

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

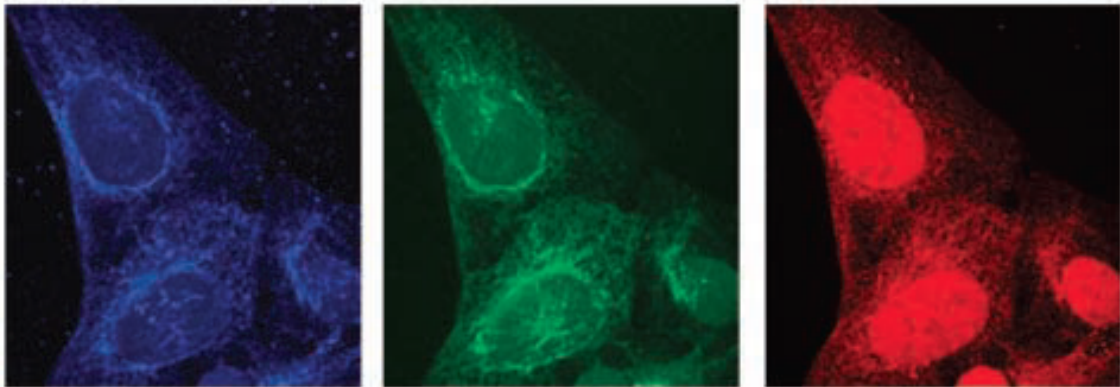
Facultad de Medicina

Departamento de Bioquímica, Biología Molecular e Inmunología



Tesis Doctoral

**IMPLICACIÓN DE LA PROTEÍNA CLUSTERINA Y LA
ACTIVIDAD APOPTÓTICA EN LA TRANSFORMACIÓN
MALIGNA Y EL PRONÓSTICO DE LOS PACIENTES
CON CÁNCER COLORRECTAL**



Julia Alcaide García

DIRECTORES

Dr. D. Maximino Redondo Bautista

Dr. D. Antonio Rueda Domínguez

2015

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Facultad de Medicina

Departamento de Bioquímica, Biología Molecular e Inmunología



TESIS DOCTORAL

**IMPLICACIÓN DE LA PROTEÍNA CLUSTERINA Y LA
ACTIVIDAD APOPTÓTICA EN LA TRANSFORMACIÓN
MALIGNA Y EL PRONÓSTICO DE LOS PACIENTES
CON CÁNCER COLORRECTAL**

DOCTORANDO

Julia Alcaide García

DIRECTORES


Dr. D. Maximino Redondo Bautista

Dr. D. Antonio Rueda Domínguez



Publicaciones y
Divulgación Científica

AUTOR: Julia Alcaide García

 <https://orcid.org/0000-0002-9301-1387>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es

Tesis Doctoral

**IMPLICACIÓN DE LA PROTEÍNA CLUSTERINA Y LA
ACTIVIDAD APOPTÓTICA EN LA TRANSFORMACIÓN
MALIGNA Y EL PRONÓSTICO DE LOS PACIENTES
CON CÁNCER COLORRECTAL**

**Tesis doctoral presentada por Dña. Julia Alcaide García, para optar al
grado de Doctora por la Universidad de Málaga.**

Málaga

Noviembre 2015

D. MAXIMINO REDONDO BAUTISTA, Facultativo Especialista del Área de Laboratorio del Hospital Costa Del Sol de Marbella y Profesor Asociado del Departamento de Bioquímica, Biología Molecular e Inmunología de la Universidad de Málaga,

CERTIFICA: Que el presente trabajo de investigación titulado “IMPLICACIÓN DE LA PROTEÍNA CLUSTERINA Y LA ACTIVIDAD APOPTÓTICA EN LA TRANSFORMACIÓN MALIGNA Y EL PRONÓSTICO DE LOS PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL”, ha sido realizado bajo mi dirección por Dña. Julia Alcaide García, para optar al título de Doctora por la Universidad de Málaga.

Y para que conste, firmo el presente certificado en Málaga a 19 de Octubre de 2015.

Fdo. Dr. Maximino Redondo Bautista

D. ANTONIO RUEDA DOMÍNGUEZ, Doctor en Medicina y Director de Área de Oncología del Hospital Costa del Sol de Marbella,

CERTIFICA: Que el presente trabajo de investigación titulado “IMPLICACIÓN DE LA PROTEÍNA CLUSTERINA Y LA ACTIVIDAD APOPTÓTICA EN LA TRANSFORMACIÓN MALIGNA Y EL PRONÓSTICO DE LOS PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL”, ha sido realizado bajo mi dirección por Dña. Julia Alcaide García, para optar al título de Doctora por la Universidad de Málaga.

Y para que conste, firmo el presente certificado en Málaga a 19 de Octubre de 2015.

Fdo. Dr. Antonio Rueda Domínguez

Agradecimientos

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a los doctores D. Maximino Redondo y D. Antonio Rueda, que son los máximos responsables de este trabajo. Su estímulo, generosidad y paciencia han hecho posible llevarlo a cabo.

También ha sido indispensable la colaboración de todos los profesionales implicados en este proyecto, así como del resto de componentes de nuestro grupo de investigación que han contribuido al desarrollo de esta línea de investigación. Especialmente, me gustaría hacer mención a Yolanda de la Torre y Eva Fernández, por su excelente asistencia técnica, y a los doctores Isabel Rodrigo, Teresa Téllez, María José Roldán, Rafael Fúnez, Elísabet Pérez, y Teresa Pereda, por su contribución a los artículos publicados y por dar respuesta a todas mis dudas.

Gracias a Francisco Rivas, Rosa Villatoro y Francisco Manuel Fernández, por su inestimable ayuda.

Gracias a mis compañeros, mi familia y amigos, que me han brindado su apoyo constante e incondicional.

Y por supuesto, gracias a los pacientes y sus familias, que inspiran las preguntas necesarias para seguir avanzando en el conocimiento de la enfermedad, siempre dispuestos a colaborar para tal fin. Ellos me curan cada día con su sabiduría y afecto.

A todos ellos, muchas gracias.

Publicaciones

Parte del contenido de este trabajo de tesis doctoral ha sido publicado en las siguientes revistas:

Redondo M, Rodrigo I, Alcaide J, Téllez T, Roldan MJ, Fúnez R, Díaz-Martin A, Rueda A, Jiménez E. **Clusterin expression is associated with decreased disease-free survival of patients with colorectal carcinomas.** Histopathology. 2010;56(7):932-6. doi: 10.1111/j.1365-2559.2010.03565.x.

Alcaide J, Fúnez R, Rueda A, Pérez-Ruiz E, Pereda T, Rodrigo I, Coveñas R, Muñoz M, Redondo M. **The role and prognostic value of apoptosis in colorectal carcinoma.** BMC Clin Pathol. 2013;13(1):24. doi: 10.1186/1472-6890-13-24.

Resumen

Introducción: La carcinogénesis colorrectal es un proceso de múltiples etapas que progresa desde el tejido normal a adenoma y finalmente carcinoma. Se ha relacionado a la clusterina (CLU), una glicoproteína heterodimérica ampliamente distribuida en el organismo de los mamíferos, con la supervivencia celular, la respuesta al estrés y la resistencia a los tratamientos antineoplásicos. De hecho, existen terapias anti-CLU con oligonucleótidos antisentido capaces de potenciar la apoptosis inducida por los citotóxicos convencionales. Sin embargo, la evidencia disponible sobre la participación de CLU en la progresión tumoral del colon es limitada y poco sabemos acerca de su valor pronóstico en el cáncer colorrectal (CCR). Además, el papel que juega la apoptosis en esta secuencia de carcinogénesis colorrectal no ha sido completamente clarificado, y los trabajos que han investigado la relación entre la actividad apoptótica y la supervivencia de los pacientes con CCR han arrojado resultados, hasta la fecha, contradictorios.

Objetivos: Los objetivos del estudio fueron estudiar la relación de CLU con la carcinogénesis y la progresión tumoral del CCR, así como su significado pronóstico, analizando el impacto de la expresión de CLU en la supervivencia de los pacientes con CCR. Asimismo, se quiso determinar la influencia de la actividad apoptótica en la carcinogénesis y el pronóstico del CCR.

Material y Métodos: Examinamos las muestras de 103 CCRs resecados en el Hospital Costa del Sol, 31 adenomas y 20 epitelios normales. CLU se determinó mediante inmunohistoquímica, usando un anticuerpo monoclonal anti-cadena α (Upstate-Millipore, Watford, Inglaterra). La expresión de CLU fue considerada negativa (CLU-) si no se observaba tinción y positiva (CLU+) cuando >10% de células resultaban teñidas. Para la detección de la apoptosis se llevó a cabo el ensayo TUNEL. La media de porcentaje apoptótico (1%, rango 0-6%) fue el punto de corte empleado para los estudios de supervivencia. La estimación de la supervivencia se hizo mediante el método

de Kaplan-Meier y usamos la regresión de Cox para el análisis multivariante (nivel de significación estadística $p < 0.05$). La mediana de seguimiento fue 54 meses. La mediana de edad fue 70 años (rango 45-91) y la distribución por estadios: I (15%), II (48%), III (23%) y IV (14%).

Resultados: Las células epiteliales del tejido normal fueron CLU-. En cambio el 16% (5/31) de los adenomas fue CLU+ y este porcentaje se incrementó en los CCRs (30%, 31/103). Las recidivas fueron más frecuentes en los tumores CLU+ (61%, 19/31) que en los CLU- (37%, 27/72) y la expresión de CLU se asoció significativamente con una menor supervivencia libre de progresión (SLP) (SLP a 5 años: $35 \pm 9\%$ vs $57 \pm 7\%$; $p = 0.03$). En el análisis multivariante, CLU (HR=2.01, IC 95% 1.03-3.90) y el estadio TNM (HR=2.20; IC 95% 1.13-4.29) fueron factores pronósticos independientes para la SLP. Encontramos un índice apoptótico (IA) mayor en los CCRs (1.09 ± 0.13) que en los adenomas (0.38 ± 0.23 , $p = 0.059$) y significativamente mayor que en el epitelio normal (0.06 ± 0.04 , $p = 0.001$). El estadio IV mostró un IA superior en comparación con otros estadios ($p = 0.017$). El IA alto se asoció con una menor SLP (SLP a 5 años: $28.5 \pm 9.6\%$ vs $61.8 \pm 8.1\%$; $p < 0.05$) y supervivencia global (SG) (SG a 5 años: $43.7 \pm 11.9\%$ vs $74.6 \pm 8.8\%$; $p < 0.05$). En el análisis multivariante, el IA (HR=2.18, IC 95% 1.08-4.37) y el estadio TNM (HR=2.41, 95% CI 1.20-4.85) resultaron factores pronósticos independientes para la SG.

Conclusiones: Tanto CLU como la actividad apoptótica aumentan progresivamente a lo largo de la secuencia mucosa sana-adenoma-carcinoma, lo que sugiere un papel relevante en la carcinogénesis colorrectal. La sobreexpresión de CLU se asocia con un peor pronóstico de los pacientes con CCR, por lo que nos permite identificar a pacientes con tumores de comportamiento más agresivo. Un IA elevado se asocia también con una mayor agresividad tumoral y una peor supervivencia del CCR.

Índice de contenidos

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Epidemiología del cáncer colorrectal	2
1.2	Factores pronósticos del cáncer colorrectal	4
1.2.1	Factores pronósticos clínico-patológicos	6
1.2.2	Factores pronósticos moleculares	10
1.3	Diagnóstico y tratamiento del cáncer colorrectal	14
1.3.1	Signos y síntomas	14
1.3.2	Pruebas diagnósticas	14
1.3.3	Estadificación	15
1.3.4	Tratamiento	17
1.4	Carcinogénesis colorrectal.	18
1.5	El balance apoptosis-proliferación	21
1.6	Clusterina	24
1.6.1	El gen de la clusterina	26
1.6.2	Estructura de la clusterina	28
1.6.3	Formas de la clusterina	29
1.6.4	Funciones de la clusterina	31
1.6.5	Síntesis y regulación de la clusterina	35
1.6.6	Clusterina y cáncer	37
2	OBJETIVOS	43
3	MATERIAL Y MÉTODOS	45
3.1	Pacientes y muestras de tejido	45
3.2	Detección de apoptosis celular in situ (Ensayo TUNEL)	47
3.3	Estudio inmunohistoquímico de la clusterina	48
3.4	Análisis estadístico	49

4	RESULTADOS	51
4.1	Expresión de clusterina	51
4.2	Valor pronóstico de clusterina	53
4.2.1	Clusterina y supervivencia libre de progresión	54
4.2.2	Clusterina y supervivencia global	55
4.3	Índice apoptótico	55
4.4	Valor pronóstico del índice apoptótico	57
4.4.1	Apoptosis y supervivencia libre de progresión	57
4.4.2	Apoptosis y supervivencia global	59
5	DISCUSIÓN	61
5.1	Clusterina	61
5.2	Apoptosis	64
6	CONCLUSIONES	69
7	BIBLIOGRAFÍA	70

Lista de figuras

Figura 1.	Incidencia y mortalidad por cáncer en hombres.	2
Figura 2.	Incidencia y mortalidad por cáncer en mujeres.	3
Figura 3.	Estadios del cáncer colorrectal.	16
Figura 4.	Vías de la carcinogénesis colorrectal.	19
Figura 5.	Proliferación, diferenciación y apoptosis en la cripta intestinal.	21
Figura 6.	Vías de señalización de la apoptosis.	23
Figura 7.	Localización del gen de la clusterina en el cromosoma 8.	26
Figura 8.	El gen de la clusterina y las variantes de ARNm.	27
Figura 9.	Estructura de la clusterina.	29
Figura 10.	Interacciones fisiológicas entre Ku70/80, clusterina y Bax.	30
Figura 11.	Regulación de la apoptosis por clusterina dependiente de los iones de calcio.	33
Figura 12.	Papel de sCLU en la progresión tumoral.	38
Figura 13.	Escape de la apoptosis en la célula cancerosa.	40
Figura 14.	Estudio inmunohistoquímico de clusterina.	52
Figura 15.	Supervivencia libre de progresión de los pacientes agrupados según la expresión de clusterina.	54
Figura 16.	Apoptosis detectada mediante TUNEL.	56
Figura 17.	Supervivencia libre de progresión según el índice apoptótico (IA).	57
Figura 18.	La supervivencia libre de progresión de los pacientes con tumores en estadio avanzado (estadios III y IV) según índice apoptótico (IA).	58

Lista de tablas

Tabla 1.	Factores pronósticos en el cáncer colorrectal localizado.	5
Tabla 2.	Factores pronósticos en el cáncer colorrectal avanzado.	6
Tabla 3.	Supervivencia causa-específica a los 5 años para el cáncer colorrectal localizado según el estadio TNM.	8
Tabla 4.	Subtipos moleculares del cáncer colorrectal según la clasificación de consenso internacional.	13
Tabla 5.	Agrupación de los estadios del cáncer colorrectal en la clasificación TNM.	16
Tabla 6.	Sinónimos o proteínas homólogas de clusterina.	25
Tabla 7.	Características de los pacientes con cáncer colorrectal.	46
Tabla 8.	Correlación de la expresión de clusterina con los factores clínico-patológicos.	53
Tabla 9.	Análisis multivariante de la supervivencia libre de progresión.	55

Abreviaturas

AJCC	American Joint Committee on Cancer
AP-1	Activator Protein-1
APC	Adenomatous Polyposis Coli
ApoJ	Apolipoproteína J
ARE	Androgen Response Element
ARNm	ARN mensajero
ASCO	American Society of Clinical Oncology
ATM	Ataxia Telangiectasia-Mutated
CCR	Cáncer colorrectal
CEA	Antígeno carcinoembrionario
CIMP	CpG island methylator phenotype
CIN	Inestabilidad cromosómica
CLE	Clusterin Element
CLI	Inhibidor de la Lisis del Complemento
CLU	Clusterina
CMS	Consensus molecular subtype
cTNM	Estadio clínico TNM
Cyt C	Citocromo C
DCC	Deleted in Colon Carcinoma
DE	Desviación estándar
dMMR	Deficiencia en proteínas reparadoras de errores del ADN o mismatch-repair
EEUU	Estados Unidos
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMT	Epithelial-Mesenchymal Transition
ER	Retículo endoplásmico
ESMO	European Society for Medical Oncology
G	Grado histológico

HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HSEs	Heat Shock Elements
HSF	Heat Shock Factor
HSF1	Heat Shock Transcription Factor 1
GPIII	Glicoproteína III
GRE	Glucocorticoid Response Element
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HR	Hazard Ratio
IA	Índice apoptótico
IC	Intervalo de confianza
IGF-1	Insulin-like Growth Factor-1
IGF-1R	Insulin-like Growth Factor 1 Receptor
IGFBP2	Insulin-like Growth Factor Binding Protein 2
IHQ	Inmunohistoquímica
IL	Interleucinas
IMS	Inestabilidad de microsatélites
IRS	Insulin Receptor Substrate
LDH	Lactato deshidrogenasa
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LOH	Loss of heterozygosity o pérdida de heterocigosidad
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MRC	Margen de resección circunferencial
MSI-H	Alta frecuencia de inestabilidad de microsatélites
MSS	Estabilidad de microsatélites
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nCLU	Clusterina nuclear
NF-κB	Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Phosphate Buffered Saline
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B
psCLU	Clusterina precursora secretada
pTNM	Estadio patológico TNM

QT-RT	Quimio-radioterapia
sCLU	Clusterina secretada
SEER	Surveillance, Epidemiology, and End Results Program
SG	Supervivencia global
SGP-2	Glicoproteína Sulfatada-2
sHSP	Small Heat-Shock Proteins
SLP	Supervivencia libre de progresión
SLR	Supervivencia libre de recidiva
SP-1	Stimulatory Element-1
SP-40,40	Proteína Secretada asociada al complemento 40,40
SSCR	ER Signal Sequence Coding Region
STAT1	Signal Transducers and Activators of Transcription 1
StR	Supervivencia tras la recidiva
TCF	T-Cell Factor
TdT	Terminal deoxynucleotidyl Transferase
TGF-β	Transforming Growth Factor- β
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α
TRPM2	Mensajero Prostático Represor de Testosterona-2
TS	Timidilato sintasa
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labeling
Ub	Ubiquitin
UICC	Union for International Cancer Control
UPR	Unfolded Protein Response
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad
XRT	Radiación

1

Introducción

El cáncer colorrectal (CCR) constituye un importante problema de salud pública en el mundo occidental, dada su incidencia y mortalidad. Esto ha motivado un gran esfuerzo colectivo por conocer mejor las bases biológicas y moleculares de esta neoplasia y mejorar el diagnóstico y tratamiento de los pacientes afectados. De hecho, en las últimas décadas ha tenido lugar un destacado avance, especialmente en los campos referidos a la técnica quirúrgica y al tratamiento sistémico. En este último, por ejemplo, se ha producido la incorporación de nuevos fármacos citotóxicos y agentes dirigidos contra dianas moleculares específicas. Estas innovaciones han permitido progresar en el manejo de los estadios localizados, pero sobre todo de los metastásicos. También se ha observado un aumento del diagnóstico precoz, y cada vez hay una mayor preocupación por encontrar técnicas diagnósticas que aumenten la aplicabilidad de los programas de cribado en la población general. Todo ello conjuntamente ha supuesto un beneficio en la supervivencia de los pacientes. Sin embargo, aún sigue siendo necesario profundizar en el conocimiento de la biología tumoral del CCR, base fundamental en la búsqueda de claves que nos guíen hacia la curación.

1.1 Epidemiología del cáncer colorrectal

Como mencionábamos anteriormente, las cifras de incidencia y mortalidad sitúan al CCR en un lugar destacado, siendo unos de los tumores más frecuentes y una importante causa de muerte por cáncer a nivel mundial.

Según las últimas estadísticas disponibles de GLOBOCAN 2012 (1), es la tercera neoplasia más frecuente en hombres (746,000 casos, 10.0% del total), por detrás del cáncer de pulmón y de próstata, y la segunda en mujeres (614,000 casos, 9.2% del total), tras el cáncer de mama. En cuanto a la mortalidad, ocupa el cuarto lugar en el sector de población masculino, tras el cáncer de pulmón, hígado y estómago, y el tercero en el femenino, tras el cáncer de mama y pulmón (Figuras 1 y 2).

Figura 1. Incidencia y mortalidad por cáncer en hombres.

Fuente: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx

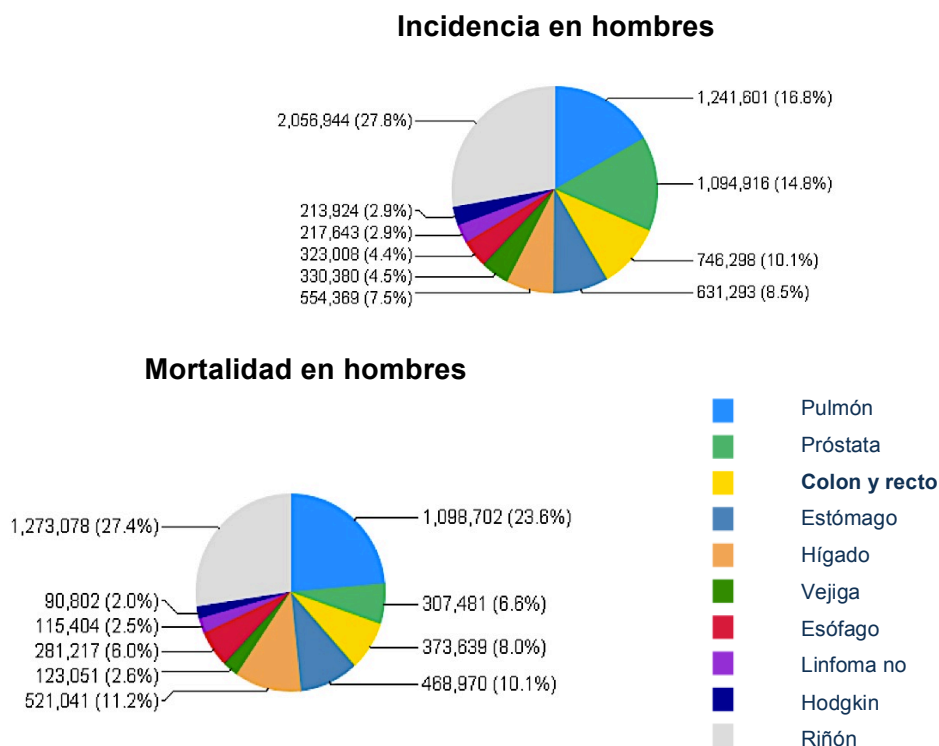
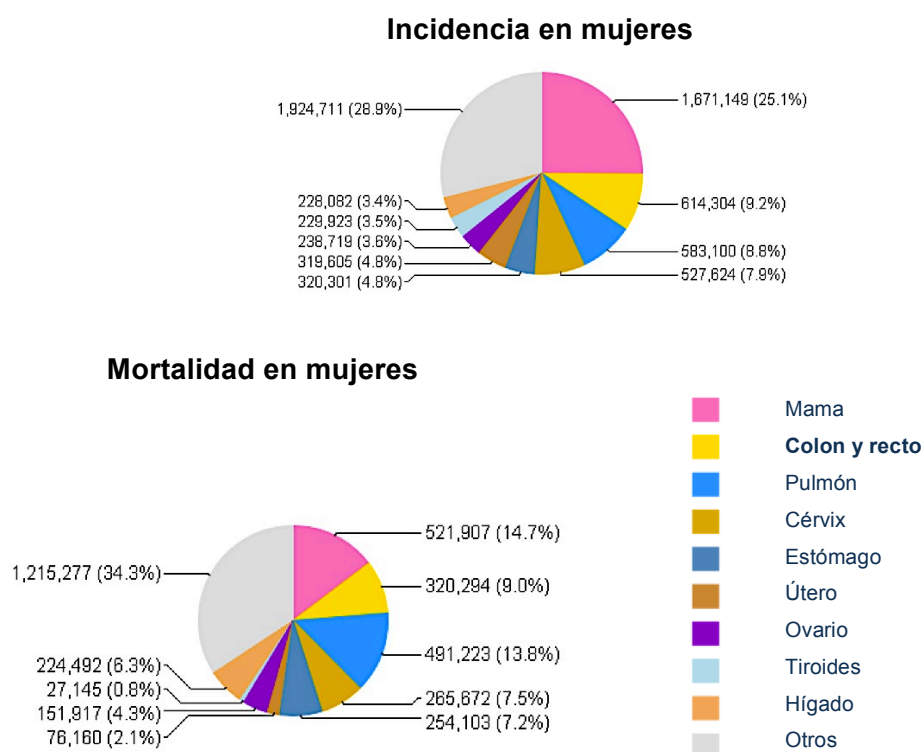


Figura 2. Incidencia y mortalidad por cáncer en mujeres.

Fuente: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx



Globalmente se estima que más de 1.3 millones de casos nuevos de CCR son diagnosticados en todo el mundo y ocurren más de 600,000 muertes cada año. (1,2). Pero el CCR no se distribuye por igual en todo el mundo, sino que existen diferencias geográficas. La incidencia es menor en los países en vías de desarrollo, como los que forman parte de África o el sur y centro de Asia. En cambio, su frecuencia es mayor en los países desarrollados, y así, encontramos tasas de incidencia más altas en Australia, Nueva Zelanda, Europa, y Norteamérica (2). Concretamente, en Estados Unidos (EEUU), se esperaba que en el 2012 el CCR fuera la tercera neoplasia en incidencia y mortalidad, tanto en hombres como en mujeres. (3). También se han observado diferencias en la evolución de las tendencias. Mientras que en EEUU se ha registrado un reciente descenso en la incidencia de CCR, que se ha relacionado con la implantación de programas de cribado poblacional, así como una reducción en las tasas de mortalidad de las principales neoplasias, entre ellas el CCR (3), en otras regiones se ha comprobado un aumento de

dichos parámetros. Zonas que previamente eran de bajo riesgo, entre ellas España, han comunicado un importante aumento de la incidencia de CCR (4). Los cambios dietéticos (mayor consumo de azúcares y carnes rojas, menor consumo de fibra), el aumento de la obesidad y el sedentarismo, y el consumo de tabaco y alcohol podrían explicar esta tendencia (2).

En Europa, es el segundo cáncer más frecuente, tras el cáncer de mama, y representa el 13.1% de todos los casos de cáncer. Con 215,000 muertes producidas por CCR en el año 2012, ocupa también el segundo lugar en mortalidad, tras el cáncer de pulmón. (5). La misma fuente sitúa al CCR en España como la tercera neoplasia en incidencia en hombres, tras el cáncer de próstata y el de pulmón, y la segunda en mujeres, tras el cáncer de mama, siendo el cáncer con más casos nuevos en 2012 considerando ambos sexos (32,240 casos nuevos), y el segundo cáncer que más muertes produce (14,700 muertes) (1).

1.2 Factores pronósticos del cáncer colorrectal

A la hora de valorar la estrategia terapéutica resulta útil disponer de factores que nos ayuden a establecer el pronóstico para cada caso. Se han estudiado tanto factores clínicos dependientes del propio paciente, como factores patológicos y moleculares presentes en el tumor. Algunos se han constituido como factores clásicos, con un significado pronóstico claramente establecido, y otros se valoran como potenciales, a raíz de las evidencias surgidas en los últimos años que sugieren su posible utilidad clínica en el futuro. En las tablas 1 y 2, podemos ver estos factores agrupados según la clasificación que hizo la ESMO (European Society for Medical Oncology) en su guía de consenso (6).

Tabla 1. Factores pronósticos en el cáncer colorrectal localizado (adaptado de Schmoll et al. 2012)

	Establecidos	Potenciales
Clínico- patológicos	T4. N+ tras QT-RT preoperatoria (recto). Afectación MRC. Obstrucción, perforación. Rotura en la cirugía. <12 Ganglios resecaados (y ratio). Invasión vascular. Invasión perineural. Pobre diferenciación (G3/G4).	Edad > 60 años. Sexo masculino. N2. Infiltrado linfocitario. Frente invasor tumoral. Tipo tumoral.
Moleculares	MSI-H, dMMR.	KRAS mutado. TS (positiva en >25%). 18q LOH. p53. SMAD4 (pérdida). Firmas genéticas.

QT-RT: Quimio-radioterapia; MRC: Margen de resección circunferencial. G: Grado; MSI-H: Alta frecuencia de inestabilidad de microsatélites; dMMR: Deficiencia en proteínas reparadoras de errores del ADN o mismatch-repair; TS: Timidilato sintasa; LOH: Loss of heterozygosity o pérdida de heterocigosidad.

Tabla 2. Factores pronósticos en el cáncer colorrectal avanzado (adaptado de Schmoll et al. 2012)

	Establecidos	Potenciales
Clínico- patológicos	PS \geq 2.	Comorbilidad.
	Edad \geq 70 años.	Estatus socio-económico.
	CEA $>$ 50 μ g/l.	Enfermedad sintomática.
	Fosfatasa alcalina \geq 300 U/l.	Múltiples localizaciones metastásicas.
	Plaquetas \geq 400 \times 10 ⁹ /l.	Afectación peritoneal.
	Hemoglobina $<$ 11 g/dl.	Adyuvancia previa con oxaliplatino.
	Leucocitos \geq 10 \times 10 ⁹ /l.	Recidiva precoz tras adyuvancia (<6 meses).
	LDH alta.	Líneas previas de tratamiento.
Moleculares	BRAF mutado.	MSI-H.
		EGFR (IHQ).
		KRAS mutado.

CEA: Antígeno carcinoembrionario; LDH: Lactato deshidrogenasa; MSI-H: Alta frecuencia de inestabilidad de microsatélites; EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico; IHQ: Inmunohistoquímica.

Revisemos ahora algunos de los factores pronósticos más relevantes para el CCR.

1.2.1 Factores pronósticos clínico-patológicos

a) Edad:

El CCR afecta predominantemente a pacientes de edad avanzada, siendo la edad media los 72 años. Más del 90% de los casos superan los 55 años (7) y el 28% de pacientes tienen más de 80 años (8). La incidencia del CCR está aumentando entre los más jóvenes, permaneciendo estable o algo menor en los adultos de más edad (9). El papel de la edad en el pronóstico del CCR sigue siendo controvertido. Los pacientes jóvenes se presentan más frecuentemente con estadios III y IV y con subtipos histológicos más desfavorables, como el mucinoso o las células en anillo de sello. Esto podría relacionarse con fenotipos moleculares más agresivos, pero también podría explicarse por una práctica clínica diferente que conllevaría un

retraso diagnóstico (por ejemplo, una menor tendencia a solicitar una colonoscopia en estos pacientes ante la misma sintomatología que pacientes mayores, o el no estar incluidos en los programas de detección precoz). Algunos autores opinan que todos estos factores conducen a una peor supervivencia. Otros, en cambio, encuentran que los resultados, ajustados por estadio tumoral, son similares a los de pacientes de edad más avanzada (10). Así lo comprobaron también Blanke y colaboradores, al analizar la respuesta a la quimioterapia sistémica y la supervivencia en el CCR metastásico, viendo que estas son similares en todos los grupos de edad (8). Para otros, en cambio, la supervivencia es mejor en los pacientes de menos de 45 años (7), quizás porque, una vez diagnosticados, tienden a ser tratados de forma más intensiva que los ancianos.

b) Género:

Si bien con frecuencia en los estudios se venían detectando ciertas diferencias entre el género femenino y masculino, habitualmente estas se achacaban al azar. Pero cada vez se ha ido prestando más atención a una posible influencia del sexo en el pronóstico del CCR. Por ejemplo, se ha visto que las mujeres presentan una mayor proporción de tumores con hipermetilación, inestabilidad de microsatélites (IMS), BRAF mutado y de localización proximal, lo que sugiere que la vía serrada juega un papel más relevante en la mujer que en el hombre. También se han observado diferencias en cuanto al efecto que tienen la dieta, la obesidad o el tabaquismo según el género (11). Y se ha evidenciado una mejor supervivencia para el sexo femenino, tanto en estadios localizados como metastásicos (12).

c) Estadío tumoral:

Es el factor pronóstico más importante. El CCR se estadifica en base a la clasificación TNM, aceptada por la UICC (Union for International Cancer Control), y por el AJCC (American Joint Committee on Cancer) (13). Este sistema cataloga el "T" (tumor) en el CCR en función de la profundidad de

invasión a través de la pared intestinal, y no del tamaño como ocurre en otras neoplasias. El “N” (nódulos linfáticos) depende del grado de afectación tumoral de los ganglios regionales y el “M” (metástasis), de la existencia de enfermedad tumoral a distancia.

En la tabla 3 podemos ver la supervivencia para cada estadio del CCR localizado, con o sin afectación ganglionar regional, según la séptima edición de la clasificación TNM, que incorpora un nuevo subestadio (estadio IIC: T4bN0M0) y redefine el estadio ganglionar según el número de ganglios afectados y la existencia de depósitos tumorales satélites (N1c).

Tabla 3. Supervivencia causa-específica a los 5 años para el cáncer colorrectal localizado según el estadio TNM (14).

Estadio tumoral (TNM)	Supervivencia a 5 años (%)
I	92.5
IIA	82.1
IIB	77.7
IIC	54.5
IIIA	83.8
IIIB	59.6
IIIC	29.7

La supervivencia se ve reducida drásticamente cuando el tumor se ha diseminado a distancia (estadio IV). Aproximadamente un 25% de los pacientes se diagnostican como estadio IV y hasta un 25% adicional de los pacientes con estadios localizados a la presentación desarrollarán metástasis a lo largo de la evolución de su enfermedad (6), siendo la localización preferente de dichas metástasis el hígado. Sólo el 11% de los pacientes con estadio IV permanecen vivos a los 5 años de su diagnóstico (15).

d) Grado de diferenciación:

Dependiendo del componente glandular, la diferenciación tumoral puede estratificarse en tres o cuatro grados (16):

- Grado 1 o bien diferenciado: más del 95% del tumor forma glándulas.
- Grado 2 o moderadamente diferenciado: formación glandular en 50-95% del tumor.
- Grado 3 o pobremente diferenciado: formación glandular en menos del 50% del tumor.
- Grado 4 o indiferenciado: formación glandular en 0% del tumor.

A pesar de la variabilidad interobservador que puede aparecer a la hora de catalogar el grado histológico, se ha comprobado el valor pronóstico del mismo (17). Si bien, en la mayoría de estudios han agrupado los cuatro grados en sólo dos categorías, tal y como recomienda la OMS (Organización Mundial de la Salud) (16) y la AJCC (13):

- Bajo grado: bien y moderadamente diferenciado (50 - 100% de formación glandular).
- Alto grado: pobremente diferenciado e indiferenciado (0 - 49% de formación glandular).

De esta forma, se ha demostrado una peor supervivencia para los tumores de alto grado, siempre que no presenten IMS, ya que esta confiere un pronóstico más favorable, por lo que hay autores que proponen incorporarla en la gradación del CCR (18).

e) Localización del tumor primario:

Clásicamente se ha dicho que los tumores que asientan en el recto tienen un peor pronóstico, por la dificultad que entrañan para llevar a cabo una cirugía oncológica adecuada y por el alto porcentaje de recaídas locales que presentan, que incluso pueden ser tardías. Para afrontar estos

problemas se han implementado mejoras terapéuticas en los últimos años como la técnica quirúrgica para la escisión total del mesorrecto y los tratamientos complementarios, que incluyen radioterapia. No obstante, según una revisión de datos del SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results Program), aunque la supervivencia en los estadios más precoces es superior para el colon, no sucede así en estadios más avanzados (IIIC y IV), donde se obtienen mejores resultados para el recto (19). No sólo podemos hablar de un distinto pronóstico entre colon y recto, sino que a nivel biológico y molecular cada vez son más evidentes las diferencias existentes entre las diversas localizaciones del CCR, incluso con características particulares para cada parte del colon. Así, los tumores proximales (situados en ciego, colon ascendente, y ángulo hepático de colon) son más frecuentemente de tipo mucinoso, con IMS, hipermutadores y con mutación del protooncogén BRAF. En cambio, los tumores distales (ángulo esplénico de colon, colon descendente y sigma) asocian más a menudo inestabilidad cromosómica, amplificación de EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) o HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) y sobreexpresión de epirregulina (20). Estas diferencias tienen implicaciones pronósticas y terapéuticas. Por ejemplo, se ha observado que los tumores proximales presentan una peor supervivencia tras la recidiva, y que los tumores metastásicos de colon distal son los que más se benefician de los fármacos anti-EGFR y los que tienen una supervivencia más prolongada (21). También la localización ha sido una de las características a destacar en algunos de los subtipos de la clasificación molecular del CCR, recientemente publicada (22).

1.2.2 Factores pronósticos moleculares

a) KRAS:

El protooncogén RAS se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 12, codifica proteínas localizadas en la membrana celular y

actúa como iniciador del ciclo de proliferación. Ejerce su acción en la vía RAS-RAF-MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), dependiente del EGFR, siendo su mutación un evento precoz en el proceso de tumorigénesis colorrectal (23). Hoy en día, su valor predictivo está claramente establecido, y así, fármacos biológicos dirigidos contra el EGFR (cetuximab, panitumumab) vieron su indicación restringida a aquellos casos de CCR metastásicos que no presentasen mutaciones en los codones 12 y 13 de KRAS (lo que supone el 40% de los casos aproximadamente). Posteriormente, también se conoció que era necesario comprobar que no estuvieran mutados los codones 61 y 146 de KRAS, y también los codones 12, 13 y 61 de NRAS (18% de casos) (24). Por tanto, hoy día, estas terapias sólo se administran a pacientes con RAS nativo, dado que los pacientes con RAS mutado no responden o incluso pueden llegar a presentar un efecto deletéreo en su supervivencia si llegan a recibirlas, sobre todo al asociar combinaciones basadas en oxaliplatino (25,26). Se ha relacionado la presencia de mutaciones de KRAS con una mayor propensión a la diseminación pulmonar (24). Sin embargo, su significado pronóstico ha sido estudiado por diferentes autores con resultados no concluyentes, influyendo el tipo de mutación detectada, el estadio tumoral y la localización del tumor primario (23).

b) BRAF:

Las mutaciones de BRAF (principalmente V600E) definen un subtipo molecular de CCR (8 - 10%), que se caracteriza por afectar predominantemente a mujeres, de edad más avanzada, con tumores localizados en colon derecho, de alto grado, mucinosos, con IMS, fenotipo metilador o CIMP (CpG Island Methylator Phenotype) y una mayor frecuencia de metástasis peritoneales y ganglionares (27). Las mutaciones de BRAF y KRAS son mutuamente excluyentes (28). Al contrario que lo que ocurre en el caso de KRAS, la mutación de BRAF se asocia con un peor pronóstico, especialmente en metastásicos (29), pero su papel a la hora de predecir la respuesta a las terapias anti-EGFR no está tan claro. Para

algunos, aún no existen suficientes datos para establecer BRAF como un factor predictivo más a tener en cuenta (30). Pero revisiones exhaustivas como la de De Roock (28) o la de Pietrantonio (27), sugieren que debería determinarse previamente al inicio de estos tratamientos como hacemos con RAS, ya que no encuentran beneficio al administrar cetuximab o panitumumab en los casos con BRAF mutado.

c) Inestabilidad de microsatélites:

La IMS, causada por un déficit en el sistema de reparación de errores del ADN (dMMR), puede deberse a una mutación germinal en las proteínas reparadoras (MLH1, PMS2, MSH2, MSH6), que da lugar al llamado síndrome de Lynch, o bien a la inactivación epigenética de MLH1, ligada al fenotipo CIMP. Es este segundo mecanismo de IMS, el esporádico, el que es más frecuente y el que suele asociar la mutación de BRAF (29). Para expertos como Fearon, la IMS es el factor molecular pronóstico más robusto (31). En estadios localizados, especialmente en estadios II (32), los casos con alta IMS presentan una mejor supervivencia, y también parecen beneficiarse menos del uso de 5-fluoruracilo adyuvante (31). En cambio, en el CCR metastásico la IMS no supone un mejor pronóstico (33). Además, el efecto protector de la IMS se ve atenuado en los casos que asocian mutación de BRAF (34).

d) Clasificación molecular del cáncer colorrectal:

Queda claro por lo descrito hasta ahora que el CCR es una enfermedad heterogénea, por lo que resulta de interés identificar subgrupos homogéneos para guiar las estrategias diagnósticas y terapéuticas. Existen múltiples clasificaciones moleculares, pero recientemente se ha propuesto un consenso internacional que hace una puesta en común de los datos de seis potentes grupos de investigación, y que gracias a herramientas informáticas para su análisis en conjunto, estratifica el CCR en cuatro subtipos principales, y un quinto subtipo compuesto por una miscelánea (Tabla 4) (22).

Tabla 4. Subtipos moleculares del cáncer colorrectal según la clasificación de consenso internacional (adaptado de Dienstmann et al. 2014).

Subtipo (%)	Características	Pronóstico
CMS1 (13%)	Mujeres, edad avanzada, colon derecho, IMS, CIMP, hipermutación, mutación de BRAF, activación inmunitaria.	Mejor SLR, SG intermedia, peor StR.
CMS2 (35%)	Colon izquierdo, epitelial, MSS, CIN, mutación de TP53, activación de WNT/MYC.	SLR intermedia, mejor SG, mejor StR.
CMS3 (11%)	Epitelial, CIN/MSI, mutación de KRAS, amplificación de MYC, sobreexpresión de IGFBP2.	SLR, SG y StR intermedia.
CMS4 (20%)	Edad más joven, estadios III/IV, mesenquimal, CIN/MSI, activación de TGF- β /VEGF, sobreexpresión de NOTCH3.	Peor SLR, peor SG, StR intermedia.
Miscelánea (21%)	Mixto, con activación epitelial-mesenquimal variable.	SLR, SG y StR intermedia.

CMS: Consensus molecular subtype; SLR: Supervivencia libre de recidiva; SG: Supervivencia global; StR: Supervivencia tras la recidiva; IMS: Inestabilidad de microsatélites; MSS: Estabilidad de microsatélites; CIN: Inestabilidad cromosómica; IGFBP2: Insulin-like Growth Factor Binding Protein 2.

Cada subtipo se caracteriza por un fenotipo particular, por la activación de determinadas vías moleculares patogénicas e incluso por distintas lesiones precursoras. Estas diferencias biológicas se traducen en diferencias en la supervivencia, y se está trabajando para establecer una correlación también con la sensibilidad a los tratamientos. Si bien es un importante esfuerzo para el avance del conocimiento del CCR, aún es una aproximación experimental.

1.3 Diagnóstico y tratamiento del cáncer colorrectal

1.3.1 Signos y síntomas

A menudo los pacientes que se presentan con síntomas al diagnóstico padecen la neoplasia en un estadio más avanzado (36), siendo las manifestaciones clínicas secundarias al crecimiento endoluminal (trastornos del hábito intestinal, con diarrea o estreñimiento, e incluso obstrucción intestinal completa, con dolor abdominal y vómitos) o exofítico del tumor (masa abdominal palpable, perforación intestinal o infiltración de órganos adyacentes como la vejiga, pudiendo dar lugar a una fístula y a complicaciones infecciosas) o bien al sangrado de la lesión, ocasionando anemia ferropénica y astenia, u objetivándose en forma de rectorragia o hematoquecia (37).

Cuando progresa la enfermedad y se disemina, lo hace preferentemente al hígado, pudiendo aparecer dolor en hipocondrio derecho y hepatomegalia a la exploración o síndrome constitucional con cansancio, pérdida de apetito y peso, y en algunos casos, fiebre paraneoplásica (38).

Por este motivo, el cribado poblacional intenta detectar el CCR en estadios más precoces, en los que los pacientes se encuentran asintomáticos, y pueden obtener un tratamiento curativo y un mejor pronóstico (39).

1.3.2 Pruebas diagnósticas

La principal es la colonoscopia, que permite no sólo detectar el tumor, localizarlo y biopsiarlo, sino también identificar otras posibles lesiones sincrónicas y la extirpación de pólipos (37). Además de una historia clínica completa, con anamnesis que incluya los antecedentes familiares y exploración física, se debe completar el estudio de extensión con una analítica con CEA, TAC de tórax y abdomen, y en el caso del cáncer de recto, también una RMN de pelvis para la estadificación local (6).

1.3.3 Estadificación

Una vez completado el estudio de extensión se puede establecer el estadio clínico de la enfermedad (cTNM). El estadio patológico, en cambio, es definido por el análisis histológico de la pieza quirúrgica (pTNM). La clasificación TNM, describe la profundidad de la invasión del tumor primario en la pared del intestino, la existencia de metástasis en los ganglios linfáticos regionales y de metástasis a distancia, y define los distintos estadios (Tabla 5) (13).

T (Tumor primario):

TX: No se puede evaluar el tumor primario.

T0: No hay evidencia de tumor primario.

Tis: Carcinoma in situ: intraepitelial o invasión de la lámina propia.

T1: El tumor invade la submucosa.

T2: El tumor invade la muscular propia.

T3: El tumor invade a través de la muscular propia y llega hasta la subserosa, hasta los tejidos pericorrectales.

T4a: El tumor penetra en la superficie del peritoneo visceral.

T4b: El tumor invade otros órganos o estructuras, o se adhiere a ellos.

N (Ganglios linfáticos regionales):

NX: No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales.

N0: No existen metástasis en los ganglios linfáticos regionales.

N1: Metástasis en 1 - 3 ganglios linfáticos regionales.

N1a: Metástasis en 1 ganglio linfático regional.

N1b: Metástasis en 2 - 3 ganglios linfáticos regionales.

N1c: Depósitos tumorales satélites en la subserosa o en tejidos no peritonealizados.

N2: Metástasis en 4 o más ganglios linfáticos regionales.

N2a: Metástasis en 4 - 6 ganglios linfáticos regionales.

N2b: Metástasis en 7 o más ganglios linfáticos regionales.

M (Metástasis a distancia):

MX: No se puede evaluar la metástasis a distancia.

M0: No hay metástasis a distancia.

M1: Metástasis a distancia.

M1a: Metástasis a distancia en un órgano o localización.

M1b: Metástasis a distancia en más de un órgano o localización o afectando al peritoneo.

Figura 3. Estadios del cáncer colorrectal.

Fuente: <http://cancer-colon.euroresidentes.com/2012/11/estadios-del-cancer-de-colon-ii.html>

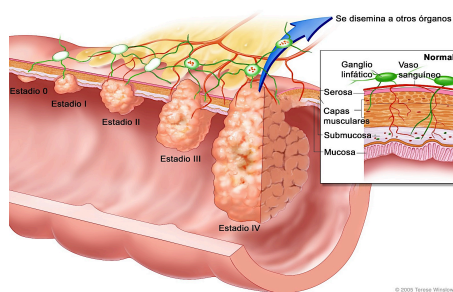


Tabla 5. Agrupación de los estadios del cáncer colorrectal en la clasificación TNM.

Estadio	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1-T2	N1/N1c	M0
	T1	N2a	M0
IIIB	T3-T4a	N1/N1c	M0
	T2-T3	N2a	M0
	T1-T2	N2b	M0
IIIC	T4a	N2a	M0
	T3-T4a	N2b	M0
	T4b	N1-N2	M0
IVA	Cualquier T	Cualquier N	M1a
IVB	Cualquier T	Cualquier N	M1b

1.3.4 Tratamiento

El plan terapéutico va a depender de factores relacionados con el paciente (edad, estado general, comorbilidades) y con el tumor, principalmente, la localización del primario y el estadio tumoral.

Los casos con **cáncer de colon localizado** resecable son candidatos a cirugía radical, con una intención curativa, siendo luego valorados para quimioterapia postoperatoria o adyuvante (estadios III y II de alto riesgo) o seguimiento (estadios I y II de bajo riesgo). La quimioterapia adyuvante se basa en el 5-fluoruracilo en infusión continua o fluoropirimidinas orales (capecitabina), que pueden administrarse en monoterapia o en combinación con oxaliplatino, siendo estándar el empleo de esquemas denominados FOLFOX o XELOX (37).

En el **cáncer de recto** que invade más allá de la muscular propia o bien presenta afectación ganglionar está indicado el uso de tratamiento neoadyuvante (antes de la cirugía), con quimio-radioterapia concomitante (basada en 5-fluoruracilo o capecitabina) o bien con esquemas de radioterapia corta (5 sesiones) (40).

Una vez se ha producido la **diseminación a distancia**, la curación habitualmente no es posible, y el tratamiento tiene una intención paliativa, dado que sólo un limitado número de pacientes (10-30%) podrá ser candidato a un abordaje radical que incluya la cirugía de metástasis (41). En las últimas décadas se han producido avances no sólo en los métodos para el diagnóstico precoz o en la técnica quirúrgica, sino también en el tratamiento sistémico, incorporándose nuevos fármacos. En primer lugar, se demostró una mayor eficacia y tolerancia con la infusión continua de 5-fluoruracilo frente a su administración en bolo, y posteriormente, la adición de leucovorin y la aparición de los esquemas en combinación con oxaliplatino e irinotecán ofrecieron mejores resultados frente a la monoterapia. De este modo, se logró pasar de los 4-6 meses de mediana de supervivencia con tratamiento de soporte hasta los 20 meses empleando esquemas de quimioterapia en combinación (42). Un

conocimiento más profundo de la biología tumoral facilitó el desarrollo de las nuevas terapias dirigidas, con dos grandes grupos de fármacos que podemos clasificar en base a su mecanismo de acción o diana frente a la cual están orientados:

- Antiangiogénicos: bevacizumab, aflibercept, regorafenib.
- Inhibidores de EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor): cetuximab, panitumumab, cuyo uso se restringe a los casos con KRAS y NRAS nativo (26).

La adición de estos nuevos fármacos ha supuesto una mejoría de la supervivencia de los pacientes con CCR, que se ha prolongado hasta llegar a superar los 24 meses (43).

En ocasiones, la cirugía o la radioterapia paliativa también juegan un papel en los casos metastásicos, además de la colocación de endoprótesis colónicas cuando se presentan síntomas obstructivos. Actualmente existe un debate sobre si la resección del tumor primario podría tener un impacto en la supervivencia de estos pacientes, y hay ensayos en marcha que abordan esta cuestión (44).

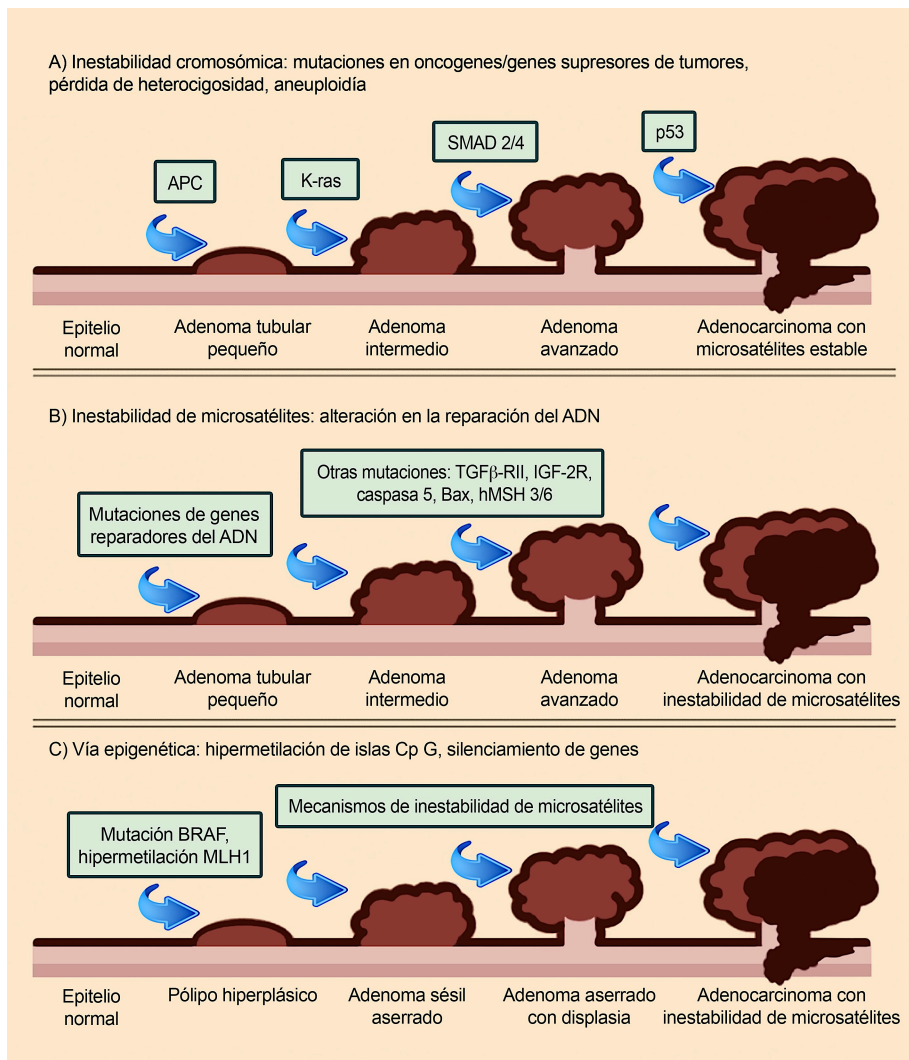
1.4 Carcinogénesis colorrectal

El desarrollo del cáncer colorrectal tiene lugar a través de una serie de etapas que conllevan la transformación histológica desde el tejido normal hasta la lesión precursora o adenoma, y finalmente el carcinoma, lo que se conoce como la “secuencia adenoma-carcinoma”. Esta denominación fue acuñada por primera vez por el grupo de Morson (45). Se piensa que un primer pequeño foco aberrante en la cripta intestinal da lugar al desarrollo de una primera cripta displásica. Posteriormente se forma un adenoma que crece progresivamente de tamaño, evolucionando también su displasia de leve a moderada y severa,

surgiendo finalmente el carcinoma invasor que puede terminar diseminándose a distancia en forma de metástasis (46).

Aunque actualmente conocemos vías alternativas que explican la carcinogénesis colorrectal, como la vía de la inestabilidad de IMS o la epigenética, la principal sigue siendo la vía clásica de la inestabilidad cromosómica (Figura 4). Esta es responsable del origen del 85% de los casos (47).

Figura 4. Vías de la carcinogénesis colorrectal (48).



Fue descrita originalmente por Fearon y Vogelstein en 1990 (49). Ellos propusieron un modelo genético de múltiples pasos que da lugar a la llamada secuencia adenoma-carcinoma:

Paralelamente a la sucesión de los cambios histopatológicos, se producen mutaciones en un orden característico en genes supresores de tumores como APC (Adenomatous Polyposis Coli), DCC (Deleted in Colon Carcinoma), SMAD 4/2 o TP53 (que pierden su función) y oncogenes como KRAS (que son activados), responsables de los procesos de iniciación y progresión tumoral. Si bien los investigadores enfatizaron que la acumulación progresiva de estos cambios genéticos es más importante que el orden en que ocurren.

La alteración más precoz es la del gen APC, situado en el brazo largo del cromosoma 5, que actúa como gen “portero”. Es decir, su inactivación es necesaria para que se pueda iniciar la proliferación celular (50,51). La pérdida de función de APC genera un aumento en la actividad de la β -catenina, lo que incrementa la señalización nuclear en asociación con el factor de transcripción TCF4, actuando sobre genes como c-myc (46). Esto produce un aumento de la proliferación celular y el bloqueo de la apoptosis. (52,53).

La mutación de APC puede seguirse de cambios en el patrón de metilación del ADN, teniendo lugar generalmente una hipometilación, lo que altera la expresión génica: la hipometilación del promotor de un oncogén puede dar lugar a su activación, mientras que la hipermetilación en un gen supresor de tumores lo inactivaría (46).

Posteriormente, en adenomas que superan el centímetro de tamaño, podemos encontrar la mutación de KRAS hasta en un 50%. Esta mutación da una ventaja selectiva a las células portadoras de la mutación de APC, impulsando su expansión clonal.

Luego se producen deleciones en otros cromosomas, como 18q y 17p, que incluyen regiones donde se localizan los genes DCC, SMAD2, SMAD4 y p53 (54). Las mutaciones en estos genes provocan la aparición de carcinomas

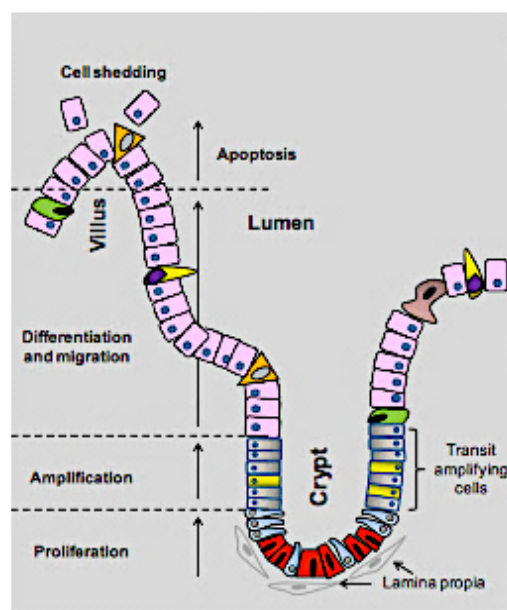
invasores. Finalmente, la transformación implicada en la transición epitelio-mesénquima, entre otras, participarán en el desarrollo de las metástasis.

1.5 El balance apoptosis - proliferación

Tres fenómenos biológicos se ven implicados en el proceso de la carcinogénesis colorrectal: proliferación, diferenciación y muerte celular o apoptosis. En el tejido normal, estos tres fenómenos se encuentran balanceados para conseguir la homeostasis. Cada uno de ellos suele tener predilección por una localización específica en la cripta intestinal (Figura 5). Así, en la mucosa normal, encontraremos una mayor actividad proliferativa en la parte más baja de la cripta. Allí se encuentran las células madre o stem cells, dividiéndose en células hijas. Éstas se multiplican y se diferencian progresivamente a medida que ascienden en la cripta hasta la parte más alta. Allí se desprenden y caen hacia el lumen o son eliminadas mediante apoptosis. Por ello la mayor concentración de muerte celular la encontraremos en la parte alta de la cripta (55).

Figura 5. Proliferación, diferenciación y apoptosis en la cripta intestinal.

Fuente: http://www.shreveportphysiology.com/fac_tak_aw.htm

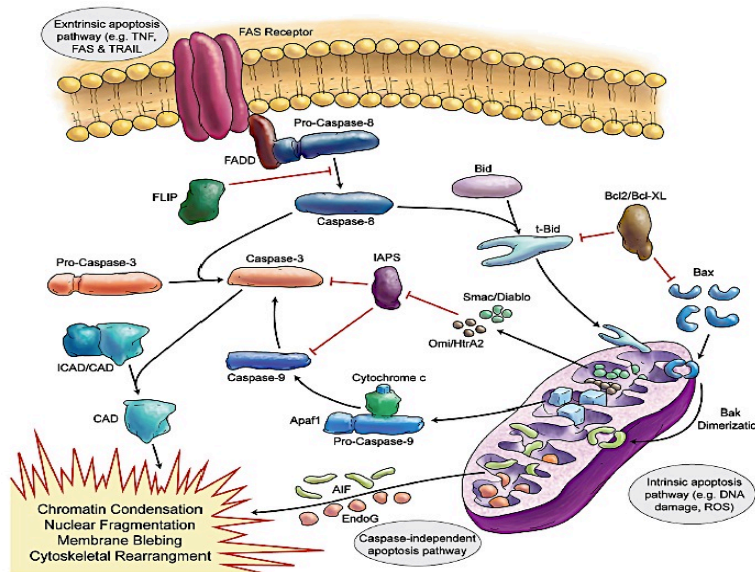


Sin embargo, este gradiente se revierte en los adenomas. En ellos la apoptosis es más frecuente en la parte baja, incluso en una mayor proporción que en el tejido normal (56–58). En el carcinoma, en cambio, no encontramos una distribución específica para dichos procesos (57). Esta distribución podría explicarse por la función que ejerce la muerte celular programada en el control del daño genético. Así, la eliminación de células con mutaciones del ADN a través de la apoptosis, impide su replicación y expansión.

Pero además de cambios en la distribución de dichos procesos, en la carcinogénesis colorrectal también se modifica su frecuencia, rompiéndose el equilibrio entre ellos y ocasionando un desbalance. Esto ocurre al verse afectados diversos sistemas de control, que en condiciones normales garantizan la homeostasis tisular, como las rutas de transducción de señales mitogénicas, el ciclo celular y la apoptosis, entre otros. Se ha demostrado que la actividad proliferativa aumenta al mismo tiempo que se agrava la displasia a lo largo de la transición adenoma-carcinoma. Sin embargo, el papel de la apoptosis en este proceso aún no ha sido completamente aclarado.

Existen dos vías principales, conectadas entre sí, por las que puede ocurrir la apoptosis: la extrínseca o mediada por receptor, que se activa por la unión de ligandos específicos (como FasL, TNF- α y TRAIL) a los receptores que existen en la superficie celular; y la intrínseca o mediada por la mitocondria, que es regulada por proteínas de la familia Bcl-2 y que puede desencadenarse por la pérdida de señales del factor de crecimiento o en respuesta a un estrés genotóxico (Figura 6).

Figura 6. Vías de señalización de la apoptosis (59).



De esta forma se evita la replicación de aquellas células con daño en su ADN, ya que las alteraciones genómicas nocivas típicamente inducen la activación de la apoptosis. Es ampliamente conocido que alteraciones en la respuesta fisiológica al daño del ADN pueden favorecer la acumulación de mutaciones oncogénicas. Y esta acumulación podría conducir al desarrollo de la neoplasia.

Si los mecanismos necesarios para equilibrar el balance entre proliferación y apoptosis funcionan adecuadamente, entonces se mantiene la homeostasis del epitelio colónico en la cripta intestinal. En cambio, en un sistema como este, que tiene una alta tasa de recambio celular, la inhibición de la función apoptótica permitiría una proliferación celular incontrolada y el desarrollo tumoral. De hecho, varios estudios han demostrado una disminución progresiva de la apoptosis durante la transformación de la mucosa normal al carcinoma colorrectal (56,60). Pero otros autores han sugerido que existe una tendencia al aumento del índice apoptótico (IA) durante el proceso del desarrollo del CCR (57,61–63). Por tanto, se necesitan nuevos estudios que confirmen si esta tendencia es la correcta.

Además, la evidencia cada vez mayor sobre la relevancia de la apoptosis en la patogénesis y la progresión del CCR, hace que nos interese por sus

potenciales implicaciones pronósticas. Sin embargo, son muy pocos los trabajos que ponen de manifiesto el significado pronóstico de la apoptosis en el CCR, y sólo algunos investigadores han comunicado supervivencias más cortas para los casos con mayor IA (64,65). De ahí el interés por definir el papel de la apoptosis en la carcinogénesis colorrectal y su relación con la supervivencia del CCR.

1.6 Clusterina

La clusterina (CLU), es una glicoproteína heterodimérica de 75-80 kDa ampliamente distribuida en el organismo de los mamíferos, donde podemos encontrarla en una amplia variedad de tejidos (especialmente en cerebro, retina, hígado, glándulas suprarrenales, próstata, testículos, riñón, pulmón y corazón) y en casi todos los fluidos fisiológicos (semen, leche materna, orina, líquido cefalorraquídeo y plasma) (66–69).

Fue descrita por primera vez en células de Sertoli de ratas (70) y en el fluido de la rete testis de carnero (71,72). Dicho fluido es conocido por provocar la agregación de las células de Sertoli y los hematíes de varias especies. Por ello cuando los autores descubrieron a la proteína responsable, decidieron llamarla “clusterina” (que produce “clusters” o agrupaciones), haciendo destacar su papel en las interacciones célula-célula (Fritz et al. 1983). Aunque ha recibido también otros nombres, relacionados con el sistema estudiado por cada investigador (Tabla 6), se estableció por consenso la denominación de clusterina (CLU) en la reunión celebrada en Cambridge en Septiembre de 1992 (66).

Actualmente sabemos que CLU interviene en múltiples procesos fisiopatológicos, como la maduración espermática, la muerte y la supervivencia celular, la regulación del ciclo celular, el transporte de lípidos, la reparación del ADN, la adhesión celular, la remodelación de tejidos, el reciclaje de membrana o el control del sistema inmune (73,74). Esto la ha convertido en el objeto de

numerosos estudios relacionados con la neurodegeneración (más concretamente con la enfermedad de Alzheimer), el envejecimiento, la aterosclerosis, la enfermedad cardiovascular o el cáncer, entre otros (69).

Tabla 6. Sinónimos o proteínas homólogas de clusterina (adaptado de Bettuzzi 2009).

Nombre	Fuente	Especie	Función	Referencia
Clusterina	Fluido de rete testis	Carnero	Reproducción	(71)
GPIII	Médula adrenal	Bovina	Gránulos cromafines	(76)
TRPM-2	Próstata	Rata	Apoptosis	(77)
SGP-2	Próstata	Rata	Reproducción	(78)
T64	Células neuroretinianas	Codorniz	Transformación celular	(79)
SP-40,40	Suero (hígado)	Humana	Modulación del complemento	(80)
CLI	Suero (hígado)	Humana	Modulación del complemento	(81)
ApoJ	Sangre	Humana	Transporte de lípidos	(82)
NA1/NA2	Sangre	Humana	Transporte de lípidos	(83)
K661	Retina	Humana	Retinitis pigmentosa	(84)

GP III: Glicoproteína III; TRPM-2: Mensajero prostático represor de testosterona-2; SGP-2: Glicoproteína sulfatada 2; SP-40,40: Proteína secretada asociada al complemento 40,40; CLI: Inhibidor de la lisis del complemento; ApoJ: Apolipoproteína J.

Todos estos procesos se caracterizan por una respuesta celular al estrés oxidativo, poniéndose en marcha la maquinaria protectora encargada de reparar el daño, lo que suele conllevar un freno en la actividad proliferativa y un incremento de la muerte celular. Por ello, algunos consideran a CLU como un sensor celular que se activa en situaciones de estrés como las inducidas por la hipoxia, las radiaciones ionizantes o el choque térmico (85). Se ha observado que su expresión se encuentra alterada en distintas neoplasias del ser humano

(73), detectándose generalmente una sobreexpresión en la mayoría de tumores analizados, como los de mama (86), laringe (87), vejiga (88), riñón (89), próstata (90), o pulmón (91). Los resultados no siempre han sido concluyentes, y algunos trabajos sugieren que CLU podría estar disminuida en ciertas neoplasias (92–95).

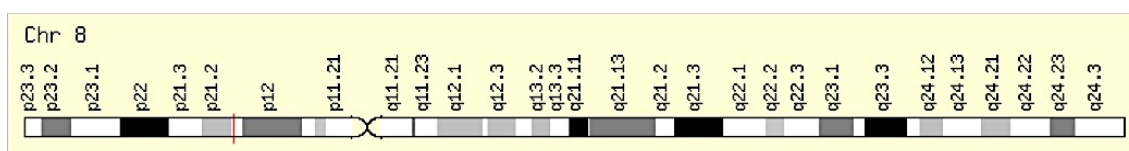
A pesar de las investigaciones llevadas a cabo, aún sigue siendo considerada una “proteína enigmática”, con funciones contradictorias en relación con la apoptosis celular, la tumorigénesis, y la progresión tumoral (Shannan et al. 2006).

1.6.1 El gen de la clusterina

El gen que codifica CLU en humanos se localiza en el cromosoma 8 del genoma humano (96), en la posición 8p21-p12 (97) (Figura 7).

Figura 7. Localización del gen de la clusterina en el cromosoma 8.

Fuente: http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?id_type=entrezgene&id=1191



Se compone de 9 exones y 8 intrones. La longitud de los exones varía desde 47 pb (exón 1) hasta 412 pb (exón 5), y en el caso de los intrones, de 207 pb (intrón 8) a 4377 pb (intrón 6). En total comprende una región de 16,580 pb (98). En todas las especies donde se ha estudiado se ha visto que posee una sola copia en el genoma y está altamente conservado (99).

En la actualidad sabemos que codifica diferentes proteínas. Es decir, CLU no se refiere a una sola proteína, sino que comprende una familia de productos

proteicos, que han podido ser detectados mediante electroforesis debido a su distinto peso molecular (75).

Se ha estudiado cómo surgen estas distintas formas de la proteína. Por una parte se habla de un procesamiento intracelular y maduración específicos para cada producto proteico. Pero también se han descrito tres transcritos o variantes de ARN mensajero (ARNm) derivadas del gen: CLU34, CLU35, CLU36 (100,101). Según la base de datos del National Center for Biotechnology Information de EEUU (NCBI), dichas variantes son:

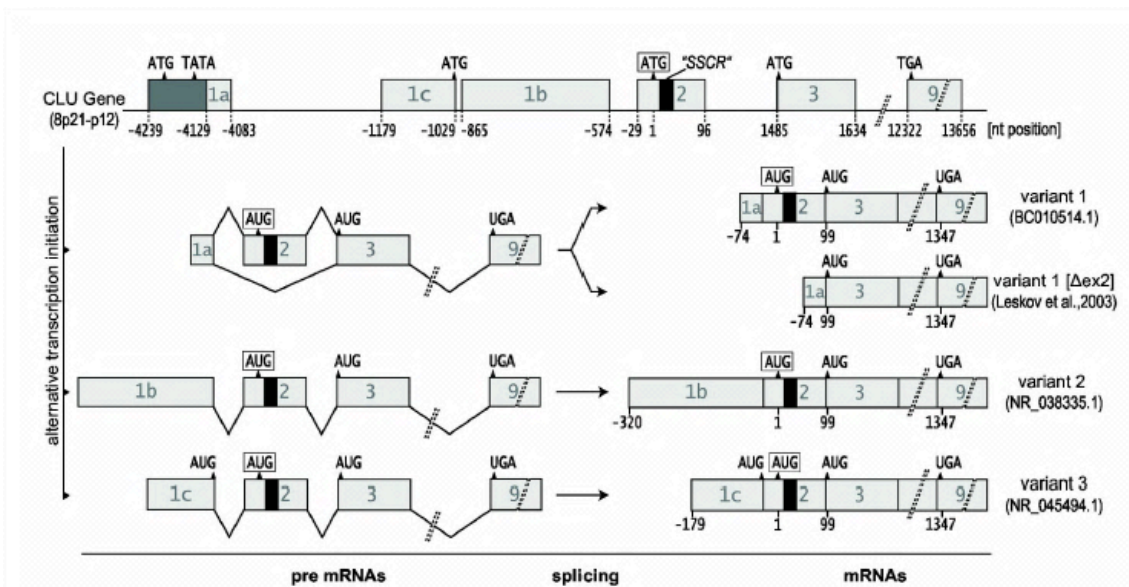
Variante 1: NM_001831.3

Variante 2: NR_038335.1

Variante 3: NR_045494.1

Todas tienen los 9 exones y 8 intrones. Comparten 8 exones, pero el primer exón es único para cada variante (1a, 1b, 1c), lo que sugiere un distinto lugar para el inicio de la transcripción (Figura 8). Las tres variantes de ARNm se han detectado en mucosa de colon normal, transformada y neoplásica (100), aunque con distintos niveles de expresión, y también en células prostáticas (69).

Figura 8. El gen de la clusterina y las variantes de ARNm (69).

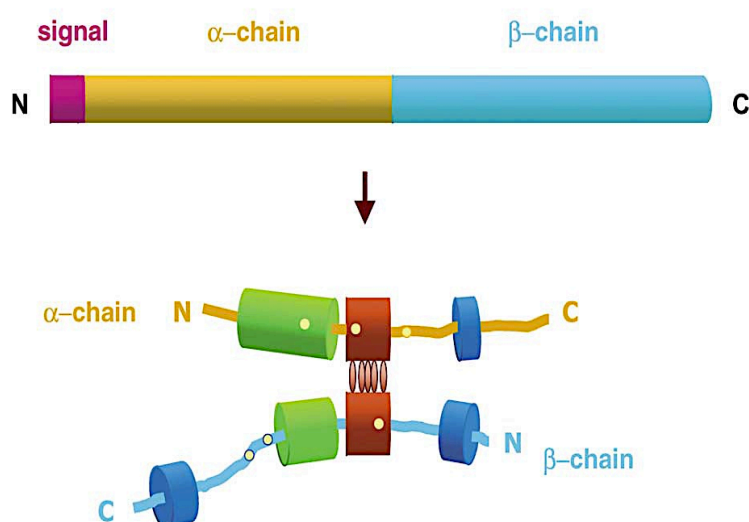


Algunos investigadores han encontrado una secuencia para la variante 1 más corta en su extremo 5' que la propuesta por el NCBI (69,101,102), y sugieren que BC010514.1 sería más correcta como variante 1 (69). Adicionalmente, otra variante 1 [Δ ex2] se genera mediante splicing alternativo, por lo que carece de exón 2 y de la secuencia que codifica la señal del retículo endoplásmico (SSCR o ER Signal Sequence Coding Region) (103).

1.6.2 Estructura de la clusterina

La cadena polipeptídica precursora de la principal forma de CLU se compone de 449 aminoácidos y es sintetizada a partir de un ARNm de unos 2 kb. Tras la traslación tiene lugar el procesamiento de la proteína que conduce a su maduración. El péptido señal guía a la proteína hacia el retículo endoplásmico (74), donde tiene lugar la separación de dicho péptido señal, de 22 nucleótidos, mediante proteólisis. El fragmento restante se divide en dos cadenas: la cadena α (34-36 kDa, aminoácidos 206-427) y la cadena β (36-39 kDa, aminoácidos 1-205) (104). En el aparato de Golgi, tiene lugar el ensamblaje de las cadenas para formar el dímero y su glicosilación. Las dos cadenas se ensamblan en antiparalelo y sus centros, ricos en cisteína, se unen por cinco puentes disulfuro. A ambos lados de este núcleo central encontramos tres α -hélices anfipáticas y dos α -hélices enrolladas. Aproximadamente el 30% de la masa de la proteína madura está conformada por carbohidratos de estructura variable, que se unen a la proteína a través de los seis puntos de N-glicosilación (68,105,106) (Figura 9).

Figura 9. Estructura de la clusterina. La cadena polipeptídica precursora (en la parte superior) pierde el péptido señal (en color magenta) mediante proteólisis, y luego se divide en dos cadenas (entre los residuos 227 y 228): la cadena α (en color amarillo) y la cadena β (en color azul celeste). Estas se ensamblan en antiparalelo formando una molécula heterodimérica (en la parte inferior de la figura), donde los centros ricos en cisteína (en color rojo) se unen por cinco puentes disulfuro (elipses de color rojo) y son flanqueados por dos hélices enrolladas (en color verde) y tres hélices anfipáticas (en color azul oscuro). Los puntos de color amarillo claro marcan los seis sitios de N-glicosilación (68).



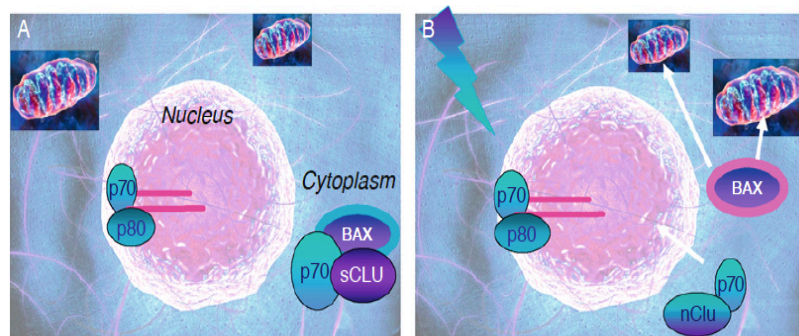
1.6.3 Formas de la clusterina

Hemos visto que el mismo gen de CLU es capaz de generar varios transcritos de ARNm. No se conoce con claridad cómo estas variantes se relacionan con cada una de las formas de la proteína, pero sí intuimos que existen al menos dos productos proteicos, con diferentes características, localizaciones y funciones. Esto nos puede ayudar a explicar por qué a menudo se ha visto a CLU implicada en funciones aparentemente contradictorias, dado que en función de la forma predominante la balanza se inclina hacia un extremo u otro, por ejemplo en relación con la supervivencia o la muerte celular.

La primera de las formas de CLU es la que corresponde con la estructura descrita previamente. La forma **precursora o psCLU**, de 60 kDa, no glicosilada y localizada en el citoplasma, es madurada dando lugar a la forma **secretada o sCLU**, un heterodímero glicosilado de 75-80 kDa, que se encuentra presente en prácticamente todos los fluidos fisiológicos (100,107,108). Se le asigna una función citoprotectora, dado que inhibe la apoptosis y por tanto promueve la supervivencia celular. También se la describe habitualmente como una chaperona extracelular independiente de ATP, por su capacidad para unirse a proteínas plegadas de forma errónea y estabilizarlas o eliminarlas, similar a la de las pequeñas proteínas de choque térmico o sHSP (Small Heat-Shock Proteins) (revisado en Wyatt et al. 2009) (Figura 8).

La segunda forma es la de localización **nuclear o nCLU**, de 45-55 kDa. Su péptido precursor se sintetiza a partir de un segundo codón de inicio (AUG), que se ha localizado en el exón 3. Le falta el péptido señal, y esto hace que no sufra el proceso de división en dos cadenas ni el de glicosilación, a diferencia de sCLU (103). Cuando la célula se ve expuesta a estrés, nCLU se transloca del citoplasma al núcleo y actúa induciendo la apoptosis (103,108). En el núcleo se une al heterodímero Ku70/80, implicado en la reparación del ADN y la inducción de la apoptosis (Figura 10).

Figura 10. Interacciones fisiológicas entre Ku70/80, clusterina y Bax. (A) En la célula normal, Bax está inactivo y se localiza en el citoplasma, interaccionado con Ku70. La proteína sCLU estabiliza esta interacción Ku70-Bax, actuando como citoprotectora. (B) Cuando ocurre un daño en el ADN, Ku70 libera a Bax. En este caso, nCLU coopera con Ku70 activando la translocación a la mitocondria de Bax, e induciendo la apoptosis (110).



Otras formas de la proteína sólo se han detectado mediante predicciones de programas informáticos, sin que hayan podido ser aisladas (111).

1.6.4 Funciones de la clusterina

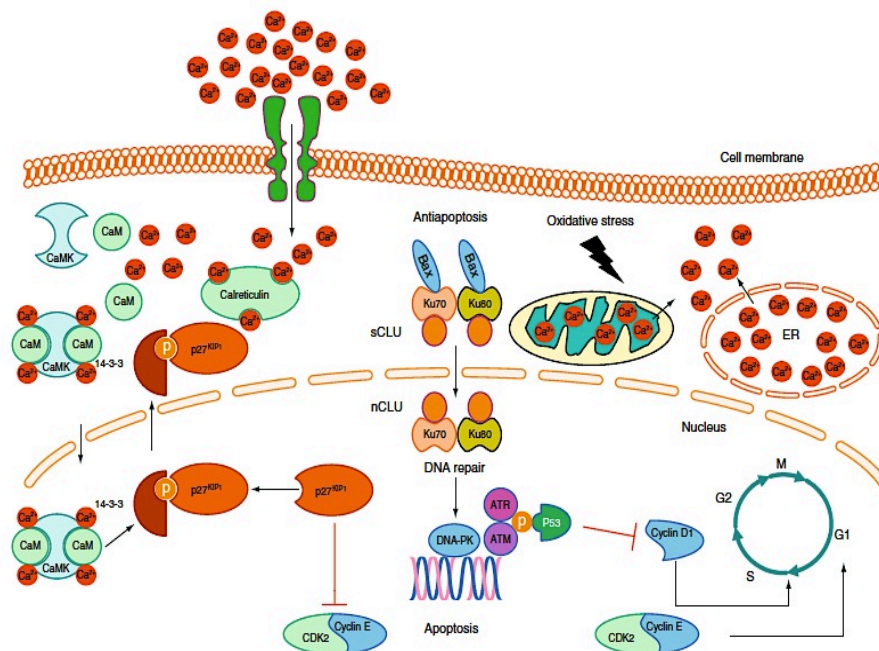
La función de CLU va a depender tanto del tipo de célula o tejido donde se encuentre, como de los factores que regulan su expresión y su localización dentro de la célula, así como de las circunstancias del entorno que rodea a esa célula (fisiológicas o patológicas). Se ha visto involucrada en enfermedades neurodegenerativas, síndromes metabólicos, glomerulonefritis, patología cardiovascular y cáncer. Esta influencia tan extensa y variada de la proteína se debe a su capacidad para interactuar con una amplia variedad de moléculas: lípidos (82), proteínas amiloides (112), componentes del complejo de ataque de membrana (99), proteínas mal plegadas (113) o quimioterápicos como el paclitaxel (114), entre otras. Se le asignan, pues, múltiples funciones fisiológicas, entre las que destacan:

- a) **Chaperona extracelular:** CLU actúa como una chaperona extracelular independiente de ATP, con una estructura similar a la de las proteínas de choque térmico. Estas proteínas a menudo están sobrepresadas en distintas neoplasias dado que son fundamentales para la supervivencia de las células cancerosas (115). Como ellas, CLU posee la capacidad de identificar aquellas proteínas que no se han plegado correctamente, unirse a su superficie hidrofóbica y favorecer su eliminación: se internan en las células mediante endocitosis y luego son degradadas en los lisosomas (109). Sabemos, por ejemplo, que una proteína de choque térmico, HSP27, y CLU se asocian para proteger a la célula de factores estresantes pro-apoptóticos (116). Esto la convierte en una proteína citoprotectora frente al estrés proteotóxico, pero también sabemos que actúa como sensor celular frente al estrés oxidativo, ejerciendo su función antioxidante a través de los grupos sulfhidrilos de los residuos de cisteína (117).

- b) Transporte de lípidos:** La mayoría de la CLU sérica, conocida en este contexto como apolipoproteína J, está contenida en complejos clusterina-apoA1 y circula como una lipoproteína de alta densidad (HDL) (82,83). Se ha descubierto que también puede unirse a lipoproteínas de baja (LDL) y muy baja densidad (VLDL) (118). CLU retira el colesterol de las membranas celulares que han sido dañadas y lo incorpora en las partículas HDL, siendo eliminado posteriormente mediante transporte inverso (119). CLU, una vez más, ejerce una función protectora, al favorecer la eliminación del exceso de lípidos y de los subproductos lipídicos tóxicos que se generan en situaciones de daño o remodelación tisular (67).
- c) Regulación del complemento:** CLU fue detectada por primera vez en humanos en los depósitos inmunes del glomérulo de un paciente con glomerulonefritis membranosa, adoptando un patrón similar al de otros componentes del complemento (120). CLU se une a C5b-6, impidiendo la formación del complejo de ataque a membrana, y de esta forma inhibe la citólisis mediada por el complemento (80,81).
- d) Apoptosis:** Respecto a la muerte celular, se ha establecido una funcionalidad dual para CLU. Por un lado, sCLU estabiliza la unión entre Ku70 y Bax, interfiriendo en la oligomerización de Bax e impidiendo la liberación del citocromo c y la activación de las caspasas (121). También es capaz de activar la vía de PI3K/AKT (Phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B) y del IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1), así como de proteger a las células de la muerte mediada por TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α) (122). Por tanto, una elevación de sCLU favorece la supervivencia celular. En cambio, una disminución en los niveles de sCLU conduce a la apoptosis, mediante la activación de p53 y la alteración de la ratio entre las proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas de la familia Bcl-2 (123). Por otra parte, nCLU estimula la apoptosis, a través del dominio BH3, situado en la región terminal-C, que secuestra a Bcl-xL, lo que libera a Bax y esto lleva a la liberación del citocromo c y a la activación de caspasa-3 (124,125).

Experimentos sobre la muerte celular tras la exposición a radiación ionizante, nos han revelado la capacidad de nCLU para interactuar con Ku70, ya separado de Bax. Ku70 a su vez, forma heterodímeros con Ku80, fundamentales en la reparación de las roturas de doble cadena. Los complejos nCLU-Ku70/Ku80, localizados en el núcleo, afectan a la reparación del ADN, conduciendo a la inestabilidad genómica y la muerte celular (126). La actividad proapoptótica de nCLU es dependiente de iones de calcio (Figura 11), y también se asocia con la inducción de TGF- β (Transforming Growth Factor- β) a través de la fosforilación de Smad2/3 (127).

Figura 11. Regulación de la apoptosis por clusterina dependiente de los iones de calcio. El estrés oxidativo produce modificaciones en las proteínas de los canales de calcio, liberando iones de calcio de la mitocondria y el retículo endoplásmico, y también permitiendo su entrada desde el exterior de la célula. Se piensa que la regulación de la apoptosis depende de la concentración de iones de calcio: a elevadas concentraciones, sCLU se une a Ku70-Bax y promueve la supervivencia celular impidiendo la apoptosis; a bajas concentraciones, nCLU se une a Ku70, desestabilizando la interacción Ku70-Bax, y conduciendo a la apoptosis (128).



- e) **Interacciones célula-célula:** Es una de sus principales funciones. CLU es capaz de promover la agregación de diferentes tipos celulares *in vitro*: hematíes, leucocitos, espermatozoides, células de los testículos de ratón TM-4, células de Sertoli de ratas y células epiteliales renales (67). El grado de agregación celular se incrementa en 24 horas, es dependiente de energía, probablemente precisa de la síntesis de proteínas y no requiere magnesio ni calcio (71,72,129). También se ha visto que depende del estado de las interacciones célula-sustrato (129), de forma que las células que pierden sus contactos célula-sustrato, ven potenciadas sus interacciones célula-célula a través de CLU, en un intento por mantener la proximidad celular (67). CLU, en determinadas circunstancias, incluso puede dar lugar a interacciones célula-sustrato aberrantes (129). Estas interacciones célula-célula y célula-sustrato son críticas tanto en el proceso de reparación tisular como en el de organogénesis, en los que se ha descrito la participación de CLU.
- f) **Maduración celular y transformación morfológica:** La diferenciación celular del músculo liso de los vasos (130) y la morfogénesis del riñón o del pulmón se han visto relacionadas con la actividad de CLU (67).
- g) **Reproducción:** Encontramos a CLU en variadas localizaciones del sistema reproductor: el citoplasma de las células de Sertoli, los estereocilios de las células principales del epidídimo, en el acrosoma y la cola de los espermatozoides, en los túbulos seminíferos y en el fluido epididimario. Se cree que CLU participa en la maduración espermática, en la formación de partes del citoesqueleto de la cola de los espermatozoides y en la defensa frente al complemento (98). También parece ejercer un papel en la función ovárica (67).

1.6.5 Síntesis y regulación de clusterina

La variante 1 del ARNm de CLU es el transcrito más abundante (102). Se cree que sCLU es la forma predominante sintetizada por las variantes de ARNm (69). Tanto la variante 1 como la variante 2 de ARNm, codifican para sCLU (100,102). Esta se genera a partir del primer codón de inicio o AUG situado en el exón 2. A diferencia de esta, la forma intranuclear, se origina por splicing alternativo de la variante 1, con el codón de inicio situado en el exón 3, tal como describió Leskov (103). Esta forma de CLU puede resultar difícil de detectar, y de hecho en algunos de los trabajos (100) no han conseguido identificar su presencia, ni en condiciones normales ni tampoco bajo estrés celular (69).

Una gran variedad de factores actúan como inductores de la síntesis de CLU en las células que se ven atacadas por ellos: el estrés oxidativo, quimioterápicos, la radiación ionizante y ultravioleta, la deprivación de estrógenos o andrógenos en tumores hormono-sensibles o el bloqueo del receptor her2-neu (117,131). Esto significa que ante estímulos proapoptóticos de diverso origen, CLU aumenta su expresión para proteger a la célula y permitir su supervivencia. Como hemos mencionado con anterioridad, esta función citoprotectora corresponde a la forma secretora de la proteína, sCLU. En cambio, nCLU, sería la responsable, en otras circunstancias, de promover la muerte celular (132,133). Esto nos lleva a pensar que cada forma de CLU está sujeta a su propia vía de regulación. Por ejemplo, los andrógenos ejercen un efecto diferencial sobre las variantes de ARNm de CLU: estimulan la expresión de la variante 2 en líneas celulares de cáncer de próstata, y en cambio inhiben la variante 1 (134).

Pero la regulación de CLU no depende sólo de la forma de la proteína, sino también del tipo celular. Además de en las células de Sertoli (135), podemos encontrar CLU en muy diversos tipos de células, como motoneuronas (136), fibroblastos de la dermis (137) y células epiteliales (138), siendo su expresión muy variable y se piensa que esto puede depender tanto de la clase de tejido

como de las diferentes vías de regulación que actuarían según las situaciones fisiológicas o patológicas (73,111). Las investigaciones sobre la influencia de los distintos entornos (órganos, condiciones de estrés, estadios evolutivos...) en los niveles y la función predominante de CLU han señalado, por ejemplo, el papel de TGF- β . Efectivamente, este factor es capaz de regular la expresión de CLU en función del tejido donde se encuentre, aumentando su expresión en astrocitos de rata y disminuyéndola en células de músculo liso de cerdo (139). También tiene la habilidad de promover la apoptosis por tamoxifeno en las células MCF-7 a través de la activación de nCLU (75).

Otros factores de crecimiento, como NGF (Nerve Growth Factor), y EGF (Epidermal Growth Factor) (134), y citocinas, como TNF- α o las IL (interleucinas) 1, 2 y 6, intervienen en la regulación de la síntesis de CLU (73). Se ha demostrado el papel de la vía Wnt en la transcripción de las variantes de ARNm, específicamente la variante 1 o CLU34, a través del factor de transcripción TCF1 (101), de modo que la anulación de Wnt en células de cáncer de colon conduce a la sobreexpresión de CLU. Otras vías que dan lugar a un aumento en la expresión de sCLU son Jak/STAT1 (Signal Transducers and Activators of Transcription 1) o IGF1 (Insulin-like Growth Factor-1) a través de la vía Src-Mek-Erk-EGR-1 (105). Goetz y colaboradores descubrieron que ATM (Ataxia Telangiectasia-Mutated) actúa como sensor del daño de ADN, siendo su activación necesaria para que se produzca la inducción del eje IGF1-sCLU tras la radiación ionizante (140). Otras vías actúan como represoras de CLU: los oncogenes Ha-Ras, mediante MEK-ERK y metilación, y c-myc disminuyen la expresión del gen de CLU (141).

Esta susceptibilidad de CLU para ser regulada por una amplia variedad de moléculas, está relacionada con los diferentes elementos presentes en la región del promotor de CLU y que pueden regular su transcripción como respuesta al estrés: AP-1 (Activator Protein-1), AP-2, SP-1 (Stimulatory Element-1), CLE (Clusterin Element), una secuencia de 14 pb muy similar a los HSEs (Heat Shock Elements), y que de hecho es reconocida por el HSF1 (Heat Shock Transcription Factor 1), y los sitios de unión de TCF (T-Cell Factor), NF-

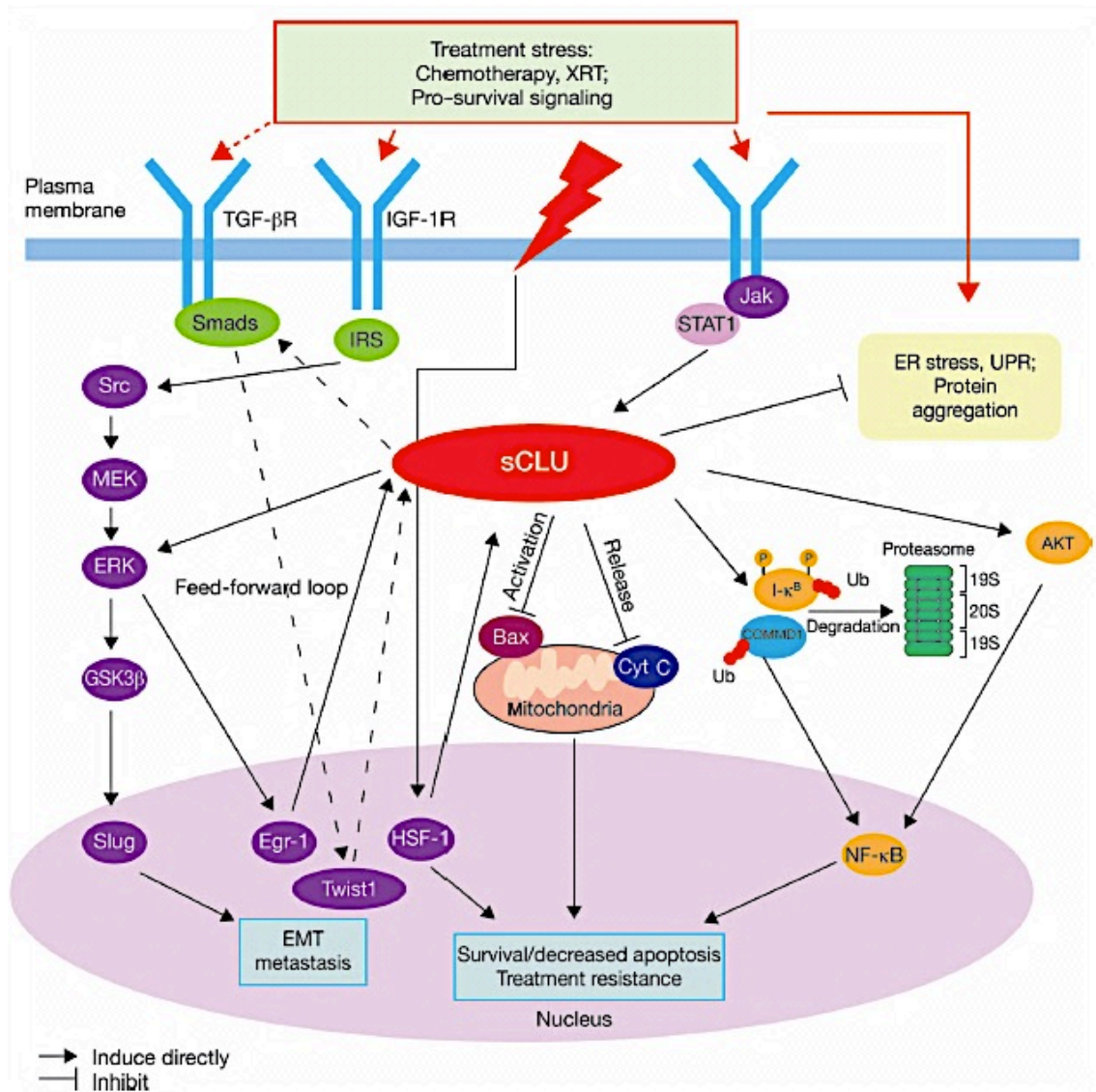
κ B (Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) y STAT1 (69,142). Existen también elementos de respuesta a los esteroides: GRE (Glucocorticoid Response Element) y ARE (Androgen Response Element) (105). Además, los dominios ricos en islas CpG indican que CLU es susceptible de ser regulada epigenéticamente mediante metilación del ADN (143) y acetilación de las histonas (144).

1.6.6 Clusterina y cáncer

La capacidad de CLU para interactuar con una gran variedad de moléculas y para llevar a cabo múltiples funciones, relacionadas con la apoptosis, la respuesta celular a un daño inducido, la regulación del sistema inmune o la adhesión celular entre otras, la convierte en una proteína crítica en el estudio del comportamiento tumoral.

Existen evidencias de la sobreexpresión de CLU en neoplasias como el cáncer de próstata (131,145), mama (86,146), laringe (147), ovario (148) y pulmón (91), entre otras. Sin embargo, hay datos contradictorios que apuntan a una disminución de CLU en las células tumorales en comparación con las células sanas (137,149,150). En general, la mayoría de autores coinciden en señalar que la supervivencia de la célula tumoral está relacionada con la sobreexpresión de sCLU y la pérdida de nCLU (108). Por tanto, la forma secretada de la glicoproteína, sCLU, facilita la progresión tumoral y la resistencia a los tratamientos oncológicos (Figura 12).

Figura 12. Papel de sCLU en la progresión tumoral (105).



Cyt C: Citocromo C; EMT: Epithelial-Mesenchymal Transition; ER: Retículo endoplásmico; HSF: Heat Shock Factor; IGF-1R: Insulin-like Growth Factor 1 Receptor; IRS: Insulin Receptor Substrate; TGF-β, Transforming Growth Factor-β; Ub: Ubiquitin; UPR: Unfolded Protein Response; XRT: Radiación.

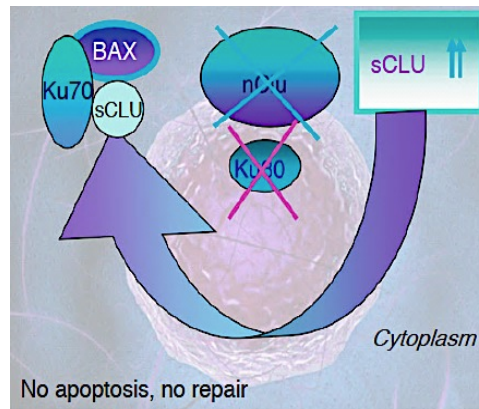
En efecto, parece que su expresión acompaña a los casos de mayor agresividad. Así por ejemplo, los niveles de CLU aumentan a medida que empeora el grado de diferenciación tumoral (145), y niveles altos se asocian con tumores de mayor tamaño (86) y de estadio más avanzado (151). También

se han obtenido datos que correlacionan su expresión con un peor pronóstico en pacientes con carcinoma renal (152), hepatocelular (153), vesical (154) y prostático (155). En cáncer de mama, también se ha asociado la CLU citoplasmática con una peor supervivencia (156,157). Sin embargo, aunque en trabajos previos de nuestro grupo se detectó una fuerte relación de CLU con la carcinogénesis y la progresión de tumores de la mama, la expresión de CLU no fue un marcador de pronóstico independiente en las series estudiadas (86). De nuevo en este punto hay autores que han encontrado resultados contradictorios, estableciendo una asociación entre CLU y buen pronóstico en adenocarcinoma de páncreas (95) o cáncer de pulmón de células no pequeñas (158).

Respecto al CCR, se ha comunicado un aumento de esta proteína en adenomas y adenocarcinomas (108,159), pero hasta nuestra publicación, su valor pronóstico sólo había sido evaluado por Kevans y colaboradores (160), encontrando una asociación entre la expresión CLU y una menor supervivencia, aunque exclusivamente para estadios II de CCR.

Un conocimiento cada vez mayor del funcionamiento de CLU ha permitido ensayar su uso diagnóstico, como marcador tumoral, y terapéutico, como diana de nuevas drogas contra el cáncer. CLU favorece que las células sometidas a un estrés oxidativo o daño genético escapen de la apoptosis (Figura 13), por lo que los tumores que la sobreexpresan se convierten en resistentes a la quimioterapia, la hormonoterapia y la radioterapia (161,162).

Figura 13. Escape de la apoptosis en la célula cancerosa. El predominio de la forma secretada de CLU frente a la forma nuclear, la pérdida de ku80 y la relocalización citoplasmática de Ku70 dan lugar a la interacción patológica de Ku70-Bax-sCLU, que inhibe la muerte celular y favorece la progresión tumoral (110).



Se han ideado oligonucleótidos antisentido que bloquean la síntesis de la proteína, para mejorar la eficacia de los citotóxicos. En efecto, los estudios preclínicos han mostrado cómo estos nuevos fármacos producen un aumento de la apoptosis inducida por la quimioterapia convencional (163,164). En la Universidad de Columbia Británica han desarrollado para su uso en humanos el custirsén (OGX-011), un inhibidor que actúa sobre el exón 2 del gen de CLU, con resultados prometedores en los ensayos clínicos fase I-II en cáncer de pulmón (165), y próstata (166,167), que han motivado la puesta en marcha de ensayos fase III (168). En el estudio SINERGY, según los datos comunicados en el último congreso anual de la Sociedad Americana de Oncología (ASCO), se ha obtenido un aumento de tres meses en la supervivencia global en el subgrupo de pacientes con peor pronóstico, afectados de cáncer de próstata metastásico resistente a castración, al asociar custirsén con docetaxel más prednisona (169).

En cuanto a su aplicabilidad como marcador, en el reciente trabajo de Bertuzzi y colaboradores, encuentran niveles alterados de CLU en plasma incluso años antes de la detección del CCR, lo que puede ser de utilidad a la hora de seleccionar población de riesgo para los programas de prevención (170). Otros

destacan su alta sensibilidad y valor predictivo positivo para casos especialmente agresivos de CCR cuando se determina su presencia en heces (171). Incluso ya ha sido testada para monitorizar la respuesta a tratamientos anti-clusterina, observándose mejor supervivencia en los pacientes en los que se reducen los niveles séricos de CLU como respuesta al tratamiento combinado con quimioterapia y custirsén (172).

2

Objetivos

1. Estudiar la relación de la clusterina con la carcinogénesis y la progresión del cáncer colorrectal. Para ello se estudiará la expresión de esta proteína en tejido colónico normal, lesiones premalignas del colon (adenomas), y carcinomas colorrectales.
2. Analizar la relación entre la expresión de clusterina y los factores pronósticos clásicos, y la supervivencia de los pacientes con cáncer colorrectal.
3. Estudiar la posible implicación de la actividad apoptótica en la carcinogénesis colorrectal y en la progresión tumoral del cáncer colorrectal.
4. Evaluar el significado pronóstico de la apoptosis, relacionándola con los factores pronósticos clásicos y la supervivencia en el cáncer colorrectal.

3

Material y Métodos

3.1 Pacientes y muestras de tejido

Un total de 103 casos de CCR fueron incluidos en nuestro estudio. Todos habían sido sometidos sucesivamente a resección quirúrgica de su tumor primario en el Hospital Costa del Sol entre enero de 2006 y diciembre de 2007. Se excluyeron aquellos pacientes que habían sido tratados con quimioterapia y/o radioterapia previamente a la cirugía. Adicionalmente se estudiaron 31 muestras de adenomas colorrectales, así como 20 muestras correspondientes a tejido colónico normal.

Las secciones de mucosa normal se obtuvieron de las piezas quirúrgicas, siempre de localizaciones alejadas del tumor, consideradas como normales por los patólogos. Por otra parte, las áreas de los tumores para el ensayo TUNEL fueron seleccionadas igualmente por patólogos expertos, siendo excluidas las áreas necróticas.

Todas las muestras fueron procesadas de la manera convencional: fijadas en formol diluido al 10% e incluidas en bloques de parafina. Todos los carcinomas

estudiados se clasificaron según los estándares de la OMS y de la UICC/AJCC para el grado de diferenciación y el estadio TNM.

Los datos clínicos se obtuvieron del registro de tumores y los informes médicos correspondientes. Se examinaron las neoplasias de 57 hombres y 46 mujeres, con una mediana de edad en el momento de la cirugía de 70 años (rango 45 - 91 años). Las principales características de los pacientes incluidos se describen en la tabla 7.

Tabla 7. Características de los pacientes con cáncer colorrectal (n = 103).

Variable	Pacientes (n)	%
Género		
Masculino	57	55
Femenino	46	45
Edad (años)		
Mediana	70	
Rango	45 - 91	
Grado histológico		
I	16	16
II	56	54
III	31	30
Localización		
Ciego y colon ascendente	22	21
Colon transverso	11	11
Sigma y colon descendente	39	38
Recto	31	30
Estadio		
I	16	15
II	49	48
III	24	23
IV	14	14
Progresión tumoral		
No	57	55
Sí	46	45

El tiempo de seguimiento se calculó desde la fecha del diagnóstico anatomopatológico inicial hasta la fecha del último contacto con el paciente, siendo la mediana de 54 meses (rango 12 - 96 meses). El estudio recibió la

aprobación del Comité Ético de Investigación y se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes.

3.2 Detección de apoptosis celular in situ (Ensayo TUNEL)

Para estudiar la apoptosis utilizamos la técnica TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labeling), descrita por primera vez por Gavrieli y colaboradores (173). Este método se basa en el marcaje in situ de los extremos 3' libres de los fragmentos de ADN generados por las endonucleasas relacionadas con la apoptosis. Para ello usamos el kit comercial para la detección de apoptosis (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). Brevemente, las secciones desparafinadas e hidratadas se incubaron durante 15 minutos con 20 µg/ml de proteinasa K (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, Estados Unidos). Tras varios lavados con PBS (Phosphate Buffered Saline), las preparaciones se cubrieron con la enzima TdT (Terminal deoxynucleotidyl Transferase) más una mezcla de nucleótidos marcados con fluoresceína (Reactivo Tunel; In Situ Cell Detection Kit: Boehringer Mannheim, Alemania), a una dilución de 1:35, durante 60 minutos y a una temperatura de 37°C. Tras nuevos lavados con PBS, se les aplicó un anticuerpo anti-fluoresceína, conjugado con fosfatasa alcalina. Una vez lavadas con PBS, las preparaciones se montaron de modo convencional para poder visualizar las células teñidas bajo la luz del microscopio.

El pretratamiento de las secciones con DNasa nos sirvió como control positivo, mientras que la omisión de la enzima del procedimiento se empleó como control negativo.

Dos patólogos evaluaron las muestras de forma independiente, sin que tuvieran acceso a los datos clínico-patológicos ni a la evolución de los pacientes del estudio. Los hallazgos morfológicos establecidos para identificar la apoptosis en las secciones de hematoxilina y eosina se emplearon en las preparaciones teñidas mediante TUNEL. Las células se consideraron

apoptóticas si el área nuclear presentaba tinción en su totalidad. Los cuerpos apoptóticos se definieron como pequeños cuerpos globulares marcados positivamente en el citoplasma de las células tumorales, pudiendo encontrarse de forma individual o en grupos. En total, para cada muestra se contabilizaron hasta 1000 células y de ellas, el número de células teñidas, en campos sucesivos a gran aumento (400x), para así calcular el índice apoptótico (IA), expresado en forma de porcentaje. Usamos la media del porcentaje apoptótico en nuestras muestras (1%) (rango: 0 - 6%) como el valor de corte para los estudios de supervivencia.

3.3 Estudio inmunohistoquímico de clusterina

Se obtuvieron secciones de 4 μm de los bloques de tejido incluido en parafina y se montaron en portaobjetos sialinizados. Posteriormente se rehidrataron mediante pases por xilol y alcohol. La peroxidasa endógena se bloqueó mediante la inmersión de los cortes, durante 15 minutos, en una solución al 3% de peróxido de hidrógeno en nitrato sódico al 0,1 N. Se usó un anticuerpo monoclonal anti-cadena α de CLU, 05-354 (clona 41D) (Upstate-Millipore, Watford, Inglaterra). Se aplicó a una dilución de 1:400 y se incubó durante la noche a una temperatura de 4°C. Luego se siguió el procedimiento estándar para la tinción, de acuerdo con el protocolo del fabricante (Dako, Glostrup, Dinamarca). Una vez realizada la incubación con el anticuerpo primario y tras varios lavados con tampón fosfato (PBS), se realizó una nueva incubación con el anticuerpo secundario (puente) biotinilado conjugado con peroxidasa-estreptavidina, durante 10 minutos. Tras nuevos lavados con PBS, se utilizó una solución de diaminobenzidina como “revelador” de la tinción. Una vez contrateñidas con hematoxilina acuosa y deshidratadas mediante pases por xilol y alcohol, las preparaciones se montaron de manera convencional.

La valoración de la expresión de clusterina, se realizó mediante la utilización de los siguientes criterios:

- Se consideraron negativas aquellas preparaciones histológicas en las que no se observaba tinción o esta era positiva en menos del 10% de las células neoplásicas.
- En cambio, se consideraron positivas aquellas preparaciones en las que más del 10% de las células neoplásicas aparecían teñidas.

Este anticuerpo ha sido empleado antes en otros trabajos con CCR (100,108). La especificidad del anticuerpo se comparó usando también en 40 muestras el anticuerpo policlonal H-330 (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, Estados Unidos), que reconoce todas las formas de CLU, obteniéndose los mismos resultados. Además, existe una buena correlación con los resultados obtenidos mediante Western blot, tal como ha sido demostrado por Andersen y colaboradores (100).

Como control positivo se usó una muestra de cáncer de mama con sobreexpresión conocida para CLU. Los controles negativos se obtuvieron omitiendo la aplicación del anticuerpo primario y continuando la realización de la técnica del modo anteriormente descrito.

3.4 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó con la aplicación del programa estadístico SPSS (SPSS. Inc., Chicago, IL, Estados Unidos).

Se realizó análisis descriptivo utilizando media y desviación estándar (DE) para variables cuantitativas, y distribución de frecuencias para las cualitativas. Para estudiar la asociación entre CLU y la apoptosis y el resto de variables relacionadas con factores pronósticos del CCR, se empleó el test de Chi-cuadrado para las variables categóricas, o en los casos en que éste no procedía (resultados esperados inferiores a 5 en más de un 20% de los casos) mediante el test de Fisher. La comparación de medias respecto a una variable cualitativa dicotómica, se llevó a cabo mediante el test de la T de Student, una

vez comprobada la normalidad de la variable cuantitativa y la homogeneidad de la varianza. En los casos en los que no se cumplía esta condición se procedió a la transformación de la variable o al uso de test no paramétrico (test U de Mann-Whitney). Para la comparación entre variables continuas y variables cualitativas con tres o más categorías, se empleó el análisis de la varianza (ANOVA), utilizando variantes paramétricas en caso de $n \geq 30$ por grupo, o en caso contrario, variante no paramétrica.

Las variables que mostraron un valor pronóstico con un nivel de significancia en el análisis univariante ($p < 0.10$), se introdujeron en el análisis multivariante, donde mediante la regresión de Cox se determinó el Hazard Ratio (HR) con respectivo intervalo de confianza al 95% (IC 95%). La supervivencia libre de progresión (SLP) se calculó desde la fecha del diagnóstico hasta la fecha de la progresión o de la muerte por cáncer; los pacientes vivos sin recidiva se censuraron en la fecha del último seguimiento. La supervivencia global (SG) se calculó desde la fecha del diagnóstico hasta la fecha de la muerte por cáncer. Para su estimación se usó el método de Kaplan-Meier, y las curvas de supervivencia fueron comparadas mediante el test de Log-rank. En los diferentes análisis se estableció el nivel de significación estadística en $p < 0.05$.

4

Resultados

4.1 Expresión de clusterina

Tal como hemos descrito, realizamos estudios de inmunohistoquímica para comprobar la expresión de CLU en el tejido colónico y saber si su expresión se relaciona con la transformación neoplásica.

Respecto al estadio tumoral, en el momento de la resección quirúrgica del tumor primario, el 15% de los pacientes presentaba un estadio I de CCR, el 48% tenía un estadio II, el 23% un estadio III y el 14% restante padecía un estadio IV de la enfermedad.

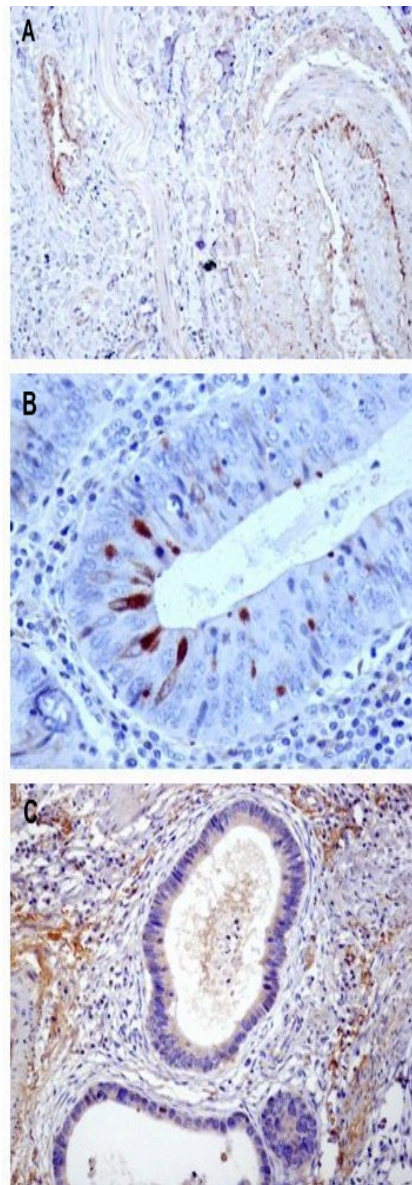
Observamos que CLU no estaba presente en el epitelio normal, siendo expresada solamente por células estromales y endoteliales en las muestras sanas de tejido colónico.

En cambio, sí se detectó expresión de CLU en las lesiones adenomatosas, que fueron inmunopositivas en el 16% de las muestras (5 / 31), sin que se encontraran diferencias entre los adenomas pequeños y los de mayor tamaño (≤ 10 mm versus > 10 mm). Este porcentaje de positividad para CLU fue aún

mayor en las muestras correspondientes a los carcinomas colorrectales. De los 103 casos, 31 (30%) marcaron positivamente para la expresión de CLU (Figura 14), siendo la localización de la tinción frecuentemente apical.

En nuestro estudio no detectamos CLU nuclear, ni en los adenomas ni en los carcinomas.

Figura 14. Estudio inmunohistoquímico de clusterina. El epitelio normal no expresó clusterina. Las células endoteliales y algunas células estromales fueron inmunorreactivas para clusterina (A). Inmunopositividad citoplasmática de clusterina en adenoma (B) y carcinoma (C).



Por otra parte, al analizar la correlación de CLU con los factores clínico-patológicos, observamos que los niveles de expresión de CLU no se correlacionaron con la edad, el género, el grado histológico, o el estadio tumoral (Tabla 8).

Tabla 8. Correlación de la expresión de clusterina con los factores clínico-patológicos.

Variables	Nº expresión de clusterina (%)		p
	Negativa	Positiva	
Género			p=0.94
Masculino	40 (39)	17 (16)	
Femenino	32 (31)	14 (14)	
Edad			p=0.14
<70 años	41 (40)	12 (12)	
>70 años	31 (30)	19 (18)	
Grado			p=0.18
I	12 (12)	4 (4)	
II	35 (34)	21 (20)	
III	25 (24)	6 (6)	
Estadio			p=0.16
I+II	44 (43)	21 (20)	
III+IV	28 (27)	10 (10)	
Recidiva			p=0.02*
No	45 (44)	12 (12)	
Sí	27 (26)	19 (18)	

* $p < 0.05$.

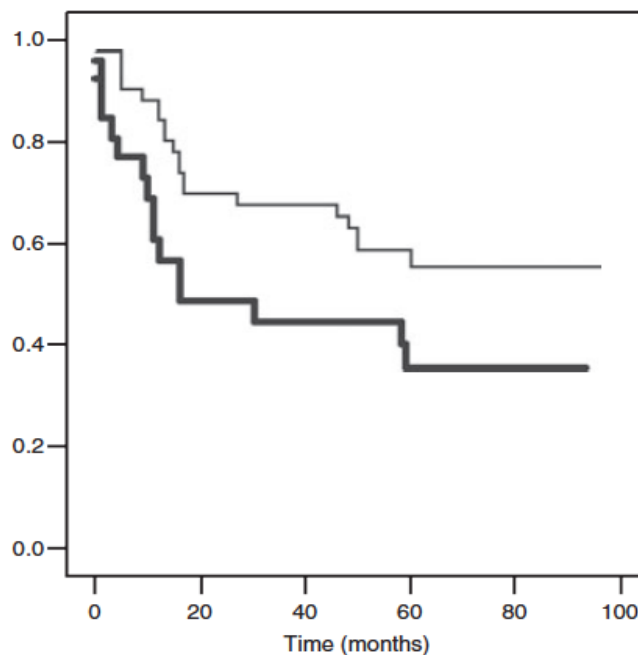
4.2 Valor pronóstico de clusterina

En nuestra serie, la recidiva o progresión tumoral tuvo lugar en 46 de los 103 casos, siendo más frecuente en el grupo de tumores CLU+ (19/31, 61%), en comparación con el grupo CLU- (27/72, 37%), alcanzando esta diferencia la significación estadística ($p = 0.020$) (Tabla 8).

4.2.1 Clusterina y supervivencia libre de progresión

Para determinar si CLU se correlaciona con el pronóstico de los pacientes con CCR, analizamos la asociación entre la expresión de CLU y la supervivencia libre de progresión (SLP). Encontramos que aquellos pacientes con tumores que expresaban CLU tenían una SLP significativamente más corta que los que no expresaban CLU. Los tumores CLU+ presentaron una SLP a 5 años del $35 \pm 9\%$, y los CLU- del $57 \pm 7\%$; $p = 0.03$, test log rank. La figura 15 muestra las curvas de Kaplan-Meier para la SLP, comparando la inmunorreactividad positiva y negativa para CLU.

Figura 15. Supervivencia libre de progresión de los pacientes agrupados según la expresión de clusterina. La supervivencia de los pacientes con tumores que expresan clusterina (línea gruesa) es significativamente más corta que la de los pacientes con tumores que no expresan clusterina (línea delgada).



Estudiamos el valor pronóstico independiente de la expresión citoplasmática de CLU mediante el análisis multivariante, siguiendo el modelo de riesgo proporcional de Cox (Tabla 9).

Tabla 9. Análisis multivariante de la supervivencia libre de progresión.

Variable	Hazard Ratio	95% CI	p
Estadio TNM	2.20	1.13-4.29	0.020
CLU	2.01	1.03-3.90	0.038

Tanto la expresión de CLU como el estadio tumoral fueron factores pronósticos independientes para la SLP. Así, la positividad para CLU se asoció significativamente con una mayor tasa de recidiva, con un Hazard Ratio (HR) de 2.01 (IC 95%: 1.03 - 3.90). Como podíamos esperar, un estadio tumoral avanzado también se relacionó con una peor SLP (HR 2.20; IC 95%: 1.13 - 4.29).

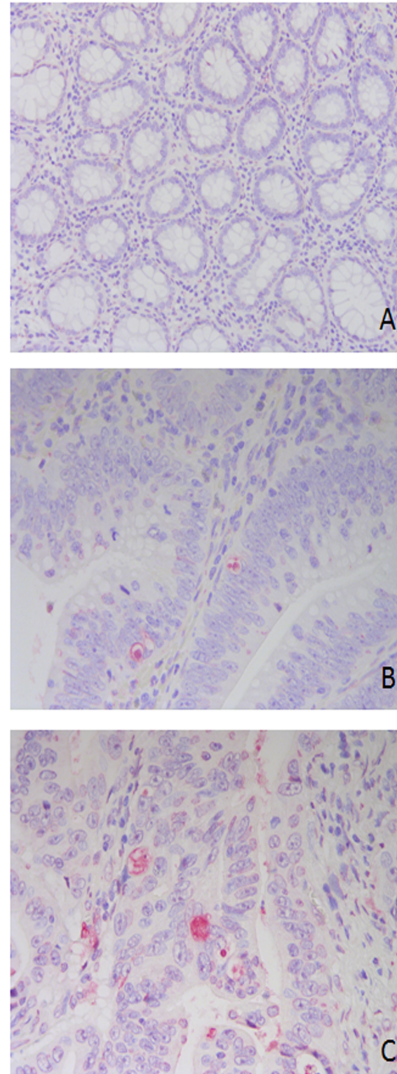
4.2.2 Clusterina y supervivencia global

Los tumores que fueron CLU+ también presentaron cifras de SG algo inferiores a las de los tumores CLU- (SG a 5 años: 60% vs 68% respectivamente), aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

4.3 Índice apoptótico

Mediante el método TUNEL cuantificamos la apoptosis en el tejido colónico y estudiamos la relación entre la frecuencia de la apoptosis y la tumorigénesis colorrectal. La tasa de células apoptóticas hallada en los carcinomas (media 1.09 ± 0.13) fue superior a la de los adenomas (media 0.38 ± 0.23 , $p = 0.059$), y significativamente superior a la de la mucosa sana (media 0.06 ± 0.04 , $p = 0.001$) (Figura 16).

Figura 16. Apoptosis detectada mediante TUNEL. En la mucosa normal las células teñidas fueron escasas (A), aumentaron en los pólipos adenomatosos (B) y especialmente en los adenocarcinomas de colon (C). Magnificación, 200x (A), 400x (B, C).



Estos hallazgos nos indican que, efectivamente, la apoptosis juega un papel en la transformación neoplásica en el CCR.

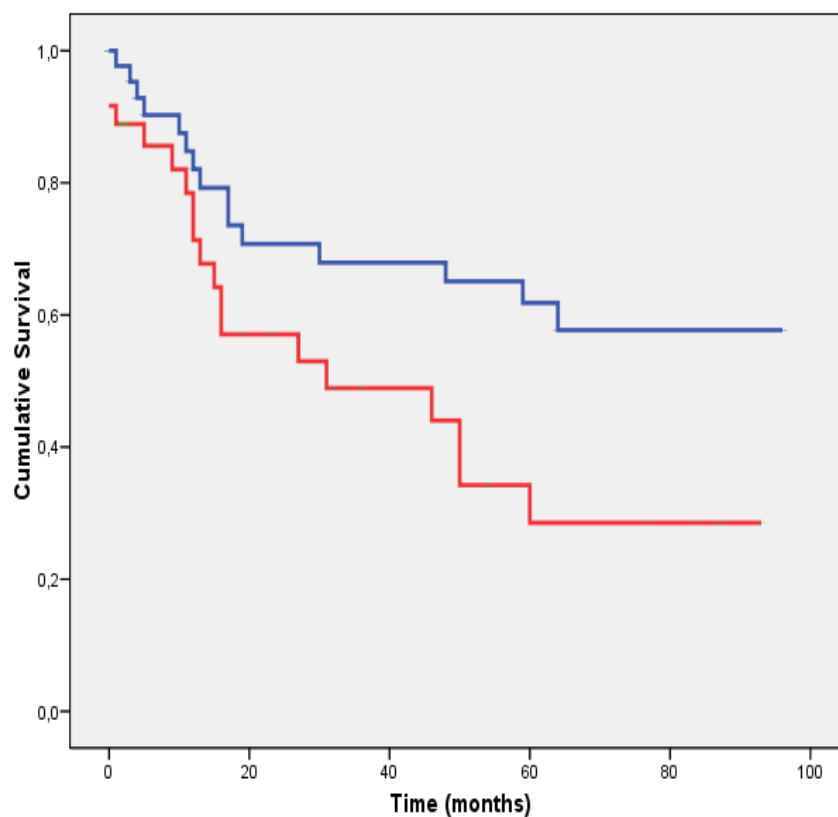
Con respecto al estadio tumoral, encontramos que los IAs fueron mucho más elevados en los casos metastásicos (estadio IV) que en los localizados (estadios I, II y III), con $p = 0.017$. En este caso, las tasas apoptóticas tampoco se correlacionaron con el género, la edad de los pacientes o el grado de diferenciación tumoral.

4.4 Valor pronóstico del índice apoptótico

4.4.1 Apoptosis y supervivencia libre de progresión

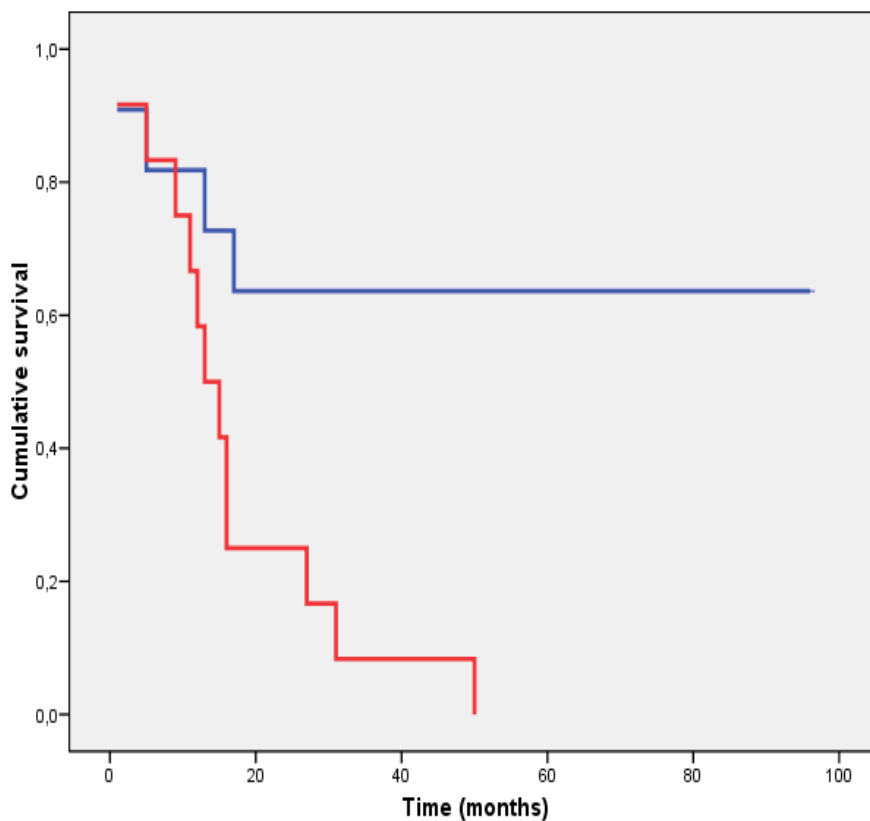
Al analizar la asociación entre el IA y la SLP pudimos demostrar que los pacientes con tumores con mayor IA (>1%) tenían una SLP significativamente inferior que los de IA menor ($p = 0.020$). En la figura 17 podemos ver las curvas de Kaplan-Meier para la SLP, comparando IA alto frente a IA bajo. La SLP a 5 años varió dependiendo del valor del IA. Así, para un IA bajo, la SLP a 5 años fue de $61.8 \pm 8.1\%$, mientras que para un IA alto (> 1%) fue de $28.5 \pm 9.6\%$, con $p = 0.020$.

Figura 17. Supervivencia libre de progresión según el índice apoptótico (IA). La supervivencia de los pacientes con tumores que presentan IAs altos (línea roja) es significativamente inferior a la de los pacientes con tumores con IAs bajos (línea azul).



En el análisis multivariante, el IA también fue un factor pronóstico independiente para la SLP. Un IA alto se asoció significativamente con un aumento en la tasa de recidiva, con un HR de 2.03 (IC 95%: 1.04 - 4.14). De nuevo, el estadio tumoral avanzado se asoció con una peor SLP (HR 2.48; IC 95%: 1.10 - 5.59). En el análisis por estadios, observamos que un IA alto se relacionó con una SLP más corta en los casos con enfermedad más avanzada (estadios III y IV) ($p = 0.004$) (Figura 18). En cambio, esta asociación no estuvo presente en los estadios más tempranos.

Figura 18. La supervivencia libre de progresión de los pacientes con tumores en estadio avanzado (estadios III y IV) según índice apoptótico (IA). Los pacientes con IAs altos (línea roja) presentan supervivencias más cortas que aquellos con IAs bajos (línea azul).



4.4.2 Apoptosis y supervivencia global

Un IA bajo se asoció con una SG más prolongada (SG a 5 años: $74.6 \pm 8.8\%$), mientras un IA alto se correlacionó con un pronóstico desfavorable (SG a 5 años: $43.7 \pm 11.9\%$, con $p = 0.027$). En el análisis multivariante, encontramos que tanto el IA como el estadio tumoral fueron factores pronósticos independientes para la SG, con HR de 2.18 (IC 95%: 1.08 - 4.37) y 2.41 (IC 95%: 1.20 - 4.85), respectivamente.

5

Discusión

5.1 Clusterina

Varios estudios clínicos y experimentales han demostrado el importante papel de CLU a la hora de inhibir la muerte celular apoptótica (122,174) y otros han comunicado la sobreexpresión de CLU en neoplasias, observada mediante inmunohistoquímica. La mayoría de ellos ha señalado la sobreexpresión citoplasmática de CLU en las células tumorales como un hallazgo relevante (86,95,145,159).

En CCR, algunos trabajos han encontrado una disminución en la expresión de CLU (175), aunque para llegar a esta conclusión, Chen y colaboradores se limitaron a comparar las muestras tumorales y sanas pareadas de 10 pacientes con cáncer de colon en estadio III. Predominan, al igual que en las neoplasias en general, los autores que señalan que esta proteína se encuentra elevada en adenomas y carcinomas (108,151,159). Un primer estudio, obtuvo niveles de ARN de CLU progresivamente mayores desde los microadenomas a los carcinomas invasores desarrollados en el intestino delgado de ratones Min (159). También analizaron 6 muestras de tejido colónico humano procedentes

de biopsias endoscópicas, incluyendo tejido normal, adenoma y carcinoma (en una muestra). Los adenomas tubulares y vellosos mostraron niveles altos de CLU, mientras que en los pólipos hiperplásicos la expresión de CLU fue débil. Posteriormente, el equipo de Pucci, estudió 30 casos, incluyendo material de biopsias y de resecciones quirúrgicas (108). Encontraron tinción nuclear para CLU tanto en el tejido normal como en adenomas, pero esta fue inexistente en los carcinomas. La tinción citoplasmática aumentó su intensidad progresivamente desde el tejido sano al tumoral, especialmente en los tumores metastásicos. El número de pacientes contemplado fue superior en el trabajo de Xie y colaboradores, con 85 CCRs resecados en el Hospital de la Universidad china Sun Yat-Sende, de estadios II, III y IV (151). En esta ocasión, disponemos de los porcentajes de las muestras con sobreexpresión de CLU, similares a lo hallado por nosotros: 17% en adenomas, 46% en tumores primarios y 57% en tumores metastásicos, tomando como referencia la expresión de CLU en la mucosa normal (con índices de tinción de 0 a 6). Tampoco detectaron una correlación con la edad, el género o la localización del tumor primario, sólo con el estadio tumoral avanzado.

Además, el significado pronóstico de la sobreexpresión de CLU ha sido escasamente investigado hasta el momento. De hecho, sólo un trabajo había presentado resultados que asociaran CLU con pronóstico en CCR (160) con anterioridad a la publicación de nuestro estudio (176), aunque en el trabajo de Kevans y colaboradores sólo se abordaron los estadios II. Ellos analizaron las diferencias en SG en este estadio según la expresión de CLU (en cuanto a porcentaje e intensidad de la tinción, a nivel epitelial y estromal), si bien no comunicaron datos de SLP.

Esto nos motivó a confirmar el papel de CLU en la carcinogénesis colorrectal, examinando no sólo tejido normal y adenomas, sino también una amplia serie de carcinomas, y también analizar la influencia de la expresión de CLU en la supervivencia de estos pacientes. En nuestra serie, CLU no estuvo presente en los tejidos normales, pero en adenomas se encontró en un 16% y en células tumorales del colon hasta en un 30% de los casos, de forma similar a lo

detectado en otras series (100,151), pero en el trabajo de Andersen la tinción citoplasmática para CLU fue superior en adenomas (60%) que en carcinomas (20% en tumores primarios y 18% en metástasis hepáticas) (100). Como hemos mencionado, otros dos trabajos previos también observaron el aumento progresivo de la expresión de CLU en la secuencia adenoma-carcinoma (108,151). Nuestros hallazgos sugieren que la hiperregulación de CLU está implicada en la tumorigénesis colónica desde el tejido normal a lesiones premalignas y malignas, tal como nuestro grupo investigador ha descrito para otras localizaciones (86,87).

No detectamos la presencia de CLU en el epitelio normal del colon. De hecho, los estudios previos han encontrado una expresión de CLU en el epitelio normal escasa o inexistente (100,151,159). Sin embargo, Pucci y colaboradores (108) observaron la expresión de CLU nuclear en las células epiteliales normales. Tanto en nuestro trabajo como en el de Andersen y colaboradores (100), se empleó para el análisis el mismo anticuerpo que fue aplicado en el trabajo de Pucci y colaboradores (108). Los motivos para tal discrepancia no se conocen, aunque se sabe que la detección de nCLU puede no ser fácil, dado que las células en las que predomina nCLU están condenadas a morir rápidamente, y por tanto a desaparecer (177).

El hallazgo de CLU en los pólipos adenomatosos indica que la hiperregulación de CLU ocurre muy precozmente en las neoplasias humanas del colon. Por otro lado, la expresión de CLU en el citoplasma de las células tumorales y en las cavidades intercelulares señala que CLU es secretada por las células tumorales. La localización citoplasmática apical ha sido observada en otros estudios en CCR (100,151,159).

Pocos trabajos han comunicado una relación entre la expresión de CLU y la supervivencia en tumores humanos. Cabía esperar que los tumores que expresaran CLU tendrían una tendencia a presentar un peor curso clínico que aquellos que no la expresan. Y de hecho, la mayoría de los estudios que han analizado la supervivencia de neoplasias CLU+ y CLU- han correlacionado la

positividad para CLU con un peor pronóstico (152–157). No obstante, también se ha comunicado un curso favorable (95,158). Se piensa que es posible que CLU ejerza diferentes papeles en función de los distintos tejidos o de las formas particulares de CLU que sean detectadas. En el presente estudio, encontramos que la expresión de CLU se asocia de forma significativa con la disminución de la SLP entre los pacientes con CCR, constituyendo un factor pronóstico independiente para la SLP. Estos resultados son similares a los obtenidos por el grupo de Kevans en estadios II de CCR (160), confirmándose que la expresión de CLU en el CCR se asocia con supervivencias inferiores.

La determinación de CLU podría ayudar a identificar aquellos pacientes con mayor riesgo de recidiva tumoral, y por tanto subsidiarios de beneficiarse de tratamientos más intensivos. Además, el subgrupo de CCRs positivos para CLU puede constituir una población seleccionada candidata a terapias dirigidas contra CLU. De esta forma, el gen de CLU se convierte en una potencial diana terapéutica en el abordaje del CCR, tal como lo demuestran los estudios con oligonucleótidos antisentido que inhiben la expresión de CLU y producen un aumento en la tasa de apoptosis inducida por los tratamientos quimioterápicos convencionales (163–167,169).

5.2 Apoptosis

Como hemos descrito, la homeostasis en el tejido normal se mantiene gracias al balance entre proliferación y apoptosis, procesos biológicos que tienen predilección por determinadas localizaciones dentro de la cripta intestinal. Una explicación para estos patrones de distribución reside en el papel de la muerte celular programada para el control del daño genético. La eliminación de células con mutaciones en su ADN, a través de la apoptosis, evita la replicación y expansión de estas células. Esta función protectora explica por qué encontramos más apoptosis en los tumores que en los tejidos sanos, ya que estos IAs elevados representan los intentos fisiológicos por eliminar

alteraciones genéticas que son frecuentes en las células neoplásicas. Es cierto que las células tumorales son capaces de desarrollar mecanismos para escapar de la apoptosis y convertirse en inmortales. Pero si sólo aquellas células neoplásicas con mutaciones que inhiben la apoptosis sobreviven y continúan proliferando, entonces la apoptosis sirve para seleccionar los especímenes más agresivos para formar parte del tumor.

Además del daño genético, otros factores, como la falta de nutrientes, de factores de crecimiento o un déficit en el aporte de oxígeno, también pueden estimular la muerte celular programada. Sabemos que la hipoxia es un hallazgo común en la mayoría de tumores sólidos, porque las neoplasias de rápida proliferación a menudo sobrepasan la capacidad de los vasos existentes para proporcionarles oxígeno. Las células malignas tienen pues, que adaptarse a su microambiente, lo que les confiere un fenotipo más resistente, aumentando el riesgo de progresión tumoral (56,178).

Como vemos, la relación entre muerte celular y carcinogénesis es estrecha. Otros autores han sugerido otra conexión entre ambos procesos. Han observado que las células apoptóticas pueden ejercer un efecto en el microambiente tumoral y en la respuesta inmune del estroma asociado, lo que da lugar a la activación de la progresión tumoral (179). La caspasa-3, un marcador de apoptosis, ha sido propuesta como la señal clave mediante la cual las células tumorales apoptóticas estimulan el crecimiento y la supervivencia del resto de células tras la acción de la radioterapia (180).

Por todo ello decimos que proliferación y apoptosis son procesos íntimamente asociados. Sin embargo, mientras sabemos que la proliferación celular aumenta gradualmente con la progresión neoplásica, los estudios que hasta la fecha han intentado clarificar si el mismo fenómeno tiene lugar con la apoptosis han dado lugar a resultados discordantes. Para algunos, la fuente de estas discrepancias podría estar en la falta de uniformidad a la hora de seleccionar y preparar los tejidos, lo que influiría en las variables pre-análisis, especialmente en cuanto al tiempo de isquemia fría y el proceso de fijación en formol (181).

Además, los distintos métodos empleados en la detección de la apoptosis podrían influir en los datos obtenidos. Pero de todas formas, independientemente del método seleccionado, la mayoría de autores coinciden en apuntar a un aumento del IA durante el curso de la progresión desde la mucosa normal al adenoma y finalmente el carcinoma, y, cuando se han comparado entre sí, se ha demostrado una buena correlación entre los diferentes métodos, como el anticuerpo M30 o la caspasa-3 (57,61–63,182). A esto hay que añadir que el principal artículo que comunicó un descenso en el IA de mucosa normal a carcinoma (60), adolece de ciertas limitaciones metodológicas, tal como señaló el grupo de Koornstra (181).

Nuestros hallazgos confirman claramente que la activación de la muerte celular programada está implicada en el proceso de carcinogénesis colorrectal que transforma los tejidos normales en lesiones premalignas y malignas. Este aumento progresivo de la tasa apoptótica a lo largo del desarrollo tumoral se ha observado no sólo en el CCR, sino también en neoplasias de otros orígenes. Nuestro grupo de investigación ya evidenció que los IAs son más altos en las metástasis ganglionares que en los carcinomas primarios de mama (183). Otros autores han visto cómo el IA también se correlaciona de forma positiva con el grado patológico en los gliomas (184). También se ha demostrado una elevación del IA en la carcinogénesis del endometrio (185) o del pulmón (186); observándose que el IA aumenta paralelamente al grado de displasia. Y en pacientes asiáticos, los investigadores han encontrado menos apoptosis en las muestras de cáncer de estómago procedentes de estadios precoces de la enfermedad, en comparación con las de estadios avanzados (187,188).

Una vez que ha quedado demostrada la participación de la apoptosis en la carcinogénesis, el siguiente paso lógico sería analizar la asociación entre la apoptosis y el pronóstico de los pacientes. Esto ha sido testado tanto en CCR como en otras neoplasias (189,190). Pero los estudios que han intentado descifrar el significado pronóstico del IA en CCR han arrojado resultados poco concluyentes. Varios trabajos hablan de un pronóstico adverso en casos con apoptosis reducida, algunos de ellos encontrando esta asociación sólo en

carcinomas de colon distal (191). Pero los trabajos más recientes sugieren una relación inversa entre IA y supervivencia (64,65,192).

Dado que proliferación y apoptosis están íntimamente relacionadas, no sería extraño descubrir que, en comparación con los tumores de curso más indolente, los más agresivos son más proliferativos y también presentan IAs más altos. De hecho, tanto el grupo de Watanabe (193) como el de Evertsson (194) observaron un aumento en la actividad apoptótica y proliferativa durante el curso de la progresión tumoral desde estadios tempranos a avanzados de CCR. La misma conclusión fue alcanzada en un estudio de cáncer rectal por Kim y colaboradores (195); estos investigadores también encontraron una asociación entre apoptosis e invasión linfática. Recientemente, patólogos de la Cleveland Clinic que investigaban la relación entre las mutaciones de KRAS y el pronóstico del CCR, hallaron que dichas mutaciones aceleran el recambio celular, lo que estimula tanto la mitosis como la apoptosis y esto a su vez se relaciona con una peor supervivencia (196).

También se han utilizado otros marcadores para analizar la relación entre apoptosis y supervivencia. Por ejemplo, se ha evaluado el significado pronóstico de la caspasa-3, aunque con resultados variables (179,197,198). Cuando el que se ha empleado ha sido el anticuerpo M30, de nuevo se ha observado una menor supervivencia para IA altos (199,200).

En nuestro estudio, publicamos que un IA alto se asocia de forma significativa con una disminución en la SLP y en la SG de los pacientes con CCR invasor. Hasta donde sabemos, era la primera vez que se comunicaban estos datos.

Además, como cabría esperar, el IA fue superior en los estadios más avanzados de la enfermedad, en consonancia con resultados similares que han sido previamente publicados (194,201).

Por tanto, la tasa de apoptosis aumenta a medida que el tumor progresa. Incluso dentro de los estadios más avanzados de la enfermedad, un IA alto se asocia con una SLP más corta. Es decir, la determinación del IA en estadios III

y IV puede indentificar aquellos pacientes en los que cabría esperar un peor pronóstico y que podrían beneficiarse de esquemas de quimioterapia más intensivos.

Si bien el tamaño muestral empleado es limitado, ha sido suficiente para identificar el valor pronóstico de apoptosis, siendo uno de los trabajos sobre detección de apoptosis en CCR con más pacientes incluidos (revisado por Koornstra et al. 2003). Por otra parte, la heterogeneidad de los casos seleccionados, permite que estén representados todos los estadios de CCR, lo que favorece la generalización de los resultados, aunque como hemos visto, el IA tuvo más capacidad para discriminar dos grupos de diferente pronóstico en los estadios III y IV. Esto nos ha motivado a seguir investigando en un grupo de pacientes más homogéneo, seleccionando para ello estadios más avanzados.

En resumen, nuestro trabajo demuestra un aumento de la apoptosis durante la carcinogénesis colorrectal y una marcada relación entre el IA y la supervivencia en el CCR. Esto hace del IA un factor pronóstico independiente en el CCR que puede ayudar a guiar las decisiones terapéuticas. Asimismo, las moléculas implicadas en el proceso de apoptosis y las vías de señalización antiapoptóticas representan marcadores diagnósticos y dianas terapéuticas en potencia.

6

Conclusiones

- 1ª) La expresión de clusterina aumenta progresivamente a lo largo de la secuencia tejido sano-adenoma-carcinoma, lo que sugiere un papel relevante en la carcinogénesis colorrectal.
- 2ª) La sobreexpresión de clusterina se asocia con un peor pronóstico de los pacientes con cáncer colorrectal, por lo que nos permite identificar a pacientes con tumores de comportamiento más agresivo.
- 3ª) El aumento de la actividad apoptótica es un evento frecuente en la carcinogénesis colorrectal y en la progresión tumoral.
- 4ª) Un índice apoptótico elevado se asocia con tumores colorrectales más agresivos y con peor supervivencia.

7

Bibliografía

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase. No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2013. p. <http://globocan.iarc.f>.
2. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global Cancer Statistics: 2011. *CA Cancer J Clin.* 2011;61(2):69–90.
3. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer Statistics , 2012. *CA Cancer J Clin.* 2012;62:10–29.
4. López-Abente G, Ardanaz E, Torrella-Ramos A, Mateos A, Delgado-Sanz C, Chirlaque MD. Changes in colorectal cancer incidence and mortality trends in Spain. *Ann Oncol.* 2010;21(Suppl 3):iii76–i82.
5. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JWW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer.* 2013;49(6):1374–403.
6. Schmoll HJ, Van cutsem E, Stein A, Valentini V, Glimelius B, Haustermans K, et al. ESMO consensus guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. A personalized approach to clinical decision making. *Ann Oncol.* 2012;23(10):2479–516.
7. McKay A, Donalessen J, Helewa RM, Park J, Wirtzfeld D, Hochman D, et al. Does young age influence the prognosis of colorectal cancer: a population-based analysis. *World J Surg Oncol.* 2014;12:370.
8. Blanke CD, Bot BM, Thomas DM, Bleyer A, Kohne CH, Seymour MT, et al. Impact of young age on treatment efficacy and safety in advanced

- colorectal cancer: A pooled analysis of patients from nine first-line phase III chemotherapy trials. *J Clin Oncol*. 2011;29(20):2781–6.
9. O’Connell JB, Maggard M a, Liu JH, Etzioni D a, Livingston EH, Ko CY. Rates of colon and rectal cancers are increasing in young adults. *Am Surg*. 2003;69(10):866–72.
 10. O’Connell JB, Maggard M a, Liu JH, Etzioni D a, Ko CY. Are survival rates different for young and older patients with rectal cancer? *Dis Colon Rectum*. 2004;47(12):2064–9.
 11. Chacko L, Macaron C, Burke CA. Colorectal Cancer Screening and Prevention in Women. *Dig Dis Sci*. 2015;60(3):698–710.
 12. Warren RS, Atreya CE, Niedzwiecki D, Weinberg VK, Donner DB, Mayer RJ, et al. Association of TP53 mutational status and gender with survival after adjuvant treatment for stage III colon cancer: results of CALGB 89803. *Clin Cancer Res*. 2013;19(20):5777–87.
 13. Edge S, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A, editors. *Colon and rectum. AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed. New York, NY: Springer; 2010. p. 143–64.
 14. Hashiguchi Y, Hase K, Kotake K, Ueno H, Shinto E, Mochizuki H, et al. Evaluation of the seventh edition of the tumour, node, metastasis (TNM) classification for colon cancer in two nationwide registries of the United States and Japan. *Color Dis*. 2012;14:1065–74.
 15. Siegel R, Desantis C, Virgo K, Stein K, Mariotto A, Smith T, et al. *Cancer Treatment and Survivorship Statistics*, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2012;62:220–41.
 16. Hamilton S, Bosman F, Boffetta P, Ilyas M, Morreau H. Carcinoma of the colon and rectum. In: Bosman F, Carneiro F, Hruban R, Theise N, editors. *World Health Organization Classification of Tumours of the Digestive System*. 4th ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2010. p. 134–46.
 17. Washington MK, Berlin J, Branton P, Burgart LJ, Carter DK, Fitzgibbons PL, et al. Protocol for the examination of specimens from patients with primary carcinoma of the colon and rectum. *Arch Pathol Lab Med*. 2008;132:1182–93.
 18. Rosty C, Williamson EJ, Clendenning M, Walters RJ, Win AK, Jenkins M a., et al. Should the grading of colorectal adenocarcinoma include microsatellite instability status? *Hum Pathol*. Elsevier Inc.; 2014;45(10):2077–84.
 19. Lee YC, Lee YL, Chuang JP, Lee JC. Differences in survival between colon and rectal cancer from SEER data. *PLoS One*. 2013;8(11):e78709.
 20. Missiaglia E, Jacobs B, D’Ario G, Di Narzo a F, Soneson C, Budinska E, et al. Distal and proximal colon cancers differ in terms of molecular, pathological and clinical features. *Ann Oncol*. 2014;25(10):1995–2001.

21. Loupakis F, Yang D, Yau L, Feng S, Cremolini C, Zhang W, et al. Primary Tumor Location as a Prognostic Factor in Metastatic Colorectal Cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2015;107(3):dju427.
22. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med.* 2015;21(11):1350–6.
23. Herzig DO, Tsikitis VL. Molecular markers for colon diagnosis, prognosis and targeted therapy. *J Surg Oncol.* 2015;111(1):96–102.
24. Morris VK, Lucas F a. S, Overman MJ, Eng C, Morelli MP, Jiang Z-Q, et al. Clinicopathologic characteristics and gene expression analyses of non-KRAS 12/13, RAS-mutated metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2014;25(10):2008–14.
25. Douillard J-Y, Oliner KS, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2013;369(11):1023–34.
26. Sorich MJ, Wiese MD, Rowland A, Kichenadasse G, McKinnon R a, Karapetis CS. Extended RAS mutations and anti-EGFR monoclonal antibody survival benefit in metastatic colorectal cancer: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Ann Oncol.* 2014;26(1):13–21.
27. Pietrantonio F, Petrelli F, Coinu A, Di Bartolomeo M, Borgonovo K, Maggi C, et al. Predictive role of BRAF mutations in patients with advanced colorectal cancer receiving cetuximab and panitumumab: A meta-analysis. *Eur J Cancer. Elsevier Ltd;* 2015;51(5):587–94.
28. De Roock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilas G, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: A retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol.* 2010;11(8):753–62.
29. Sinicrope F a., Shi Q, Smyrk TC, Thibodeau SN, Dienstmann R, Guinney J, et al. Molecular Markers Identify Subtypes of Stage III Colon Cancer Associated With Patient Outcomes. *Gastroenterology. Elsevier, Inc;* 2015;148(1):88–99.
30. Van Cutsem E, Köhne C-H, Láng I, Folprecht G, Nowacki MP, Cascinu S, et al. Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol.* 2011;29(15):2011–9.
31. Fearon ER, Carethers JM. Molecular Subtyping of Colorectal Cancer: Time to Explore Both Intertumoral and Intratumoral Heterogeneity to Evaluate Patient Outcome. *Gastroenterology.* 2015;148(1):10–3.
32. Klingbiel D, Saridaki Z, Roth a. D, Bosman FT, Delorenzi M, Tejpar S. Prognosis of stage II and III colon cancer treated with adjuvant 5-fluorouracil or FOLFIRI in relation to microsatellite status: results of the

- PETACC-3 trial. *Ann Oncol.* 2014;26(1):126–32.
33. Goldstein J, Tran B, Ensor J, Gibbs P, Wong HL, Wong SF, et al. Multicenter retrospective analysis of metastatic colorectal cancer (CRC) with high-level microsatellite instability (MSI-H). *Ann Oncol.* 2014;25(5):1032–8.
 34. Lochhead P, Kuchiba A, Imamura Y, Liao X, Yamauchi M, Nishihara R, et al. Microsatellite instability and braf mutation testing in colorectal cancer prognostication. *J Natl Cancer Inst.* 2013;105(15):1151–6.
 35. Dienstmann R, Guinney J, Delorenzi M, Reynies A De, Roepman P, Vermeulen L, et al. Colorectal Cancer Subtyping Consortium (CRCSC) identification of a consensus of molecular subtypes. *J Clin Oncol.* 2014;32(5s (suppl; abstr 3511)).
 36. Moreno CC, Mittal PK, Sullivan PS, Rutherford R, Staley CA, Cardona K, et al. Colorectal Cancer Initial Diagnosis: Screening Colonoscopy, Diagnostic Colonoscopy, or Emergent Surgery, and Tumor Stage and Size at Initial Presentation. *Clin Colorectal Cancer.* Elsevier Inc.; 2015;1–7.
 37. Labianca R, Nordlinger B, Beretta GD, Mosconi S, Mandalà M, Cervantes A, et al. Early colon cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2013;24(Suppl 6):vi64–72.
 38. Fonseca E, Navarro M. Cáncer de colon y recto. In: Cruz Hernández JJ, Rodríguez Sánchez CA, del Barco Morillo E, editors. *Oncología clínica.* 4^a ed. Madrid: Nova Sidonia; 2008. p. 433–49.
 39. Von Karsa L, Patnick J, Segnan N. European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening and diagnosis: Overview and introduction to the full Supplement publication. *Endoscopy.* 2013;45(1):51–9.
 40. Stintzing S. Management of colorectal cancer. *F1000Prime Rep.* 2014;6:108.
 41. Kanas GP, Taylor A, Primrose JN, Langeberg WJ, Kelsh M a., Mowat FS, et al. Survival after liver resection in metastatic colorectal cancer: Review and meta-analysis of prognostic factors. *Clin Epidemiol.* 2012;4(1):283–301.
 42. Tournigand C, André T, Achille E, Lledo G, Flesh M, Mery-Mignard D, et al. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: A randomized GERCOR study. *J Clin Oncol.* 2004;22(2):229–37.
 43. Heinemann V, Douillard JY, Ducreux M, Peeters M. Targeted therapy in metastatic colorectal cancer - An example of personalised medicine in action. *Cancer Treat Rev.* 2013;39(6):592–601.
 44. Van de Velde CJH. Surgery: Palliative primary tumour resection in

- mCRC—debate continues. *Nat Rev Clin Oncol*. Nature Publishing Group; 2015;12(3):129–30.
45. Muto T, Bussey HJ MB. The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer*. 1975;36(6):2251–70.
 46. Ilyas M, Straub J, Tomlinson IP, Bodmer WF. Genetic pathways in colorectal and other cancers. *Eur J Cancer*. 1999;35(14):1986–2002.
 47. Frattini M, Balestra D, Suardi S, Oggionni M, Alberici P, Radice P, et al. Different genetic features associated with colon and rectal carcinogenesis. *Clin Cancer Res*. 2004;10(12 Pt 1):4015–21.
 48. Teran a., Arias Loste MT, De La Peña J. *Cáncer de colon y recto*. Medicine (Baltimore). Elsevier Masson SAS; 2012;11(7):420–30.
 49. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990;61(5):759–67.
 50. Vogelstein B, Kinzler KW. Multistep nature of cancer. *Trends Genet*. 1993;9(4):138–41.
 51. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from Hereditary Colorectal Cancer. *Cell*. 1996;87(2):159–70.
 52. Gumbiner BM. Signal transduction of beta-catenin. *Curr Opin Cell Biol*. 1995;7(5):634–40.
 53. Behrens J, von Kries JP, Kühl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, et al. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature*. 1996;382(6592):638–42.
 54. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science*. 1991;253(5015):49–53.
 55. Barker N, van de Wetering M, Clevers H. The intestinal stem cell. *Genes Dev*. 2008;22(14):1856–64.
 56. Aotake T, Lu CD, Chiba Y, Muraoka R, Tanigawa N. Changes of angiogenesis and tumor cell apoptosis during colorectal carcinogenesis. *Clin Cancer Res*. 1999;5(1):135–42.
 57. Sinicrope FA, Roddey G, McDonnell TJ, Shen Y, Cleary KR, Stephens LC. Increased apoptosis accompanies neoplastic development in the human colorectum. *Clin Cancer Res*. 1996;2(12):1999–2006.
 58. Boman BM, Huang E. Human colon cancer stem cells: A new paradigm in gastrointestinal oncology. *J Clin Oncol*. 2008;26(17):2828–38.
 59. Marzban H, Del Bigio MR, Alizadeh J, Ghavami S, Zachariah RM, Rastegar M. Cellular commitment in the developing cerebellum. *Front Cell Neurosci*. 2015;8(450):1–26.
 60. Bedi A, Pasricha PJ, Akhtar AJ, Barber JP, Bedi GC, Giardiello FM, et al. Inhibition of apoptosis during development of colorectal cancer. *Cancer Res*. 1995;55(9):1811–6.

61. Baretton GB, Diebold J, Christoforis G, Vogt M, Müller C, Dopfer K, et al. Apoptosis and immunohistochemical bcl-2 expression in colorectal adenomas and carcinomas. Aspects of carcinogenesis and prognostic significance. *Cancer*. 1996;77(2):255–64.
62. Koornstra JJ, Rijcken FEM, De Jong S, Hollema H, de Vries EGE, Kleibeuker JH. Assessment of apoptosis by M30 immunoreactivity and the correlation with morphological criteria in normal colorectal mucosa, adenomas and carcinomas. *Histopathology*. 2004;44(1):9–17.
63. De Oliveira Lima F, De Oliveira Costa H, Barrezueta LF, Fujiyama Oshima CT, Silva Jr. JA, Gomes TS, et al. Immunoexpression of inhibitors of apoptosis proteins and their antagonist SMAC/DIABLO in colorectal carcinoma: Correlation with apoptotic index, cellular proliferation and prognosis. *Oncol Rep*. 2009;22(2):295–303.
64. Bendardaf R, Ristamäki R, Kujari H, Laine J, Lamlum H, Collan Y, et al. Apoptotic index and bcl-2 expression as prognostic factors in colorectal carcinoma. *Oncology*. 2003;64(4):435–42.
65. Hilska M, Collan YU, O Laine VJ, Kössi J, Hirsimäki P, Laato M, et al. The significance of tumor markers for proliferation and apoptosis in predicting survival in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2005;48(12):2197–208.
66. Fritz I, Murphy B. Clusterin Insights into a multifunctional protein. *Trends Endocrinol Metab*. 1993;4(2):41–5.
67. Rosenberg ME, Silkensen J. Clusterin: Physiologic and pathophysiologic considerations. *Int J Biochem Cell Biol*. 1995;27(7):633–45.
68. Jones SE, Jomary C. Clusterin. *Int J Biochem Cell Biol*. 2002;34(5):427–31.
69. Prochnow H, Gollan R, Rohne P, Hassemer M, Koch-Brandt C, Baiersdörfer M. Non-Secreted Clusterin Isoforms Are Translated in Rare Amounts from Distinct Human mRNA Variants and Do Not Affect Bax-Mediated Apoptosis or the NF- κ B Signaling Pathway. *PLoS One*. 2013;8(9):e75303.
70. Kissinger C, Skinner MK, Griswold MD. Analysis of Sertoli cell-secreted proteins by two-dimensional gel electrophoresis. *Biol Reprod*. 1982;27(1):233–40.
71. Blaschuk O, Burdzy K, Fritz IB. Purification and characterization of a cell-aggregating factor (clusterin), the major glycoprotein in ram rete testis fluid. *J Biol Chem*. 1983;258(12):7714–20.
72. Fritz IB, Burdzy K, Séthell B, Blaschuk O. Ram rete testis fluid contains a protein (clusterin) which influences cell-cell interactions in vitro. *Biol Reprod*. 1983;28(5):1173–88.
73. Trougakos IP, Gonos ES. Clusterin/Apolipoprotein J in human aging and cancer. *Int J Biochem Cell Biol*. 2002;34(11):1430–48.
74. Shannan B, Seifert M, Leskov K, Willis J, Boothman D, Tilgen W, et al.

- Challenge and promise: roles for clusterin in pathogenesis, progression and therapy of cancer. *Cell Death Differ.* 2006;13(1):12–9.
75. Bettuzzi S. Introduction. *Adv Cancer Res.* 2009;104(9):1–8.
 76. Fischer-Colbrie R, Zangerle R, Frischenschlager I, Weber A, Winkler H. Isolation and immunological characterization of a glycoprotein from adrenal chromaffin granules. *J Neurochem.* 1984;42(4):1008–16.
 77. Léger JG, Montpetit ML, Tenniswood MP. Characterization and cloning of androgen-repressed mRNAs from rat ventral prostate. *Biochem Biophys Res Commun.* 1987;147(1):196–203.
 78. Bettuzzi S, Hiipakka R a, Gilna P, Liao ST. Identification of an androgen-repressed mRNA in rat ventral prostate as coding for sulphated glycoprotein 2 by cDNA cloning and sequence analysis. *Biochem J.* 1989;257(1):293–6.
 79. Michel D, Gillet G, Volovitch M, Pessac B, Calothy G, Brun G. Expression of a novel gene encoding a 51.5 kD precursor protein is induced by different retroviral oncogenes in quail neuroretinal cells. *Oncogene Res.* 1989;4(2):127–36.
 80. Kirszbaum L, Sharpe J a, Murphy B, d'Apice a J, Classon B, Hudson P, et al. Molecular cloning and characterization of the novel, human complement-associated protein, SP-40,40: a link between the complement and reproductive systems. *EMBO J.* 1989;8(3):711–8.
 81. Jenne DE, Tschopp J. Molecular structure and functional characterization of a human complement cytolysis inhibitor found in blood and seminal plasma: identity to sulfated glycoprotein 2, a constituent of rat testis fluid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(18):7123–7.
 82. De Silva H V., Stuart WD, Park YB, Mao SJT, Gil CM, Wetterau JR, et al. Purification and characterization of apolipoprotein J. *J Biol Chem.* 1990;265(24):14292–7.
 83. James RW, Hochstrasser a C, Borghini I, Martin B, Pometta D, Hochstrasser D. Characterization of a human high density lipoprotein-associated protein, NA1/NA2. Identity with SP-40,40, an inhibitor of complement-mediated cytolysis. *Arterioscler Thromb.* 1991;11(3):645–52.
 84. Jones SE, Meerabux JMA, Yeats DA, Neal MJ. Analysis of differentially expressed genes in retinitis pigmentosa retinas. Altered expression of clusterin mRNA. *FEBS Lett.* 1992;300(3):279–82.
 85. Trougakos IP, Gonos ES. Oxidative stress in malignant progression: The role of clusterin, a sensitive cellular biosensor of free radicals. *Adv Cancer Res.* 2009;104(9):171–210.
 86. Redondo M, Villar E, Torres-Muñoz J, Tellez T, Morell M, Petito CK. Overexpression of Clusterin in Human Breast Carcinoma. *Am J Pathol.* 2000;157(2):393–9.
 87. Redondo M, Esteban F, González-Moles MA, Delgado-Rodríguez M,

- Nevado M, Torres-Muñoz JE, et al. Expression of the antiapoptotic proteins clusterin and Bcl-2 in laryngeal squamous cell carcinomas. *Tumor Biol.* 2006;27(4):195–200.
88. Miyake H, Hara I, Kamidono S, Gleave ME. Synergistic chemsensitization and inhibition of tumor growth and metastasis by the antisense oligodeoxynucleotide targeting clusterin gene in a human bladder cancer model. *Clin Cancer Res.* 2001;7(12):4245–52.
 89. Miyake H, Hara S, Arakawa S, Kamidono S, Hara I. Over expression of clusterin is an independent prognostic factor for nonpapillary renal cell carcinoma. *J Urol.* 2002;167(2 Pt 1):703–6.
 90. Zellweger T, Kiyama S, Chi K, Miyake H, Adomat H, Skov K, et al. Overexpression of the cytoprotective protein clusterin decreases radiosensitivity in the human LNCaP prostate tumour model. *BJU Int.* 2003;92(4):463–9.
 91. July L V, Beraldi E, So A, Fazli L, Evans K, English JC, et al. Nucleotide-based therapies targeting clusterin chemosensitize human lung adenocarcinoma cells both in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther.* 2004;3(3):223–32.
 92. Bettuzzi S, Scorcioni F, Astancolle S, Davalli P, Scaltriti M, Corti A. Clusterin (SGP-2) transient overexpression decreases proliferation rate of SV40-immortalized human prostate epithelial cells by slowing down cell cycle progression. *Oncogene.* 2002;21(27):4328–34.
 93. Thomas-Tikhonenko A, Viard-Leveugle I, Dews M, Wehrli P, Seignani C, Yu D, et al. Myc-Transformed Epithelial Cells Down-Regulate Clusterin, Which Inhibits Their Growth in Vitro and Carcinogenesis in Vivo. *Cancer Res.* 2004;64(9):3126–36.
 94. Zhang LY, Ying WT, Mao YS, He HZ, Liu Y, Wang HX, et al. Loss of clusterin both in serum and tissue correlates with the tumorigenesis of esophageal squamous cell carcinoma via proteomics approaches. *World J Gastroenterol.* 2003;9(4):650–4.
 95. Xie M-J, Motoo Y, Su S-B, Mouri H, Ohtsubo K, Matsubara F, et al. Expression of clusterin in human pancreatic cancer. *Pancreas.* 2002;25(3):234–8.
 96. Purrello M, Bettuzzi S, Di Pietro C, Mirabile E, Di Blasi M, Rimini R, et al. The gene for SP-40,40, human homolog of rat sulfated glycoprotein 2, rat clusterin, and rat testosterone-repressed prostate message 2, maps to chromosome 8. *Genomics.* 1991;10(1):151–6.
 97. Dietzsch E, Murphy BF, Kirszbaum L, Walker ID, Garson OM. Regional localization of the gene for clusterin (SP-40,40; gene symbol CLI) to human chromosome 8p12-->p21. *Cytogenet Cell Genet.* 1992;61(3):178–9.
 98. Wong P, Taillefer D, Lakins J, Pineault J, Chader G, Tenniswood M. Molecular characterization of human TRPM-2/clusterin, a gene

- associated with sperm maturation, apoptosis and neurodegeneration. *Eur J Biochem.* 1994;221(3):917–25.
99. Jenne DE, Tschopp J. Clusterin: the intriguing guises of a widely expressed glycoprotein. *Trends Biochem Sci.* 1992;17(4):154–9.
 100. Andersen CL, Schepeler T, Thorsen K, Birkenkamp-Demtröder K, Mansilla F, Aaltonen LA, et al. Clusterin expression in normal mucosa and colorectal cancer. *Mol Cell Proteomics.* 2007;6(6):1039–48.
 101. Schepeler T, Mansilla F, Christensen LL, Orntoft TF, Andersen CL. Clusterin expression can be modulated by changes in TCF1-mediated Wnt signaling. *J Mol Signal.* 2007;2:6.
 102. Bonacini M, Coletta M, Ramazzina I, Naponelli V, Modernelli A, Davalli P, et al. Distinct promoters, subjected to epigenetic regulation, drive the expression of two clusterin mRNAs in prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1849(1):44–54.
 103. Leskov KS, Klovov DY, Li J, Kinsella TJ, Boothman DA. Synthesis and functional analyses of nuclear clusterin, a cell death protein. *J Biol Chem.* 2003;278(13):11590–600.
 104. Kirszbaum L, Bozas S, Walker I. SP-40,40, a protein involved in the control of the complement pathway, possesses a unique array of disulphide bridges. *FEBS Lett.* 1992;297(1-2):70–6.
 105. Zoubeydi A, Chi K, Gleave M. Targeting the cytoprotective chaperone, clusterin, for treatment of advanced cancer. *Clin Cancer Res.* 2010;16(4):1088–93.
 106. Bhutia SK, Das SK, Kegelman TP, Azab B, Dash R, Su Z, et al. mda-7/IL-24 differentially regulates soluble and nuclear clusterin in prostate cancer. 2012;227(5):1805–13.
 107. Burkey BF, de Silva H V, Harmony JAK. Intracellular processing of apolipoprotein J precursor to the mature heterodimer. *J Lipid Res.* 1991;32(6):1039–48.
 108. Pucci S, Bonanno E, Pichiorri F, Angeloni C, Spagnoli LG. Modulation of different clusterin isoforms in human colon tumorigenesis. *Oncogene.* 2004;23(13):2298–304.
 109. Wyatt A, Yerbury J, Poon S, Dabbs R, Wilson M. Chapter 6: The chaperone action of Clusterin and its putative role in quality control of extracellular protein folding. *Adv Cancer Res.* 2009;104:89–114.
 110. Mazzarelli P, Pucci S, Spagnoli LG. CLU and colon cancer. The dual face of CLU: From normal to malignant phenotype. *Adv Cancer Res.* 2009;105(09):45–61.
 111. Rizzi F, Coletta M, Bettuzzi S. Clusterin (CLU): From one gene and two transcripts to many proteins. *Adv Cancer Res.* 2009;104(1):9–23.
 112. Boggs LN, Fuson KS, Baez M, Churgay L, McClure D, Becker G, et al.

- Clusterin (Apo J) protects against in vitro amyloid-beta (1-40) neurotoxicity. *J Neurochem.* 1996;67(3):1324–7.
113. Poon S, Treweek TM, Wilson MR, Easterbrook-Smith SB, Carver J a. Clusterin is an extracellular chaperone that specifically interacts with slowly aggregating proteins on their off-folding pathway. *FEBS Lett.* 2002;513(2-3):259–66.
 114. Park DC, Yeo SG, Wilson MR, Yerbury JJ, Kwong J, Welch WR, et al. Clusterin interacts with Paclitaxel and confer Paclitaxel resistance in ovarian cancer. *Neoplasia.* 2008;10(9):964–72.
 115. Lanneau D, Brunet M, Frisan E, Solary E, Fontenay M, Garrido C. Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *J Cell Mol Med.* 2008;12(3):743–61.
 116. Albany C, Hahn NM. Heat shock and other apoptosis-related proteins as therapeutic targets in prostate cancer. *Asian J Androl.* 2014;16(3):359–63.
 117. Trougakos IP. The Molecular Chaperone Apolipoprotein J/Clusterin as a Sensor of Oxidative Stress: Implications in Therapeutic Approaches - A Mini-Review. *Gerontology.* 2013;59(6):514–23.
 118. Baralla A, Sotgiu E, Deiana M, Pasella S, Pinna S, Mannu A, et al. Plasma Clusterin and Lipid Profile: A Link with Aging and Cardiovascular Diseases in a Population with a Consistent Number of Centenarians. *PLoS One.* 2015;10(6):e0128029.
 119. Gelissen IC, Hochgrebe T, Wilson MR, Easterbrook-Smith SB, Jessup W, Dean RT, et al. Apolipoprotein J (clusterin) induces cholesterol export from macrophage-foam cells: a potential anti-atherogenic function? *Biochem J.* 1998;331(Pt 1):231–7.
 120. Murphy BF, Kirszbaum L, Walker ID, d'Apice JF. Sp-40,40, a newly identified normal human serum protein found in the SC5b-9 complex of complement and in the immune deposits in glomerulonephritis. *J Clin Invest.* 1988;81(6):1858–64.
 121. Zhang H, Kim JK, Edwards C a, Xu Z, Taichman R, Wang C-Y. Clusterin inhibits apoptosis by interacting with activated Bax. *Nat Cell Biol.* 2005;7(9):909–15.
 122. Sensibar JA, Sutkowski DM, Raffo A, Buttyan R, Griswold MD, Sylvester SR, et al. Prevention of cell death induced by tumor necrosis factor alpha in LNCaP cells by overexpression of sulfated glycoprotein-2 (clusterin). *Cancer Res.* 1995;55(11):2431–7.
 123. Trougakos IP, Lourda M, Antonelou MH, Kletsas D, Gorgoulis VG, Papassideri IS, et al. Intracellular Clusterin Inhibits Mitochondrial Apoptosis by Suppressing p53-Activating Stress Signals and Stabilizing the Cytosolic Ku70-Bax Protein Complex. *Clin Cancer Res.* 2009;15(1):48–59.

124. Kim N, Yoo JC, Han JY, Hwang EM, Kim YS, Jeong EY, et al. Human nuclear clusterin mediates apoptosis by interacting with Bcl-XL through C-terminal coiled coil domain. *J Cell Physiol.* 2012;227(3):1157–67.
125. Lee DH, Ha JH, Kim Y, Bae KH, Park JY, Choi WS, et al. Interaction of a putative BH3 domain of clusterin with anti-apoptotic Bcl-2 family proteins as revealed by NMR spectroscopy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;408(4):541–7.
126. Yang C-R, Leskov K, Hosley-Eberlein K, Criswell T, Pink JJ, Kinsella TJ, et al. Nuclear clusterin/XIP8, an x-ray-induced Ku70-binding protein that signals cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(11):5907–12.
127. Lee K-B, Jeon J-H, Choi I, Kwon O-Y, Yu K, You K-H. Clusterin, a novel modulator of TGF-beta signaling, is involved in Smad2/3 stability. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;366(4):905–9.
128. Pajak B, Orzechowski A. Regulation of clusterin activity by calcium. *Adv Cancer Res.* 2009;104(09):33–58.
129. Tung PS, Burdzy K, Wong K, Fritz IB. Competition between cell-substratum interactions and cell-cell interactions. *J Cell Physiol.* 1992;152(2):410–21.
130. Diemer V, Hoyle M, Baglioni C, Millis AJT. Expression of Porcine Complement Cytolysis Inhibitor mRNA in Cultured Aortic Smooth Muscle Cells. *J Biol Chem.* 1992;267(8):5257–64.
131. July L V, Akbari M, Zellweger T, Jones EC, Goldenberg SL, Gleave ME. Clusterin expression is significantly enhanced in prostate cancer cells following androgen withdrawal therapy. *Prostate.* 2002;50(3):179–88.
132. Scaltriti M, Bettuzzi S, Sharrard RM, Caporali a, Caccamo a E, Maitland NJ. Clusterin overexpression in both malignant and nonmalignant prostate epithelial cells induces cell cycle arrest and apoptosis. *Br J Cancer.* 2004;91(10):1842–50.
133. Scaltriti M, Santamaria A, Paciucci R, Bettuzzi S. Intracellular clusterin induces G2-M phase arrest and cell death in PC-3 prostate cancer cells1. *Cancer Res.* 2004;64(17):6174–82.
134. Cochrane DR, Wang Z, Muramaki M, Gleave ME, Nelson CC. Differential regulation of clusterin and its isoforms by androgens in prostate cells. *J Biol Chem.* 2007;282(4):2278–87.
135. Collard MW, Griswold MD. Biosynthesis and molecular cloning of sulfated glycoprotein 2 secreted by rat Sertoli cells. *Biochemistry.* 1987;26(12):3297–303.
136. Danik M, Chabot JG, Hassan-Gonzalez D, Suh M, Quirion R. Localization of sulfated glycoprotein-2/clusterin mRNA in the rat brain by in situ hybridization. *J Comp Neurol.* 1993;334(2):209–27.
137. Scaltriti M, Brausi M, Amorosi A, Caporali A, D'Arca D, Astancolle S, et al. Clusterin (SGP-2, ApoJ) expression is downregulated in low- and high-

- grade human prostate cancer. *Int J Cancer*. 2004;108(1):23–30.
138. Aronow BJ, Lund SD, Brown TL, Harmony J a, Witte DP. Apolipoprotein J expression at fluid-tissue interfaces: potential role in barrier cytoprotection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(2):725–9.
 139. Park S, Mathis KW, Lee IK. The physiological roles of apolipoprotein J/clusterin in metabolic and cardiovascular diseases. *Rev Endocr Metab Disord*. 2014;15(1):45–53.
 140. Goetz EM, Shankar B, Zou Y, Morales JC, Luo X, Araki S, et al. ATM-dependent IGF-1 induction regulates secretory clusterin expression after DNA damage and in genetic instability. *Oncogene*. Nature Publishing Group; 2011;30(35):3745–54.
 141. Trougakos IP, Gonos ES. Regulation of clusterin/apolipoprotein J, a functional homologue to the small heat shock proteins, by oxidative stress in ageing and age-related diseases. *Free Radic Res*. 2006;40(12):1324–34.
 142. Michel D, Chatelain G, North S, Brun G. Stress-induced transcription of the clusterin / apoJ gene. 1997;50(Pt 1):45–50.
 143. Serrano A, Redondo M, Tellez T, Castro-Vega I, Roldan MJ, Mendez R, et al. Regulation of clusterin expression in human cancer via DNA methylation. *Tumour Biol*. 2009;30(5-6):286–91.
 144. Deb M, Sengupta D, Rath SK, Kar S, Parbin S, Shilpi A, et al. Clusterin gene is predominantly regulated by histone modifications in human colon cancer and ectopic expression of the nuclear isoform induces cell death. *Biochim Biophys Acta*. Elsevier B.V.; 2015;1852(8):1630–45.
 145. Steinberg J, Oyasu R, Lang S, Sintich S, Rademaker a, Lee C, et al. Intracellular levels of SGP-2 (Clusterin) correlate with tumor grade in prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 1997;3(10):1707–11.
 146. Yom CK, Woo HY, Min SY, Kang SY, Kim HS. Clusterin overexpression and relapse-free survival in breast cancer. *Anticancer Res*. 2009;29(10):3909–12.
 147. Redondo M, Esteban F, González-Moles M a, Delgado-Rodríguez M, Nevado M, Torres-Muñoz JE, et al. Expression of the antiapoptotic proteins clusterin and bcl-2 in laryngeal squamous cell carcinomas. *Tumour Biol*. 2006;27(4):195–200.
 148. Xie D, Lau SH, Sham JST, Wu Q-L, Fang Y, Liang L-Z, et al. Up-regulated expression of cytoplasmic clusterin in human ovarian carcinoma. *Cancer*. 2005;103(2):277–83.
 149. Bettuzzi S, Davalli P, Astancolle S, Carani C, Madeo B, Tampieri A, et al. Tumor progression is accompanied by significant changes in the levels of expression of polyamine metabolism regulatory genes and clusterin (sulfated glycoprotein 2) in human prostate cancer specimens. *Cancer Res*. 2000;60(1):28–34.

150. Liu B, Han MTZ, Zhang J, Lu P, Li J, Song N, et al. Downregulation of Clusterin Expression in Human Testicular Seminoma. *Cell Physiol Biochem*. 2013;32(4):1117–23.
151. Xie D, Sham JST, Zeng WF, Che LH, Zhang M, Wu HX, et al. Oncogenic role of clusterin overexpression in multistage colorectal tumorigenesis and progression. *World J Gastroenterol*. 2005;11(21):3285–9.
152. Kurahashi T, Muramaki M, Yamanaka K, Hara I, Miyake H. Expression of the secreted form of clusterin protein in renal cell carcinoma as a predictor of disease extension. *BJU Int*. 2005;96(6):895–9.
153. Kang YK, Hong SW, Lee H, Kim WH. Overexpression of clusterin in human hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol*. 2004;35(11):1340–6.
154. Krüger S, Mahnken A, Kausch I, Feller AC. Value of clusterin immunoreactivity as a predictive factor in muscle-invasive urothelial bladder carcinoma. *Urology*. 2006;67(1):105–9.
155. Miyake H, Yamanaka K, Muramaki M, Kurahashi T, Gleave M, Hara I. Enhanced expression of the secreted form of clusterin following neoadjuvant hormonal therapy as a prognostic predictor in patients undergoing radical prostatectomy for prostate cancer. *Oncol Rep*. 2005;14(5):1371–5.
156. Krüger S, Ola V, Fischer D, Feller AC, Friedrich M. Prognostic significance of clusterin immunoreactivity in breast cancer. *Neoplasma*. 2007;54(1):46–50.
157. Zhang S, Zhang D, Zhu Y, Guo H, Zhao X, Sun B. Clusterin expression and univariate analysis of overall survival in human breast cancer. *Technol Cancer Res Treat*. 2006;5(6):573–8.
158. Albert JM, Gonzalez A, Massion PP, Chen H, Olson SJ, Shyr Y, et al. Cytoplasmic clusterin expression is associated with longer survival in patients with resected non small cell lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007;16(9):1845–51.
159. Chen X, Halberg RB, Ehrhardt WM, Torrealba J, Dove WF. Clusterin as a biomarker in murine and human intestinal neoplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(16):9530–5.
160. Kevans D, Foley J, Tenniswood M, Sheahan K, Hyland J, O'Donoghue D, et al. High clusterin expression correlates with a poor outcome in stage II colorectal cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18(2):393–9.
161. Djeu JY, Wei S. Clusterin and chemoresistance. *Adv Cancer Res*. 1st ed. Elsevier Inc.; 2009;105(09):77–92.
162. Redondo M, Tellez T, Roldan MJ. The role of clusterin (CLU) in malignant transformation and drug resistance in breast carcinomas. *Adv Cancer Res*. 2009;105(09):21–43.
163. Gleave M, Miyake H. Use of antisense oligonucleotides targeting the

- cytoprotective gene, clusterin, to enhance androgen- and chemo-sensitivity in prostate cancer. *World J Urol.* 2005;23(1):38–46.
164. Redondo M, Téllez T, Roldan MJ, Serrano A, García-Aranda M, Gleave ME, et al. Anticlusterin treatment of breast cancer cells increases chemotherapy- and tamoxifen sensitivity and counteracts the inhibitory action of dexamethasone on chemotherapy-induced cytotoxicity. *Breast Cancer Res.* 2007;9(6):R86.
 165. Laskin JJ, Nicholas G, Lee C, Gitlitz B, Vincent M, Cormier Y, et al. Phase I/II Trial of Custirsen (OGX-011), an Inhibitor of Clusterin, in Combination with a Gemcitabine and Platinum Regimen in Patients with Previously Untreated Advanced Non-small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2012;7(3):579–86.
 166. Saad F, Hotte S, North S, Eigl B, Chi K, Czaykowski P, et al. Randomized phase II trial of Custirsen (OGX-011) in combination with docetaxel or mitoxantrone as second-line therapy in patients with metastatic castrate-resistant prostate cancer progressing after first-line docetaxel: CUOG trial P-06c. *Clin Cancer Res.* 2011;17(17):5765–73.
 167. Chi KN, Hotte SJ, Yu EY, Tu D, Eigl BJ, Tannock I, et al. Randomized phase II study of docetaxel and prednisone with or without OGX-011 in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28(27):4247–54.
 168. Higano CS. Potential use of custirsen to treat prostate cancer. *Onco Targets Ther.* 2013;6:785–97.
 169. Chi KN, Higano CS, Blumenstein BA, Reeves JA, Feyerabend S, Gravis G, et al. Phase III SYNERGY trial: Docetaxel +/- custirsen and overall survival in patients (pts) with metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC) and poor prognosis. *J Clin Oncol.* 2015;33(Suppl 15: Abstr 5009).
 170. Bertuzzi M, Marelli C, Bagnati R, Colombi A, Fanelli R, Saieva C, et al. Plasma clusterin as a candidate pre-diagnosis marker of colorectal cancer risk in the Florence cohort of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition : a pilot study. *BMC Cancer.* 2015;15:56.
 171. Bonanno E, Rulli F, Galatà G, Pucci S, Sesti F, Maria Farinon A, et al. Stool test for colorectal cancer screening: What is going on? *Surg Oncol.* 2007;16(Suppl 1):S43–5.
 172. Blumenstein B, Saad F, Hotte S, Chi KN, Eigl B, Gleave M, et al. Reduction in serum clusterin is a potential therapeutic biomarker in patients with castration-resistant prostate cancer treated with custirsen. *Cancer Med.* 2013;2(4):468–77.
 173. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol.* 1992;119(3):493–501.
 174. Miyake H, Nelson C, Rennie PS, Gleave ME. Testosterone-repressed

prostate message-2 is an antiapoptotic gene involved in progression to androgen independence in prostate cancer. *Cancer Res.* 2000;60(1):170–6.

175. Chen T. Clusterin-Mediated Apoptosis Is Regulated by Adenomatous Polyposis Coli and Is p21 Dependent but p53 Independent. *Cancer Res.* 2004;64(20):7412–9.
176. Redondo M, Rodrigo I, Alcaide J, Tellez T, Roldan MJ, Funez R, et al. Clusterin expression is associated with decreased disease-free survival of patients with colorectal carcinomas. *Histopathology.* 2010;56(7):932–6.
177. Bettuzzi S, Rizzi F. Nuclear CLU (nclu) and the fate of the cell. *Adv Cancer Res.* 2009;104(09):59–88.
178. Rohwer N, Cramer T. Hypoxia-mediated drug resistance: Novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways. *Drug Resist Updat.* 2011;14(3):191–201.
179. Noble P, Vyas M, Al-Attar A, Durrant S, Scholefield J, Durrant L. High levels of cleaved caspase-3 in colorectal tumour stroma predict good survival. *Br J Cancer.* Nature Publishing Group; 2013;108(10):2097–105.
180. Huang Q, Li F, Liu X, Li W, Shi W, Liu F-F, et al. Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy. *Nat Med.* 2011;17(7):860–6.
181. Koornstra JJ, de Jong S, Hollema H, de Vries EGE, Kleibeuker JH. Changes in apoptosis during the development of colorectal cancer: a systematic review of the literature. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2003;45(1):37–53.
182. Carr NJ. M30 expression demonstrates apoptotic cells, correlates with in situ end-labeling, and is associated with Ki-67 expression in large intestinal neoplasms. *Arch Pathol Lab Med.* 2000;124(12):1768–72.
183. Villar E, Redondo M, Rodrigo I, Garcia J, Avila E, Matilla A. bcl-2 Expression and apoptosis in primary and metastatic breast carcinomas. *Tumour Biol.* 2001;22(3):137–45.
184. Zhen H-N, Zhang X, Hu P-Z, Yang T-T, Fei Z, Zhang J-N, et al. Survivin expression and its relation with proliferation, apoptosis, and angiogenesis in brain gliomas. *Cancer.* 2005;104(12):2775–83.
185. Atasoy P, Bozdogan O, Erekul S, Bozdogan N, Bayram M. Fas-mediated pathway and apoptosis in normal, hyperplastic, and neoplastic endometrium. *Gynecol Oncol.* 2003;91(2):309–17.
186. Törmänen U, Nuorva K, Soini Y, Paakko P. Apoptotic activity is increased in parallel with the metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence of the bronchial epithelium. *Br J Cancer.* 1999;79(5-6):996–1002.
187. Koshida Y, Saegusa M, Okayasu I. Apoptosis , cell proliferation and expression of Bcl12 and Bax in gastric carcinomas : immunohistochemical and clinicopathological study. 1997;75(3):367–73.

188. Ishii HH, Gobe GC, Pan W, Yoneyama J, Ebihara Y. Apoptosis and cell proliferation in the development of gastric carcinomas: associations with c-myc and p53 protein expression. *J Gastroenterol Hepatol.* 2002;17(9):966–72.
189. Törmänen U, Eerola AK, Rainio P, Vähäkangas K, Soini Y, Sormunen R, et al. Enhanced apoptosis predicts shortened survival in non-small cell lung carcinoma. *Cancer Res.* 1995;55(23):5595–602.
190. de Jong JS, van Diest PJ, Baak JP. Number of apoptotic cells as a prognostic marker in invasive breast cancer. *Br J Cancer.* 2000;82(2):368–73.
191. Sinicrope F a, Hart J, Hsu H, Carcinomas NC, Lemoine M, Michelassi F. Apoptotic and mitotic indices predict survival rates in lymph node-negative colon carcinomas. 1999;5(7):1793–804.
192. Garrity MM, Burgart LJ, Mahoney MR, Windschitl HE, Salim M, Wiesenfeld M, et al. Prognostic value of proliferation, apoptosis, defective DNA mismatch repair, and p53 overexpression in patients with resected Dukes' B2 or C colon cancer: a North Central Cancer Treatment Group Study. *J Clin Oncol.* 2004;22(9):1572–82.
193. Watanabe I, Toyoda M, Okuda J, Tenjo T, Tanaka K, Yamamoto T, et al. Detection of apoptotic cells in human colorectal cancer by two different in situ methods: antibody against single-stranded DNA and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end-labeling (TUNEL) methods. *Jpn J Cancer Res.* 1999;90(2):188–93.
194. Evertsson S, Bartik Z, Zhang H, Jansson A, Sun XF. Apoptosis in relation to proliferating cell nuclear antigen and Dukes' stage in colorectal adenocarcinoma. *Int J Oncol.* 1999;15(1):53–8.
195. Kim Y-H, Lee JH, Chun H, Nam S-J, Lee W-Y, Song SY, et al. Apoptosis and its correlation with proliferative activity in rectal cancer. *J Surg Oncol.* 2002;79(4):236–42.
196. Liu X, Jakubowski M, Hunt JL. KRAS gene mutation in colorectal cancer is correlated with increased proliferation and spontaneous apoptosis. *Am J Clin Pathol.* 2011;135(2):245–52.
197. Leonardos L, Butler LM, Hewett PJ, Zalewski PD, Cowled P a. The activity of caspase-3-like proteases is elevated during the development of colorectal carcinoma. *Cancer Lett.* 1999;143(1):29–35.
198. Jonges LE, Nagelkerke JF, Ensink NG, van der Velde E a, Tollenaar R a, Fleuren GJ, et al. Caspase-3 activity as a prognostic factor in colorectal carcinoma. *Lab Investig.* 2001;81(5):681–8.
199. Evans C, Morrison I, Heriot a G, Bartlett JB, Finlayson C, Dalgleish a G, et al. The correlation between colorectal cancer rates of proliferation and apoptosis and systemic cytokine levels; plus their influence upon survival. *Br J Cancer.* 2006;94(10):1412–9.

200. Rupa JD, de Bruïne AP, Gerbers AJ, Leers MPG, Nap M, Kessels AGH, et al. Simultaneous detection of apoptosis and proliferation in colorectal carcinoma by multiparameter flow cytometry allows separation of high and low-turnover tumors with distinct clinical outcome. *Cancer*. 2003;97(10):2404–11.
201. Elkablawy M a, Maxwell P, Williamson K, Anderson N, Hamilton PW. Apoptosis and cell-cycle regulatory proteins in colorectal carcinoma: relationship to tumour stage and patient survival. *J Pathol*. 2001;194(4):436–43.

