y peritoneales (C).

Los estudios histológicos comparativos del tumor primario y del PDOX fueron compatibles con la observada en los tumores de los pacientes de los que derivaron, cosa ya ampliamente demostrado en otros estudios. Algunos PDOX generados presentaban características mucinosas inherentes al subgrupo CMS1 de CCR. Características que se mantuvieron en el primer implante como en pases sucesivos (Figura 8, Figura 9 y Figura 10). De los tumores mostrados, los PDOX004 (Figura 9B), PDOX006 y PDOX007 (Figura 10A y B) los podemos

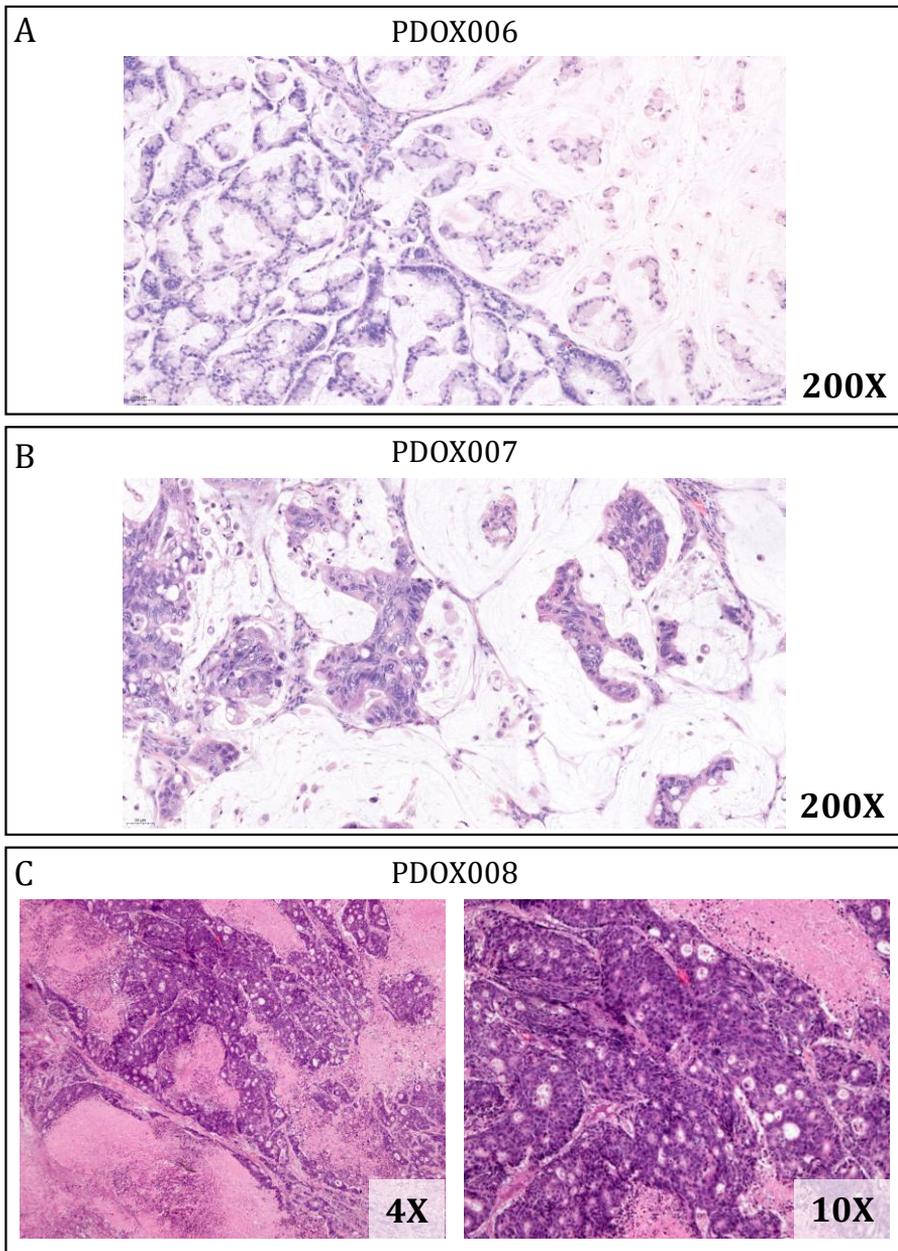
clasificar como adenocarcinomas mucinosos, siendo PDOX006 un tumor de bajo grado con un componente de células en anillo de sello (<5%), mientras que el tumor PDOX007 es de alto grado. Hablamos de tumores de bajo grado cuando el tejido tumoral se parece al tejido sano y contiene diferentes agrupaciones de células. Otros tumores, como los PDOX001 y PDOX009 (alto grado), no muestran un patrón histológico claro, por lo que los clasificamos como son adenocarcinomas no especificado (*not otherwise specified*, NOS). Por último, a pesar de que la presencia de linfocitos es característica de los tejidos del subgrupo CMS1, ninguno de los tumores presenta un infiltrado linfocitario significativo. Este resultado es esperable ya que todas las biopsias fueron implantadas en ratones inmunosuprimidos.



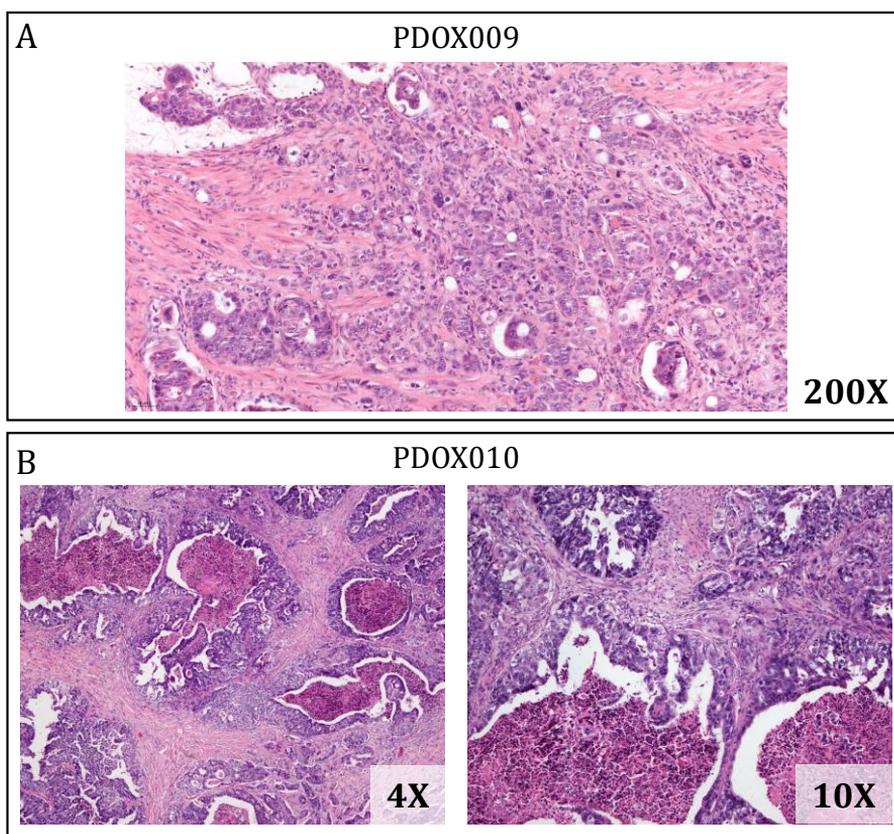
**Figura 8. Patrones histológicos de las muestras de CCR PDOX001 y PDOX002.** El colon en su estado nativo (**A**) muestra una estructura muy clara en la que se aprecian las criptas de las vellosidades a diferencia de los tumores PDOX001 (**B**) y PDOX002 (**C**) sin un patrón estructural claro.



**Figura 9. Patrones histológicos de las muestras de CCR PDOX003, PDOX004 y PDOX005. El tumor PDOX004 (B) presenta una histología altamente mucinosa en comparación con PDOX003 (A) con una estructura compacta y PDOX005 (C).**



**Figura 10. Patrones histológicos de las muestras de CCR PDOX006, PDOX007 y PDOX008. Los tumores PDOX006 (A) y PDOX007 (B) tienen un alto grado de diferenciación histológica de tipo mucinoso a diferencia de PDOX008 (C).**



**Figura 11. Patrones histológicos de las muestras de CCR PDOX009 y PDOX010.**

Evaluamos si las mutaciones observadas en los tumores de los pacientes también se detectaban en sus correspondientes modelos *orthoxenografts*. Para ello, analizamos los exones 15 y 2 de los genes *BRAF* y *KRAS*, respectivamente, así como la presencia o ausencia de MSI mediante secuenciación Sanger de un panel de 5 microsatélites (BAT-26, BAT-25, NR-21, NR-24 y NR-27) tras la extracción del ADN del tejido tumoral crecido *in vivo*. Los resultados muestran que, para todas las muestras, las mutaciones detectadas en los tumores de los pacientes se perpetúan a lo largo de diferentes pases en los *orthoxenografts*. Asimismo, se conserva la inestabilidad en los tumores desarrollados en el modelo murino respecto a la encontrada en los pacientes (Tabla 20).

**Tabla 20. Resultados de la caracterización genética de los tumores en *orthoxenografts*.** Los tumores crecidos en ratones mantienen las mismas mutaciones y estado de MSI que los pacientes de los que provenía. \*el paciente presenta una mutación *KRAS* (A146P/T/V). wt, salvaje.

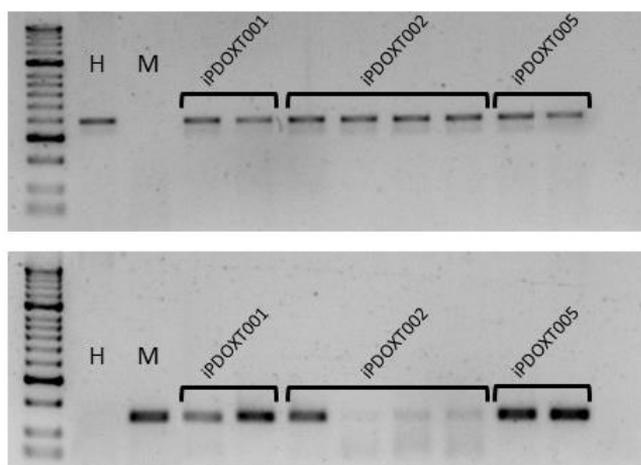
Paciente	Muestra	<i>BRAF</i>	<i>KRAS</i>	MSI
P001	<b>PDOX001</b>	wt	G12D	MSI-H
P002	<b>PDOX002</b>	wt	wt*	MSS
P003	<b>PDOX003</b>	V600E	wt	MSS
P004	<b>PDOX004</b>	V600E	wt	MSI-H
P005	<b>PDOX005</b>	wt	wt	MSS
P006	<b>PDOX006</b>	V600E	wt	MSI-H
P007	<b>PDOX007</b>	wt	G12D	MSS
P008	<b>PDOX008</b>	V600E	wt	MSS
P009	<b>PDOX009</b>	V600E	wt	MSI-H
P010	<b>PDOX010</b>	wt	wt	MSI-H

### 3.1.3. Generación y caracterización de los modelos *in vitro*

En los estudios publicados en los que se hace uso de los organoides como herramienta principal de investigación, la generación de las líneas se realiza directamente a partir de la muestra del tumor primario obtenida del paciente. Sin embargo, aquí testamos otra estrategia en la que partimos de los tumores generados en los modelos *orthoxenografts* como fuente para la generación de los organoides, lo que nos permitió generar modelos *in vivo* e *in vitro* a partir de una pequeña biopsia tumoral.

Al disgregar el tumor obtuvimos una suspensión de células compuestas por las propias células tumorales y las células del estroma, que en nuestro caso eran murinas, que se incluyeron inicialmente todas en el cultivo *in vitro*. Estas células murinas son principalmente fibroblastos del microambiente tumoral o de otros tejidos del ratón de donde se implantó la muestra, como el colon o el

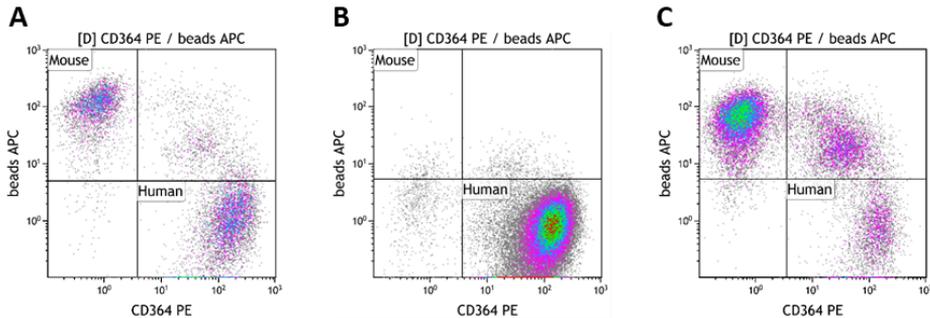
hígado, que tienen un crecimiento muy rápido y que podrían desplazar a las poblaciones celulares de interés. Una vez establecido el cultivo, comprobamos mediante experimentos de PCR con cebadores específicos que discriminan el ADN humano/murino, si las células de los cultivos obtenidos eran las células tumorales humanas o murinas (Figura 12). Los resultados demostraron que, a pesar de que la mayoría de tumoroides eran derivados de células humanas, se detectaba la presencia de células de ratón en los cultivos celulares tridimensionales. No pudimos, discernir si estos eran restos celulares que permanecían en cultivo de forma inerte o células que lograron formar estructuras complejas consiguiendo dividirse.



**Figura 12. PCR Humano/ratón.** Contaminación de células de ratón presente en los cultivos de organoides en tres de las líneas establecidas. En la parte superior la prueba con los cebadores de humano (H) y en la inferior con los de ratón (M). iPDOXT, ICO *Patient Derived Orthotopic Xenografts Tumoroids*.

Dado que en nuestros cultivos existía la presencia de ambas poblaciones, se decidió realizar una separación de las poblaciones humanas y murinas. Otro de los objetivos previstos con la separación es contar con un cultivo enriquecido de células tumorales para aseguramos que cualquier estudio, tanto farmacológico como genético, que podamos realizar cuente con la certeza de estar observando la respuesta o analizando únicamente las células tumorales. Una vez finalizado el protocolo de separación celular, se comprobó el resultado por citometría de flujo.

Antes de realizar la separación, y como se evidenció en los experimentos de PCR previos, se detectó señal de ambos fluorocromos reflejando la existencia de células de ambas especies (Figura 13A). Una vez filtradas las células y tras el análisis de los resultados de la citometría de flujo se consigue la separación total de las poblaciones celulares humanas (Figura 13B) y murinas (Figura 13C).



**Figura 13. Análisis de los resultados de citometría de flujo.** Antes de la depleción de las células murinas **(A)** se aprecian ambas poblaciones celulares. El uso del kit nos permite seleccionar y separar las células humanas **(B)** del conjunto de las células de ratón **(C)**.

Así, una vez deplecionadas las células murinas y obtenidas únicamente las células humanas, se procedió a establecer los cultivos de tumoroides en 3D con Matrigel® como matriz extracelular. Con protocolos desarrollados en nuestro grupo se consiguieron generar un total de seis líneas de cultivos de tumoroides o iPDOXT (*ICO Patient Derived Orthotopic Xenografts Tumoroids*) a partir de las 10 muestras iniciales, dando como resultado una tasa de éxito del 60%: iPDOXT001, iPDOXT002, iPDOXT004, iPDOXT008, iPDOXT009 e iPDOXT010. En los 4 cultivos restantes no fue posible establecer estos cultivos porque las células no crecieron o lo hicieron muy lentamente sin conseguir establecerse.

**Tabla 21. Información y correlación de las identificaciones en los pacientes, orthoxenografts y tumoroides.** ID, identificación. wt, nativo. ne, no establecido.

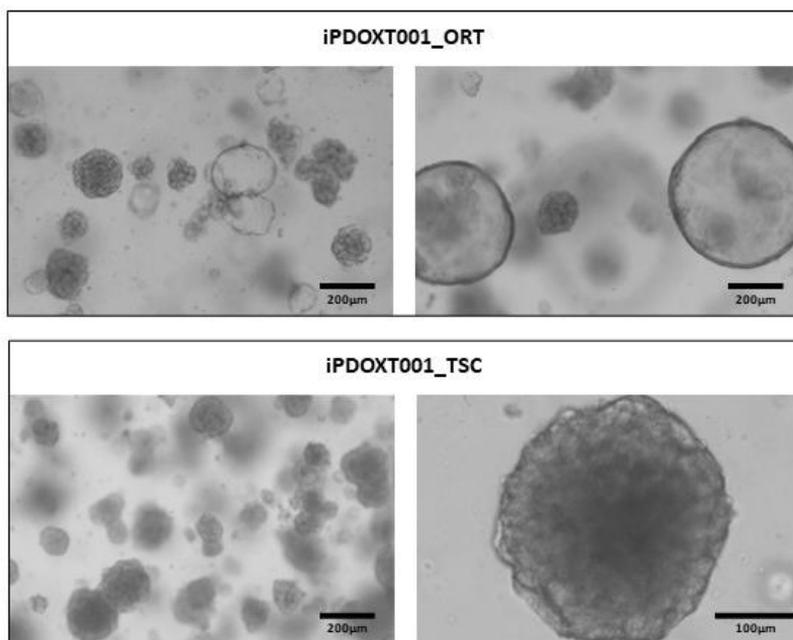
PACIENTE		PDOX		TUMOROIDES	
ID	Alteraciones	ID	Alteraciones	ID	Pase
<b>P001</b>	<i>KRAS</i> (G12D) <i>BRAF</i> ? MSI-H	<b>PDOX001</b>	<i>KRAS</i> (G12D) <i>BRAF</i> (WT) MSI-H	<b>iPDOXT001</b>	>10
<b>P002</b>	<i>KRAS</i> (A146P/T/V) MSS	<b>PDOX002</b>	<i>KRAS/BRAF</i> (WT) MSS	<b>iPDOXT002</b>	>10
<b>P003</b>	<i>BRAF</i> (V600E) MSS	<b>PDOX003</b>	<i>BRAF</i> (V600E) MSS	ne	ne
<b>P004</b>	<i>BRAF</i> (V600E/D) MSI-H	<b>PDOX004</b>	<i>BRAF</i> (V600E) MSI-H	<b>iPDOXT004</b>	5
<b>P005</b>	<i>KRAS/BRAF</i> (WT) MSS	<b>PDOX005</b>	<i>KRAS/BRAF</i> (WT) MSS	ne	ne
<b>P006</b>	<i>BRAF</i> (V600E) MSI-H	<b>PDOX006</b>	<i>BRAF</i> (V600E) MSI-H	ne	ne
<b>P007</b>	<i>KRAS</i> (G12D) <i>BRAF</i> ? MSS	<b>PDOX007</b>	<i>KRAS</i> (G12D) <i>BRAF</i> (WT) MSS	ne	ne
<b>P008</b>	<i>BRAF</i> (V600E) MSS	<b>PDOX008</b>	<i>BRAF</i> (V600E) MSS	<b>iPDOXT008</b>	>10
<b>P009</b>	<i>BRAF</i> (V600E) MSI-H	<b>PDOX009</b>	<i>BRAF</i> (V600E) MSI-H	<b>iPDOXT009</b>	2
<b>P010</b>	<i>KRAS/BRAF</i> (WT) MSI-H	<b>PDOX010</b>	<i>KRAS/BRAF</i> (WT) MSI-H	<b>iPDOXT010</b>	6

Es importante resaltar que en los organoides obtenidos, no se observó una morfología similar entre ellos, sino que cada uno presentó una estructura 3D de crecimiento específica que varió desde estructuras quísticas de paredes finas hasta organoides compactos carentes de lumen. Se realizó una evaluación microscópica de las estructuras por si su comportamiento espacial tuviera un impacto sobre los resultados de los análisis posteriores.

### 3.1.3.1. Arquitectura de los organoides

#### **iPDOXT001**

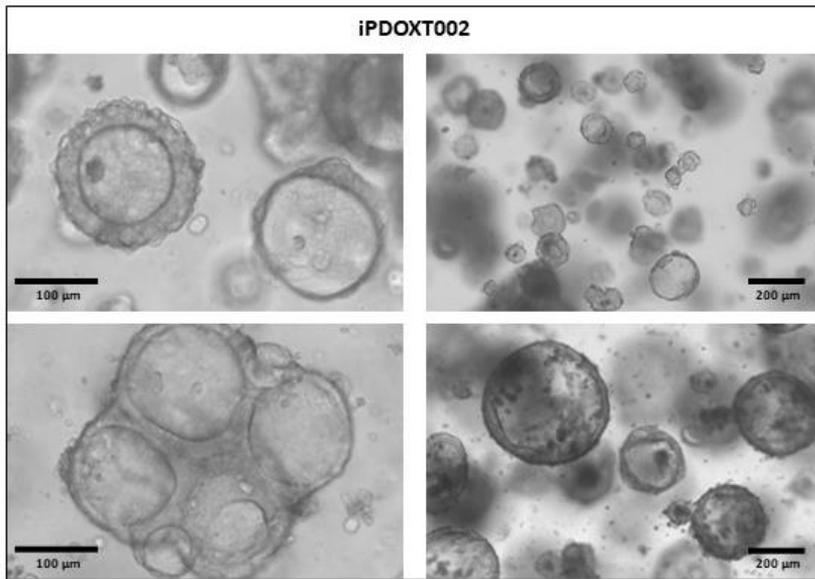
Para estudiar si la arquitectura de los tumoroides cambia en función del lugar de implantación, en el caso del tumoroides iPDOXT001 se partió para su generación, de los tumores generados por implantación subcutánea (TSC) como ortotópica en el colon del ratón (ORT). Una vez disgregados los tumores, seleccionadas las células humanas y establecida la línea celular en 3D, se pueden apreciar diferencias entre las líneas generadas a partir de los tumores crecidos en las dos localizaciones (Figura 14). En el cultivo proveniente del tumor subcutáneo, únicamente se observó un tipo de estructura compacta rellena de células con un núcleo más oscuro. Por otro lado, en el cultivo derivado del tumor ortotópico se detectan dos arquitecturas claramente diferenciadas: la primera es la misma que se pudo apreciar en el caso del TSC, mientras que la segunda está formada por una capa fina de células epiteliales en el exterior y vacías en su interior. Esto puede ser indicativo de una mayor heterogeneidad en el tumor ortotópico, indicando posiblemente la existencia de diferentes poblaciones celulares humanas dentro del mismo cultivo. Desafortunadamente, tras una sucesión de 2 pases, únicamente se consiguió mantener viable la línea de tumoroides proveniente del tumor subcutáneo y, por tanto, será la que se usará para los posteriores experimentos.



**Figura 14. Estructura de los tumoroides iPDOXT001. Fotografía de microscopía de los tumoroides embebidos en matrigel en cultivo.** Las muestras provenientes del tumor iPDOX001 implantado ortotópicamente generan dos estructuras diferentes de tumoroides (superior) mientras que las del tumor subcutáneo sólo una (inferior). ORT, ortotópico. TSC, tumor subcutáneo.

### **iPDOXT002**

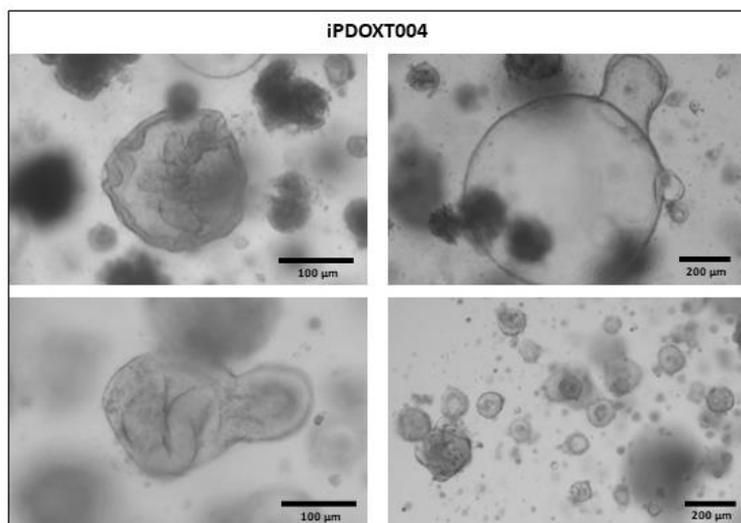
En la línea de tumoroides iPDOXT002 se detectó otra arquitectura diferente a las dos anteriores (Figura 15). En este caso se observaron tumoroides con lumen, pero con una capa más gruesa de células epiteliales en la parte externa. Además, de forma anecdótica, en diversos pases algunas de estas estructuras formaban agregaciones de tumoroides, crecían aglomeradas.



**Figura 15. Estructura de los tumoroides iPDOXT002. Fotografía de microscopía de los tumoroides embebidos en matrigel en cultivo.** La arquitectura de los tumoroides iPDOXT002 presenta una capa gruesa de células con lumen en su interior. En la imagen inferior izquierda se forma un aglomerado de tumoroides para formar una única estructura tridimensional.

#### **iPDOXT004**

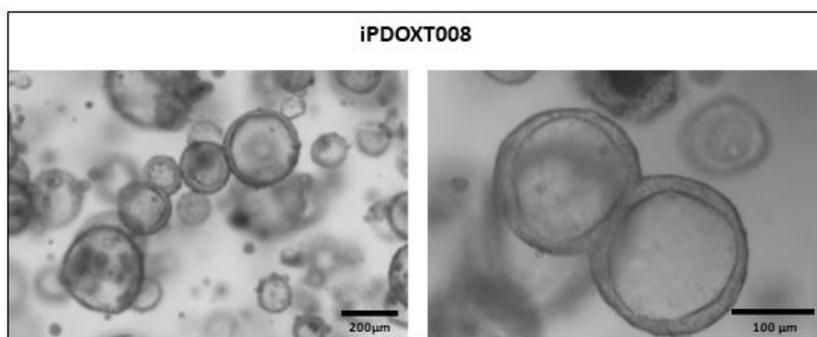
El caso de la línea de tumoroides iPDOXT004 llama particularmente la atención (Figura 16). La arquitectura de estos tumoroides se asemeja mucho a la encontrada en la línea iPDOXT002, sin embargo, la superficie de algunas esferas se comienza a doblar sobre si misma formando unas vellosidades internas que se asemejan a las que se pueden encontrar en los organoides de colon normal [115]. La formación de estos organoides es minoritaria en comparación con la arquitectura más simple, compuesta por una capa externa gruesa, y vacías en su interior, debido a que requieren más tiempo de cultivo para que se formen.



**Figura 16. Estructura de los tumoroides iPDOXT004. Fotografía de microscopía de los tumoroides embebidos en matrigel en cultivo.** La aparición de vellosidades internas y arquitecturas más complejas es característica de la línea de tumoroides iPDOXT005 (superior e inferior izquierda). A pesar de ello, estos tumoroides no son representativos del global de la línea celular (inferior derecha).

### **iPDOXT008**

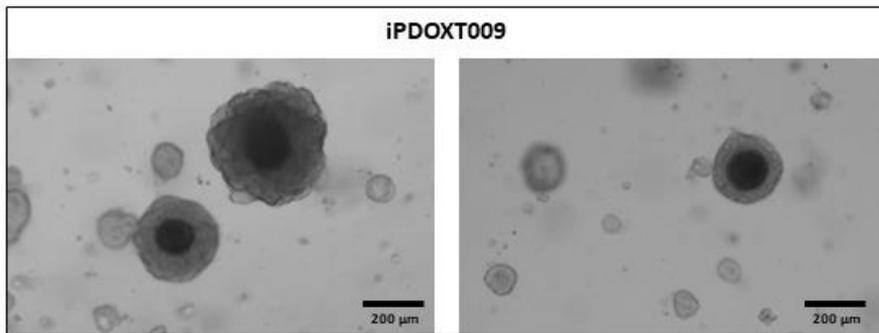
La estructura tridimensional que muestran las células de este tumor en cultivo es muy similar a la que podemos encontrar en la línea PDOXT002. Esta línea es de las que mejor nos crecieron a lo largo de toda la tesis.



**Figura 17. Estructura de los tumoroides iPDOXT008. Fotografía de microscopía de los tumoroides embebidos en matrigel en cultivo.** La arquitectura de los tumoroides iPDOXT008 presenta una capa gruesa de células con lumen en su interior.

### iPDOXT009

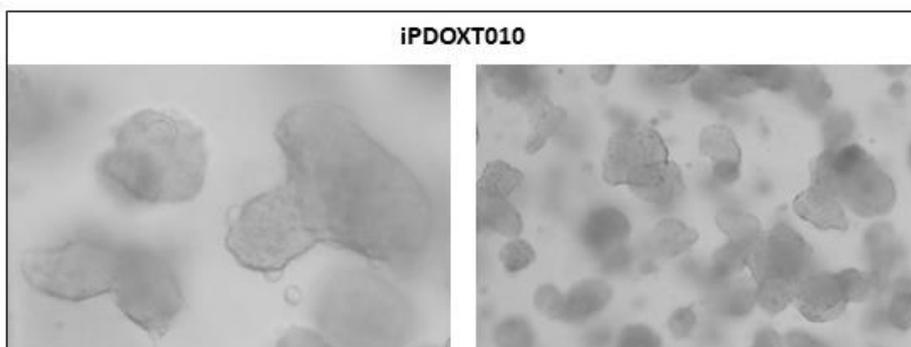
El establecimiento de esta línea fue difícil, pues las células mostraban una baja capacidad de división celular, llevando a una expansión lenta, llegando incluso a degradarse el matrigel antes de que hubiera una confluencia suficiente para realizar un pase. Asimismo, la arquitectura del cultivo 3D obtenida fue de una esfera maciza de células presentaba un núcleo más oscuro mucho más acuciado que el que encontramos en la línea iPDOXT001 (Figura 18), lo que se correspondía con una baja viabilidad celular observada por conteo automático con azul de tripano. Por ello, esta línea no se incluyó en los experimentos de cribado farmacológico.



**Figura 18. Estructura de los tumoroides iPDOXT009. Fotografía de microscopía de los tumoroides embebidos en matrigel en cultivo.** Esta línea de tumoroides presenta una estructura compacta de células con un núcleo necrótico más oscuro. Poca concentración de tumoroides en los cultivos.

### iPDOXT010

Por último, la muestra iPDOXT010 cuenta con unas estructuras muy similares a las encontradas en la iPDOXT001 compuestas por tumoroides compactos rellenos de células (Figura 19). Fue llamativo que algunos tumoroides del cultivo formaron pequeñas extensiones generando estructuras con aspectos más tubulares o alargados en lugar de esferas como se observó en los cultivos 3D de los otros tumores.



**Figura 19. Estructura de los tumoroides iPDOXT010. Fotografía de microscopía de los tumoroides embebidos en matrigel en cultivo.**

### 3.1.3.2. Caracterización genética de las líneas celulares establecidas

Una vez extraído y aislado el ADN de todas las líneas de tumoroides establecidas en cultivo, al igual que se hizo con las muestras obtenidas del ratón, se secuenciaron los mismos fragmentos de los genes *BRAF* y *KRAS* y el panel de 5 microsatélites antes mencionado (Tabla 22). Se observó que los cultivos celulares de tumoroides mantuvieron las mismas características genéticas que los modelos *orthoxenografts* correspondientes y, por consiguiente, de los tumores de los pacientes de los que derivaron.

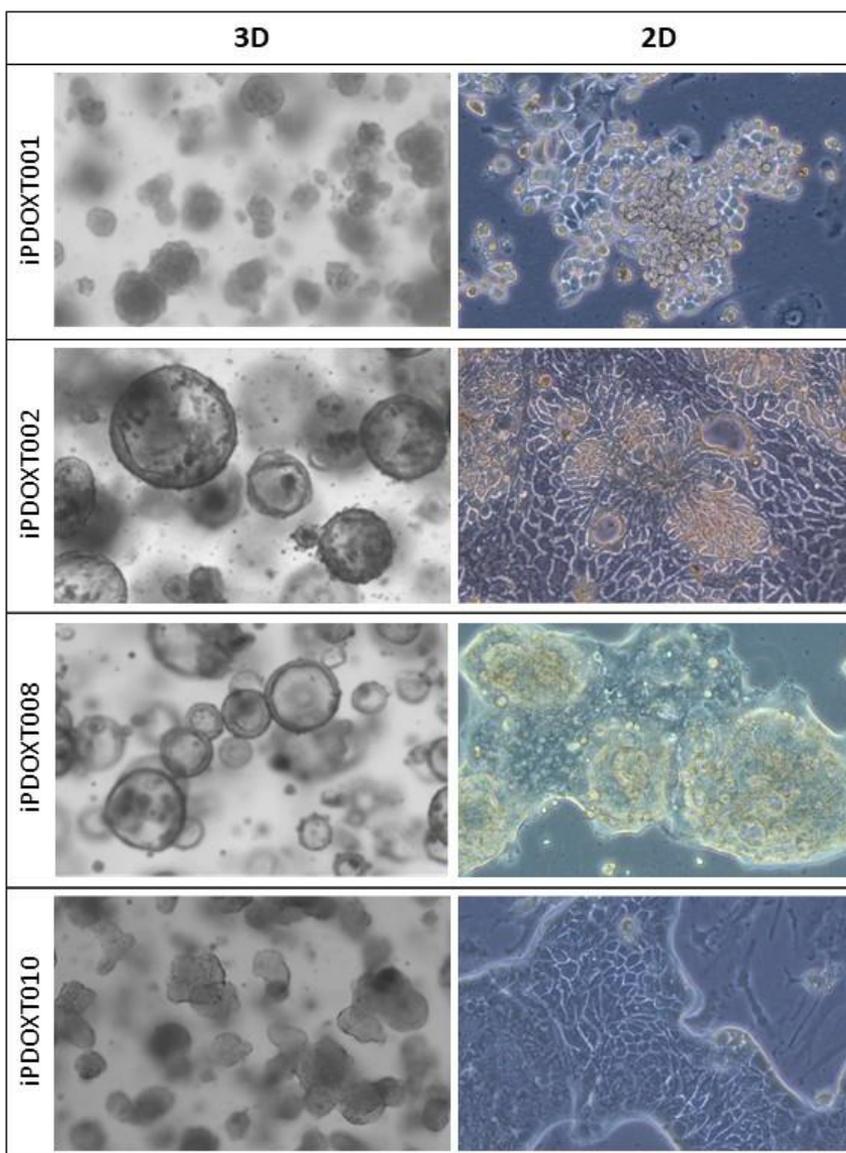
En las líneas de tumoroides encontramos tres con mutaciones V600E en *BRAF* (iPDOXT004, 8 y 9) (50%) y una con una mutación G12D en el gen *KRAS* (iPDOXT001) ( $\approx 20\%$ ). En cuanto al estado de inestabilidad de microsatélites, 4 de las 6 líneas establecidas ( $\approx 70\%$ ) cuentan con marcadores que indiquen la presencia de inestabilidad: una de ellas con la mutación en *KRAS* detectada (iPDOXT001), dos con una mutación en *BRAF* (iPDOXT004 e iPDOXT009) y la última sin mutaciones.

Tabla 22. Resultados de la caracterización genética de los tumoroides. wt, salvaje.

Paciente	PDOX	Tumoroides	<i>BRAF</i>	<i>KRAS</i>	MSI	Pase extracción ADN
P001	PDOX001	iPDOXT001	wt	G12D	MSI-H	2, 5 y 14
P002	PDOX002	iPDOXT002	wt	wt	MSS	2 y 12
P004	PDOX004	iPDOXT004	V600E	wt	MSI-H	1
P008	PDOX008	iPDOXT008	V600E	wt	MSS	2 y 6
P009	PDOX009	iPDOXT009	V600E	wt	MSI-H	1
P010	PDOX010	iPDOXT010	wt	wt	MSI-H	2

### 3.1.3.3. Generación de cultivos 2D

A pesar de que el objetivo principal de la tesis es la utilización de los modelos *orthoxenografts* y de tumoroides como herramientas para un cribado farmacológico en el CCR, decidimos establecer, siempre que fuera posible, líneas celulares en monocapa de los mismos tumores. Este abordaje adicional nos permitió observar paralelamente el comportamiento de las células tumorales en cultivos 2D tradicionales, y así, si fuera necesario en un futuro, poder realizar estudios farmacológicos comparativos entre los cultivos 2D y 3D. Además, debido a las características de quimiorresistencia de las muestras, su establecimiento para futuros estudios es de suma utilidad, independientemente de su uso o no en esta tesis. De los seis cultivos iPDOXT establecidos, se han podido desarrollar 4 líneas en cultivo 2D: iPDOX001, iPDOX002, iPDOX008 e iPDOX010. Las líneas celulares que se han conseguido generar provienen siempre de la disgregación de los cultivos de tumoroides y no de los tumores crecidos en los ratones. La disposición de las células observada en los cultivos en monocapa se asemeja bastante a los cultivos de tumoroides (Figura 20), encontrando acumulaciones de células en las líneas derivadas de iPDOXT001 e iPDOXT008, zonas menos diferenciadas y con espacios vacíos como ocurría en iPDOXT002 y estructuras más tubulares o alargadas similares a las presentes en iPDOXT010.



**Figura 20. Comparación de los cultivos 3D y los 2D.** Las estructuras celulares no se ven alteradas, en términos generales, entre los cultivos 3D (izq.) y los 2D (drcha.) derivadas de la misma muestra.

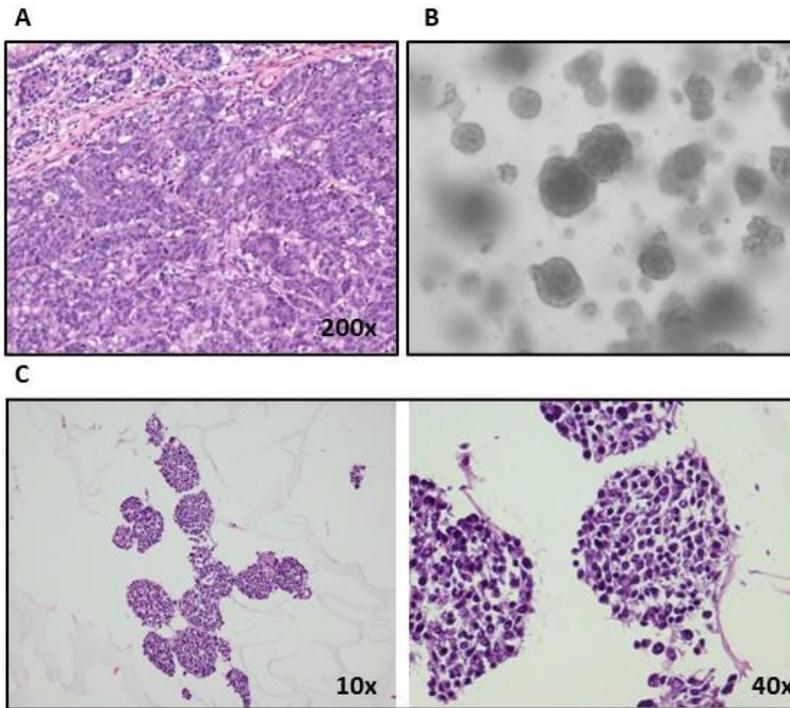
Adicionalmente, como control de nuestros experimentos farmacológicos, se ha hecho uso de las líneas celulares establecidas de cáncer de colon sensibles a la quimioterapia HT-29 y HCT-116, crecidas también en 3D.

**Tabla 23. Características de las líneas control.** ATCC, *American Type Culture Collection*.

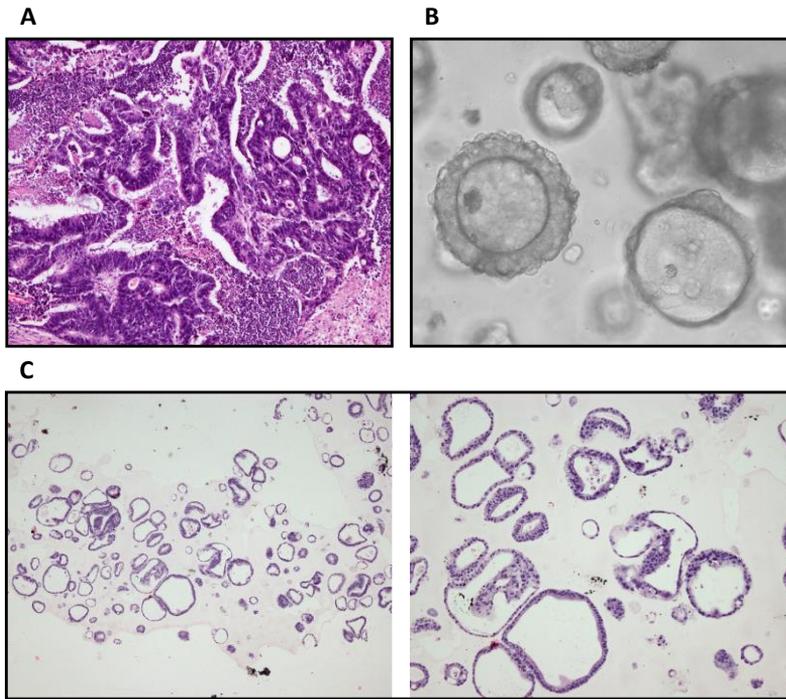
LÍNEA	ATCC	CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS
HT-29	HTB-38	MSS, <i>BRAF</i> (V600E), <i>PIK3CA</i> (P449T), <i>TP53</i> (R273H)
HCT-116	CCL-247	MSI, <i>KRAS</i> (G13D), <i>PIK3CA</i> (H1047R)

#### 3.1.4. Comparación modelos *in vivo* e *in vitro*

El estudio por H&E de los cortes de los PDOX y de los tumoroides fijados, sugieren una similitud entre los pares. Así, los tejidos con una histología compacta y sin características mucinosas, como la encontrada en la muestra PDOX001, generan tumoroides sin lumen e igual de compactos (Figura 21). Mientras tanto, en aquellos tumores donde se apreciaba un medio o alto grado de diferenciación histológica (PDOX002) generan tumoroides con estructuras huecas (Figura 22). En esta tesis no lo hemos realizado, pero el experimento que nos hubiera permitido mostrar la analogía histológica entre ambos hubiera requerido de la inyección ortotópica en el ciego de ratones de estos tumoroides.



**Figura 21. Comparativa histológica de la muestra PDOX001 y iPDOXT001.** El tumor PDOX001, sin histología mucinosa (A), genera tumoroides en el cultivo *in vitro* (B) que no presentan lumen en su interior, sino que están formados por una estructura compacta de células (C).



**Figura 22. Comparativa histológica de la muestra PDOX002 y iPDOXT002.** Las características histológicas mucinosas encontradas en el tumor PDOX002 (A) se asemejan a las del cultivo *in vitro* de tumoroides (B), con arquitecturas vacías de células en su interior rodeados de las células tumorales (C).

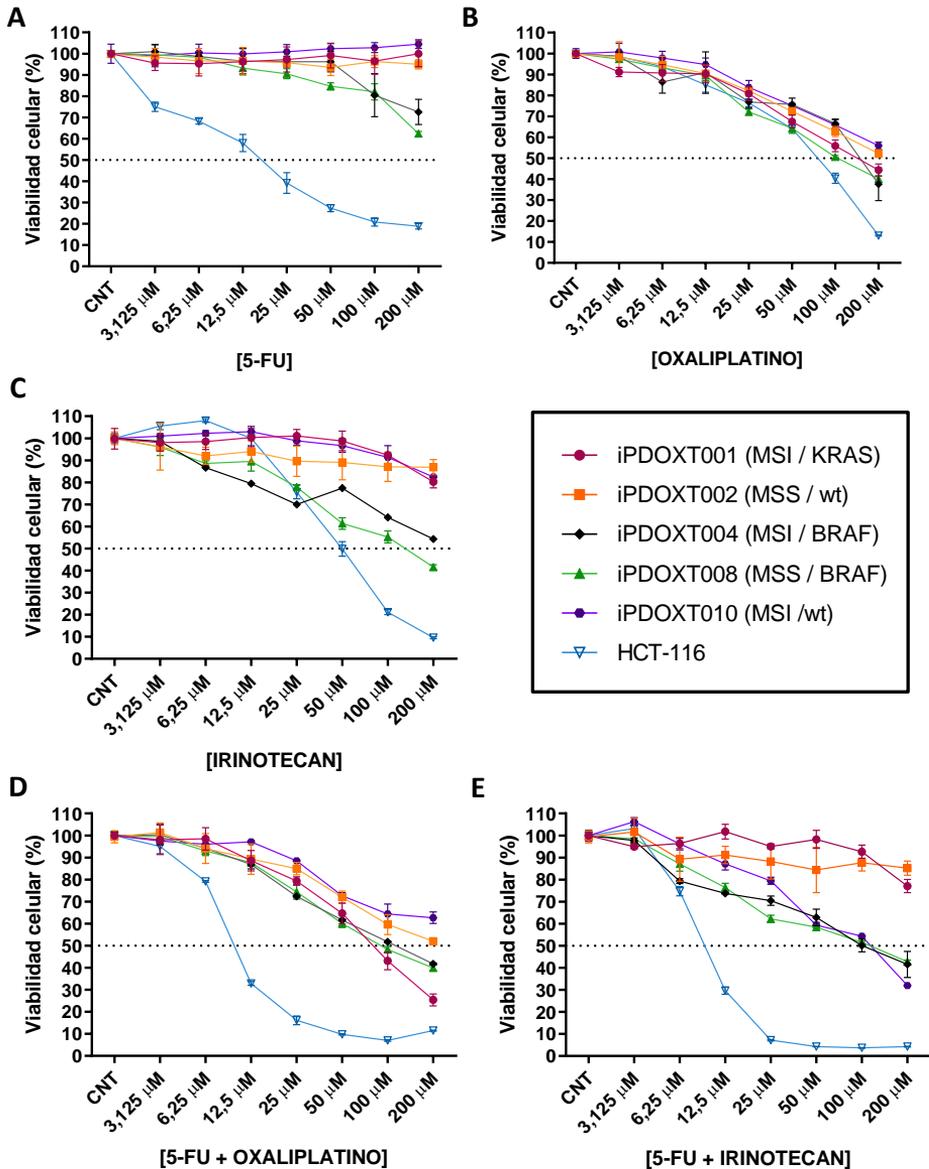
### **3.2. LOS MODELOS DE TUMOROIDES REPRODUCEN LA QUIMIORRESISTENCIA OBSERVADA EN LOS PACIENTES CON CCR METASTÁSICO**

Antes de realizar el cribado de fármacos con la librería completa, se decidió comprobar cómo respondían las líneas de tumoroides a la terapia estándar usada en el tratamiento del CCR. Como ya se ha comentado, las biopsias/tumores proceden de pacientes que mostraron resistencia a las combinaciones de fármacos FOLFOX (5-FU+Oxaliplatino) o FOLFIRI (5-FU+Irinotecan). Por lo que, si mantienen esta propiedad de quimioresistencia, esperaríamos una respuesta similar en los ensayos farmacológicos, tanto en monoterapia como en terapia combinada. Como control de nuestros

experimentos, usamos la líneas HCT-116 crecida en cultivos 3D para mantener las mismas condiciones que las líneas a testar (Figura 23).

En el tratamiento con monoterapia, la línea sensible HCT-116 mostró un efecto diferenciador de las líneas de tumoroides al verse reducida su viabilidad con una IC50 entre 12.5-25  $\mu\text{M}$  tras el tratamiento con 5-FU (Figura 23A) y de 50  $\mu\text{M}$  con el tratamiento con IRI (Figura 23C). Los iPDOXT mostraron resistencia a estos dos tratamientos haciendo que su viabilidad no bajara del 80% en todas las líneas, salvo la línea iPDOXT008 con el IRI, que si llevo a disminuir su viabilidad al 50% con una dosis de tratamiento superior a los 100  $\mu\text{M}$  (Figura 23C). En cuanto al tratamiento con oxaliplatino, tanto la línea control como todas las líneas de tumoroides respondieron de igual manera, exceptuando a concentraciones muy elevadas (200  $\mu\text{M}$ ) donde la línea HCT-116 mostró mayor sensibilidad llegando a valores de casi 10% de viabilidad (Figura 23B).

En los regímenes de terapia dual, la adición del 5-FU al tratamiento con OXA o IRI no supuso un cambio en general en los iPDOXT, pero sí sustancialmente en la línea HCT-116. Las combinaciones hicieron bajar la IC50 de la línea sensible en hasta 8 veces en el tratamiento individual del OXA (Figura 23D) y en 4 veces con el IRI (Figura 23E). Esta nueva IC50 es bastante similar a la ya conseguida con el efecto del 5-FU en monoterapia sobre la HCT-116, pero su viabilidad decae del 40% a concentraciones de 25  $\mu\text{M}$  hasta menos del 10% al combinarla con OXA e IRI. En cuando a los tumoroides, la incorporación de 5-FU a los tratamientos no produce ningún tipo de efecto a cómo se comportaron las células en tratamiento individual de OXA e IRI. Únicamente en la línea iPDOXT010 se apreció una respuesta mayor en la combinación de 5-FU+IRI que en los tratamientos individuales (Figura 23E).



**Figura 23. Ensayos de viabilidad farmacológica con la terapia estándar en tumoroides.** La combinación del 5-fluorouracilo con el irinorecan o el oxaliplatio produce una reducción de la viabilidad celular mayor a concentraciones menores que el tratamiento en monoterapia. Sin embargo, el efecto observado en las líneas iPDOXT es de varios grados de magnitud menor que la línea control HCT-116. CNT, control.  $\mu\text{M}$ , micro molar. Media  $\pm$  SD (n=6-10).

### 3.3. EL USO DE TUMOROIDES PERMITE EVALUAR LA EFICACIA DE UN GRAN NÚMERO DE FÁRMACOS

A diferencia de los modelos *in vivo*, en ratón, los organoides nos permiten la evaluación de la respuesta a fármacos de forma masiva con una considerable reducción en tiempo, coste y son más sostenibles. Testamos la eficacia de una selección de 42 fármacos (ver Material y Métodos), en las líneas de tumoroides generadas.

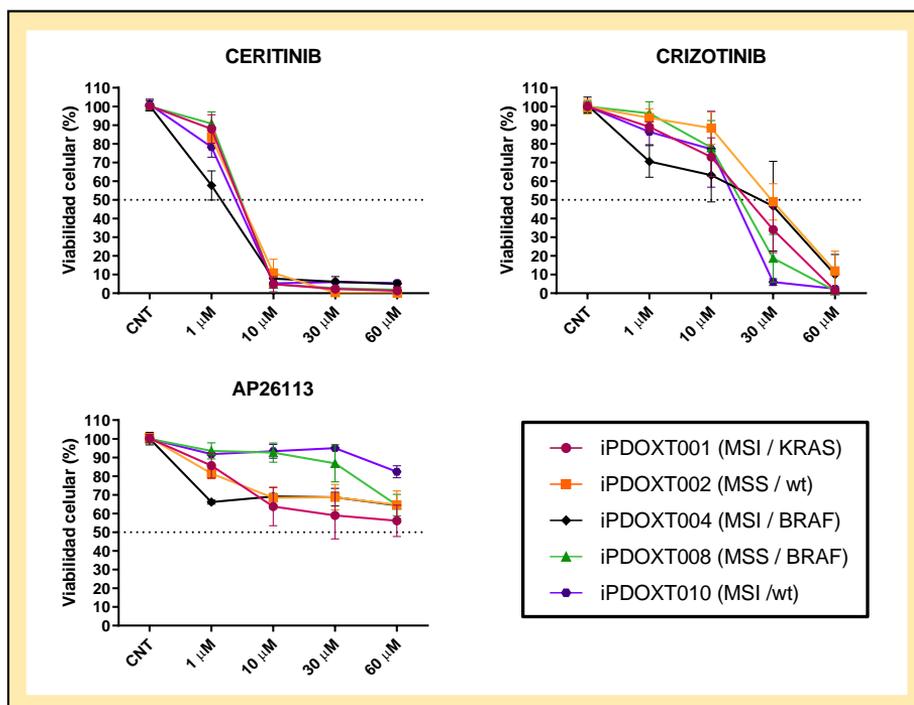
#### 3.3.1. Ensayos de viabilidad farmacológica en tumoroides

Una vez que comprobamos que nuestras líneas de tumoroides son resistentes a los esquemas clásicos de quimioterapia FOLFOX y FOLFIRI, reproduciendo lo observado en los pacientes de los que derivan, se propuso la realización de un cribado farmacológico. Se compararon los resultados obtenidos entre líneas MSS y MSI o entre las líneas con o sin mutaciones *BRAF* y *KRAS* tanto con o sin MSI. Todos estos ensayos se realizaron por triplicado en todas las líneas y únicamente en regímenes de monoterapia.

Los estudios que hemos realizado en los tumoroides con los diferentes fármacos y para los cuales se obtiene una reducción de la viabilidad celular mayor del 50% pertenecen a cuatro diferentes grupos o categorías de inhibidores; afectan a diferentes dianas terapéuticas. Hemos considerado una reducción mínima del 50% como *cutt-off* en nuestros experimentos. En los estudios realizados hemos observado que, en la mayoría de los casos, los tratamientos con fármacos que pertenecen al mismo grupo muestran resultados bastante análogos.

Grupo 1: Inhibidores de ALK. Dos de ellos (ceritinib y crizotinib) han generado una drástica reducción de casi el 100% de la viabilidad en todas las líneas de tumoroides ensayadas (Figura 24). Especialmente llamativo es el caso del ceritinib, ya que es el que provoca un efecto mayor a unas concentraciones relativamente bajas, si se compara con todos los demás compuestos testados en esta tesis. Este resultado ha sido bastante sorprendente ya que, en el caso del

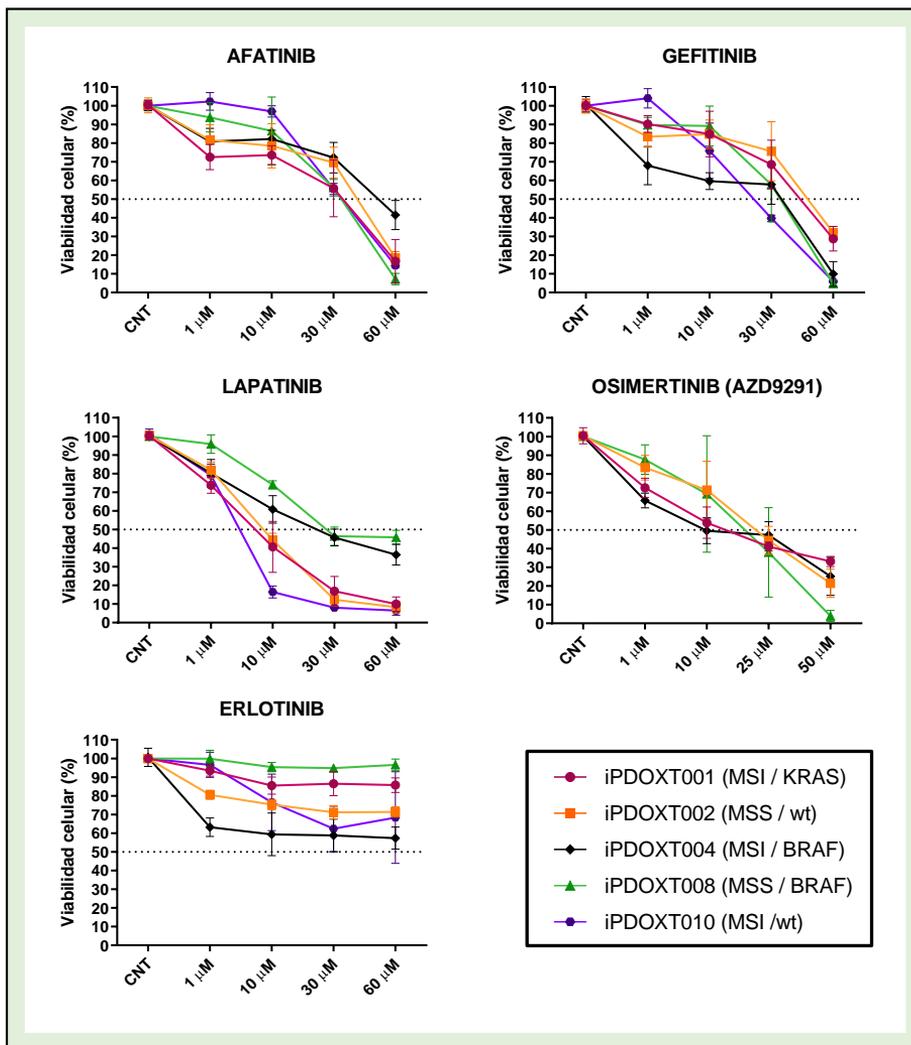
brigatinib (AP26113, aprobado para pacientes que generan resistencia a ceritinib en NSCLC), no se ha observado en ningún momento una reducción de la viabilidad menor al 50%.



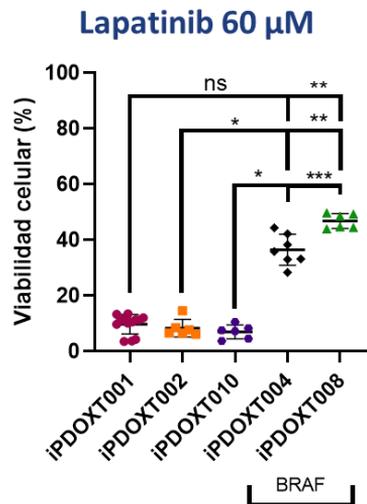
**Figura 24. Inhibidores de ALK.** Ceritinib, crizotinib y AP26113 son inhibidores de ALK (RTK) altamente potentes y selectivos, cuyo efecto de los dos primeros muestran una reducción de viabilidad mayor al 50% en las líneas de tumoroides. CNT, control. Media,  $\pm$  SD (n=6-16).

**Grupo 2: Inhibidores de EGFR.** Cuatro de los cinco fármacos testados (afatinib, gefitinib, lapatinib y AZD-9291 (osimertinib)) mostraron una reducción de la viabilidad por debajo del 50% a concentraciones cercanas a los 60  $\mu$ M, siendo ligeramente más eficaz el lapatinib, que muestra un IC50 menor a los otros (Figura 25). Además, el lapatinib mostró diferencias significativas entre las muestras que eran portadoras de la mutación de *BRAF* y las que no, confiriendo a las mutadas una mayor resistencia (Figura 26). Todas nuestras líneas de tumoroides se ven afectadas por el uso de los inhibidores de EGFR, independientemente del estado mutacional de *BRAF* o *KRAS*. Por último, llama la

atención que, al igual que pasaba con los inhibidores de ALK, estos fármacos están destinados principalmente al tratamiento del NSCLC.



**Figura 25. Inhibidores de EGFR.** Los tratamientos con inhibidores de receptores de la familia ErbB resultan efectivos en las líneas de tumoroides independientemente del estado mutacional de *BRAF* o *KRAS*, a excepción del lapatinib. El erlotinib no tuvo ningún efecto sobre la viabilidad celular de ninguna de las líneas. CNT, control. Media,  $\pm$  SD (n=6-16).



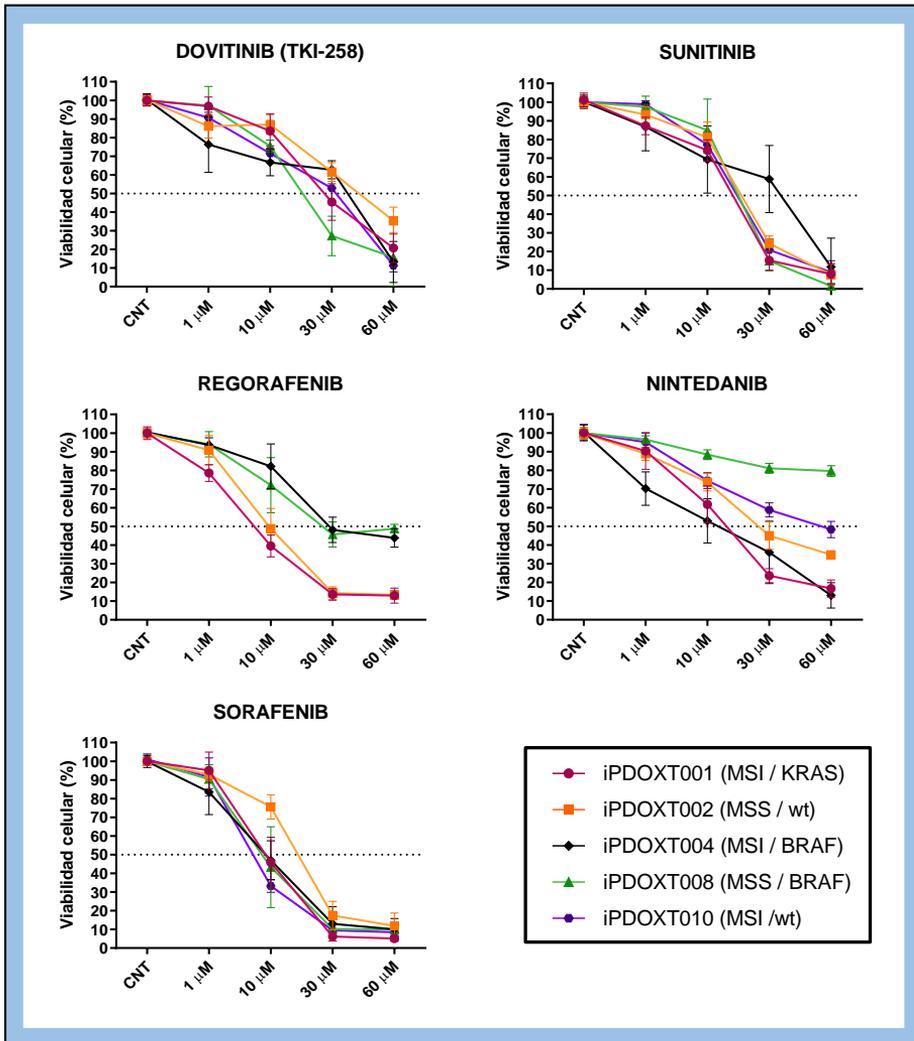
**Figura 26. Ensayo de viabilidad celular tras el tratamiento con lapatinib.** Las líneas con la presencia de mutaciones en *BRAF* (iPDOXT004 e iPDOXT008) muestran una mayor resistencia tras 72h de tratamiento con lapatinib que las líneas sin la mutación (iPDOXT001, iPDOXT002 e iPDOXT010). Media  $\pm$  SD (n=6-15). Prueba de Dunn para comparaciones múltiples, no paramétrico. ns, no significativo. \*p<0.05 \*\*p<0.01 \*\*\*p<0.001.

**Grupo 3: Inhibidores de receptores de tirosina quinasas** que tenían un efecto promotor de la angiogénesis y la metástasis, como son VEGFR, FGFR, PDGFR, entre otros. De todos ellos, únicamente el regorafenib está aprobado por la FDA para el tratamiento contra el CCRm. Otros, como el nintenedib, lenvatinib, pazopanib o sunitinib, que ya se usan para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, están en sendos ensayos clínicos para evaluar su eficacia en el uso contra el CCR.

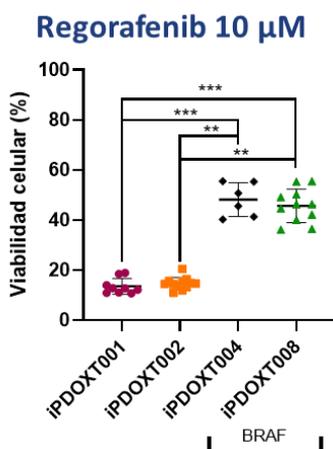
De los siete inhibidores testados, sólo lenvatinib y pazopanib no mostraron ningún efecto, mientras que con la administración de dovitinib (TKI-258), sunitinib, regorafenib, nintenedib y sorafenib sí se produjo una reducción de la viabilidad celular por debajo del 50% (Figura 27). Pudiendo detectarse diferencias entre los tratamientos en algunas líneas concretas de tumoroides. En el caso de la línea iPDOXT004 observamos una mayor resistencia al sunitinib a los 30  $\mu$ M al igual que ocurre al tratarse con regorafenib. Pasa un efecto similar

en la línea iPDOXT008 donde, no sólo muestra una mayor resistencia al tratamiento del regorafenib, al igual que ocurría con la anterior línea, sino que también presenta resistencia al tratamiento con nintenedib. Por otro lado, en el tratamiento con dovitinib o sorafenib, todas las líneas se comportaron de la misma manera, teniendo el sorafenib un efecto más pronunciado.

Dentro de estos siete fármacos, hay que prestar especial atención al efecto que produce el regorafenib en los tumoroides de CCRm. En las líneas iPDOXT001 (MSI/*KRAS*) e iPDOXT002 (MSS) el efecto que tiene este compuesto sobre la viabilidad celular es significativamente mayor que en las líneas iPDOXT004 (MSI/*BRAF*) e iPDOXT008 (MSS/*BRAF*) que poseen mutaciones activadoras en el gen *BRAF* (Figura 28). Esta diferencia es la única observable entre todos los fármacos probados en cuanto a la comparación de los estados mutaciones de *BRAF* y *KRAS* y la presencia o no de MSI.



**Figura 27. Inhibidores de receptores tirosina quinasa (RTK).** Los fármacos con dianas contra receptores tirosina quinasa resultan efectivos a concentraciones de 30  $\mu\text{M}$  en casi todas las líneas de tumoroides, dependiendo del fármaco. El regorafenib, aprobado por la FDA para el tratamiento del CCRm, mostró diferencias en la viabilidad celular tras su administración entre muestras *BRAF* (V600E) y *BRAF* wt. CNT, control. Media,  $\pm$  SD (n=6-16).



**Figura 28. Ensayo de viabilidad celular tras el tratamiento con regorafenib.** Las líneas con la presencia de mutaciones en *BRAF* (iPDOXT004 e iPDOXT008) muestran una mayor resistencia tras 72h de tratamiento con regorafenib que las líneas sin la mutación (iPDOXT001 e iPDOXT002). Media  $\pm$  SD (n=6-15). Prueba de Dunn para comparaciones múltiples, no paramétrico. \*\*p<0.01 \*\*\*p<0.001.

**Grupo 4. El resto de los fármacos** que hemos evaluado, en su mayoría, no produjeron ningún efecto considerable que supongan una reducción en la viabilidad celular de las líneas de tumoroides. Entre estos fármacos que no se han agrupado bajo ninguna categoría se encuentran los inhibidores de CDK4/6 (ciclo celular), MEK1/2, PARP1/2, CHEK1/2, AKT, FAK, PI3K, PP2A, etc. (Figura 29, Figura 30, Figura 31, Figura 32 y Figura 33). De todos, el palbociclib, prexasertib y LB-100 mostraron resultados interesantes en nuestras líneas de tumoroides.

Con una visión más general entre todas las líneas de tumoroides generadas, la línea iPDOXT004 es la que, de una forma mayoritaria, exhibe una mayor sensibilidad farmacológica a casi todos los compuestos testados. En los gráficos presentados se puede apreciar que esta línea presenta una viabilidad menor de forma genérica. Este hecho puede ser debido a la respuesta de la arquitectura de los tumoroides frente al fármaco y/o a la presencia de MSI junto con la mutación V600E en *BRAF*, ya que es la única línea que presenta estas características juntas. Por otro lado, la línea iPDOXT008 reporta el efecto contrario en la mayoría de los fármacos, tendiendo en común con la anterior la presencia de la mutación en *BRAF*, pero sin genotipo MSI.

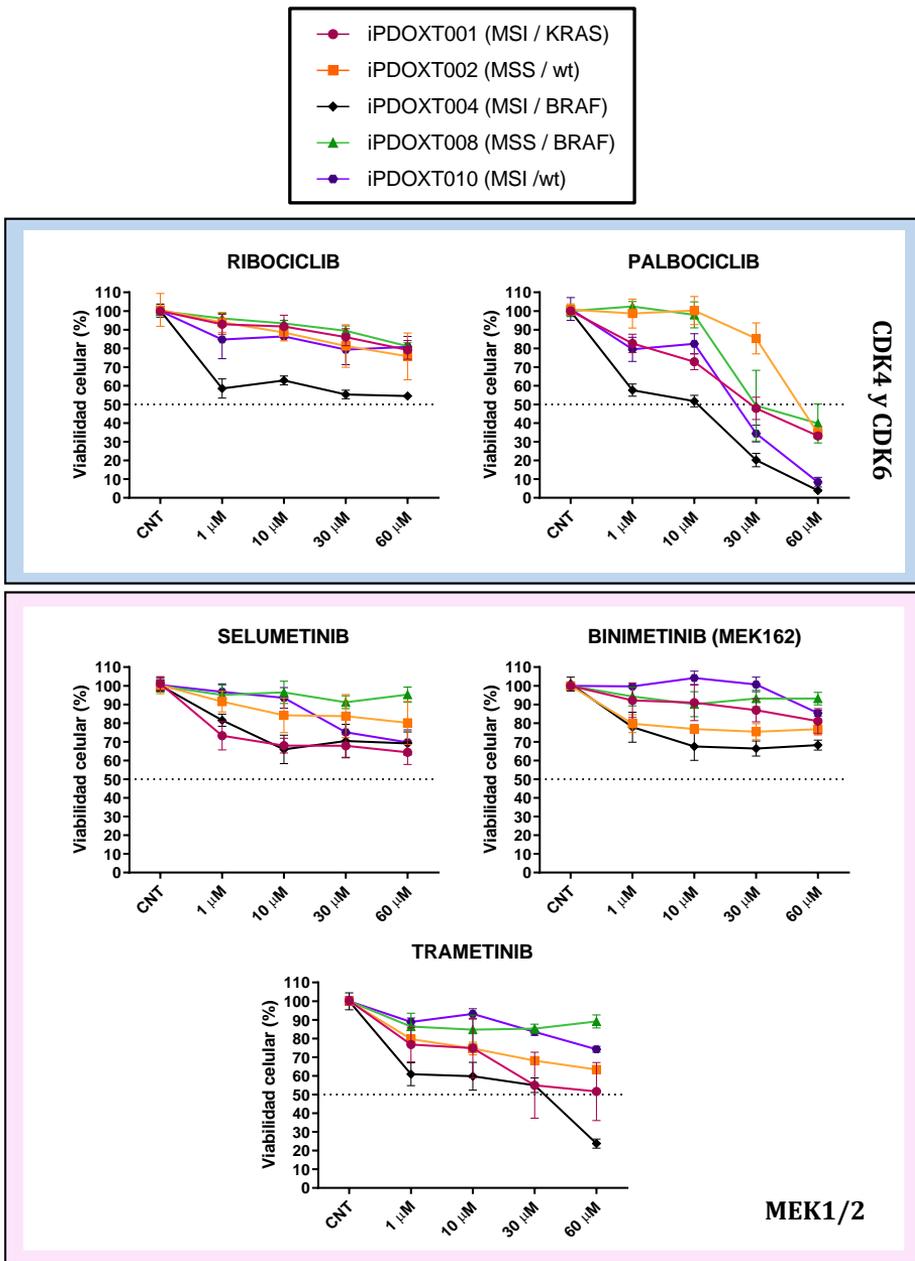


Figura 29. Fármacos inhibidores del ciclo celular (CDK4/6) y MEK1/2.

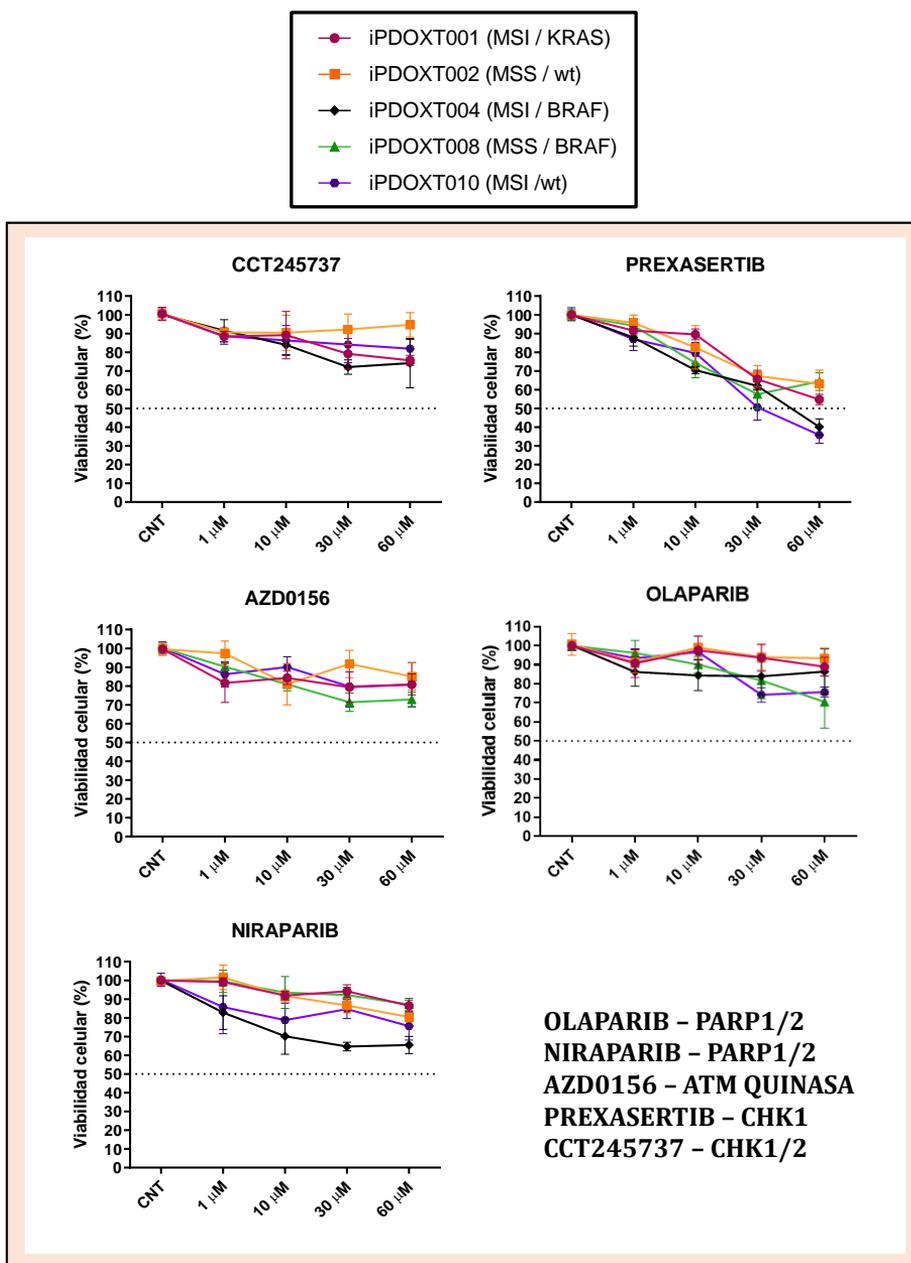


Figura 30. Fármacos inhibidores del mecanismo de reparación del ADN.

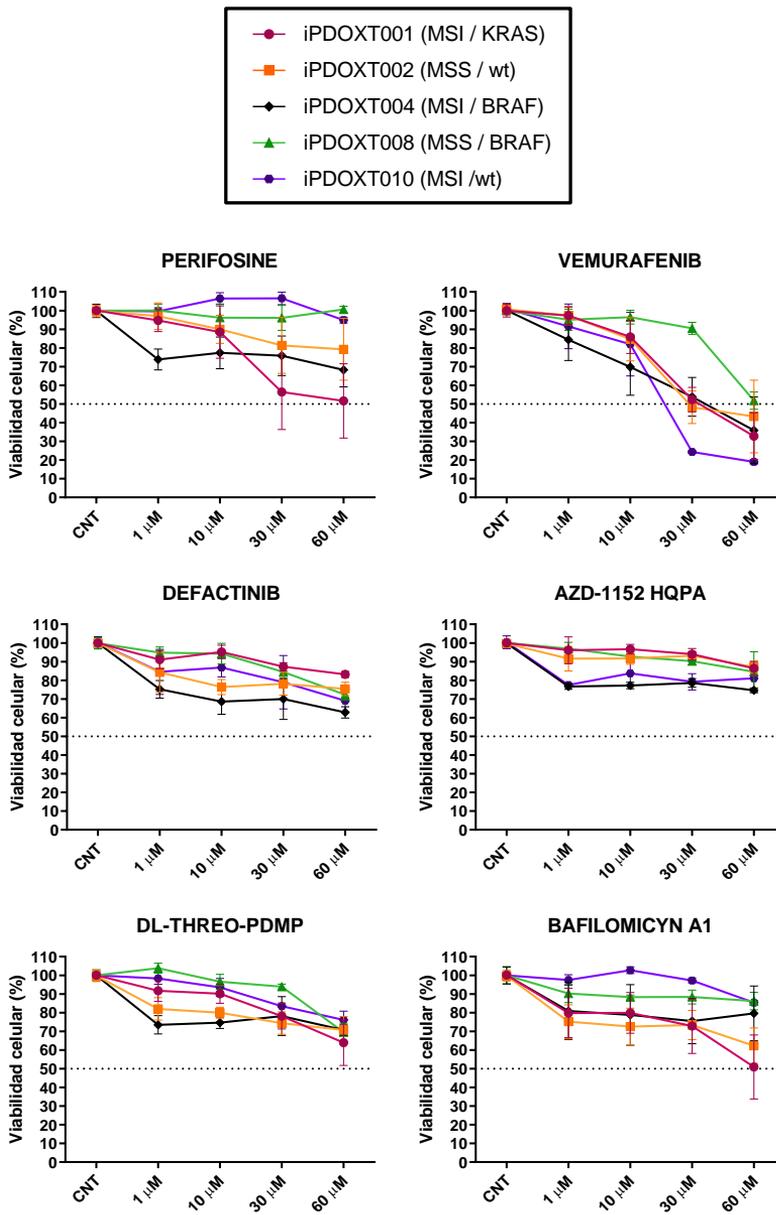


Figura 31. Fármacos sin efecto sobre los tumoroides de CCR 1.

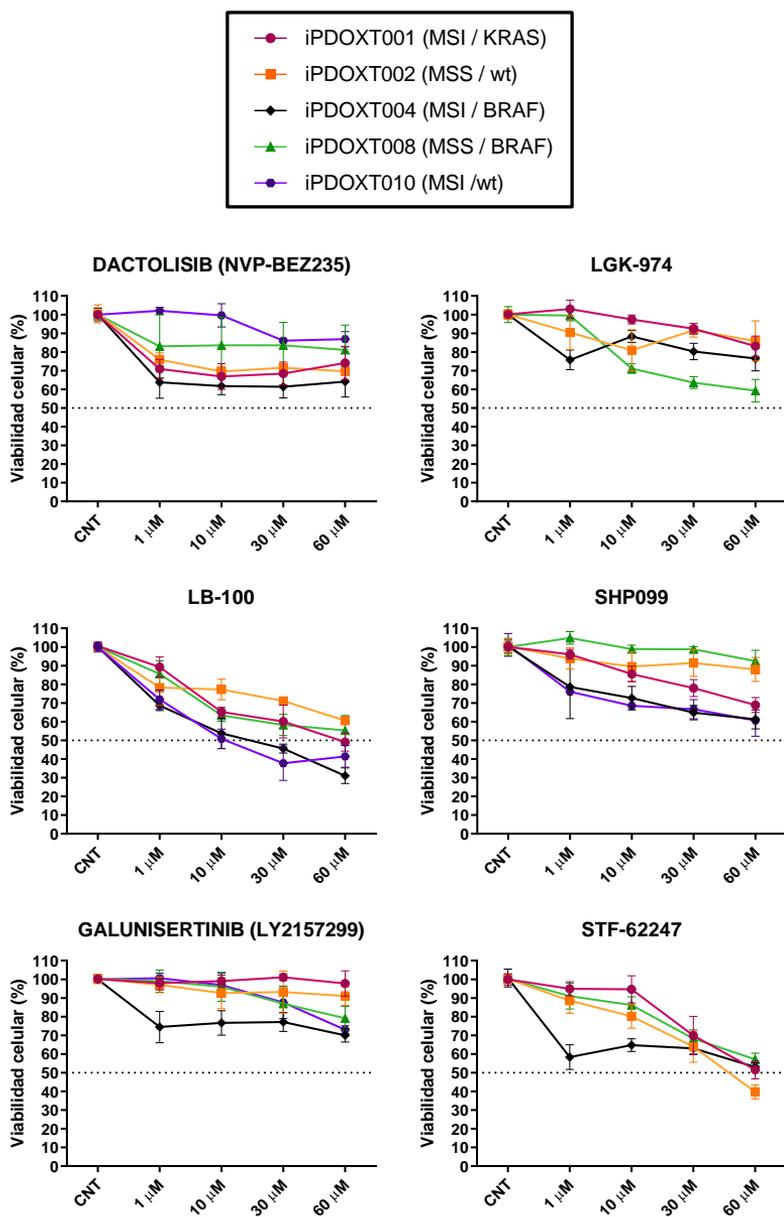


Figura 32. Fármacos sin efecto sobre los tumoroides de CCR 2.

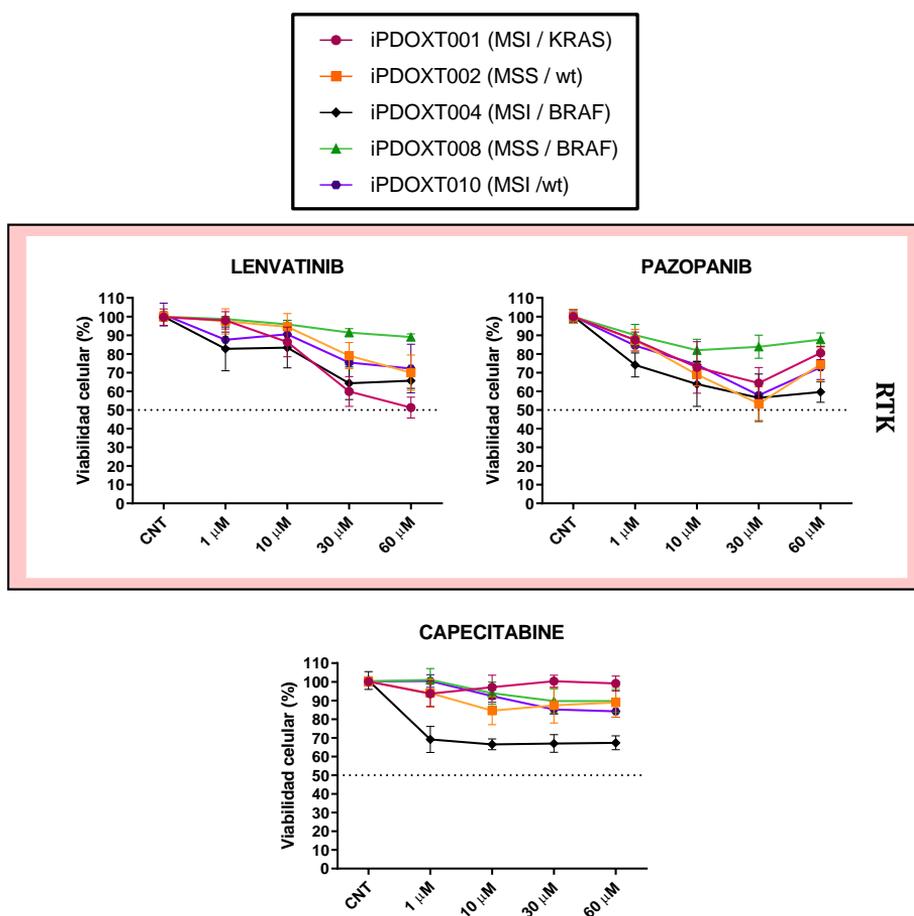


Figura 33. Fármacos sin efecto sobre los tumoroides de CCR 3.

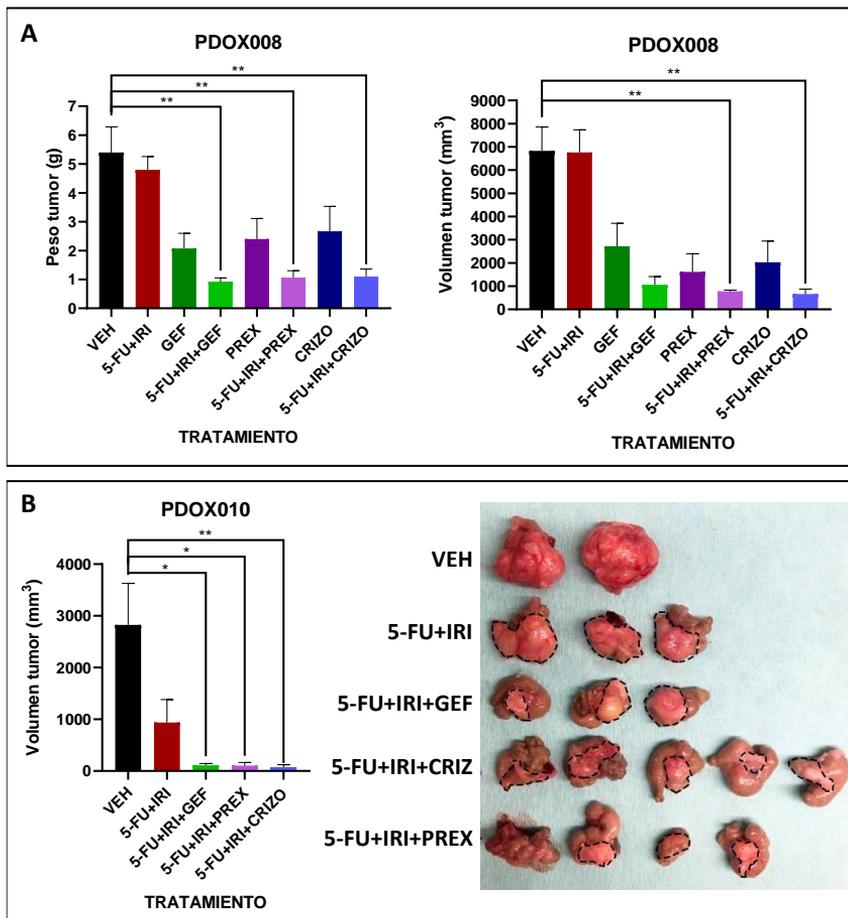
### 3.4. LAS COMBINACIONES DE FÁRMACOS PROPUESTAS MUESTRAN MEJORES RESULTADOS QUE LA TERAPIA COMBINADA ESTÁNDAR

Con el objetivo de evaluar a nivel preclínico, *in vivo* en los PDOX, posibles alternativas terapéuticas eficaces para los pacientes que se muestran resistencia a los tratamientos del CCR, se procedió a validar algunos fármacos/combinaciones identificadas en los tumoroides. Así, en base a los resultados obtenidos en los estudios en tumoroides, y en base a criterios clínicos de su potencial utilidad en tratamiento de CCR. Así consideramos que podían ser

candidatos interesantes para el tratamiento del CCR los siguientes fármacos para evaluar en ratones: i) gefitinib (GEF), crizotinib (CRIZO) y prexasertib (PREX) tanto en monoterapia como en combinación con 5-FU + IRI; ii) y vemurafenib (VEMU), lapatinib (LAPAT), regorafenib (REGO), ceritinib (CERIT) y sorafenib (SORA) únicamente en monoterapia.

Con esta selección se realizaron tres experimentos *in vivo* independientes utilizando los PDOX originales, PDOX008 y PDOX010, a partir de los cuales derivamos los tumoroides. Para ello, los dos PDOX, implantados a nivel ortotópico en el ciego de los ratones, se expandió cada uno en 5-7 ratones también de forma ortotópica, y una vez tuvimos suficiente masa tumoral, lo tumores se fragmentaron y se utilizaron para implantar en el ciego la serie de ratones donde evaluar la eficacia de los fármacos (ver Material y Métodos).

El tratamiento con 5-FU+IRI no mostró una reducción significativa del tamaño en ninguno de los dos PDOX analizados, resultado en consonancia con lo observado en los pacientes (Figura 34A y B). En el caso del PDOX008, que fue el primero en realizarse, se observó que, aunque sin ser significativa, los tratamientos en monoterapia con GEF, PREX y CRIZO producía una reducción considerable del peso y del tamaño de los tumores, siendo esta mucho mayor que la obtenida con la terapia estándar 5-FU+IRI. Sin embargo, cuando estos fármacos se administraban de forma combinada con 5-FU+IRI sí que se obtuvieron diferencias significativas, concluyendo así que la adición de estos fármacos a las terapias estándar aumenta su efectividad, abriendo una ventana terapéutica para estos pacientes resistentes (Figura 34A).



**Figura 34. Resultados del tratamiento en tumores PDX008 y PDX010.** Los tratamientos con triple combinación 5-FU+IRI+GEF/PREX/CRIZO producen una reducción del peso (**A izq.**) y volumen (**A drcha. y B**) de los tumores mayor que la terapia basada en 5-FU+IRI y el tratamiento en monoterapia de GEF/PREX/CRIZO. Media  $\pm$  SD (n=2-5). Prueba de Dunn para comparaciones múltiples, no paramétrico. \*p<0.05, \*\*p<0.01. VEH, vehículo.

En el caso del PDX010, teniendo en cuenta los resultados obtenidos anteriormente en el PDX008, tratamos directamente con las combinaciones de fármacos que habían mostrado resultados significativos. En este experimento se replicaron los resultados anteriores (Figura 34B) confirmando así que, en las muestras procedentes de dos pacientes diferentes, las combinaciones 5-FU+IRI+GEF, 5-FU+IRI+PREX y 5-FU+IRI+CRIZO son más eficaces que la combinación de primera elección 5-FU+IRI, para la cual son resistentes. Del

mismo modo, la adición de GEF, PREX y CRIZO a la combinación de 5-FU+IRI no incrementó de forma significativa la toxicidad observada en los ratones respecto al tratamiento con 5-FU+IRI. La toxicidad fue evaluada mediante el pesaje de los ratones a lo largo del experimento, no encontrando diferencias a lo largo del tiempo ni entre grupos experimentales (Tabla 24).

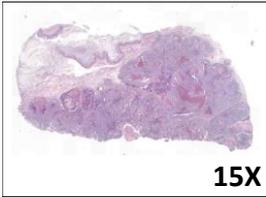
**Tabla 24. Peso de los ratones al inicio y final del experimento de terapia combinada con el tumor PDOX010.** No se detectan diferencias significativas en el peso (g) entre condiciones experimentales ni a lo largo de la duración del tratamiento.

iPDOXT010			
Condición	Ratón	Inicio (g)	Final (g)
VEH	1	27,8	28,4
	2	29,1	29,2
5-FU+IRI	1	29,6	30,6
	2	31,6	32,1
	3	31,3	32,6
5-FU+IRI+GEF	1	33,6	34
	2	29,4	28,8
	3	28,4	27,4
	4	31,5	31,5
5-FU+IRI+PREX	1	26,9	27,9
	2	29,1	28
	3	29,7	30,5
	4	33,1	29,1
5-FU+IRI+CRIZO	1	32,8	32,6
	2	29,4	29,3
	3	31,6	32
	4	28,7	27,7
	5	33	33,8

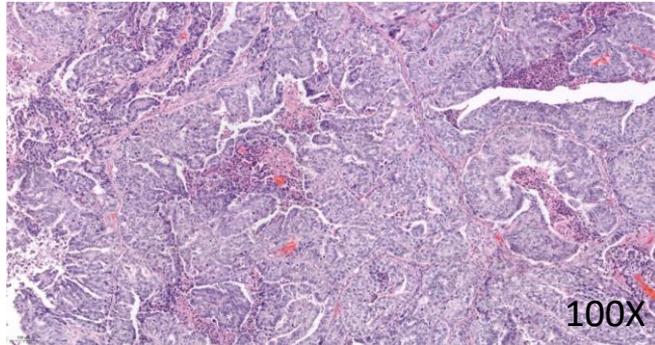
El análisis histopatológico de los tumores de los dos PDOX muestran variabilidad de respuesta entre los tratamientos combinados de 5-FU+IRI+GEF, 5-FU+IRI+PREX y 5-FU+IRI+CRIZO y el vehículo o el tratamiento con la terapia estándar 5-FU+IRI. El estudio identifica parámetros de respuesta histológica para los tratamientos combinados en los dos tumores tratados PDOX008 y PDOX010, aunque para el tumor PDOX008 la respuesta es muy leve. En el caso de PDOX010,

el patólogo confirmó que existían cambios regresivos histológicos muy claros en los tratamientos combinados para los tres tratamientos (Figura 35A-E).

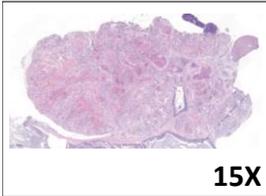
**A**



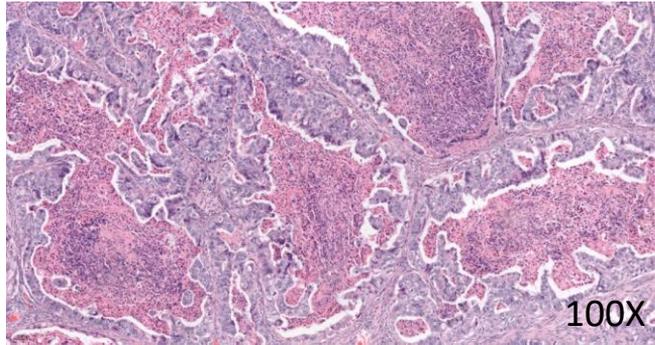
Vehículo



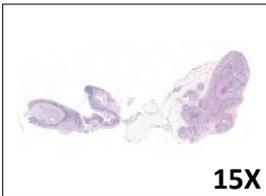
**B**



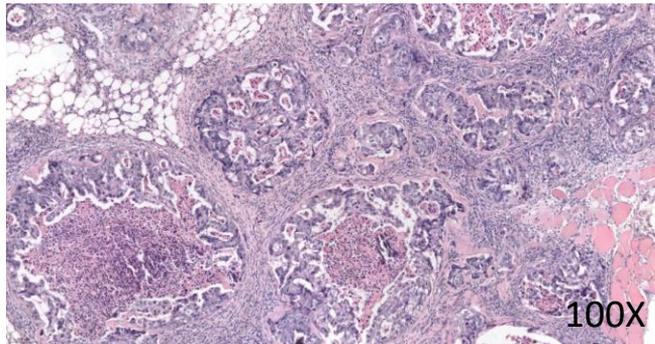
5-FU+IRI

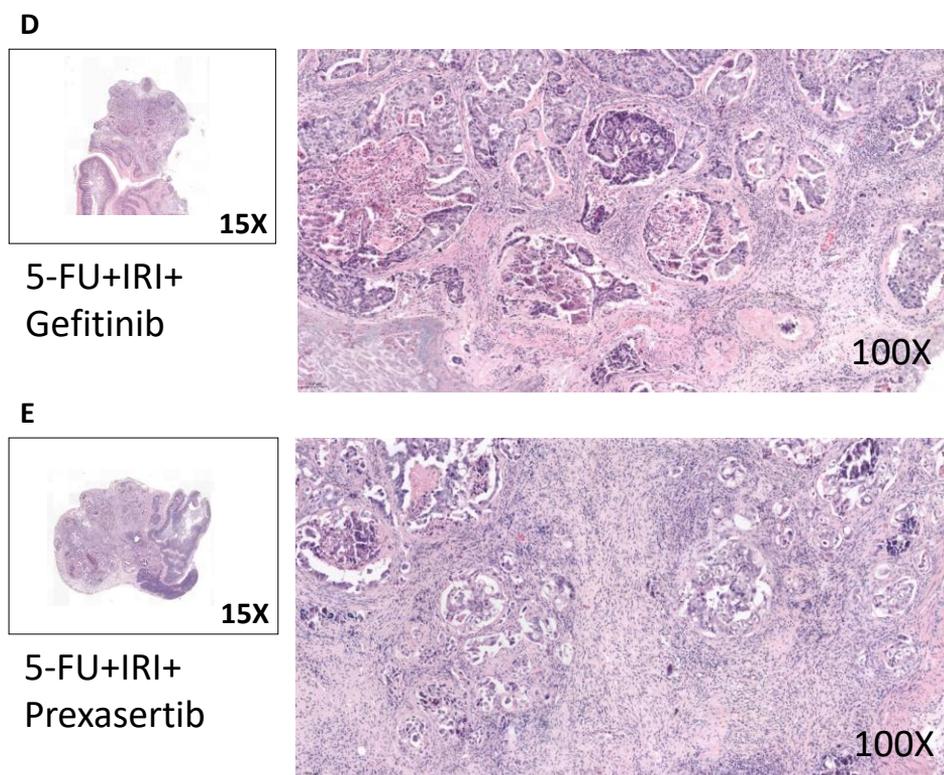


**C**



5-FU+IRI+  
Crizotinib

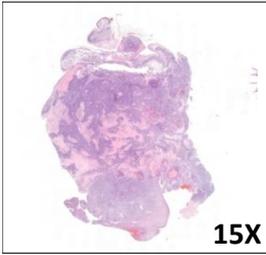




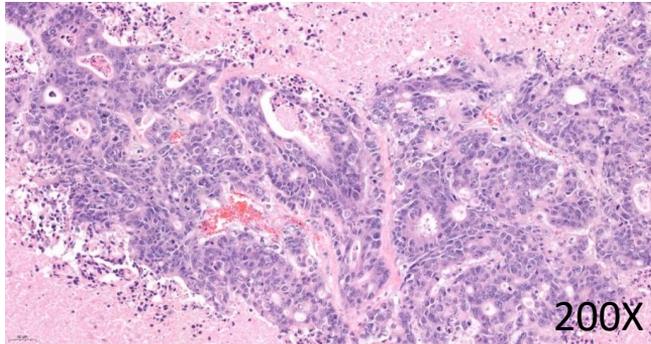
**Figura 35. Análisis histopatológicos tras la respuesta a tratamientos en PDOX010.** En comparación con el vehículo (A), los tumores que recibieron la terapia estándar (5-FU+IRI) (B) mostraron un patrón histológico más acuciado de muerte celular. Los parámetros de respuesta histológica se vieron incrementados en los tratamientos de triple combinación (C, D y E).

En el caso del tratamiento tras el recrecimiento del tumor PDOX008, se observan cambios regresivos histológicos, igual que en el anterior, pero esta vez de forma menos notoria (Figura 36A-G). El tratamiento donde se apreció mayor respuesta fue en el tratamiento combinado de 5-FU+IRI+CRIZO (Figura 36E). Con este tratamiento, se detectó presencia de fibrosis e inflamación crónica con áreas en las que se ven células tumorales individuales o en pequeños grupos. La presencia de fibrosis e inflamación en los tumores es un signo significativo de respuesta histológica más que la necrosis del tejido.

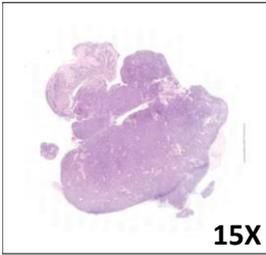
**A**



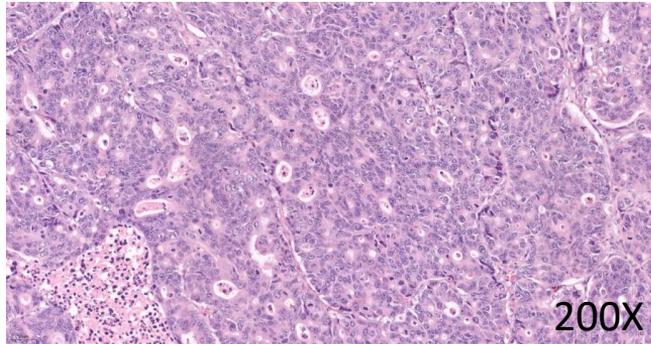
Vehículo



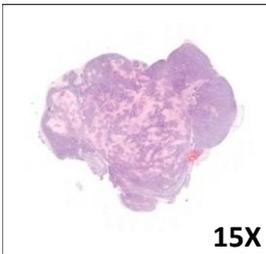
**B**



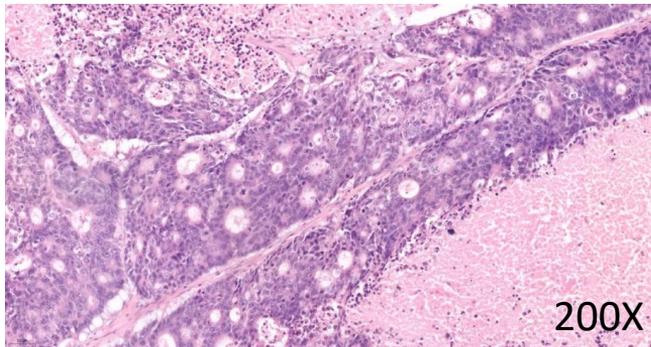
5-FU+IRI



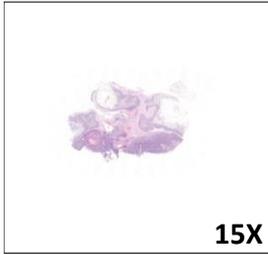
**C**



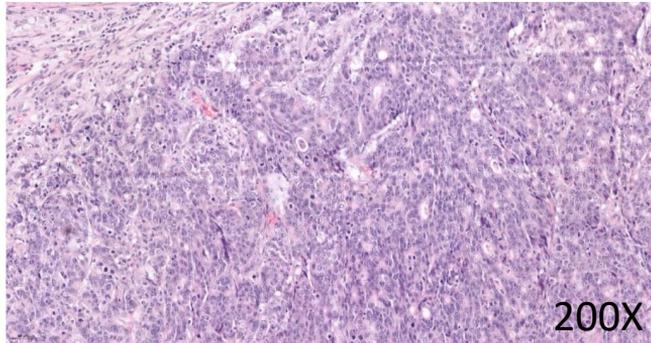
Gefitinib



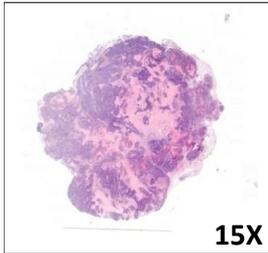
**C**



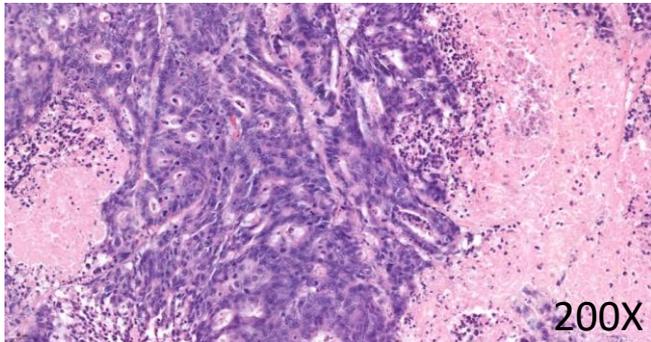
5-FU+IRI+GEF



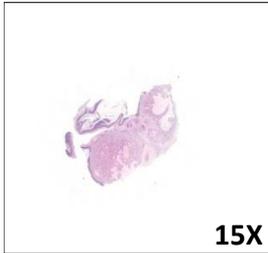
**D**



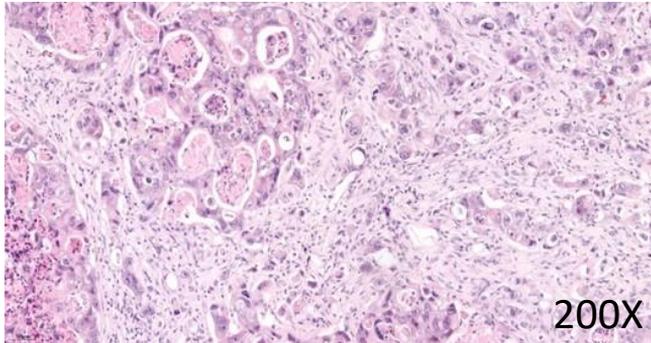
CRIZO

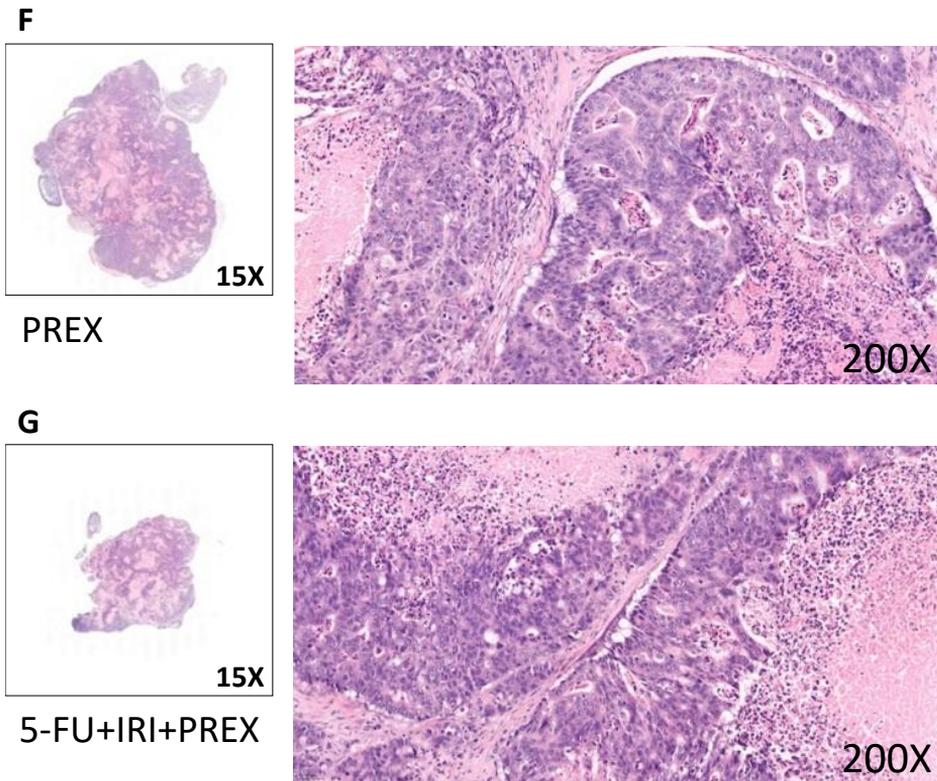


**E**



5-FU+IRI+CRIZO



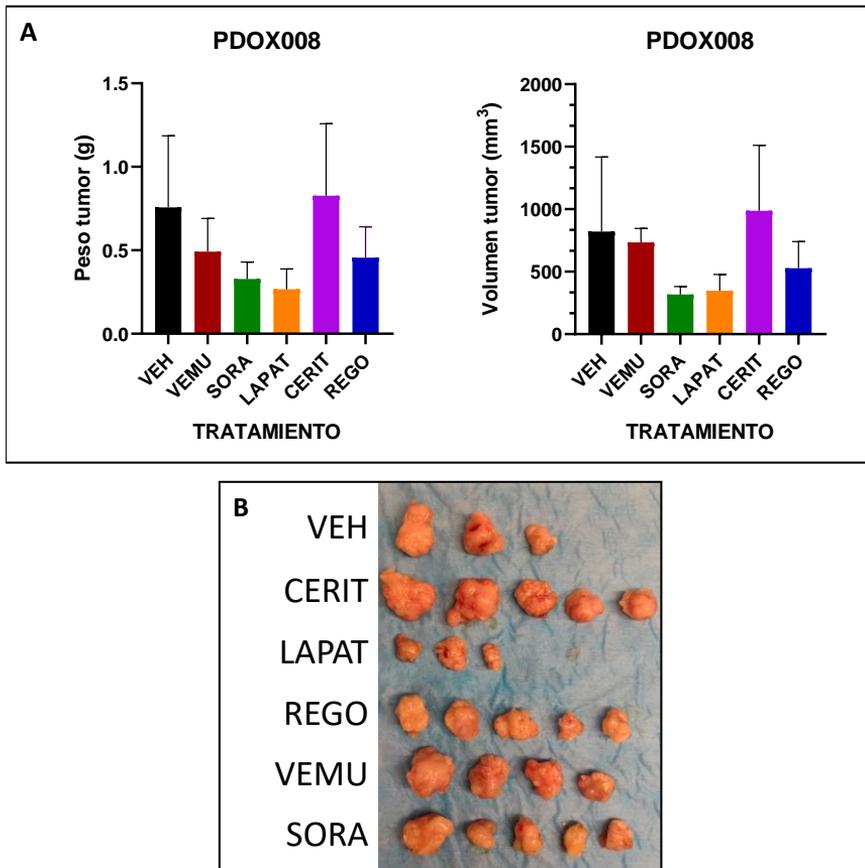


**Figura 36. Análisis histopatológicos tras la respuesta a tratamientos en PDOX008.** En términos generales, en comparación con el vehículo **(A)** y el tratamiento estándar 5-FU+IRI **(B)**, los diferentes tratamientos individuales de gefitinib, crizotinib y prexasertib no supusieron cambios regresivos histológicos notables **(C, D y E)**. Los tumores con parámetros marcados de respuesta histológica se detectaron en los tratamientos de triple combinación **(C, D y E)**, siendo la combinación de 5-FU+IRI+CRIZO el más efectivo de todos **(E)**.

Una vez comprobado los resultados significativos de la combinación de la quimioterapia clásica basada en 5-FU+IRI con moléculas biológicas como anti-EGFR (GEF), anti-ALK (CRIZO) o anti-CHEK1/2 (PREX), se decidió realizar otro experimento con el PDOX008 para evaluar, en monoterapia, si distintos fármacos de estas familias de inhibidores ofrecían mejores resultados. Por tanto, se utilizaron otros fármacos anti-EGFR y anti-ALK como el lapatinib (LAPAT) y ceritinib (CERIT), respectivamente. Además, incorporamos el vemurafenib

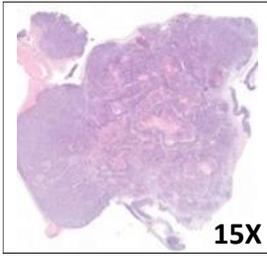
(VEMU), sorafenib (SORA) y regorafenib (REGO) dado el resultado observado *in vitro*.

Al igual que ocurría en los anteriores experimentos, no fuimos capaces de detectar en monoterapia ningún tratamiento que mostrara, de forma significativa, una reducción de peso o tamaño del tumor (Figura 37A y B), ni una respuesta histológica regresiva (Figura 38). Pero, al igual que observamos previamente, sí que se detecta una tendencia a la baja tanto en peso como en volumen de los tumores tratados. Por otro lado, es llamativo el caso del CERIT, que de todos los fármacos evaluados en los experimentos *in vitro* en tumoroides, era el que mayor efecto tenía sobre la viabilidad celular, a unas concentraciones más bajas, en todas las líneas de tumoroides. Sin embargo, en los experimentos con PDOX no se apreció ninguna disminución, llegando incluso a superar en tamaño a los tumores no tratados. Hay que tener en cuenta que, por desgracia, no pudimos contar con más tumores en la condición de vehículo por la muerte de los ratones a lo largo de las dos semanas de tratamiento.

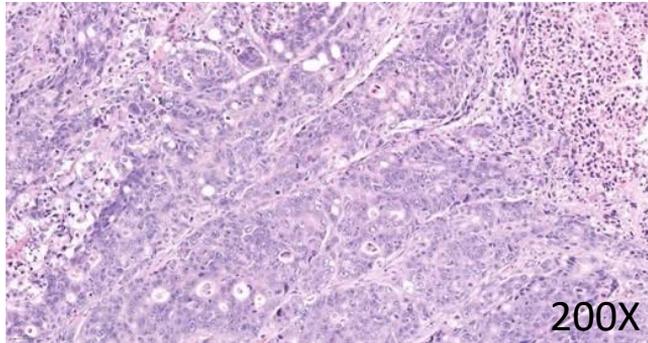


**Figura 37. Resultados del tratamiento en monoterapia en tumores PDOX008.** No se detectan diferencias significativas en ninguno de los tratamientos, pero sí una tendencia a la baja tanto en peso como en volumen tumoral **(A)**. Fotografía de los tumores una vez finalizado el experimento **(B)** Media  $\pm$  SD (n=3-5). Prueba de Dunn para comparaciones múltiples, no paramétrico. VEH, vehículo.

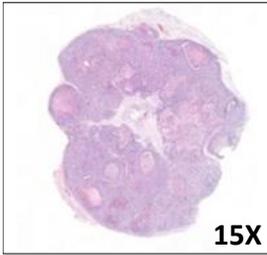
**A**



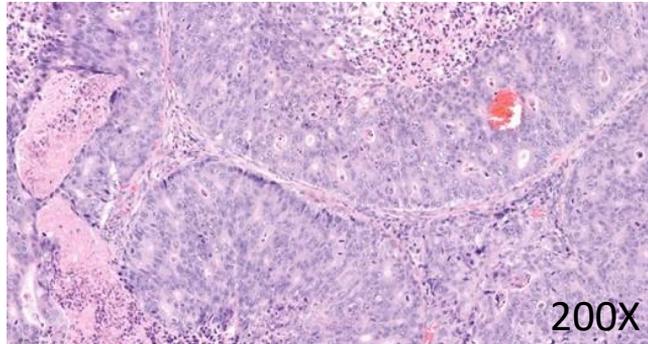
Vehículo



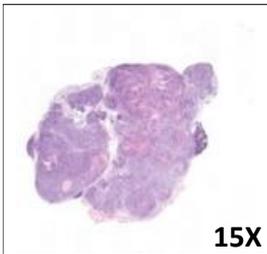
**B**



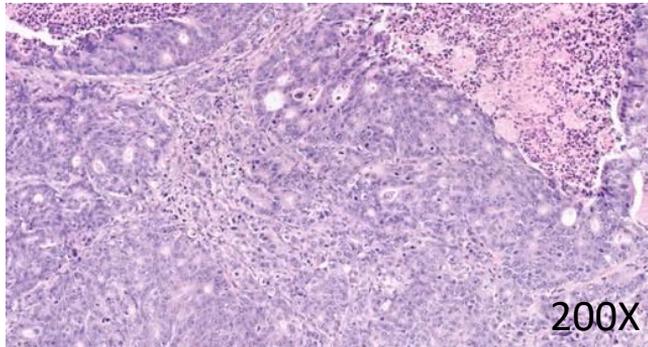
CERITINIB

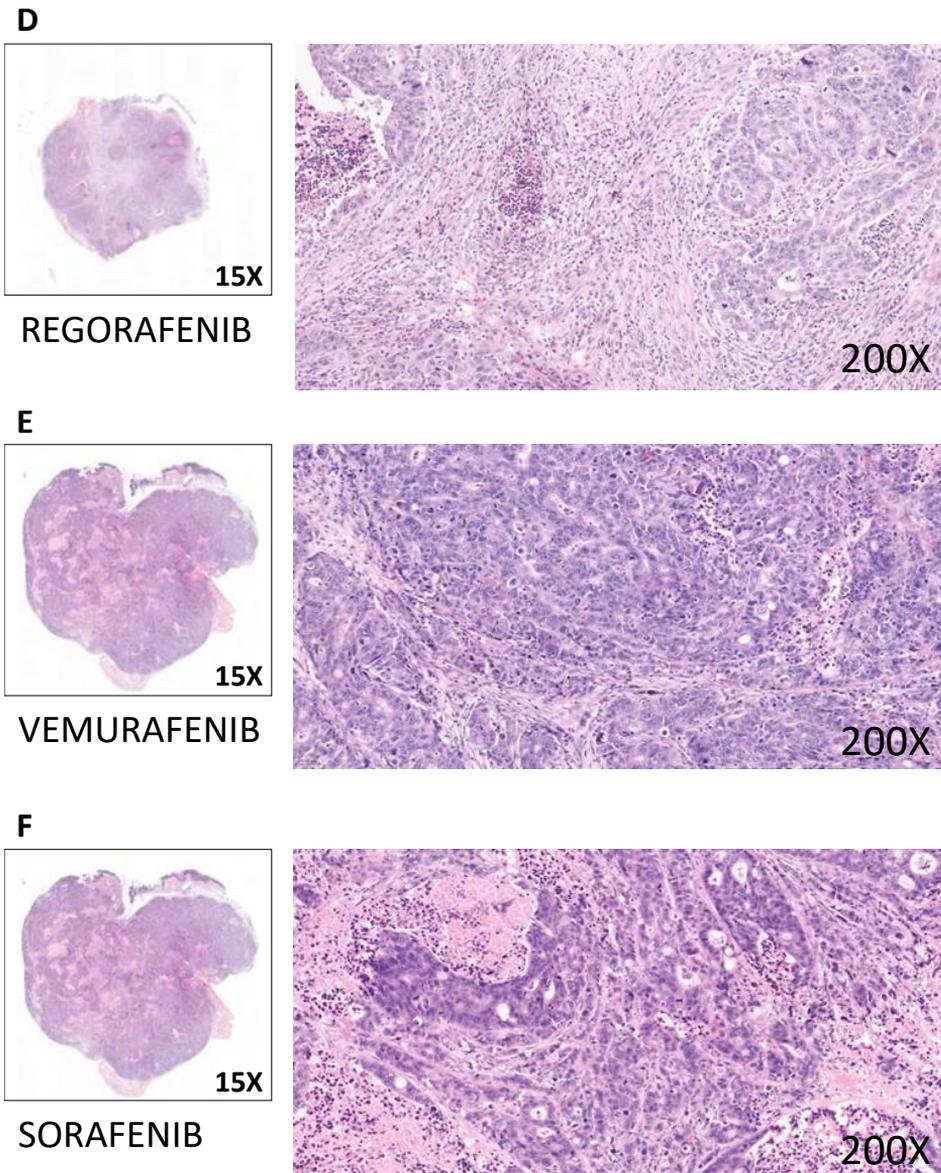


**C**



LAPATINIB

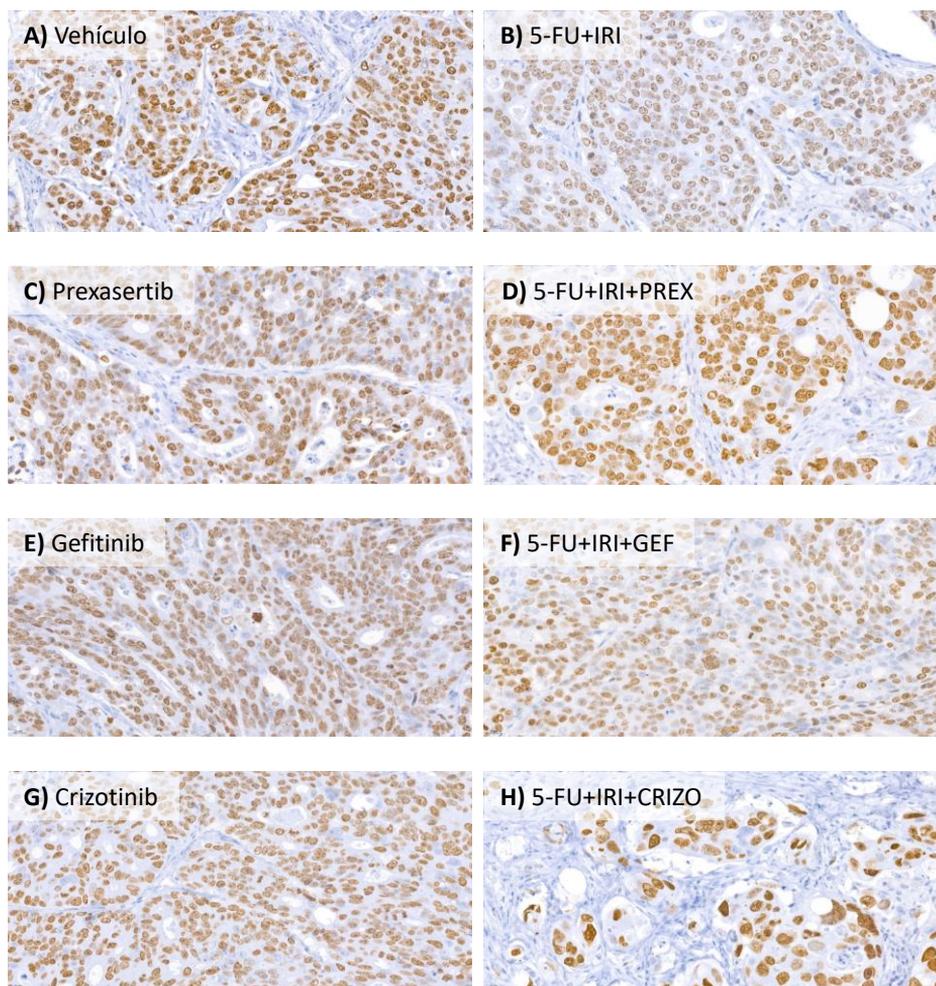




**Figura 38. Análisis histopatológicos tras la respuesta a tratamientos en monoterapia en PDOX008.** Ninguno de los tratamientos probados en monoterapia ha generado una respuesta histológica destacable.

Una vez finalizados los experimentos *in vivo*, decidimos iniciar un acercamiento a la caracterización molecular de los tumores tratados. Para ello, evaluamos el nivel de proliferación celular por IHQ de Ki67 en los tumores

PDOX008. El análisis de Ki67 mostró que todos los tumores tratados (Figura 39B-H) vieron ligeramente reducida su capacidad proliferativa en comparación con el vehículo (Figura 39A). Esta disminución se vio acentuada principalmente en los tratamientos triples con 5-FU+IRI+GEF o CRIZO, siendo mayor en el segundo caso (Figura 39F y H).



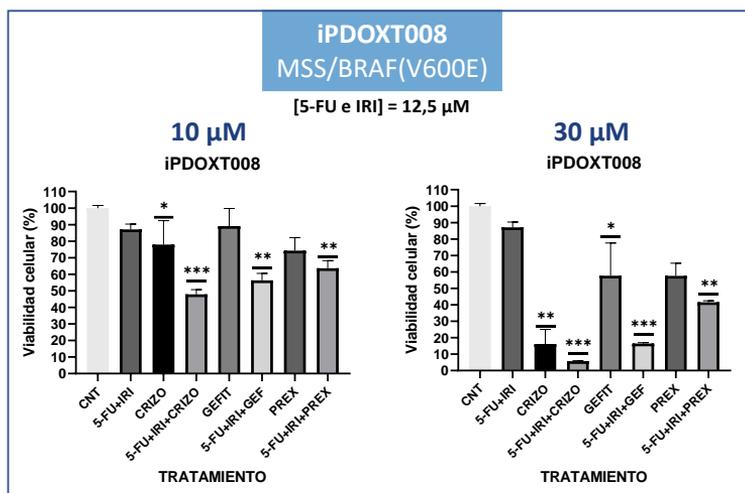
**Figura 39. Evaluación de la proliferación mediante IHQ para Ki67.** La terapia combinada de 5-FU+IRI con GEFIT (F) o CRIZO (H) muestra una ligera reducción de la proliferación celular tras el tratamiento en los tumores *orthoxenografts*, siendo más pronunciada en el segundo caso. Todas las fotografías están tomadas a 400x. IHQ, inmunohistoquímica.

Por último, en los meses finales de la tesis, se ha comenzado a realizar estudios moleculares por *Western Blot* de proteínas implicadas en las vías de señalización de los fármacos testados, al igual que IHQ para observar la expresión de ciertas proteínas de interés, como es el caso de ALK y su estado de activación (p-ALK) (datos no mostrados).

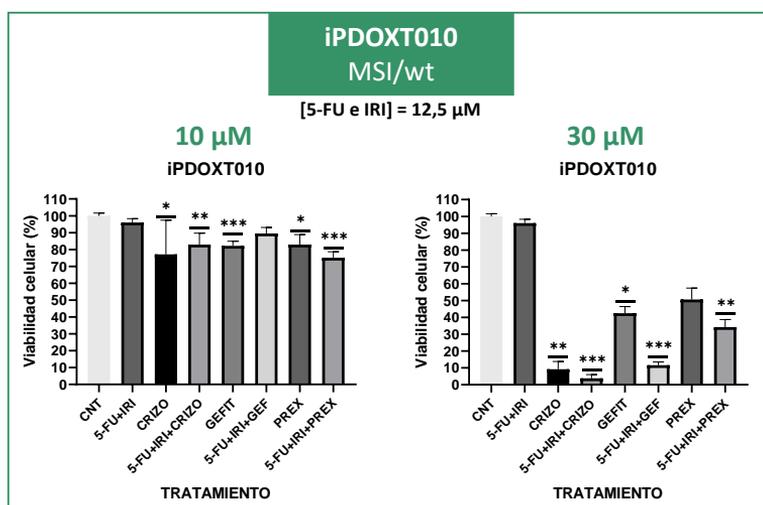
### **3.5. LOS TUMOROIDES REPRODUCEN LA RESPUESTA OBSERVADA EN LOS EXPERIMENTOS *IN VIVO* AL TRATAMIENTO COMBINADO**

Una vez finalizados los experimentos *in vivo* y debido a que en los tumoroides únicamente se había testado los fármacos de manera individual, decidimos incluir las combinaciones encontradas a estos modelos *in vitro*. Para ello, las concentraciones de los fármacos de quimioterapia (5-FU e IRI) se mantuvieron constantes a 12,5  $\mu\text{M}$  mientras que la del gefitinib, crizotinib y prexasertib se fueron modificando de manera creciente igual que cuando se realizaron los experimentos en monoterapia (1-10-30-60  $\mu\text{M}$ ). Estas combinaciones se trataron en los mismos tumores que en los PDOX: iPDOXT008 e iPDOXT010.

A concentraciones elevadas (30  $\mu\text{M}$ ), se obtuvieron resultados significativos en los tratamientos combinados de 5-FU+IRI+CRIZO y GEFIT ( $p < 0.001$ ) y, con menor significancia, en la combinación con PREXA ( $p < 0.01$ ) en ambas líneas de tumoroides (Figura 40 drcha. y Figura 41 drcha.). Este efecto, también se vio menos acentuado a concentraciones de fármacos de 10  $\mu\text{M}$  (Figura 40 izq. y Figura 41 izq.). Las combinaciones resultaron en una reducción de la viabilidad mayor que en el tratamiento en monoterapia en ambos tumores. Estos resultados son de gran valor, ya que permiten el uso de los modelos de tumoroides para la búsqueda de compuestos, no solo en monoterapia, sino también en terapia combinada.



**Figura 40. Respuesta celular en iPDOXT008 a los tratamientos combinados.** En la línea iPDOXT008, el tratamiento combinado produce una reducción de la viabilidad mayor que el uso aislado de la quimioterapia (5-FU+IRI) y el gefitinib, crizotinib y prexasertib. Media ± SD (n=6-8). Prueba de Dunn para comparaciones múltiples, no paramétrico. \*p<0.05 \*\*p<0.01 \*\*\*p<0.001.



**Figura 41. Respuesta celular en iPDOXT010 a los tratamientos combinados.** En la línea iPDOXT010, el tratamiento combinado produce una reducción de la viabilidad mayor que el uso aislado de la quimioterapia (5-FU+IRI) y el gefitinib, crizotinib y prexasertib. Media ± SD (n=6-8). Prueba de Dunn para comparaciones múltiples, no paramétrico. \*p<0.05 \*\*p<0.01 \*\*\*p<0.001.

## **4. DISCUSIÓN**



#### 4.1. PDOX Y ORGANOIDES DERIVADOS DE TUMORES COMO SISTEMA PARA LA INVESTIGACIÓN ONCOLÓGICA

Actualmente, dentro de las estrategias de medicina de precisión están empezando a tomar relevancia el disponer de sistemas/modelos preclínicos donde poder evaluar de una forma individualizada cuál es la respuesta concreta de un tumor a los tratamientos. Así, hablamos de **ensayos coclínicos** cuando los estudios preclínicos y los ensayos clínicos se realizan simultáneamente, lo que permite la integración de datos en tiempo real para estratificar con precisión y personalizar el tratamiento para los pacientes, individualmente [116]. Pero, poder llegar a implementar estas estrategias conlleva complicaciones, y más en tiempo real. Cuando se habla de ensayos coclínicos, estos se basan en el uso de modelos de ratones modificados genéticamente. Sin embargo, la mayoría de las veces hace referencia al uso de xenoinjertos derivados de pacientes implantados en el tejido subcutáneo de ratones inmunosuprimidos (PDX), y en un muy pequeño porcentaje de los casos, a modelos ortotópicos, es decir, implantado en el mismo órgano de origen (PDOX). Aunque, de todos ellos, los modelos PDOX manifiestan claras ventajas respecto a los otros al recapitular de una forma más fehaciente el comportamiento del tumor (p. ej. histología, genética, heterogeneidad, capacidad metastásica, respuesta a tratamientos, etc.) [117], [118]. No obstante, estos modelos al tratarse en condiciones *in vivo*, implica el uso de ratones de experimentación, haciendo que existan importantes limitaciones logísticas, éticas y económicas [119]. Otro aspecto importante es si se pretenden usar estos modelos, de una forma más o menos sistemática, para la aplicación clínica de la medicina personalizada, ya que presentan dos limitaciones muy importantes: i) Tiempo de ejecución; se necesitan entre 3-6 meses para poder evaluar las terapias. Este no es un hecho banal, ya que esta demora limita el uso de los modelos PDOX para realizar tratamientos de pacientes en tiempo real [120]; ii) No son un sistema eficiente, ni sostenible económicamente, para realizar estudios de cribado farmacológico de alto rendimiento. Son adecuados para evaluar la efectividad de un número limitado de fármacos o combinaciones

de fármacos. Algunos autores, para poder aumentar la efectividad, han sugerido hacer experimentos de eficacia de “un ratón un fármaco”, en el que se evalúa la respuesta en un único animal, permitiendo así evaluar más fármacos/combinaciones, a pesar de las limitaciones que implica este esquema. Además, es primordial mencionar que, a la hora de pensar en los PDOX como sistemas de evaluación de tratamientos, es necesario llegar a conseguir tasas de implantación representativas (>70%), hecho que precisa de una amplia experiencia del grupo ejecutor.

Por estos aspectos, entre otros, los organoides derivados de pacientes (PDO), se están posicionando como sólidos modelos preclínicos de investigación donde evaluar nuevas terapias o realizar *screening* de fármacos de una forma más eficiente al reducir tiempo y dinero. A pesar de las grandes posibilidades que ofrecen, su potencial como predictores de respuesta clínica sigue sin estar claro [121]. En este contexto, hemos pretendido evaluar de forma paralela la capacidad predictiva de respuesta de tumoroides/PDOX generados a partir de biopsias de pacientes MSI metastásicos, para la cual hemos testado un set de 45 fármacos.

#### **4.1.1. Los tumoroides se generaron de forma satisfactoria directamente de los tumores crecidos en PDOX.**

La mayoría de los estudios en organoides de cáncer colorrectal humano se han realizado en cultivos derivados a partir de muestras de tumores primarios [122]. El cultivo de organoides intestinales se puede generar a partir de la recogida de criptas intestinales que, en condiciones óptimas de cultivo y con factores de crecimiento adecuados, forman estructuras tridimensionales [123]. Del mismo modo, se pueden establecer organoides directamente a partir de células madre intestinales. Estas células con expresión de LGR5<sup>+</sup> pueden aislarse de varios órganos y propagarse como organoides epiteliales *in vitro* para estudiar la fisiología y la transformación neoplásica. Además, por sí solas, son capaces de generar estructuras tridimensionales, ricas en células proliferantes en unas pocas semanas [124]. En nuestro estudio hemos seguido una aproximación diferente, basada en derivar los tumoroides tras el crecimiento tumoral en modelos PDOX a

partir de la implantación de las biopsias de los pacientes. Así, pudimos establecer de forma satisfactoria líneas de tumoroides a partir de la disgregación de los tumores crecidos en modelos *orthoxenografts* (PDOXT). Sin embargo, hay que tener en cuenta que los organoides establecidos a partir de tumores trasplantados en ratones deben distinguirse de los que se generan directamente a partir de células madre primarias humanas [125]. La estrategia que hemos seguido nos ha permitido disponer de una mayor cantidad de muestra a la hora de intentar establecer el cultivo 3D, así como disponer del PDOX del paciente para realizar los experimentos necesarios y contrastar ambos modelos: tumoroides (PDOXT) y *orthoxenografts* (PDOX).

La idea de cultivar células primarias de CCR durante un periodo prolongado surgió del descubrimiento fundamental, por parte de Toshiro Sato *et al.*, que las células madre intestinales sanas pueden cultivarse con *Wnt*, *R-spondina-1*, *EGF* y *Noggin*, ya que son factores principales de las vías de señalización que dirigen el desarrollo del epitelio intestinal adulto [126]–[128]. Por esta razón, hemos utilizado para el cultivo de tumoroides una serie de componentes esenciales, además del medio de cultivo *Advanced DMEM*, para su correcto desarrollo: los factores *EGF* [129] y *Noggin* (inhibidor de la proteína morfogenética ósea, BMP [130]) que promueven la proliferación de las células madre y ayudan al desarrollo de los organoides en cultivo; la R-spondina-1 (RSPO1), ligando del receptor LGR5, que causa la hiperplasia de las células madre intestinales, ayudando a su renovación; la inhibición del efecto antiproliferativo del receptor del factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) por *A 83-01* y la de p38 MAPK por *SB 202190* que ayudan al mantenimiento de las células madre intestinales o de colon humanas, y útil para el establecimiento de organoides de CCR; y la inhibición de la proteína quinasa asociada a Rho (ROCK) *Y-27632* para prevenir la muerte por anoikis [131]. Otros factores que se añadieron al cultivo fueron gastrina, prostaglandina E<sub>2</sub> y suplementos como el N-2, B-27, Nicotinamida y N-acetil-L-cisteína, que contienen mezclas de vitaminas y cofactores. Además de estos factores, es necesario la existencia de una matriz extracelular que de soporte físico y embeba las células aisladas de los tumores

para la aparición de estructuras tridimensionales [128]. Se pueden encontrar diversos tipos de matrices extracelulares, pero el Matrigel®, que fue el escogido para los cultivos de este trabajo, y el *Basement Membrane Extract* (BME) son las que se usan habitualmente en los cultivos tridimensionales.

Durante la tesis, debido a la pandemia de la Covid-19 y al desabastecimiento global de suministros, en ciertos momentos tuvimos dificultades para obtener tanto el Matrigel® como los suplementos del medio de cultivo. Esto nos permitió observar que la ausencia de ciertos factores como *Noggin*, *Y-27632* o *hEGF* son clave en el desarrollo de nuestros tumoroides de colon. Estos tumoroides, aunque permanecían viables, detuvieron radicalmente su crecimiento y, por tanto, su expansión. Sin embargo, es necesario aclarar que la privación otros factores (*SB 202190*, Nicotinamida, N-2 o R-Spondina-1) no afectó de la misma manera a todas las líneas, ya que había líneas que tenían una capacidad proliferativa mayor que otras (p. ej. iPDOXT001 e iPDOXT008) y su desarrollo pudo continuar (datos por observación microscópica). Por ejemplo, las células del CCR son menos dependientes de los factores WNT y, por lo tanto, el crecimiento *ex vivo* de las células del CCR no requiere de la incorporación Wnt3A o R-spondina-1 al medio [132], [133]. Del mismo modo, se ha descrito que la combinación diferentes factores pueden influir en el establecimiento de los cultivos de organoides. En un estudio realizado por T. Sato *et. al.* observaron que el 32,5% de los organoides de CCR no pudieron crecer en condiciones con *EGF*, *Noggin*, *A 83-01* y *SB 202190* a concentraciones de oxígeno atmosférico. Además, se llegaron a testar hasta ocho condiciones de cultivo combinadas para las células de CCR aisladas de diferentes pacientes para poder llegar a obtener una tasa de éxito del 100% [134]. Por último, la disminución de la dependencia de los factores de nicho puede ser debida a la acumulación de alteraciones a lo largo de la progresión del adenoma-carcinoma, haciendo que algunos factores del medio de cultivo sean prescindibles para ciertos cultivos de organoides derivados de tumores [134]. Lo que parece estar claro es que la presencia o ausencia de factores denota la importancia del efecto del microambiente en la generación de

los organoides, pudiendo llegar a ser una limitación que no existe en los modelos PDOX [135]–[138].

#### **4.1.2. Los tumoroides mantienen las características de los tumores PDOX y representan la heterogeneidad existente en el CCR.**

En el estudio se incluyeron un total de 12 pacientes en estadio IV que habían recibido al menos una línea de quimioterapia con el tratamiento estándar para el CCR: 5-FU + OXA o 5-FU + IRI. De estos 12 pacientes, se consiguieron generar 10 modelos *orthoxenografts* (83%) y derivar 6 líneas de tumoroides a partir de los tumores crecidos en los ratones (60%). Esto nos ha permitido iniciar la generación de un pequeño biobanco a partir de muestras de pacientes que presentan MSI con o sin mutaciones en *BRAF*. En literatura, la tasa de éxito en el establecimiento de organoides varía entre el 30-90%, dependiendo del tipo y la cantidad inicial de tejido, el tratamiento previo del paciente y la presencia de necrosis o de epitelio sano en la muestra tumoral de partida [121], [139]. Concretamente en CCR, la tasa de éxito en el varía entre los diferentes estudios desde el 60% hasta el 81% en condiciones de cultivo estándar. Sin embargo, no se han establecido cultivos de organoides a partir de todos los tejidos del CCR. Se ha estudiado que los tejidos derivados de subtipos histológicos de CCR poco frecuentes (p. ej. el adenocarcinoma mucinoso), los cánceres de colon en fase avanzada y los cánceres rectales tenían menos probabilidades de formar organoides [133], [134]. Este es el caso de organoides derivados de tumores de colon con características de MSI, con mutación en *BRAF* o *KRAS*, poco diferenciados y/o de tipo mucinoso. Por tanto, es plausible pensar que los pacientes con este tipo de tumores tienen menos probabilidades de beneficiarse de los ensayos de fármacos en organoides *ex vivo*, pero también puede sugerir diferencias biológicas en el crecimiento del tumor. Es por ello por lo que la estrategia utilizada en esta tesis se basa en la combinación de modelos tumoroides/PDOX para lograr un equilibrio entre el éxito en el establecimiento de los modelos y el cribado a gran escala de fármacos en tiempo real, partiendo

de que ambos modelos representan de manera bastante fiel las características de los tumores primarios.

Teniendo en cuenta las consideraciones mencionadas, nuestro porcentaje de éxito en cuanto al establecimiento de dichos organoides (60%) se encuentra dentro de los parámetros habituales. Asimismo, sí que conseguimos establecer de forma satisfactoria tumoroides en cultivo de 4 de las 5 muestras con genotipo MSI-H. Sin embargo, una de ellas (iPDOXT009) no se expandió lo suficiente como para realizar el cribado farmacológico y otra (iPDOXT004) mostró dificultades durante todo su cultivo, llegando incluso a no poder completar el testeo de los 42 fármacos sobre ella. A parte de mostrar MSI-H, estas dos muestras también son poseedoras de la mutación *BRAF* (V600E). Para los cuatro PDOX que no conseguimos derivar los tumoroides, lo intentamos al menos en 3 veces, a partir de diferentes pases del PDOX, probando distintas condiciones de cultivo. Esto sugiere que alguna propiedad intrínseca de los tumores hace difícil su crecimiento como tumoroides *in vitro*. En este sentido se ha sugerido que la presencia de mutaciones en *TP53* es importante a la hora de establecer líneas celulares. Todas estas muestras tienen la característica de ser portadoras de mutaciones en *BRAF* (P003 y 6) o *KRAS* (P007) además, en el caso de P006 y P007, de tener una histología bastante marcada de tipo mucinoso.

Está ampliamente descrito que los PDOX mantienen las características histopatológicas y genéticas de los tumores primarios de los que proceden [140]–[142]. Para comprobar que ocurría lo mismo en los cultivos PDOXT establecidos, se realizaron pruebas tanto histológicas, con cortes de los tumores y tumoroides incluidos en parafina, así como genéticas analizando de los genes *BRAF* y *KRAS* y la presencia o ausencia de MSI. En cuanto a la observación histológica, existe una fuerte analogía entre los cortes histológicos de los tumores y los tumoroides derivados del mismo paciente. En los tumoroides derivados de tumores con mayor grado de diferenciación histológica de tipo mucinoso se observó un lumen central más grande. Por otro lado, los análisis genéticos confirman que tanto los tumores crecidos en los ratones como los tumoroides derivados de estos, mantienen las mismas mutaciones en *BRAF* y *KRAS*, así como el genotipo MSI de

los pacientes, aunque no podemos descartar que haya ocurrido selección clonal al establecer los tumoroides y que estos hayan perdido parte de su heterogeneidad celular. Un análisis mutacional comparativo más profundo entre la muestra del tumor del paciente, el PDOX y los tumoroides derivados sería necesario para poder ver la pérdida de clones celulares que ha podido ocurrir al establecer y expandir los tumoroides. Por tanto, los PDOXT generados conservan las mutaciones evaluadas de los tejidos tumorales de los que proceden, por lo que podrían constituir un modelo útil para la prueba masivo de fármacos en estrategias de oncología personalizada para estos pacientes.

Como se comentó en la introducción, los tumores que se pueden clasificar dentro del subgrupo molecular CMS1, se caracterizan por la presencia de una histología de tipo mucinosa o difusa además de ser tumores con un genotipo MSI. El adenocarcinoma mucinoso presenta una abundante secreción mucosa que abarca al menos el 50% del volumen del tumor, y actualmente se desconoce hasta qué punto estas características histopatológicas influyen en la respuesta terapéutica [143]. En este estudio, 3 de los 5 tumores con MSI, los PDOX004, PDOX006 y PDOX009, mantenían esta histología. Precisamente estos tres modelos presentan la mutación V600E en *BRAF*. Por otro lado, los otros PDOX con MSI, los PDOX001 y PDOX010, no reflejan una histología difusa y no tienen esta mutación, pero sí presentan mutación en *KRAS*, como es el caso del PDOX001, o ninguna de las dos en el caso del PDOX010. La presencia de alteraciones en *BRAF* y MSI se considera factores de mal pronóstico en CCRm, por lo que es posible que la conjunción de estas dos alteraciones se relacione con un patrón histológico determinado [144]. Sin embargo, es necesario generar y analizar un mayor número de PDOX para CCR con estas dos alteraciones para comprobar si existe esta relación con la histología y/o con un patrón de respuesta a fármacos.

En este estudio, sólo los tumores con MSI PDOX004, PDOX006 y PDOX009 (3/5) mantenían esta histología. Es destacable que estas tres muestras estén mutadas en *BRAF*, a diferencia de las otras muestras con MSI (PDOX001 y PDOX010) que no reflejan una histología difusa y que tengan o una mutación en

*KRAS* (PDOX001) o ninguna de las dos (PDOX011). La presencia de alteraciones en *BRAF* y MSI se consideran factores de mal pronóstico en CCRm, por lo que es posible que la conjunción de estas se vea reflejado en el patrón histológico [144]. Sin embargo, es necesario un análisis de un mayor número de muestras con estas dos alteraciones para correlacionarlas con su histología o su respuesta a fármacos.

La morfología de los cultivos *in vitro* de los tumoroides muestra una similitud en estos parámetros histológicos respecto del modelo PDOX del que derivan. En este sentido, las líneas PDOXT establecidas formaron diferentes arquitecturas tridimensionales. En algunos casos con un lumen central grande con una capa externa de células de grosor variable, como por ejemplo los iPDOXT002, 4 y 8, y en otros casos eran densos y sin lumen, como las líneas iPDOXT001, 9 y 10. En estos últimos casos, sería necesario estudiar más profundamente si presentan un núcleo necrótico, ya que podría alterar los resultados de los ensayos de viabilidad. Esta variedad de arquitecturas encontradas puede ser un reflejo de la gran heterogeneidad que existe en el CCR, donde la presencia o ausencia de MSI y el conjunto de mutaciones podrían guiar la forma en que las células se agrupan formando los tumoroides [132], [145], [146].

## **4.2. LOS TUMOROIDES COMO HERRAMIENTA PARA EL CRIBADO FARMACOLÓGICO**

Ya se ha descrito en la literatura que el establecimiento de biobancos de organoides constituye una herramienta preclínica con un gran potencial en investigación en el cáncer colorrectal [121], [125], [147]–[149] y otros tipos de cáncer [105], [106], [150]–[155]. Asimismo, para que los organoides puedan constituir una herramienta útil en el cribado farmacológico y en oncología personalizada, estos modelos deben ser capaces de reproducir de forma eficiente las características del tumor primario del paciente del que derivan. En este trabajo mostramos que los modelos de tumoroides derivados de pacientes con CCRm son un punto de partida práctico para el cribado de fármacos *in vitro*. En

---

nuestro estudio con un panel de 42 fármacos mostramos que los diferentes fenotipos de las combinaciones de genotipos *BRAF-KRAS-MSI-MSS* presentan diferencias en la respuesta terapéutica.

#### **4.2.1. Respuesta a la quimioterapia estándar.**

Inicialmente, se evaluó la respuesta farmacológica de los modelos 3D a las líneas terapéuticas recibidas por los pacientes de los que se derivaron, como fueron las combinaciones 5-FU + OXA (FOLXOX) o 5-FU + IRI (FOLFIRI), mostrando respuestas equivalentes.

En los ensayos realizados, ni los tratamientos en monoterapia de 5-FU, OXA e IRI, ni las combinaciones en régimen de FOLFOX o FOLFIRI resultaron eficaces en todas las líneas PDOXT si se comparan con la respuesta obtenida en tumoroides derivados de líneas de CCR sensibles HCT-116 usadas como control, por lo que podríamos considerar que su respuesta terapéutica sería equivalente a la observada en los pacientes con estadio IV de los que derivan, y que recibieron como tratamiento en primera línea FOLFOX o CAPOX sin mostrar respuesta. En los cultivos PDOXT no se detectaron diferencias significativas en la respuesta terapéutica a la quimioterapia observada según los patrones mutacionales de *BRAF/KRAS* y *MSI/MSS* de los modelos. Las líneas de tumoroides más sensibles fueron PDOXT004 y PDOXT008 que presentan la mutación *BRAF* (V600E), aunque tienen un diferente estatus de inestabilidad de microsatélites. Sin embargo, únicamente la viabilidad bajó del 50% en concentraciones superiores a los 100  $\mu\text{M}$ , donde la IC50 contra todos los compuestos siguió siendo entre 8 y 16 veces mayor que las líneas HCT-116.

Sobre el estado de MSI se ha descrito que los tumores CCR MSI-H tienen un mejor pronóstico en comparación con los tumores MSS. Un metaanálisis evaluó a 1277 pacientes con CCR en estadio I-IV de MSI-H de un total de 32 estudios elegibles [156]. Este metaanálisis confirmó la asociación entre la MSI y el pronóstico favorable determinado tanto por la supervivencia global (SG) como por la supervivencia libre de enfermedad (DSF) de los pacientes con CCR. Se encontró un efecto beneficioso significativo del tratamiento con 5-FU en los

tumores MSS, mientras que no se llegó a una conclusión clara en los tumores MSI debido a la elevada heterogeneidad entre estudios. Aunque cabe destacar que la mayoría de los pacientes incluidos en estos estudios son pacientes en estadios I-III, por lo que en el entorno metastásico se dispone de pocos datos sobre el papel del estado de la MSI, principalmente debido a la baja prevalencia de la MSI en el estadio IV. Estos resultados contrastan con lo observado en nuestras líneas, ya que los tumores MSS presentaron la misma resistencia al tratamiento con 5-FU que los tumores MSI. Se observó una tendencia no significativa de mayor sensibilidad a los tratamientos quimioterápicos en la línea PDOXT008 (MSS y *BRAF* (V600E)) respecto a la otra línea MSS generada, la PDOXT002. Necesitamos explorar más estas observaciones con otros modelos que podamos generar con estas características genéticas.

Otro punto interesante es el papel de las mutaciones de *BRAF* en CCRm. Los metaanálisis más recientes no han mostrado ningún beneficio de la adición del 5-FU a la quimioterapia de primera línea en los pacientes de CCRm con mutaciones *BRAF* (V600E) [157], [158]. El valor pronóstico de las mutaciones *BRAF* (V600E) en el CCR se ha demostrado en varios estudios clínicos, donde se ha asociado la mutación *BRAF* (V600E) a una peor SG en relación con los pacientes con *BRAF* (WT) [159]-[161]. En cuanto a la relación de las mutaciones de *BRAF* con el estado MSI-H, se ha descrito que la mutación *BRAF* (V600E) no afecta al buen pronóstico de los tumores MSI en pacientes con enfermedad temprana, y su impacto en la SG se limitó a los tumores MSI-L y MSS [162], [163]. Centrándonos más en enfermedad metastásica, en el análisis conjunto de los estudios CAIRO, CAIRO2, COIN y FOCUS se vio que la mediana de la SG y PFS fueron significativamente peores en pacientes con MSI-H [164]. Adicionalmente, los pacientes con tumores MSI-H/*BRAF* (WT) tuvieron una mejor SG en comparación con los tumores MSI-H/*BRAF* (V600E). En nuestro estudio, las líneas iPDOXT004 e iPDOXT008 son portadoras de esta mutación y no mostraron una diferencia significativa al tratamiento con 5-FU respecto a las líneas que no eran portadoras de la mutación. La única línea generada que presenta tanto la

mutación en BRAF como un estado MSI-H es la iPDOXT004 la cual tampoco mostró un comportamiento diferente al tratamiento estándar.

Como se ha mencionado, es posible que la coincidencia de la mutación de BRAF (V600E) junto con un estado de MSI-H muestren, no solo una SG menor, sino un peor pronóstico en CCRm. La quimioresistencia a los tratamientos estándar con FOLFOX o FOLFIRI, igual que ocurre en los pacientes de esta tesis y las líneas derivadas en *orthoxenografts* y de tumoroides, parece estar asociado a estos genotipos. No obstante, también se ha asociado la resistencias en terapias dirigidas. Por ello, en esta tesis se ha evaluado el potencial terapéutico de un grupo seleccionado de terapias dirigidas *in vitro* contra este tipo de tumores y, posteriormente se han validarlo *in vivo* en los modelos PDOX.

#### **4.2.2. Respuestas a terapias dirigidas**

##### **4.2.2.1. Inhibidores de ALK**

Las translocaciones genéticas que conducen a la activación constitutiva de los receptores tirosina quinasa (RTK) desempeñan un papel crucial en la tumorigénesis de diferentes neoplasias, incluido el CCR [165]. Las fusiones de RTK que implican a *ALK*, *ROS1* y *NTRK1-2-3* se producen entre el 0.2%-2.4% de los CCR y pueden representar nuevas dianas para la intervención terapéutica [166]. En un estudio que aglutina la información clínica de pacientes con reordenamientos en CCR [167] se encontró que existía una asociación relevante, desde el punto de vista clínico, con el estado MSI-H (48.1% vs 8.1%,  $p < 0.001$ ,  $n=27$ ). Dado que el estado MSI-H se registra en menos del 5% de los CCRm, la frecuencia de los tumores con reordenamiento MSI-H es inesperadamente alta. Por último, es llamativo que los reordenamientos de *ALK* muestren un patrón histológico de tipo mucinoso, como ocurre con los tumores MSI del subgrupo CMS1 [168], [169]. A pesar de todo, debido a su baja incidencia, aún son limitados los conocimientos sobre las características clínicas y patológicas, el pronóstico y la sensibilidad de estos tumores a los tratamientos disponibles.

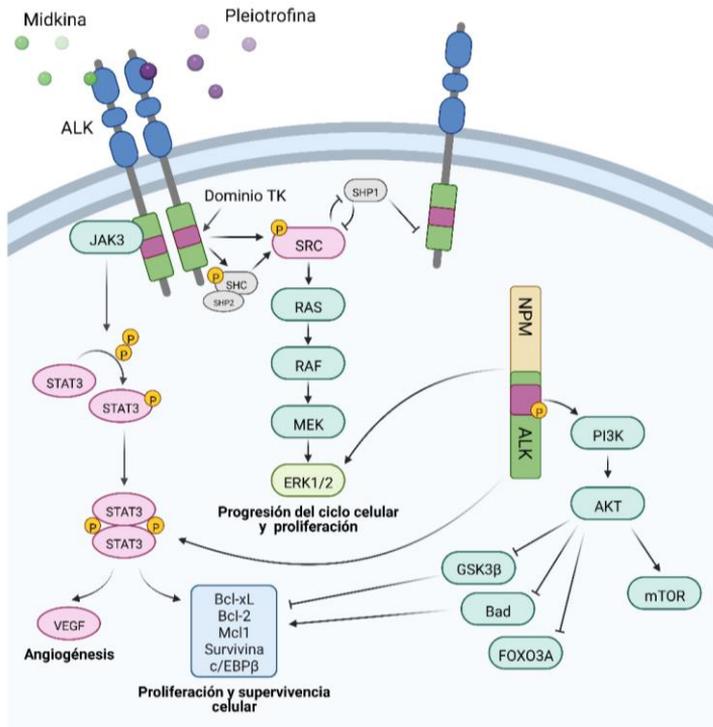
La frecuencia de estos reordenamientos en CCR es minoritaria en comparación con la del cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) que

ronda entre el 3-7% [170]. En nuestros estudios decidimos probar 3 inhibidores de ALK, aunque no estén aprobados contra los tumores colorrectales. El primer medicamento de este tipo que entró en los ensayos clínicos fue el **crizotinib** (LDK378), aprobado rápidamente por la FDA en 2011 para el tratamiento del NSCLC en células con fusiones de *ALK* o *ROS1*. El hecho de que la mediana de la PFS de los pacientes tratados con crizotinib sea  $\approx 10$  meses sugiere que la mayoría de los tumores adquieren resistencia al fármaco en un año. Para sobreponerse a esta resistencia adquirida, se han aprobado otros compuestos como el **ceritinib** [171] y el **AP26113** o **brigatinib** [172], pero todos ellos aprobados contra tumores NSCLC con fusiones *ALK*.

En las líneas PDOXT tratadas con estos tres inhibidores de ALK, se pudo observar que tanto el crizotinib como el ceritinib mostraron acción antitumoral reduciendo la viabilidad en los 4 cultivos 3D establecidos. En el caso del ceritinib se observaron porcentajes de viabilidad del 10% a los 10  $\mu\text{M}$  en todas las líneas. Comparando los mecanismos de acción del crizotinib y el ceritinib, podría ser esperable este efecto debido a que el ceritinib es un inhibidor más potentes que el crizotinib, ya que, a concentraciones más bajas produce un efecto antitumoral mayor. Sin embargo, cuando se testaron los compuestos sobre los tumores PDOX008 y PDOX010, crecidos en ratones de forma ortotópica, únicamente se detectó efecto en el tamaño tumoral en el tratamiento con crizotinib mientras que el ceritinib no mostró reducción del tamaño tumoral. Además, la combinación del crizotinib con el 5-FU+IRI aun mostró mayor efecto antitumoral en estos dos modelos. La diferencia de efectos entre los experimentos *in vivo* e *in vitro* con organoides al tratamiento con ceritinib es diferente a la esperada si además tenemos en cuenta el impacto del crizotinib en ambos modelos. Aunque en este estudio no hemos podido realizar todavía un estudio del estado de la fusión génica de *ALK* en estos PDOX de CCR, creemos que será importante realizarlo todo y a pesar de la baja frecuencia de los eventos de fusión génica de *ALK* en CCR. Consideramos que es bastante improbable que todas las muestras recogidas sean portadoras de fusiones *ALK*. Nosotros hemos usado para realizar estos

experimentos concentraciones descritas en la literatura, así como aquellas de baja toxicidad.

La transformación de la ALK oncogénica está mediada por las interacciones con las moléculas descendentes que desencadenan en importantes cascadas de señalización intracelular (Figura 42). Las fusiones de *ALK* activan muchas vías diferentes sin necesidad de estímulos, entre las que las más relevantes se encuentran la vía *Ras-extracelular signal-regulated kinase* (ERK), la vía quinasa Jano 3 (JAK3)-STAT3 y la vía fosfoinositol 3-quinasa (PI3K)-AKT. Estas vías comparten muchos puntos de interacción para mediar los efectos de la actividad ALK. Dada la inesperada respuesta a estas terapias hemos iniciado el estudio de las fusiones de *ALK* en nuestras muestras, así como el estado de la vía de señalización, en los PDOX tratados.



**Figura 42. Vía de señalización de ALK.** Las proteínas de fusión con ALK mantienen el dominio tirosina cinasa (TK) sin necesidad de ser activados por ningún ligando, permitiendo la activación constitutiva de las vías de señalización PI3K, RAS-ERK1/2 y JAK-STAT.

#### 4.2.2.2. Respuesta a inhibidores de EGFR

El bloqueo farmacológico del EGFR puede inhibir la señalización y la proliferación de las células tumorales. Entre todos los fármacos testados en este estudio, el **afatinib** es el que está descrito como el más potente de todos, ya que, en las dosis máximas toleradas, el afatinib fue más eficaz que el gefitinib o el lapatinib [173]. El afatinib es un TKI de EGFR de segunda generación, diseñado para tener una inhibición más potente y superar las mutaciones activadoras de *EGFR* que conducen a la resistencia a los fármacos de EGFR-TKI de primera generación, como el gefitinib, lapatinib y erlotinib. Afatinib se une y bloquea de forma selectiva, potente e irreversible a EGFR (ErbB1), HER2 (ErbB2) y ErbB4, con lo cual bloquea la cascada de señalización de todos los homodímeros y heterodímeros de la familia. Su habilidad para bloquear todos los miembros de la familia ErbB diferencia afatinib de los TKI de primera y tercera generación (osimertinib), y su unión irreversible lo diferencia de los TKI del EGFR de primera generación que tienen unión reversible. Todos estos fármacos, al igual que los anteriormente descritos, están aprobados para su uso en NSCLC (afatinib, erlotinib, gefitinib), así como cáncer de mama HER2+ (lapatinib).

Las alteraciones en *BRAF* hacen que los tumores de CCR portadores de estas mutaciones muestren resistencia a la terapia anti-EGFR. De los 5 compuestos testados en los tumoroides, únicamente el **erlotinib** no produjo una disminución de la viabilidad por debajo del 50%. Los otros cuatro, independientemente del estado mutacional en *BRAF*, mostraron efecto antitumoral. Sólo en el tratamiento *in vitro* con **lapatinib** en los PDOXT se observaron diferencias significativas entre las líneas mutadas en *BRAF* y las que no, mostrando mayor resistencia en las líneas portadoras de la mutación. Además, el lapatinib mostró efecto en concentraciones entre 10-30  $\mu\text{M}$ , a diferencia de los otros 3 compuestos donde la reducción de la viabilidad se produjo en concentraciones de 60  $\mu\text{M}$ . Cuando se analizaron estos compuestos en las *orthoxenografts*, tanto la muestra mutada (PDOX008) como la que presentaba el alelo nativo (PDOX010) mostraron una reducción de masa y tamaño tumoral significativa cuando se combinaba el gefitinib con 5-FU+IRI. En monoterapia, el

**gefitinib** y el lapatinib mostraron una tendencia no significativa al reducir el peso/volumen tumoral. Este efecto sinérgico, encontrado en el tratamiento con gefitinib en PDOX, también se había observado en el tratamiento con inhibidores de ALK mencionados en el apartado anterior, y parece apreciarse una tendencia en la terapia con resultados sensibles en el CCRm.

En la literatura, se ha descrito el resultado positivo en un ensayo clínico de dos pacientes CCRm que demostraron una respuesta clínica al lapatinib junto con la capecitabina y oxaliplatino (CAPOX) [174]. El lapatinib es un fármaco que inhibe tanto la actividad de EGFR como la de HER2, mientras que el erlotinib únicamente actúa sobre EGFR (Figura 43). Es posible que esta diferencia en las dianas de ambas drogas sea la responsable de que el lapatinib tenga efecto antitumoral sobre los PDOXT y no el erlotinib. Además, el efecto del lapatinib debería ser similar o inferior al del afatinib, ya que actúan sobre los mismos receptores ErbB, teniendo el afatinib mayor efectividad. Por último, hay que recordar que estos fármacos están aprobados para el tratamiento de otros cánceres que no son el CCR, por lo que puede que su metabolización en las células tumorales del colon sea diferente a las de pulmón o mama. Para comprender mejor el mecanismo de resistencia e interacciones de estos compuestos, consideramos ampliar en un futuro los estudios mutacionales sobre EGFR y HER2.



con una mala supervivencia debido a su capacidad para promover la metástasis, mientras que la señalización de VEGFR2 desempeña un papel importante en la angiogénesis tumoral. Los miembros de la familia FGF contribuyen a la proliferación de las células tumorales y a la resistencia a la quimioterapia en líneas celulares de cáncer de casi todos los tipos tumorales [176]. Por último, se ha demostrado que la sobreexpresión de PDGF- $\beta$  y PDGFR- $\beta$  promueve el crecimiento tumoral y la angiogénesis [177]. Estos hallazgos sugieren la importancia de realizar una inhibición simultánea de las vías FGFR/PDGFR/VEGFR para conseguir efectos antitumorales exitosos. La inhibición de múltiples angioquinas conduce a la supresión de la señalización de las moléculas RAS-RAF-MAPK y las moléculas relacionadas con PI3K-AKT, que están principalmente implicadas en la proliferación celular, la supervivencia celular y la invasión tumoral.

En este estudio se trataron todas las PDOXT con hasta 7 fármacos actualmente usados en el tratamiento de diferentes tipos tumorales enfocados en la inhibición de los receptores mencionados (Tabla 25).

**Tabla 25. Tratamiento de los inhibidores de receptores tirosina quinasas angiogénicos.**

FÁRMACO	TRATAMIENTO	DIANAS
<b>Lenvatinib</b>	Carcinoma diferenciado de tiroides Carcinoma de células renales Carcinoma hepatocelular Cáncer de endometrio	VEGFR1-3, FGFR1-4, PDGFR $\alpha$ , c-KIT y RET [178], [179]
<b>Pazopanib</b>	Carcinoma de células renales Sarcoma de tejido blando	VEGFR1-3, PDGFR $\alpha/\beta$ y c-KIT [180]
<b>Regorafenib</b>	Cáncer colorrectal metastásico	VEGFR1-3, TIE2, PDGFR $\beta$ , FGFR, c-KIT, RET y RAF [181]
<b>Dovitinib</b>	Carcinoma de células renales	VEGFR1-3, PDGFR $\beta$ , FGFR1-3, FTL3 y c-KIT [182]
<b>Sunitinib</b>	Cáncer de estroma gastrointestinal Carcinoma de células renales Cáncer de páncreas	VEGFR1-2, PDGFR $\alpha/\beta$ , FLT3, c-KIT y RET [183]
<b>Nintedanib</b>	Enfermedad pulmonar intersticial	VEGFR1-3, FGFR1-3 y PDGFR $\alpha/\beta$ [184]
<b>Sorafenib</b>	Carcinoma diferenciado de tiroides Carcinoma de células renales Carcinoma hepatocelular	PDGFR- $\beta$ , VEGFR2, c-KIT, Raf-1 y B-Raf [185]

Cinco de los 7 fármacos evaluados en los tumoroides dieron una disminución de la viabilidad de más del 50% (dovitinib, subitinib, regorafenib, nintenedib y sorafenib), llegando a valores entre el 40-10% dependiendo del fármaco. Todos estos fármacos son inhibidores multiquinasas con dianas terapéuticas en común entre todos ellos. De estos, los que tuvieron un efecto mayor a concentraciones menores fueron el sorafenib y el sunitinib, ya que a los 30  $\mu\text{M}$  ya mostraban valores de viabilidad por debajo del 20%.

Algunos de los fármacos incluidos en este estudio, han sido evaluados para el CCR o están en sendos ensayos clínicos para probar su eficacia en esta enfermedad. El **dovitinib** (TKI258), aunque está indicado para el carcinoma de

células renales (RCC), podría tener un efecto beneficioso en pacientes de CCR, ya que en se ha visto que el tratamiento con TKI258 mostró una actividad antitumoral significativa en experimentos de PDX con tumores de CCR independientemente mutaciones de *KRAS* o *BRAF* [186]. Estos resultados concuerdan con los obtenidos tras el tratamiento con dovitinib en nuestros modelos de tumoroides, ya que tuvo un efecto antitumoral considerable sin diferencias entre todas las líneas. El **nintedanib** ha demostrado poseer una importante actividad antitumoral en estudios preclínicos y en los primeros ensayos clínicos realizados en una variedad de tumores sólidos, incluido el CCR [187], tanto como agente único como en combinación con diferentes fármacos citotóxicos, aunque con resultados algo decepcionantes en pacientes con CCRm refractario [188]. Testando el nintedanib en los tumoroides observamos que, en los ensayos de viabilidad celular, la línea PDOXT008 (MSS/*BRAF*) nunca bajó a niveles inferiores al 60%, mientras que otras líneas con características genéticas de MSS (iPDOX002 e iPDOX010) y *BRAF* (V600E) (iPDOXT004) sí que vieron reducida su viabilidad a valores de 40-20%. Por otra parte, sin llegar a ser significativo para todas las líneas, las muestras con un estado MSI-H mostraron mayor efecto antitumoral (viabilidad <20%) cuando se trababan con este fármaco a diferencia de las líneas MSS (viabilidad 80-40%). Por último, el **sorafenib** ha sido evaluado en el entorno del CCR con mutación de *KRAS* en varios estudios de fase II. Las pruebas no han tenido éxito en el tratamiento de los pacientes con CCRm donde las mutaciones en *KRAS/BRAF* no fueron predictivas de ningún beneficio [189].

A pesar de lo expuesto en el párrafo anterior, el único de todos los mencionados que está indicado y aprobado por la FDA para el tratamiento del CCR es el **regorafenib**. En nuestro estudio, se observaron respuestas diferentes dependiendo del estado mutacional de *BRAF*, teniendo mayor efecto en aquellas muestras que eran portadores del alelo salvaje. El regorafenib es un inhibidor multiquinasa que se dirige a los receptores angiogénicos (VEGFR1-3, TIE2), estromales (PDGFR- $\beta$ , FGFR) y oncogénicos de tirosina quinasa de señalización intracelular (KIT, RET y RAF) [190]. En nuestros experimentos *in vivo*, el

regorafenib en el tumor PDOX008 (*BRAF* (V600E)) no mostró una reducción tumoral si se compara con el grupo control igual que ocurría en las líneas PDOXT008. Seguramente, su efecto se haya visto alterado por la presencia de esta mutación, haciendo que la vía de señalización siga en funcionamiento a pesar de la administración del fármaco

De los dos fármacos que no dieron ninguna respuesta que supusiera una disminución de la viabilidad de más del 50%, como ocurría con los otros 5, el **pazopanib** es el único que no actúa sobre los receptores FGFR. El pazopanib es una pequeña molécula de segunda generación inhibidora de la tirosina cinasa de la angiogénesis que se dirige a los receptores VEGF1-3, a los receptores PDGF (PDGFR $\alpha$  y PDGFR $\beta$ ) y a KIT. Sin embargo, el **lenvatinib** es un inhibidor que sí que actúa sobre todos los receptores relacionados con la angiogénesis: VEGFR1-3, FGFR1-4 y PDGFR $\alpha$ , además de los protooncogenes RET y KIT. Los estudios preclínicos han demostrado que el lenvatinib tiene una potente actividad antiangiogénica, principalmente a través de la inhibición de las vías de señalización del VEGF y del FGF [191].

En conclusión, nuestros resultados sugieren que los receptores tirosina quinasa, como FGFR, VEGFR y PDGFR, pueden ser una diana eficaz para el tratamiento del CCR, siendo un enfoque viable para mejorar el resultado de los pacientes con CCR.

#### 4.2.2.4. Respuesta a inhibidores CHK1/2 (Prexasertib)

La incorporación del prexasertib, no sólo a los experimentos de tumoroides, sino también a los experimentos *in vivo* se debió a la publicación de un artículo científico en la revista Nature a inicios del año 2022 [192]. Los investigadores involucrados manifiestan que el tratamiento con irinotecán y la inhibición de CHEK1 tienen efectos sinérgicos en las células de cáncer de colon MSS o con doble mutación *KRAS-TP53*, conduciendo a la apoptosis y a la supresión del crecimiento del xenoinjerto tumoral. Esta combinación presentaba una potencia y eficacia significativamente mayores en las líneas celulares MSS que en las líneas celulares MSI.

Como se ha mencionado, el irinotecan es ampliamente utilizado en la clínica para tratar el CCR, mientras que los inhibidores de CHEK1 pueden potenciar las respuestas de los compuestos que dañan el ADN mediante la anulación de la detención del ciclo celular inducida por el daño del ADN. En este sentido, el prexasertib, un inhibidor selectivo competitivo con el ATP de las quinasas de punto de control 1 y 2 (*CHK1/2*), tiene potencial actividad como agente antineoplásico [193]. Tras su administración, el prexasertib se une selectivamente a CHK1, principalmente, impidiendo así su actividad y anulando la reparación del ADN dañado [194]. Esto puede conducir a una acumulación de errores en el ADN promoviendo la inestabilidad genómica y la apoptosis. CHK1 es una proteína serina/treonina quinasa que actúa sobre el punto de control del ciclo celular de la fase M y es esencial para la reparación del ADN, por lo que desempeña un papel clave en la resistencia a los agentes quimioterapéuticos.

En nuestros ensayos farmacológicos en tumoroides, no se han observado diferencias significativas entre muestras portadoras o no de la mutación en *KRAS* o entre MSI y MSS, a diferencia de los resultados del estudio mencionado [192], pero sí que se detectó una bajada en la viabilidad celular mayor al 50% tras el tratamiento con prexasertib en todas las líneas. Sin embargo, el resultado más significativo es la respuesta al tratamiento combinado de 5-FU+IRI+PREX en los experimentos con PDOX.

Estos resultados abren la puerta a la incorporación de nuevas dianas terapéuticas en pacientes afectados por CCR y, sobre todo, al estudio de terapias combinadas de fármacos dirigidos con la quimioterapia estándar. La evaluación de la potencia y la eficacia de la combinación son complementarias, por lo que el uso de terapias múltiples de dosis bajas podría conducir a la reducción de las dosis de cada fármaco, a la mejora de la eficacia o a ambas, en relación con los agentes únicos. A pesar de los resultados expuestos, es necesaria una validación más detallada de las combinaciones de fármacos prometedoras que aquí se presentan, con un mayor número de muestras además de estudios genéticos y moleculares más exhaustivos.

### **4.3. GRAN COMPLEMENTARIEDAD DE LOS MODELOS DE TUMOROIDES Y PDOX**

Tanto los tumoroides como en los modelos PDOX generados en este estudio reprodujeron de forma satisfactoria las características tumorales, genéticas e histopatológicas, del tumor del paciente del que derivaron. A la hora de realizar un estudio de selección de potenciales fármacos útiles para tratar los pacientes, los datos de respuesta obtenidos en los ensayos en organoides derivados de los PDOX, han sido de utilidad para su posterior evaluación preclínica *in vivo*. Detectamos una alta equivalencia entre la respuesta a la quimioterapia estándar (5-FU, OXA e IRI) tanto *in vitro* como *in vivo*, lo que indica que los modelos de tumoroides y PDOX recapitulan de una forma bastante fidedigna el comportamiento observado en los pacientes de los que derivan. Respecto a las terapias dirigidas evaluadas *in vitro*, seleccionadas y posteriormente evaluadas *in vivo*, a grandes rasgos podemos decir que nos han permitido seleccionar tres tipos de terapias que han manifestado un potencial terapéutico a explorar en el tratamiento de este tipo de tumores. En conjunto podemos considerar que el sistema PDOX-Tumoroides-PDOX es un buen sistema a la hora de evaluar potenciales opciones terapéuticas. Los tumoroides, aparte de ser herramientas útiles para la selección de potenciales terapias, podrían contribuir a la reducción de los ensayos con animales en la investigación biomédica. Sin embargo, pensamos que, para una correcta aplicación de los fármacos a través de un tratamiento personalizado, seguirá siendo necesario la complementariedad de ambos modelos.

### **4.4. LIMITACIONES DEL ESTUDIO**

Somos conscientes de que este trabajo presenta bastantes limitaciones en cuanto a análisis o estudios adicionales que se podrían haber hecho, o que se podrán hacer en un futuro, para continuar contribuyendo a definir mejor el tratamiento de la enfermedad metastásica en CCR.

Una de las principales limitaciones del estudio es el reducido número de tumoroides que se establecieron con las diferentes características genéticas de interés, para así poder formar grupos y aplicar análisis estadísticos para llegar a conclusiones más robustas. En este punto nos gustaría resaltar la complejidad que lleva el poder llegar a obtener una muestra de un paciente en fresco para poderla implantar en los ratones. Hecho que se ve agravado cuando se hace sobre un tumor de baja frecuencia. Por esto es importante poner en valor la posibilidad de disponer de estos pocos, pero relevantes modelos pareados de PDOX/Tumoroides, para la realización de este trabajo, así como de cara a futuros estudios.

En algunas condiciones, sí que se encontraron diferencias cuando se compararon los efectos de algunos fármacos en función de la presencia o ausencia de mutaciones en *BRAF* o inestabilidad de microsatélites. Sin embargo, consideramos que es necesario aumentar el número de líneas de tumoroides para poder atribuir las respuestas farmacológicas encontradas con la mutación de un gen específico o a su estado MSI. Además, sería importante ampliar el número de muestras con origen metastásico. La incidencia muy baja de pacientes con CCR con enfermedad avanzada y genotipo MSI, con o sin mutaciones en *BRAF*, ha dificultado la obtención de un número mayor de muestra para nuestro proyecto. Adicionalmente, durante la realización del estudio, la pandemia por la COVID-19 también ha sido un factor que nos ha dificultado mucho la ejecución del trabajo, ya que durante la pandemia tuvimos que sacrificar los ratones, criopreservar tumores y tumoroides, y parar la implantación de nuevos modelos. Postpandemia, la puesta en marcha de nuevo de estrategias de implantación de nuevos tumores, así como la descriopreservación de PDOX/tumoroides nos afectó muchísimo y generó retraso a la hora de poder realizar un mejor y más profundo trabajo durante el tiempo de esta tesis.

La generación y optimización de los protocolos de establecimiento de los cultivos en organoides también fue bastante desafiante al inicio de este proyecto. El porcentaje de éxito del establecimiento de los cultivos 3D no es tan elevado como nos gustaría, aun así, partiendo inicialmente de 10 modelos *orthoxenografts*

consideramos que la tasa de generación, establecimiento y mantenimiento de las 6 líneas de tumoroides es muy buena. La falta de éxito en 4 de las líneas podría atribuirse a los factores de crecimiento añadidos al medio de cultivo, las características genéticas inherentes a la muestra, o incluso la histología del tejido del que se derivó (p. ej. histología mucinosa), tal y como se comentó anteriormente. Además, observamos que el éxito de crecimiento de los de organoides una vez criopreservados es menor que en los modelos en 2D.

En este estudio no evaluamos las terapias basadas en inhibidores de punto de control inmunitario (inmunoterapia, ICI), indicada para cáncer colorrectal con inestabilidad de microsatélites. Actualmente, la inmunoterapia es el enfoque más prometedor para contrarrestar la resistencia al 5-FU en el CCR. Anticuerpos anti-PD1 y anti-PDL1, han dado muy buenos resultados en este tipo de tumores debido a su alta infiltración linfocítica en el tejido. Hicimos unas tentativas preliminares cocultivando células del sistema inmune con los tumoroides, pero estos aún son muy preliminares. Sin embargo, en nuestro laboratorio hemos desarrollado la tecnología para humanizar los ratones inmunodeprimidos con PBMCs o células hematopoyéticas humanas, aunque no nos dio tiempo de poder realizar estos experimentos en el tiempo de la tesis y planeamos poderlos hacer en el futuro con ICI en monoterapia o combinación con otros fármacos.

A nivel de análisis futuros, también consideramos que son necesarios estudios genéticos y citogenéticos más profundos de los modelos *in vivo* y 3D generados, no sólo de *BRAF* y *KRAS*, sino a otros genes que, visto los resultados de los ensayos farmacológicos, pueden estar interfiriendo en la sensibilidad o resistencia: *ALK*, *EGFR*, *TP53*, *VEGFR*, *PIK3CA*, *SMAD4*... Uno de los aspectos que menos hemos podido desarrollar ha sido la realización de estudios funcionales para caracterizar las respuestas observadas. Pero una cosa muy importante a resaltar es que, a pesar de las limitaciones del estudio, hemos encontrado varios fármacos que en combinación con los tratamientos de quimioterapia producen, en modelos ortotópicos, una reducción importante y significativa del tamaño/volumen tumoral. Y lo que es más importante, las respuestas observadas

tienen una correlación con una respuesta histológica, lo que indudablemente refuerza el valor de la estrategia seguida.

También podríamos complementar estos estudios con otros análisis funcionales, utilizando herramientas de edición genética como CRISPR-Cas9 en tumoroides. La reversión de la mutación en *BRAF* en los tumoroides y los posteriores ensayos con la misma librería de compuestos daría datos relevantes sobre el efecto de esta mutación en la resistencia de los tumores CCRm MSI-H. Por último, tal y como hemos mencionado, un estudio a nivel molecular mediante técnicas como la inmunohistoquímica, inmunofluorescencia y *Western blot* nos ha de permitir aumentar el conocimiento de las vías de señalización a la respuesta farmacológica en tumores de CCR.

Igualmente, una mejora de la técnica de los cultivos de los tumoroides en un entorno inmunocompetente ha de permitir integrar los tratamientos de quimioterapia, terapias dirigidas y la inmunoterapia a la hora de intentar mejorar el tratamiento de estos pacientes.



# **CONCLUSIONES**



1. Los modelos preclínicos de PDOX/*orthoxenografts* generados mediante la implantación quirúrgica de forma ortotópica de biopsias de tumores MSI, en el colon de ratones inmunosuprimidos, mantienen las características histopatológicas y genéticas de tumores primarios del paciente del cual derivan.
2. Los PDOX generados son una fuente de material fresco de altísima calidad biológica que permite derivar de forma muy eficiente, *in vitro*, los tumoroides/PDOXT útiles para la realización de múltiples aproximaciones, entre las que están la evaluación de fármacos. Aproximación que permite una importante reducción en el tiempo y coste de los experimentos, así como implementar estrategias de las 3Rs para limitar el uso de animales de experimentación.
3. Tanto los PDOX/*orthoxenografts* como los tumoroides, generados a partir de los tumores MSI, mimetizan la resistencia a los tratamientos de quimioterapia de forma análoga a la observada en los pacientes de los que derivan.
4. Los estudios de eficacia terapéutica en monoterapia realizados en los tumoroides MSI identificaron respuestas significativas con tres grupos/familias de inhibidores: i) Inhibidores de EGFR; ii) Inhibidores de VEGFR/PDGFR/FGFR, e iii) Inhibidores de ALK.
5. Para la mayoría de los tratamientos evaluados en los tumoroides, la presencia o no de MSI no correlacionó con diferencias significativas en las repuestas observadas. En el caso de los tratamientos con lapatinib y regorafenib, sí que se observaron diferencias en función del estado mutacional de *BRAF*.
6. Los estudios preclínicos de respuesta *in vivo* realizados en monoterapia en varios PDOX, no han identificado que ninguna de las terapias seleccionadas en los tumoroides reduzca el peso o tamaño de forma significativa en los tumores MSI resistentes a la quimioterapia (5-FU+IRI). Sin embargo, los

tratamientos en combinación de gefitinib, crizotinib y prexasertib con 5-FU+IRI sí mejoraron significativamente la respuesta. Estos tratamientos pueden representar un avance en el tratamiento del CCR con MSI resistentes al esquema quimioterápico clásico.

7. El uso combinado de PDOX/tumoroides para un mismo tumor, tal y como hemos mostrado en este trabajo en casos MSI resistentes a los tratamientos de quimioterapia, parece ser una herramienta mejor a la hora de identificar nuevas aproximaciones terapéuticas que el uso aislado tanto de PDOX como de los tumoroides. Ambos sistemas de forma individual presentan limitaciones.
8. En este sentido, la combinación de ambas aproximaciones puede ayudar a mejorar el tratamiento de los pacientes de cáncer en general, y de colon en particular.

## COLABORACIONES

Durante el desarrollo de esta tesis, he colaborado y participado activamente en el desarrollo de otros proyectos que han resultado en 3 publicaciones en revistas científicas de relevancia:

***SMARCA4 deficient tumours are vulnerable to KDM6A/UTX and KDM6B/JMJD3 blockade.*** Romero OA, Vilarrubi A, Albuquerque-Bejar JJ, Gomez A, Andrades A, Trastulli D, Pros E, Setien F, Verdura S, Farré L, **Martín-Tejera JE**, Llabata P, Oaknin A, Saigi M, Piulats JM, Matias-Guiu X, Medina PP, Vidal A, Villanueva A, Sanchez-Cespedes M. *Nat Commun.* 2021 Jul 14;12(1):4319

***Extramedullary multiple myeloma patient-derived orthotopic xenograft with a highly altered genome: combined molecular and therapeutic studies.*** Farre L, Sanz G, Ruiz-Xivillé N, Castro de Moura M, **Martin-Tejera JE**, Gonçalves-Ribeiro S, Martinez-Iniesta M, Calaf M, Luis Mosquera J, Martín-Subero JJ, Granada I, Esteller M, Domingo-Domenech E, Climent F, Villanueva A, Sureda A. *Dis Model Mech.* 2021 Jul 1;14(7):dmm048223

***Epigenetic loss of RNA-methyltransferase NSUN5 in glioma targets ribosomes to drive a stress adaptive translational program.*** Janin M, Ortiz-Barahona V, de Moura MC, Martínez-Cardús A, Llinàs-Arias P, Soler M, Nachmani D, Pelletier J, Schumann U, Calleja-Cervantes ME, Moran S, Guil S, Bueno-Costa A, Piñeyro D, Perez-Salvia M, Rosselló-Tortella M, Piqué L, Bech-Serra JJ, De La Torre C, Vidal A, Martínez-Iniesta M, **Martín-Tejera JE**, Villanueva A, Arias A, Cuartas I, Aransay AM, La Madrid AM, Carcaboso AM, Santa-Maria V, Mora J, Fernandez AF, Fraga MF, Aldecoa I, Pedrosa L, Graus F, Vidal N, Martínez-Soler F, Tortosa A, Carrato C, Balañá C, Boudreau MW, Hergenrother PJ, Kötter P, Entian KD, Hench J, Frank S, Mansouri S, Zadeh G, Dans PD, Orozco M, Thomas G, Blanco S, Seoane J, Preiss T, Pandolfi PP, Esteller M. *Acta Neuropathol.* 2019 Dec;138(6):1053-1074.



# **REFERENCIAS**



- 
- [1] H. Sung *et al.*, "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries," *CA Cancer J Clin*, vol. 71, no. 3, May 2021, doi: 10.3322/caac.21660.
- [2] SEER, "Colorectal Cancer - Cancer Stat Facts," *SEER Cancer Stat Facts: Colorectal Cancer*, 2019.
- [3] R. Dienstmann, L. Vermeulen, J. Guinney, S. Kopetz, S. Tejpar, and J. Tabernero, "Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer," *Nature Reviews Cancer*. 2017. doi: 10.1038/nrc.2016.126.
- [4] R. L. Siegel, K. D. Miller, and A. Jemal, "Cancer statistics, 2019," *CA Cancer J Clin*, vol. 69, no. 1, pp. 7–34, 2019, doi: 10.3322/caac.21551.
- [5] N. B. Henrikson *et al.*, "Family history and the natural history of colorectal cancer: Systematic review," *Genetics in Medicine*, vol. 17, no. 9. Nature Publishing Group, pp. 702–712, Sep. 02, 2015. doi: 10.1038/gim.2014.188.
- [6] F. Kastrinos, N. J. Samadder, and R. W. Burt, "Use of Family History and Genetic Testing to Determine Risk of Colorectal Cancer," *Gastroenterology*, vol. 158, no. 2, pp. 389–403, Jan. 2020, doi: 10.1053/j.gastro.2019.11.029.
- [7] E. J. Kuipers *et al.*, "Colorectal cancer," *Nat Rev Dis Primers*, vol. 1, Nov. 2015, doi: 10.1038/nrdp.2015.65.
- [8] H. Yu and K. Hemminki, "Genetic epidemiology of colorectal cancer and associated cancers," *Mutagenesis*, vol. 35, no. 3. Oxford University Press, pp. 207–219, May 01, 2020. doi: 10.1093/mutage/gez022.
- [9] I. Mármol, C. Sánchez-de-Diego, A. P. Dieste, E. Cerrada, and M. J. R. Yoldi, "Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer," *Int J Mol Sci*, vol. 18, no. 1, Jan. 2017, doi: 10.3390/IJMS18010197.

- [10] H. Kawakami, A. Zaanani, and F. A. Sinicrope, "Microsatellite Instability Testing and Its Role in the Management of Colorectal Cancer," *Current Treatment Options in Oncology*. 2015. doi: 10.1007/s11864-015-0348-2.
- [11] G. A. Laporte, N. M. Leguisamo, A. N. Kalil, and J. Saffi, "Clinical importance of DNA repair in sporadic colorectal cancer," *Crit Rev Oncol Hematol*, vol. 126, no. 2010, pp. 168–185, 2018, doi: 10.1016/j.critrevonc.2018.03.017.
- [12] E. R. Fearon and B. Vogelstein, "A genetic model for colorectal tumorigenesis," *Cell*. 1990. doi: 10.1016/0092-8674(90)90186-I.
- [13] N. N. Keum and E. Giovannucci, "Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies," *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, vol. 16, no. 12, pp. 713–732, 2019, doi: 10.1038/s41575-019-0189-8.
- [14] W. M. Grady and S. D. Markowitz, "The Molecular Pathogenesis of Colorectal Cancer and Its Potential Application to Colorectal Cancer Screening," *Dig Dis Sci*, vol. 60, no. 3, pp. 762–772, Mar. 2015, doi: 10.1007/s10620-014-3444-4.
- [15] B. Vogelstein and K. W. Kinzler, "The multistep nature of cancer," *Trends in Genetics*, vol. 9, no. 4. Trends Genet, pp. 138–141, 1993. doi: 10.1016/0168-9525(93)90209-Z.
- [16] Z. Herceg and P. Hainaut, "Genetic and epigenetic alterations as biomarkers for cancer detection, diagnosis and prognosis," *Molecular Oncology*, vol. 1, no. 1. Wiley-Blackwell, pp. 26–41, Jun. 2007. doi: 10.1016/j.molonc.2007.01.004.
- [17] C. Lengauer, K. W. Kinzler, and B. Vogelstein, "Genetic instability in colorectal cancers," *Nature*, vol. 386, no. 6625, pp. 623–627, Apr. 1997, doi: 10.1038/386623a0.
- [18] R. Gryfe *et al.*, "Tumor Microsatellite Instability and Clinical Outcome in Young Patients with Colorectal Cancer," *New England Journal of Medicine*,

- 
- vol. 342, no. 2, pp. 69–77, Jan. 2000, doi: 10.1056/nejm200001133420201.
- [19] M. Toyota, N. Ahuja, M. Ohe-Toyota, J. G. Herman, S. B. Baylin, and J. P. J. Issa, “CpG island methylator phenotype in colorectal cancer,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 96, no. 15, pp. 8681–8686, Jul. 1999, doi: 10.1073/pnas.96.15.8681.
- [20] M. S. Pino and D. C. Chung, “The Chromosomal Instability Pathway in Colon Cancer,” *Gastroenterology*, vol. 138, no. 6, pp. 2059–2072, 2010, doi: 10.1053/j.gastro.2009.12.065.
- [21] M. B. Jeong, J. H. Kim, and G. H. Kang, “Epigenetic alterations in colorectal cancer: The CpG island methylator phenotype,” *Histology and Histopathology*, vol. 28, no. 5, pp. 585–595, May 2013. doi: 10.14670/HH-28.585.
- [22] S. Ogino *et al.*, “CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer,” *Gut*, vol. 58, no. 1, pp. 90–96, Jan. 2009, doi: 10.1136/gut.2008.155473.
- [23] J. Guinney *et al.*, “The consensus molecular subtypes of colorectal cancer,” *Nat Med*, 2015, doi: 10.1038/nm.3967.
- [24] W. K. Kim *et al.*, “Identification and selective degradation of neopeptide-containing truncated mutant proteins in the tumors with high microsatellite instability,” *Clinical Cancer Research*, vol. 19, no. 13, pp. 3369–3382, Jul. 2013, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0684.
- [25] N. Rodriguez-Salas *et al.*, “Clinical relevance of colorectal cancer molecular subtypes,” *Crit Rev Oncol Hematol*, vol. 109, pp. 9–19, 2017, doi: 10.1016/j.critrevonc.2016.11.007.
- [26] E. Fessler and J. P. Medema, “Colorectal Cancer Subtypes: Developmental Origin and Microenvironmental Regulation,” *Trends Cancer*, vol. 2, no. 9, pp. 505–518, 2016, doi: 10.1016/j.trecan.2016.07.008.

- [27] R. Gupta, S. Sinha, and R. N. Paul, "The impact of microsatellite stability status in colorectal cancer," *Curr Probl Cancer*, vol. 42, no. 6, pp. 548–559, 2018, doi: 10.1016/j.currproblcancer.2018.06.010.
- [28] E. Fessler and J. P. Medema, "Colorectal Cancer Subtypes: Developmental Origin and Microenvironmental Regulation," *Trends Cancer*, vol. 2, no. 9, pp. 505–518, Sep. 2016, doi: 10.1016/J.TRECAN.2016.07.008.
- [29] N. Stjepanovic *et al.*, "Hereditary gastrointestinal cancers: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up," *Annals of Oncology*, vol. 30, no. 10. Oxford University Press, pp. 1558–1571, Oct. 01, 2019. doi: 10.1093/annonc/mdz233.
- [30] C. Evrard, G. Tachon, V. Randrian, L. Karayan-Tapon, and D. Tougeron, "Microsatellite instability: Diagnosis, heterogeneity, discordance, and clinical impact in colorectal cancer," *Cancers (Basel)*, vol. 11, no. 10, pp. 1–25, 2019, doi: 10.3390/cancers11101567.
- [31] S. Popat, R. Hubner, and R. S. Houlston, "Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 23, no. 3. J Clin Oncol, pp. 609–618, 2005. doi: 10.1200/JCO.2005.01.086.
- [32] J. W. T. Toh, K. Phan, F. Reza, P. Chapuis, and K. J. Spring, "Rate of dissemination and prognosis in early and advanced stage colorectal cancer based on microsatellite instability status: systematic review and meta-analysis," *International Journal of Colorectal Disease*, vol. 36, no. 8. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, pp. 1573–1596, Aug. 01, 2021. doi: 10.1007/s00384-021-03874-1.
- [33] G. Lech, R. Słotwiński, M. Słodkowski, and I. W. Krasnodębski, "Colorectal cancer tumour markers and biomarkers: Recent therapeutic advances," *World J Gastroenterol*, vol. 22, no. 5, pp. 1745–1755, Feb. 2016, doi: 10.3748/wjg.v22.i5.1745.

- 
- [34] S. Benvenuti *et al.*, "Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies," *Cancer Res*, vol. 67, no. 6, pp. 2643–2648, Mar. 2007, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4158.
- [35] R. A. DeStefanis, J. D. Kratz, P. B. Emmerich, and D. A. Deming, "Targeted Therapy in Metastatic Colorectal Cancer: Current Standards and Novel Agents in Review," *Curr Colorectal Cancer Rep*, vol. 15, no. 2, 2019, doi: 10.1007/S11888-019-00430-6.
- [36] D. Cunningham *et al.*, "Cetuximab Monotherapy and Cetuximab plus Irinotecan in Irinotecan-Refractory Metastatic Colorectal Cancer," *New England Journal of Medicine*, vol. 351, no. 4, pp. 337–345, Jul. 2004, doi: 10.1056/nejmoa033025.
- [37] C. J. Allegra *et al.*, "American society of clinical oncology provisional clinical opinion: Testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 27, no. 12, pp. 2091–2096, Apr. 20, 2009. doi: 10.1200/JCO.2009.21.9170.
- [38] M. Malumbres and M. Barbacid, "RAS oncogenes: The first 30 years," *Nature Reviews Cancer*, vol. 3, no. 6, pp. 459–465, Jun. 2003. doi: 10.1038/nrc1097.
- [39] M. Schirripa and H.-J. Lenz, "Biomarker in CRC.," *Cancer J*, vol. 22, no. 3, pp. 156–164, 2016, doi: 10.1097/PPO.000000000000190.
- [40] J. Y. Douillard *et al.*, "Final results from PRIME: Randomized phase III study of panitumumab with FOLFOX4 for first-line treatment of metastatic colorectal cancer," *Annals of Oncology*, vol. 25, no. 7, pp. 1346–1355, 2014, doi: 10.1093/annonc/mdu141.

- [41] D. JY, R. A, and S. R, "RAS Mutations in Colorectal Cancer ," *New England Journal of Medicine*, vol. 369, no. 22, pp. 2159–2160, Nov. 2013, doi: 10.1056/nejmc1312697.
- [42] A. R. Sepulveda *et al.*, "Molecular biomarkers for the evaluation of colorectal cancer: Guideline from The American Society for Clinical Pathology, College of American Pathologists, Association for Molecular Pathology, and the American Society of Clinical Oncology," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 35, no. 13, pp. 1453–1496, May 2017, doi: 10.1200/JCO.2016.71.9807.
- [43] D. M. Muzny *et al.*, "Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer," *Nature*, vol. 487, no. 7407, pp. 330–337, Jul. 2012, doi: 10.1038/NATURE11252.
- [44] G. A. Margonis *et al.*, "Association of BRAF mutations with survival and recurrence in surgically treated patients with metastatic colorectal liver cancer," *JAMA Surg*, vol. 153, no. 7, Jul. 2018, doi: 10.1001/jamasurg.2018.0996.
- [45] T. Yokota *et al.*, "BRAF mutation is a powerful prognostic factor in advanced and recurrent colorectal cancer," *Br J Cancer*, vol. 104, no. 5, pp. 856–862, Mar. 2011, doi: 10.1038/bjc.2011.19.
- [46] D. J. Weisenberger *et al.*, "CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer," *Nat Genet*, vol. 38, no. 7, pp. 787–793, Jul. 2006, doi: 10.1038/NG1834.
- [47] S. Ogino *et al.*, "Predictive and prognostic roles of BRAF mutation in stage III colon cancer: Results from intergroup trial CALGB 89803," *Clinical Cancer Research*, vol. 18, no. 3, pp. 890–900, Feb. 2012, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2246.
- [48] A. J. French *et al.*, "Prognostic significance of defective mismatch repair and BRAF V600E in patients with colon cancer," *Clinical Cancer Research*,

- 
- vol. 14, no. 11, pp. 3408–3415, Jun. 2008, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1489.
- [49] P. Gao *et al.*, “Is the prediction of prognosis not improved by the seventh edition of the TNM classification for colorectal cancer? Analysis of the surveilla006Ece, epidemiology, and end results (SEER) database,” *BMC Cancer*, 2013, doi: 10.1186/1471-2407-13-123.
- [50] Y. H. Xie, Y. X. Chen, and J. Y. Fang, “Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer,” *Signal Transduct Target Ther*, vol. 5, no. 1, 2020, doi: 10.1038/s41392-020-0116-z.
- [51] W. A. Messersmith, “NCCN Guidelines Updates: Management of Metastatic Colorectal Cancer,” *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN*, vol. 17, no. 55. NLM (Medline), pp. 599–601, May 01, 2019. doi: 10.6004/jnccn.2019.5014.
- [52] S. Blondy, V. David, M. Verdier, M. Mathonnet, A. Perraud, and N. Christou, “5-Fluorouracil resistance mechanisms in colorectal cancer: From classical pathways to promising processes,” *Cancer Sci*, vol. 111, no. 9, p. 3142, Sep. 2020, doi: 10.1111/CAS.14532.
- [53] T. J. Wigle, E. v. Tsvetkova, S. A. Welch, and R. B. Kim, “DPYD and Fluorouracil-Based Chemotherapy: Mini Review and Case Report,” *Pharmaceutics*, vol. 11, no. 5, May 2019, doi: 10.3390/PHARMACEUTICS11050199.
- [54] A. J. Gelibter *et al.*, “Adjuvant chemotherapy in resected colon cancer: When, how and how long?,” *Surg Oncol*, vol. 30, pp. 100–107, Sep. 2019, doi: 10.1016/J.SURONC.2019.06.003.
- [55] P. Piedbois *et al.*, “Modulation of fluorouracil by leucovorin in patients with advanced colorectal cancer: evidence in terms of response rate. Advanced Colorectal Cancer Meta-Analysis Project,” *J Clin Oncol*, vol. 10, no. 6, pp. 896–903, 1992, doi: 10.1200/JCO.1992.10.6.896.

- [56] P. Chen *et al.*, "CQ synergistically sensitizes human colorectal cancer cells to SN-38/CPT-11 through lysosomal and mitochondrial apoptotic pathway via p53-ROS cross-talk," *Free Radic Biol Med*, vol. 104, pp. 280–297, Mar. 2017, doi: 10.1016/J.FREERADBIOMED.2017.01.033.
- [57] T. André *et al.*, "Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 27, no. 19, pp. 3109–3116, Jul. 2009, doi: 10.1200/JCO.2008.20.6771.
- [58] S. Sharif, M. J. O'Connell, G. Yothers, S. Lopa, and N. Wolmark, "FOLFOX and FLOX regimens for the adjuvant treatment of resected stage II and III colon cancer," *Cancer Investigation*, vol. 26, no. 9, pp. 956–963, Nov. 2008. doi: 10.1080/07357900802132550.
- [59] M. Koopman *et al.*, "Sequential versus combination chemotherapy with capecitabine, irinotecan, and oxaliplatin in advanced colorectal cancer (CAIRO): a phase III randomised controlled trial," *Lancet*, vol. 370, no. 9582, pp. 135–142, Jul. 2007, doi: 10.1016/S0140-6736(07)61086-1.
- [60] H. J. Schmoll and D. Sargent, "Single agent fluorouracil for first-line treatment of advanced colorectal cancer as standard?," *Lancet*, vol. 370, no. 9582. Elsevier B.V., pp. 105–107, Jul. 14, 2007. doi: 10.1016/S0140-6736(07)61062-9.
- [61] A. J. Gelibter *et al.*, "Adjuvant chemotherapy in resected colon cancer: When, how and how long?," *Surg Oncol*, vol. 30, pp. 100–107, Sep. 2019, doi: 10.1016/J.SURONC.2019.06.003.
- [62] D. J. Boyne *et al.*, "Association between adjuvant chemotherapy duration and survival among patients with Stage II and III colon cancer a systematic review and Meta-analysis," *JAMA Network Open*, vol. 2, no. 5. American Medical Association, May 01, 2019. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2019.4154.

- 
- [63] B. M. Meyers, R. Cosby, F. Queresby, and D. Jonker, "Adjuvant Chemotherapy for Stage II and III Colon Cancer Following Complete Resection: A Cancer Care Ontario Systematic Review," *Clin Oncol*, vol. 29, no. 7, pp. 459–465, Jul. 2017, doi: 10.1016/j.clon.2017.03.001.
- [64] D. J. Sargent *et al.*, "Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer," *J Clin Oncol*, vol. 28, no. 20, pp. 3219–3226, Jul. 2010, doi: 10.1200/JCO.2009.27.1825.
- [65] K. Bracht, A. M. Nicholls, Y. Liu, and W. F. Bodmer, "5-Fluorouracil response in a large panel of colorectal cancer cell lines is associated with mismatch repair deficiency," *Br J Cancer*, 2010, doi: 10.1038/sj.bjc.6605780.
- [66] R. Dienstmann, R. Salazar, and J. Tabernero, "Personalizing colon cancer adjuvant therapy: Selecting optimal treatments for individual patients," *Journal of Clinical Oncology*. 2015. doi: 10.1200/JCO.2014.60.0213.
- [67] N. M. Leguisamo *et al.*, "Base excision repair imbalance in colorectal cancer has prognostic value and modulates response to chemotherapy," *Oncotarget*, 2017, doi: 10.18632/oncotarget.14909.
- [68] R. Jover *et al.*, "The efficacy of adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil in colorectal cancer depends on the mismatch repair status," *Eur J Cancer*, 2009, doi: 10.1016/j.ejca.2008.07.016.
- [69] G. Hutchins *et al.*, "Value of mismatch repair, KRAS, and BRAF mutations in predicting recurrence and benefits from chemotherapy in colorectal cancer," *Journal of Clinical Oncology*, 2011, doi: 10.1200/JCO.2010.30.1366.
- [70] S. Vodenkova, T. Buchler, K. Cervena, V. Veskrnova, P. Vodicka, and V. Vymetalkova, "5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future," *Pharmacology and Therapeutics*. 2019. doi: 10.1016/j.pharmthera.2019.107447.

- [71] R. Cohen *et al.*, “Immunotherapy and metastatic colorectal cancers with microsatellite instability or mismatch repair deficiency,” *Bulletin du Cancer*. 2019. doi: 10.1016/j.bulcan.2018.09.004.
- [72] H. Hurwitz *et al.*, “Bevacizumab plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer,” *New England Journal of Medicine*, vol. 350, no. 23, pp. 2335–2342, Jun. 2004, doi: 10.1056/nejmoa032691.
- [73] G. Tomasello, F. Petrelli, M. Ghidini, A. Russo, R. Passalacqua, and S. Barni, “FOLFOXIRI plus bevacizumab as conversion therapy for patients with initially unresectable metastatic colorectal cancer: A systematic review and pooled analysis,” *JAMA Oncol*, vol. 3, no. 7, Jul. 2017, doi: 10.1001/jamaoncol.2017.0278.
- [74] I. Marques, A. Araújo, and R. A. de Mello, “Anti-angiogenic therapies for metastatic colorectal cancer: Current and future perspectives,” *World Journal of Gastroenterology*, vol. 19, no. 44. Baishideng Publishing Group Co, pp. 7955–7971, Nov. 28, 2013. doi: 10.3748/wjg.v19.i44.7955.
- [75] E. van Cutsem *et al.*, “Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer,” *N Engl J Med*, vol. 360, no. 14, pp. 1408–1417, Apr. 2009, doi: 10.1056/NEJMOA0805019.
- [76] J. Taberero *et al.*, “Phase II trial of cetuximab in combination with fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer,” *J Clin Oncol*, vol. 25, no. 33, pp. 5225–5232, Nov. 2007, doi: 10.1200/JCO.2007.13.2183.
- [77] J. Taieb, A. Lapeyre-Prost, P. Laurent Puig, and A. Zaanan, “Exploring the best treatment options for BRAF-mutant metastatic colon cancer,” *Br J Cancer*, vol. 121, no. 6, pp. 434–442, Sep. 2019, doi: 10.1038/S41416-019-0526-2.

- 
- [78] C.-H. Köhne and H.-J. Lenz, "Chemotherapy with targeted agents for the treatment of metastatic colorectal cancer," *Oncologist*, vol. 14, no. 5, pp. 478–488, May 2009, doi: 10.1634/THEONCOLOGIST.2008-0202.
- [79] G. Vlahovic and J. Crawford, "Activation of tyrosine kinases in cancer," *Oncologist*, vol. 8, no. 6, pp. 531–538, Dec. 2003, doi: 10.1634/THEONCOLOGIST.8-6-531.
- [80] R. B. Corcoran *et al.*, "EGFR-mediated re-activation of MAPK signaling contributes to insensitivity of BRAF mutant colorectal cancers to RAF inhibition with vemurafenib," *Cancer Discov*, vol. 2, no. 3, pp. 227–235, Mar. 2012, doi: 10.1158/2159-8290.CD-11-0341.
- [81] H. Yang *et al.*, "Antitumor activity of BRAF inhibitor vemurafenib in preclinical models of BRAF-mutant colorectal cancer," *Cancer Res*, vol. 72, no. 3, pp. 779–789, Feb. 2012, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2941.
- [82] S. Kopetz *et al.*, "Randomized Trial of Irinotecan and Cetuximab With or Without Vemurafenib in BRAF-Mutant Metastatic Colorectal Cancer (SWOG S1406)," *J Clin Oncol*, vol. 39, no. 4, pp. 285–294, Feb. 2021, doi: 10.1200/JCO.20.01994.
- [83] A. Lopez, K. Harada, M. Vasilakopoulou, N. Shanbhag, and J. A. Ajani, "Targeting Angiogenesis in Colorectal Carcinoma," *Drugs*, vol. 79, no. 1, pp. 63–74, Jan. 2019, doi: 10.1007/S40265-018-1037-9.
- [84] H. Hurwitz *et al.*, "Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer," *N Engl J Med*, vol. 350, no. 23, pp. 2335–2342, Jun. 2004, doi: 10.1056/NEJMOA032691.
- [85] R. Schmieder *et al.*, "Regorafenib (BAY 73-4506): antitumor and antimetastatic activities in preclinical models of colorectal cancer," *Int J Cancer*, vol. 135, no. 6, pp. 1487–1496, Sep. 2014, doi: 10.1002/IJC.28669.
- [86] A. Grothey *et al.*, "Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre,

- randomised, placebo-controlled, phase 3 trial," *Lancet*, vol. 381, no. 9863, pp. 303–312, 2013, doi: 10.1016/S0140-6736(12)61900-X.
- [87] J. L. Markman and S. L. Shiao, "Impact of the immune system and immunotherapy in colorectal cancer," *J Gastrointest Oncol*, vol. 6, no. 2, pp. 208–223, 2015, doi: 10.3978/J.ISSN.2078-6891.2014.077.
- [88] J. R. Brahmer *et al.*, "Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer," *N Engl J Med*, vol. 366, no. 26, pp. 2455–2465, Jun. 2012, doi: 10.1056/NEJMOA1200694.
- [89] D. T. Le *et al.*, "PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency," *New England Journal of Medicine*, vol. 372, no. 26, pp. 2509–2520, Jun. 2015, doi: 10.1056/nejmoa1500596.
- [90] M. A. Morse *et al.*, "Safety of Nivolumab plus Low-Dose Ipilimumab in Previously Treated Microsatellite Instability-High/Mismatch Repair-Deficient Metastatic Colorectal Cancer," *Oncologist*, vol. 24, no. 11, pp. 1453–1461, Nov. 2019, doi: 10.1634/THEONCOLOGIST.2019-0129.
- [91] J. L. Wilding and W. F. Bodmer, "Cancer cell lines for drug discovery and development," *Cancer Res*, vol. 74, no. 9, pp. 2377–2384, 2014, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2971.
- [92] J. M. Fernandes Neto *et al.*, "Multiple low dose therapy as an effective strategy to treat EGFR inhibitor-resistant NSCLC tumours," *Nat Commun*, vol. 11, no. 1, Dec. 2020, doi: 10.1038/S41467-020-16952-9.
- [93] M. Young, L. Ordonez, and A. R. Clarke, "What are the best routes to effectively model human colorectal cancer?," *Mol Oncol*, vol. 7, no. 2, pp. 178–89, Apr. 2013, doi: 10.1016/j.molonc.2013.02.006.
- [94] R. C. Oliveira, A. M. Abrantes, J. G. Tralhão, and M. F. Botelho, "The role of mouse models in colorectal cancer research—The need and the importance of the orthotopic models," *Animal Models and Experimental Medicine*, vol. 3, no. 1. John Wiley and Sons Inc, pp. 1–8, Mar. 01, 2020. doi: 10.1002/ame2.12102.

- 
- [95] J. Kondo and M. Inoue, "Application of Cancer Organoid Model for Drug Screening and Personalized Therapy," *Cells*, vol. 8, no. 5, p. 470, 2019, doi: 10.3390/cells8050470.
- [96] B. M. Baker and C. S. Chen, "Deconstructing the third dimension: how 3D culture microenvironments alter cellular cues," *J Cell Sci*, vol. 125, no. Pt 13, pp. 3015–3024, Jul. 2012, doi: 10.1242/JCS.079509.
- [97] A. Cacciamali, R. Villa, and S. Dotti, "3D Cell Cultures: Evolution of an Ancient Tool for New Applications.," *Front Physiol*, vol. 13, p. 836480, Jul. 2022, doi: 10.3389/fphys.2022.836480.
- [98] A. Fedi, C. Vitale, P. Giannoni, G. Caluori, and A. Marrella, "Biosensors to Monitor Cell Activity in 3D Hydrogel-Based Tissue Models," *Sensors*, vol. 22, no. 4, Feb. 2022, doi: 10.3390/s22041517.
- [99] R. Edmondson, J. J. Broglie, A. F. Adcock, and L. Yang, "Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors," *Assay Drug Dev Technol*, vol. 12, no. 4, pp. 207–218, May 2014, doi: 10.1089/ADT.2014.573.
- [100] H. Clevers, "Modeling Development and Disease with Organoids," *Cell*, vol. 165, no. 7, pp. 1586–1597, Jun. 2016, doi: 10.1016/J.CELL.2016.05.082.
- [101] M. A. Lancaster and J. A. Knoblich, "Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies," *Science*, vol. 345, no. 6194, 2014, doi: 10.1126/SCIENCE.1247125.
- [102] H. Xu, X. Lyu, M. Yi, W. Zhao, Y. Song, and K. Wu, "Organoid technology and applications in cancer research," *J Hematol Oncol*, vol. 11, no. 1, pp. 1–15, 2018, doi: 10.1186/s13045-018-0662-9.
- [103] T. Sato *et al.*, "Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium," *Gastroenterology*, vol. 141, no. 5, pp. 1762–1772, 2011, doi: 10.1053/J.GASTRO.2011.07.050.

- [104] M. Huch *et al.*, “Long-term culture of genome-stable bipotent stem cells from adult human liver,” *Cell*, vol. 160, no. 1–2, pp. 299–312, Jan. 2015, doi: 10.1016/J.CELL.2014.11.050.
- [105] L. Broutier *et al.*, “Culture and establishment of self-renewing human and mouse adult liver and pancreas 3D organoids and their genetic manipulation,” *Nat Protoc*, vol. 11, no. 9, pp. 1724–1743, Sep. 2016, doi: 10.1038/NPROT.2016.097.
- [106] W. R. Karthaus *et al.*, “Identification of multipotent luminal progenitor cells in human prostate organoid cultures,” *Cell*, vol. 159, no. 1, pp. 163–175, Sep. 2014, doi: 10.1016/J.CELL.2014.08.017.
- [107] G. Vlachogiannis *et al.*, “Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers,” *Science (1979)*, vol. 359, no. 6378, pp. 920–926, Feb. 2018, doi: 10.1126/science.aao2774.
- [108] J. Drost and H. Clevers, “Organoids in cancer research,” *Nature Reviews Cancer*, vol. 18, no. 7. Nature Publishing Group, pp. 407–418, Jul. 01, 2018. doi: 10.1038/s41568-018-0007-6.
- [109] K. P. O’Rourke *et al.*, “Transplantation of engineered organoids enables rapid generation of metastatic mouse models of colorectal cancer,” *Nat Biotechnol*, vol. 35, no. 6, pp. 577–582, Jun. 2017, doi: 10.1038/nbt.3837.
- [110] L. Boni, A. Benevento, G. Dionigi, F. Rovera, M. Diurni, and R. Dionigi, “Injection of colorectal cancer cells in mesenteric and antimesenteric sides of the colon results in different patterns of metastatic diffusion: An experimental study in rats,” *World J Surg Oncol*, vol. 3, Oct. 2005, doi: 10.1186/1477-7819-3-69.
- [111] J. E. Talmadge, R. K. Singh, I. J. Fidler, and A. Raz, “Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer,” *American Journal of Pathology*, vol. 170, no. 3. American Society for Investigative Pathology Inc., pp. 793–804, 2007. doi: 10.2353/ajpath.2007.060929.

- 
- [112] G. Francia, W. Cruz-Munoz, S. Man, P. Xu, and R. S. Kerbel, "Mouse models of advanced spontaneous metastasis for experimental therapeutics," *Nature Reviews Cancer*, vol. 11, no. 2. Nat Rev Cancer, pp. 135–141, Feb. 2011. doi: 10.1038/nrc3001.
- [113] R. M. Hoffman, "Orthotopic metastatic mouse models for anticancer drug discovery and evaluation: A bridge to the clinic," *Invest New Drugs*, vol. 17, no. 4, pp. 343–360, 1999, doi: 10.1023/A:1006326203858.
- [114] K. M. Brown, A. Xue, A. Mittal, J. S. Samra, R. Smith, and T. J. Hugh, "Patient-derived xenograft models of colorectal cancer in preclinical research: A systematic review," *Oncotarget*, vol. 7, no. 40, pp. 66212–66225, 2016, doi: 10.18632/oncotarget.11184.
- [115] T. Sato *et al.*, "Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium," *Gastroenterology*, vol. 141, no. 5, pp. 1762–1772, 2011, doi: 10.1053/J.GASTRO.2011.07.050.
- [116] A. T. Byrne *et al.*, "Interrogating open issues in cancer precision medicine with patient-derived xenografts," *Nat Rev Cancer*, vol. 17, no. 4, pp. 254–268, Apr. 2017, doi: 10.1038/NRC.2016.140.
- [117] T. Namekawa, K. Ikeda, K. Horie-Inoue, and S. Inoue, "Application of Prostate Cancer Models for Preclinical Study: Advantages and Limitations of Cell Lines, Patient-Derived Xenografts, and Three-Dimensional Culture of Patient-Derived Cells," *Cells*, vol. 8, no. 1, Jan. 2019, doi: 10.3390/CELLS8010074.
- [118] J. Jung, H. S. Seol, and S. Chang, "The Generation and Application of Patient-Derived Xenograft Model for Cancer Research," *Cancer Res Treat*, vol. 50, no. 1, pp. 1–10, Jan. 2018, doi: 10.4143/CRT.2017.307.
- [119] J. G. Clohessy and P. P. Pandolfi, "Mouse hospital and co-clinical trial project--from bench to bedside," *Nat Rev Clin Oncol*, vol. 12, no. 8, pp. 491–498, Aug. 2015, doi: 10.1038/NRCLINONC.2015.62.

- [120] D. Gao and Y. Chen, "Organoid development in cancer genome discovery," *Curr Opin Genet Dev*, vol. 30, pp. 42–48, Feb. 2015, doi: 10.1016/J.GDE.2015.02.007.
- [121] G. Vlachogiannis *et al.*, "Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers," *Science*, vol. 359, no. 6378, pp. 920–926, Feb. 2018, doi: 10.1126/SCIENCE.AAO2774.
- [122] M. van de Wetering *et al.*, "Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients," *Cell*, vol. 161, no. 4, pp. 933–945, May 2015, doi: 10.1016/J.CELL.2015.03.053.
- [123] T. Sato *et al.*, "Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche," *Nature*, vol. 459, no. 7244, pp. 262–265, May 2009, doi: 10.1038/NATURE07935.
- [124] T. Sato *et al.*, "Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium," *Gastroenterology*, vol. 141, no. 5, pp. 1762–1772, 2011, doi: 10.1053/J.GASTRO.2011.07.050.
- [125] A. Barbáchano *et al.*, "Organoids and Colorectal Cancer," *Cancers (Basel)*, vol. 13, no. 11, Jun. 2021, doi: 10.3390/CANCERS13112657.
- [126] T. Sato *et al.*, "Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche," *Nature*, vol. 459, no. 7244, pp. 262–265, May 2009, doi: 10.1038/NATURE07935.
- [127] H. Clevers, "Modeling Development and Disease with Organoids," *Cell*, vol. 165, no. 7, pp. 1586–1597, Jun. 2016, doi: 10.1016/J.CELL.2016.05.082.
- [128] T. Sato *et al.*, "Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium," *Gastroenterology*, vol. 141, no. 5, pp. 1762–1772, 2011, doi: 10.1053/J.GASTRO.2011.07.050.

- 
- [129] A. U. Dignass and A. Sturm, "Peptide growth factors in the intestine," *Eur J Gastroenterol Hepatol*, vol. 13, no. 7, pp. 763–770, 2001, doi: 10.1097/00042737-200107000-00002.
- [130] A. P. G. Haramis *et al.*, "De novo crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine," *Science*, vol. 303, no. 5664, pp. 1684–1686, Mar. 2004, doi: 10.1126/SCIENCE.1093587.
- [131] C. Hofmann *et al.*, "Cell-cell contacts prevent anoikis in primary human colonic epithelial cells," *Gastroenterology*, vol. 132, no. 2, pp. 587–600, 2007, doi: 10.1053/J.GASTRO.2006.11.017.
- [132] M. van de Wetering *et al.*, "Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients," *Cell*, vol. 161, no. 4, pp. 933–945, May 2015, doi: 10.1016/J.CELL.2015.03.053.
- [133] X. Li *et al.*, "Ex Vivo Organoid Cultures Reveal the Importance of the Tumor Microenvironment for Maintenance of Colorectal Cancer Stem Cells," *Cancers (Basel)*, vol. 12, no. 4, Apr. 2020, doi: 10.3390/CANCERS12040923.
- [134] M. Fujii *et al.*, "A Colorectal Tumor Organoid Library Demonstrates Progressive Loss of Niche Factor Requirements during Tumorigenesis," *Cell Stem Cell*, vol. 18, no. 6, pp. 827–838, Jun. 2016, doi: 10.1016/J.STEM.2016.04.003.
- [135] Y. Zhao *et al.*, "Development of a new patient-derived xenograft humanised mouse model to study human-specific tumour microenvironment and immunotherapy," *Gut*, vol. 67, no. 10, pp. 1845–1854, Apr. 2018, doi: 10.1136/GUTJNL-2017-315201.
- [136] T. Xia, W. L. Du, X. Y. Chen, and Y. N. Zhang, "Organoid models of the tumor microenvironment and their applications," *J Cell Mol Med*, vol. 25, no. 13, pp. 5829–5841, Jul. 2021, doi: 10.1111/JCMM.16578.
- [137] M. Grönholm, M. Feodoroff, G. Antignani, B. Martins, F. Hamdan, and V. Cerullo, "Patient-Derived Organoids for Precision Cancer

- Immunotherapy," *Cancer Res*, vol. 81, no. 12, pp. 3149–3155, Jun. 2021, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-20-4026.
- [138] O. Chaudhuri, J. Cooper-White, P. A. Janmey, D. J. Mooney, and V. B. Shenoy, "Effects of extracellular matrix viscoelasticity on cellular behaviour," *Nature*, vol. 584, no. 7822, pp. 535–546, Aug. 2020, doi: 10.1038/S41586-020-2612-2.
- [139] M. van de Wetering *et al.*, "Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients," *Cell*, vol. 161, no. 4, pp. 933–945, May 2015, doi: 10.1016/J.CELL.2015.03.053.
- [140] L. Farre *et al.*, "Extramedullary multiple myeloma patient-derived orthotopic xenograft with a highly altered genome: combined molecular and therapeutic studies," *Dis Model Mech*, vol. 14, no. 7, Jul. 2021, doi: 10.1242/DMM.048223.
- [141] J. Fernández-Rodríguez *et al.*, "Use of patient derived orthotopic xenograft models for real-time therapy guidance in a pediatric sporadic malignant peripheral nerve sheath tumor," *Ther Adv Med Oncol*, vol. 12, 2020, doi: 10.1177/1758835920929579.
- [142] Y. Lai, X. Wei, S. Lin, L. Qin, L. Cheng, and P. Li, "Current status and perspectives of patient-derived xenograft models in cancer research," *J Hematol Oncol*, vol. 10, no. 1, May 2017, doi: 10.1186/S13045-017-0470-7.
- [143] N. Hugen, G. Brown, R. Glynne-Jones, J. H. W. de Wilt, and I. D. Nagtegaal, "Advances in the care of patients with mucinous colorectal cancer," *Nat Rev Clin Oncol*, vol. 13, no. 6, pp. 361–369, Jun. 2016, doi: 10.1038/NRCLINONC.2015.140.
- [144] L. J. M. Mekenkamp *et al.*, "Mucinous adenocarcinomas: Poor prognosis in metastatic colorectal cancer," *Eur J Cancer*, vol. 48, no. 4, pp. 501–509, Mar. 2012, doi: 10.1016/j.ejca.2011.12.004.

- 
- [145] G. Vlachogiannis *et al.*, "Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers," *Science*, vol. 359, no. 6378, pp. 920–926, Feb. 2018, doi: 10.1126/SCIENCE.AAO2774.
- [146] N. K. Finnberg *et al.*, "Application of 3D tumoroid systems to define immune and cytotoxic therapeutic responses based on tumoroid and tissue slice culture molecular signatures," *Oncotarget*, vol. 8, no. 40, pp. 66747–66757, Sep. 2017, doi: 10.18632/ONCOTARGET.19965.
- [147] F. Weeber *et al.*, "Preserved genetic diversity in organoids cultured from biopsies of human colorectal cancer metastases," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 112, no. 43, pp. 13308–13311, Oct. 2015, doi: 10.1073/PNAS.1516689112.
- [148] M. van de Wetering *et al.*, "Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients," *Cell*, vol. 161, no. 4, pp. 933–945, May 2015, doi: 10.1016/J.CELL.2015.03.053.
- [149] M. Fujii *et al.*, "A Colorectal Tumor Organoid Library Demonstrates Progressive Loss of Niche Factor Requirements during Tumorigenesis," *Cell Stem Cell*, vol. 18, no. 6, pp. 827–838, Jun. 2016, doi: 10.1016/J.STEM.2016.04.003.
- [150] C. Calandrini *et al.*, "An organoid biobank for childhood kidney cancers that captures disease and tissue heterogeneity," *Nat Commun*, vol. 11, no. 1, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41467-020-15155-6.
- [151] L. Broutier *et al.*, "Human primary liver cancer-derived organoid cultures for disease modeling and drug screening," *Nat Med*, vol. 23, no. 12, pp. 1424–1435, 2017, doi: 10.1038/nm.4438.
- [152] N. Sachs *et al.*, "A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity," *Cell*, vol. 172, no. 1–2, pp. 373–386.e10, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.cell.2017.11.010.
- [153] S. Dumont, "Organoids of epithelial ovarian cancer as a novel preclinical in vitro tool," vol. 2, p. 28, 2018.

- [154] K. Grenier, J. Kao, and P. Diamandis, "Three-dimensional modeling of human neurodegeneration: brain organoids coming of age," *Mol Psychiatry*, 2019, doi: 10.1038/s41380-019-0500-7.
- [155] H. Chen *et al.*, "Urological cancer organoids, patients' avatars for precision medicine: past, present and future.," *Cell Biosci*, vol. 12, no. 1, p. 132, Aug. 2022, doi: 10.1186/s13578-022-00866-8.
- [156] C. Guastadisegni, M. Colafranceschi, L. Ottini, and E. Dogliotti, "Microsatellite instability as a marker of prognosis and response to therapy: A meta-analysis of colorectal cancer survival data," *Eur J Cancer*, vol. 46, no. 15, pp. 2788–2798, Oct. 2010, doi: 10.1016/j.ejca.2010.05.009.
- [157] J. C. Jones *et al.*, "Non-V600 BRAF Mutations Define a Clinically Distinct Molecular Subtype of Metastatic Colorectal Cancer," *J Clin Oncol*, vol. 35, no. 23, pp. 2624–2630, Aug. 2017, doi: 10.1200/JCO.2016.71.4394.
- [158] F. A. Sinicrope *et al.*, "Molecular markers identify subtypes of stage III colon cancer associated with patient outcomes," *Gastroenterology*, vol. 148, no. 1, pp. 88–99, Jan. 2015, doi: 10.1053/J.GASTRO.2014.09.041.
- [159] J. Tol, I. D. Nagtegaal, and C. J. A. Punt, "BRAF mutation in metastatic colorectal cancer," *N Engl J Med*, vol. 361, no. 1, pp. 98–99, Jul. 2009, doi: 10.1056/NEJMC0904160.
- [160] S. Venderbosch *et al.*, "Mismatch repair status and BRAF mutation status in metastatic colorectal cancer patients: a pooled analysis of the CAIRO, CAIRO2, COIN, and FOCUS studies," *Clin Cancer Res*, vol. 20, no. 20, pp. 5322–5330, Oct. 2014, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0332.
- [161] T. J. Price *et al.*, "Impact of KRAS and BRAF Gene Mutation Status on Outcomes From the Phase III AGITG MAX Trial of Capecitabine Alone or in Combination With Bevacizumab and Mitomycin in Advanced Colorectal Cancer," *J Clin Oncol*, vol. 29, no. 19, pp. 2675–2682, Jul. 2011, doi: 10.1200/JCO.2010.34.5520.

- 
- [162] A. D. Roth *et al.*, "Prognostic Role of *KRAS* and *BRAF* in Stage II and III Resected Colon Cancer: Results of the Translational Study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 Trial," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 28, no. 3, pp. 466–474, Jan. 2010, doi: 10.1200/JCO.2009.23.3452.
- [163] W. S. Samowitz *et al.*, "Poor Survival Associated with the *BRAF* V600E Mutation in Microsatellite-Stable Colon Cancers," *Cancer Res*, vol. 65, no. 14, pp. 6063–6069, Jul. 2005, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0404.
- [164] S. Venderbosch *et al.*, "Mismatch Repair Status and *BRAF* Mutation Status in Metastatic Colorectal Cancer Patients: A Pooled Analysis of the CAIRO, CAIRO2, COIN, and FOCUS Studies," *Clinical Cancer Research*, vol. 20, no. 20, pp. 5322–5330, Oct. 2014, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0332.
- [165] A. T. Shaw, P. P. Hsu, M. M. Awad, and J. A. Engelman, "Tyrosine kinase gene rearrangements in epithelial malignancies," *Nat Rev Cancer*, vol. 13, no. 11, pp. 772–787, 2013, doi: 10.1038/NRC3612.
- [166] E. Medico *et al.*, "The molecular landscape of colorectal cancer cell lines unveils clinically actionable kinase targets," *Nat Commun*, vol. 6, Apr. 2015, doi: 10.1038/NCOMMS8002.
- [167] F. Pietrantonio *et al.*, "ALK, ROS1, and NTRK Rearrangements in Metastatic Colorectal Cancer," *J Natl Cancer Inst*, vol. 109, no. 12, Dec. 2017, doi: 10.1093/JNCI/DJX089.
- [168] J. Lasota *et al.*, "Colorectal Adenocarcinomas Harboring ALK Fusion Genes: A Clinicopathologic and Molecular Genetic Study of 12 Cases and Review of the Literature," *Am J Surg Pathol*, vol. 44, no. 9, pp. 1224–1234, Sep. 2020, doi: 10.1097/PAS.0000000000001512.
- [169] C. Langner *et al.*, "Mucinous differentiation in colorectal cancer--indicator of poor prognosis?," *Histopathology*, vol. 60, no. 7, pp. 1060–1072, Jun. 2012, doi: 10.1111/J.1365-2559.2011.04155.X.

- [170] M. Soda *et al.*, "Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer," *Nature*, vol. 448, no. 7153, pp. 561–566, Aug. 2007, doi: 10.1038/NATURE05945.
- [171] I. B. Muller, A. J. de Langen, R. J. Honeywell, E. Giovannetti, and G. J. Peters, "Overcoming crizotinib resistance in ALK-rearranged NSCLC with the second-generation ALK-inhibitor ceritinib," *Expert Rev Anticancer Ther*, vol. 16, no. 2, pp. 147–157, Feb. 2016, doi: 10.1586/14737140.2016.1131612.
- [172] D. R. Camidge *et al.*, "Brigatinib Versus Crizotinib in ALK Inhibitor-Naive Advanced ALK-Positive NSCLC: Final Results of Phase 3 ALTA-1L Trial," *J Thorac Oncol*, vol. 16, no. 12, pp. 2091–2108, Dec. 2021, doi: 10.1016/J.JTHO.2021.07.035.
- [173] R. Roskoski, "The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer," *Pharmacol Res*, vol. 79, pp. 34–74, 2014, doi: 10.1016/J.PHRS.2013.11.002.
- [174] A. Sartore-Bianchi, F. Loupakis, G. Argilés, and G. W. Prager, "Challenging chemoresistant metastatic colorectal cancer: therapeutic strategies from the clinic and from the laboratory," *Ann Oncol*, vol. 27, no. 8, pp. 1456–1466, Aug. 2016, doi: 10.1093/ANNONC/MDW191.
- [175] D. J. Hicklin and L. M. Ellis, "Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis," *J Clin Oncol*, vol. 23, no. 5, pp. 1011–1027, 2005, doi: 10.1200/JCO.2005.06.081.
- [176] M. A. Krook *et al.*, "Fibroblast growth factor receptors in cancer: genetic alterations, diagnostics, therapeutic targets and mechanisms of resistance," *Br J Cancer*, vol. 124, no. 5, pp. 880–892, Mar. 2021, doi: 10.1038/S41416-020-01157-0.
- [177] M. Kodama *et al.*, "Expression of platelet-derived growth factor (PDGF)-B and PDGF-receptor  $\beta$  is associated with lymphatic metastasis in human

- gastric carcinoma," *Cancer Sci*, vol. 101, no. 9, pp. 1984–1989, Sep. 2010, doi: 10.1111/J.1349-7006.2010.01639.X.
- [178] M. Catalano *et al.*, "Lenvatinib: established and promising drug for the treatment of advanced hepatocellular carcinoma," *Expert Rev Clin Pharmacol*, vol. 14, no. 11, pp. 1353–1365, 2021, doi: 10.1080/17512433.2021.1958674.
- [179] K. Suyama and H. Iwase, "Lenvatinib: A Promising Molecular Targeted Agent for Multiple Cancers," *Cancer Control*, vol. 25, no. 1, Jan. 2018, doi: 10.1177/1073274818789361.
- [180] S. Miyamoto, S. Kakutani, Y. Sato, A. Hanashi, Y. Kinoshita, and A. Ishikawa, "Drug review: Pazopanib," *Jpn J Clin Oncol*, vol. 48, no. 6, pp. 503–513, Jun. 2018, doi: 10.1093/JJCO/HYY053.
- [181] T. J. Ettrich and T. Seufferlein, "Regorafenib," *Recent Results Cancer Res*, vol. 211, pp. 45–56, 2018, doi: 10.1007/978-3-319-91442-8\_3.
- [182] F. André *et al.*, "Targeting FGFR with dovitinib (TKI258): Preclinical and clinical data in breast cancer," *Clinical Cancer Research*, vol. 19, no. 13, pp. 3693–3702, Jul. 2013, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0190.
- [183] G. S. Papaetis and K. N. Syrigos, "Sunitinib: a multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor in the era of molecular cancer therapies," *BioDrugs*, vol. 23, no. 6, pp. 377–389, 2009, doi: 10.2165/11318860-000000000-00000.
- [184] M. C. Riesco-Martinez, A. Sanchez-Torre, and R. Garcia-Carbonero, "Safety and efficacy of nintedanib for the treatment of metastatic colorectal cancer," *Expert Opin Investig Drugs*, vol. 26, no. 11, pp. 1295–1305, Nov. 2017, doi: 10.1080/13543784.2017.1385762.
- [185] W. Tang *et al.*, "The mechanisms of sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma: theoretical basis and therapeutic aspects," *Signal Transduct Target Ther*, vol. 5, no. 1, Dec. 2020, doi: 10.1038/S41392-020-0187-X.

- [186] A. Das *et al.*, "In Vitro Effect of Dovitinib (TKI258), a Multi-Target Angiokinasase Inhibitor on Aggressive Meningioma Cells," *Cancer Invest*, vol. 38, no. 6, pp. 349–355, Jul. 2020, doi: 10.1080/07357907.2020.1773844.
- [187] "Nintedanib and Capecitabine in Treating Patients With Refractory Metastatic Colorectal Cancer - Full Text View - ClinicalTrials.gov." <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02393755> (accessed Oct. 17, 2022).
- [188] E. van Cutsem *et al.*, "Nintedanib for the treatment of patients with refractory metastatic colorectal cancer (LUME-Colon 1): A phase III, international, randomized, placebo-controlled study," *Annals of Oncology*, vol. 29, no. 9, pp. 1955–1963, Sep. 2018, doi: 10.1093/ANNONC/MDY241.
- [189] O. Abdel-Rahman, "Targeting BRAF aberrations in advanced colorectal carcinoma: from bench to bedside," *Future Oncol*, vol. 12, no. 1, pp. 25–30, Jan. 2016, doi: 10.2217/FON.15.226.
- [190] R. Schmieder *et al.*, "Regorafenib (BAY 73-4506): antitumor and antimetastatic activities in preclinical models of colorectal cancer," *Int J Cancer*, vol. 135, no. 6, pp. 1487–1496, Sep. 2014, doi: 10.1002/IJC.28669.
- [191] M. Matsuki *et al.*, "Lenvatinib inhibits angiogenesis and tumor fibroblast growth factor signaling pathways in human hepatocellular carcinoma models," *Cancer Med*, vol. 7, no. 6, pp. 2641–2653, Jun. 2018, doi: 10.1002/CAM4.1517.
- [192] P. Jaaks *et al.*, "Effective drug combinations in breast, colon and pancreatic cancer cells," *Nature*, vol. 603, no. 7899, pp. 166–173, Mar. 2022, doi: 10.1038/S41586-022-04437-2.
- [193] D. Hong *et al.*, "Phase I Study of LY2606368, a Checkpoint Kinase 1 Inhibitor, in Patients With Advanced Cancer," *J Clin Oncol*, vol. 34, no. 15, pp. 1764–1771, May 2016, doi: 10.1200/JCO.2015.64.5788.
- [194] C. D. Lowery *et al.*, "The Checkpoint Kinase 1 Inhibitor Prexasertib Induces Regression of Preclinical Models of Human Neuroblastoma," *Clin Cancer*

*Res*, vol. 23, no. 15, pp. 4354–4363, Aug. 2017, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-2876.