



POLITÉCNICA



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA

AGRONÓMICA, ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA – BIOLOGÍA VEGETAL

Elaboración de una batería de modelos multiclonicos tumorales como estrategia de medicina personalizada

TRABAJO FIN DE GRADO

Autor: David Astorgano López

Tutor: María del Carmen Ramírez Castillejo

Junio de 2019



POLITÉCNICA



E.T.S. DE INGENIERÍA AGRONÓMICA,
ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA, ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS

GRADO DE BIOTECNOLOGÍA

**ELABORACIÓN DE UNA BATERÍA DE MODELOS MULTICLÓNICOS
TUMORALES COMO ESTRATEGIA DE MEDICINA PERSONALIZADA**

TRABAJO FIN DE GRADO

David Astorgano López

MADRID, 2019

Director: María del Carmen Ramírez Castillejo

Dpto. de Biotecnología – Biología Vegetal



POLITÉCNICA



**E.T.S. DE INGENIERÍA AGRONÓMICA,
ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS**

**ELABORACIÓN DE UNA BATERÍA DE MODELOS MULTICLÓNICOS TUMORALES COMO
ESTRATEGIA DE MEDICINA PERSONALIZADA**

**Memoria presentada por David Astorgano López para la obtención del título de
Graduado en Biotecnología por la Universidad Politécnica de Madrid**

Fdo: David Astorgano López

VºBº Tutor y Director del TFG

**Dra. María del Carmen Ramírez Castillejo
Profesor Ayudante Doctor
Dpto de Biotecnología – Biología Vegetal
ETSIAAB – Universidad Politécnica de Madrid**

Madrid, 25, Junio, 2019

“Si me lleva cien años, será una pena, pero no dejaré de trabajar mientras viva”

Marie Curie

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a la Dra. Carmen Ramírez Castillejo la oportunidad que me ha dado, por confiar y por ver en mí lo que otros no han sabido ver. Tu esfuerzo y dedicación son insuperables y tu compromiso con la sociedad, un verdadero ejemplo a seguir. Gracias por dejarme ser parte de ello.

Gracias a todos los que han formado parte del equipo de Stem Cells, en especial a Adrián, Josefa, Nico y Paula. A vosotros, no habría podido pedir mejores compañeros de laboratorio. Hemos pasado mucho tiempo juntos, tanto dentro como fuera del laboratorio. Me habéis ayudado y me habéis enseñado, pero, sobre todo, habéis estado cuando lo necesitaba. Creo que, después de todo, ya no somos únicamente compañeros, también somos amigos.

Gracias a la Dra. Pilar Sánchez Gómez y a todo su equipo de Neuro-Onco, Ricardo, Teresa, Berta, Elena y Dani. Por tener que sufrirme durante los últimos 3 meses de trabajo y por ayudarme en todo cuanto necesitaba. Este trabajo tampoco hubiera sido posible sin vosotros y por ello os estaré siempre agradecido.

Finalmente, me gustaría agradecerle a mi familia. Por todo vuestro apoyo, por el interés que habéis mostrado y por todo el ánimo recibido. También por las veces que os habéis preocupado por mí.

Muchas gracias a todos.

David

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	I
ÍNDICE.....	II
ÍNDICE DE TABLAS	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	V
LISTA DE SÍMBOLOS (fórmulas matemáticas).....	VI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VII
ABSTRACT/RESUMEN	VIII
Capítulo 1: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
1.1. Introducción	1
1.1.1. Situación actual del cáncer.....	1
1.1.2. Cáncer de colon y recaída	2
1.1.3. Marcadores de células madre tumorales.....	4
1.1.4. Proteína reguladora de la autorrenovación: PEDF.....	5
1.2. Objetivos e hipótesis	6
Capítulo 2: MATERIAL Y MÉTODOS	7
2.1. Líneas celulares y modelos multiclonales	7
2.2. Cultivos celulares.....	7
2.3. Marcaje con anticuerpos específicos de proteínas de superficie y citometría de flujo.....	8
2.4. Estudio de la viabilidad celular.....	9
2.4.1. Elaboración de curvas dosis-respuesta	9
2.4.2. Ensayos MTT.....	10
2.5. Ensayos <i>in vivo</i> con animales de experimentación	10
2.6. Obtención de medios condicionados con el extremo C-terminal de la proteína PEDF ...	10
2.6.1 Western blot.....	11
2.7. Análisis estadístico	11
Capítulo 3: RESULTADOS	12
3.1. Citometría de flujo	12

3.2. Ensayos <i>in vivo</i> con animales de experimentación	14
3.2.1. Experimento 1	14
3.2.2. Experimento 2	16
3.3. Estudio de la viabilidad celular.....	17
3.2.1. Líneas celulares puras	17
3.2.2. Modelos multiclonicos de DLD-1: DLD-1 (25%) y DLD-1 (50%).....	18
3.2.3. Modelos multiclonicos de HT-29: HT-29 (25%) y HT-29 (50%)	20
Capítulo 4: DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	21
4.1. Discusión	21
4.1.1. Estudio de marcadores, velocidad de crecimiento tumoral y respuesta a tratamiento	21
4.1.2. El efecto de la proteína recombinante PEDF sobre la quimiorresistencia y recaída	23
4.1.3. Validez de la elaboración de una batería de modelos multiclonicos tumorales como estrategia de medicina personalizada.....	24
4.1.4. Discusión sobre las dificultades de las técnicas empleadas.....	24
4.2. Conclusiones.....	26
BIBLIOGRAFÍA.....	27

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Proporción de líneas celulares puras en los modelos multiclonicos.....	7
Tabla 2: Anticuerpos utilizados para el estudio por citometría de flujo.....	8
Tabla 3: Concentraciones máximas administradas a las líneas celulares y a los modelos multiclonicos	9
Tabla 4: Porcentaje de células positivas para marcadores relacionados con CMTs en líneas de CRC	13
Tabla 5: Porcentajes de viabilidad celular de DLD-1, DLD-1 (25%) y DLD-1 (50%) a concentraciones de 3, 6 y 12 mg/ μ L (concentración fisiológica máxima)	19

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Diseño experimental del estudio de supervivencia celular con concentraciones crecientes de oxaliplatino	9
Figura 2: Porcentaje de expresión positiva de los marcadores BCRP1, EpCAM, AC133 y CD34 en las líneas SW480, HT-29 y HT-29 (25%).....	12
Figura 3: Porcentaje de expresión positiva de los marcadores BCRP1, EpCAM, AC133 y CD34 en las líneas SW480, DLD-1 (25%) y DLD-1 (50%)	13
Figura 4 (A y B): Curvas de crecimiento de los tumores SW480, HT-29 y DLD-1 y sus pendientes	14
Figura 5: Progresión de los tumores SW480, HT-29 y DLD-1	15
Figura 6 (A y B): Curvas de crecimiento de los tumores HT-29, HT-29 (25%) y HT-29 (50%) y sus pendientes.....	15
Figura 7 (A y B): Curvas de crecimiento de los tumores DLD -1 y DLD -1 (25%) y sus pendientes	16
Figura 8 (A y B): Curvas de crecimiento de los tumores HT-29 (25%) y HT-29 (50%) y sus pendientes.....	16
Figura 9 (A y B): Curvas de crecimiento de los tumores DLD-1 (25%) y DLD-1 (50%) y sus pendientes.....	17
Figura 10: Supervivencia de las líneas celulares SW480, HT-29 y DLD-1 tratadas con oxaliplatino	18
Figura 11: Supervivencia de la línea celular DLD-1 y los modelos multiclonales DLD-1 (25%) y DLD-1 (50%) tratados con oxaliplatino.....	19
Figura 12: Supervivencia de la línea celular HT-29 y los modelos multiclonales HT-29 (25%) y HT-29 (50%) tratados con oxaliplatino.....	20
Figura 13 (A y B): Efecto de la muerte celular sobre la proporción de células positivas analizadas para BCRP1 en SW480	25

LISTA DE SÍMBOLOS (fórmulas matemáticas).

Volumen tumoral (V)..... 10

Longitud mayor (L_1 , mm)

Longitud menor (L_2 , mm)

$$V = 2 * L_1 * L_2 * 0,52$$

Valor Predictivo Positivo (VPP)..... 23

Verdaderos Positivos (VP)

Falsos Positivos (FP)

$$VPP = \frac{VP}{VP + FP}$$

Valor Predictivo Negativo (VPN) 23

Verdaderos Negativos (VN)

Falsos Negativos (FN)

$$VPN = \frac{VN}{VN + FN}$$

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC	ATP-binding cassette
AECC	Agencia Española Contra el Cáncer
AML	Leucemia Mieloide Aguda
CIT	Célula iniciadora de tumores
CM	Célula madre
CMT	Célula madre tumoral
CRC	Cáncer colorrectal
CSC	<i>Cancer Stem Cell</i>
CTC	Célula tumoral circulante
DMSO	Dimetil sulfóxido
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> o Suero bovino fetal
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Globocan 2018	<i>Global Cancer Observatory 2018</i>
IC50	Concentración inhibitoria media máxima
MTT	Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
OMS	Organización Mundial de la Salud
OXA	Oxaliplatino
p96	Placa multipocillo de 96 pocillos
p100	Placa <i>petri</i> de 58 cm ²
PBP	<i>Protein-Binding Protein</i> o Proteína de unión a proteína
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i> o Buffer fosfato salino
PEDF	<i>Pigment epithelium-derived factor</i>
SC	<i>Stem Cell</i>
TIC	<i>Tumor Initiating Cell</i>
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VEGFR	Receptor de VEGF
VN	Verdaderos negativos
VP	Verdaderos positivos
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo

ABSTRACT/RESUMEN

Colorectal cancer (CRC) is the second most common form of cancer and the second cause of cancer-related death in Spain. Some of the evidence found in the last decade appoint cancer as a stem cell disease and despite having good treatments, some patients suffer a relapse. It is thought that the primary tumour can be treated properly, and the relapse may be caused by this stem-like cells, called cancer stem cells (CSCs).

As normal stem cells, CSCs undergo asymmetric division, which provides self-renewal and generates a population of cells that forms the tumour bulk while procuring CSCs maintenance. Moreover, CSCs are more chemoresistant due to their slower division rate. This way, the population remains in the body, suffering epithelial-mesenchymal transition, invading distant niche and causing the relapse.

Prior to relapse, the model here presented proposes using CRC immortalized cell lines to create a free-access data base of molecular signatures related to a certain behaviour. To achieve this goal, CRC cell lines were mixed to create multiclonic models and analysed to obtain their molecular signature, growth speed and treatment response. This data base is a preliminary work that will provide the best treatment for a patient's tumour before its appearance.

The origin of CSCs is still unknown, but if we manage to identify the tumour molecular signature through its molecular markers, we might be able to relate it to its growth speed and treatment response. This data base be the starting point to develop a personalised and precision medicine strategies for each patient relapse.

Capítulo 1: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1. Introducción

Actualmente, los tratamientos oncológicos están cada vez más desarrollados; sin embargo, la recaída sigue siendo un gran problema en la lucha contra el cáncer. Las recaídas, o recidivas en el argot médico, son eventos mucho más resistentes, de peor pronóstico y respuesta al tratamiento y lo que verdaderamente mata a los pacientes oncológicos. Si conseguimos predecir la recaída, y conocer de antemano la firma molecular del tumor, así como su respuesta a distintos tratamientos, podremos proponer una estrategia de medicina personalizada más eficaz para cada tipo de paciente.

1.1.1. Situación actual del cáncer

El cáncer es la enfermedad con mayor morbilidad a nivel mundial. De acuerdo con los últimos datos recogidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS), el número de tumores continúa creciendo, aumentando de los 14 millones de casos en el año 2012 a los 18,1 millones en 2018. Se espera que para el año 2040 se alcancen los 29,5 millones de casos.

La incidencia (número de casos nuevos por año expresado bien en número absoluto o como una tasa por 100.000 personas) en el caso de España, en el año 2018 fue de 270.363 casos diagnosticados, siendo mayor en hombres (155.971) que en mujeres (114.392). El número de nuevos casos detectados por 100.000 habitantes fueron de 579 en la población total (681:100.000 en hombres y 480:100.000 en mujeres)⁽¹⁾.

Según la Agencia Española Contra el Cáncer (AECC)⁽²⁾, al analizar las cifras por tipo en ambos sexos durante el año 2018, el cáncer más frecuente fue el colorrectal (CRC, 14% del total), seguido del de mama (12% del total), próstata (12% del total) y pulmón (10% del total), con unas cifras de 37.172, 32.825, 31.728 y 27.351, respectivamente. Si analizamos los sexos por separado, el CRC es el segundo tipo de cáncer más frecuente tanto en mujeres como en hombres, seguido del cáncer de mama en mujeres (29%) y del de próstata en hombres (20%).

Si hablamos de la prevalencia a 5 años, es decir, pacientes de cáncer diagnosticados en los 5 años anteriores, un total de 772.853 pacientes siguen vivos a los 5 años. El CRC, en términos de impacto, es el segundo más prevalente, seguido del cáncer de mama en mujeres y del de próstata en hombres. Finalmente, en términos de mortalidad, en 2018 se registraron 110.753 fallecimientos debidos a esta enfermedad. Los tipos de cáncer con mayor tasa de mortalidad fueron el de pulmón, con 22.481 fallecidos, el CRC, con 15.656 fallecidos, el de páncreas, con 6.962 fallecidos, y el de mama, con 6.665 fallecidos⁽²⁾.

Según Globocan 2018 (*Global Cancer Observatory*), el CRC es el tercer tipo de cáncer más frecuente, con casi 2 millones de casos diagnosticados en todo el mundo, y el segundo que más muertes causa por detrás del cáncer de pulmón, con más de 880.000 muertes⁽¹⁾. Los países donde más casos se producen y los que mayores tasas de mortalidad tienen proceden de Europa, América del norte y Oceanía. No obstante, esta tendencia está cambiando y la incidencia está aumentando en países donde antes era menor, como España y otros países del centro de Europa, principalmente debido a cambios en la dieta^(3,4). Otros factores de riesgo, además de la dieta son historial familiar de cáncer colorrectal⁽⁵⁾, enfermedad intestinal inflamatoria⁽⁶⁾, tabaco⁽⁷⁾, consumo excesivo de alcohol⁽⁸⁾, alto consumo de carne roja⁽⁹⁾, obesidad⁽¹⁰⁾ y diabetes⁽¹¹⁾.

1.1.2. Cáncer de colon y recaída

Las células de nuestro organismo se dividen de forma regular para sustituir a las células muertas y reparar los tejidos, todo con el fin de mantener el correcto funcionamiento de los órganos y sistemas. Cuando estos mecanismos fallan en una célula, ésta y sus descendientes comienzan una división no controlada que con el tiempo dará lugar a un tumor.

Habitualmente, la pérdida en el control del ciclo celular que lleva a la división descontrolada es consecuencia de una inestabilidad genética y de errores a la hora de reparar el daño genético. Sin embargo, estas dos propiedades no son suficientes para que se desarrolle el tumor. También son necesarias otras características para que un tumor salga adelante: insensibilidad a las señales inhibitorias del crecimiento, autosuficiencia para generar factores de crecimiento, angiogénesis, evasión de la apoptosis y del sistema inmune, metabolismo alterado y capacidad para invadir y metastatizar⁽¹²⁻¹⁴⁾. Estas alteraciones pueden afectar a cualquier célula dentro del organismo, otorgándole las características por las cuales se genera el tumor. Cuando estos procesos tienen lugar en el colon o en el recto, nos encontramos ante un cáncer colorrectal.

Sin embargo, aunque existan diferentes teorías por las cuales se origina una neoplasia⁽¹⁵⁾, cada vez está más presente el modelo de las células madre tumorales (CMTs o *Cancer Stem Cells*, CSCs) como iniciadoras de los procesos neoplásicos, tanto primarios como recidivas. Debido a su carácter iniciador de tumores, también reciben el nombre de células iniciadoras de tumores (CITs o *Tumor Initiating Cells*, TICs). Las CMTs fueron aisladas por primera vez de pacientes con leucemia mieloide aguda (AML)⁽¹⁶⁾, posteriormente se encontraron evidencias de su presencia en tumores sólidos^(17,18). La población de CMTs dentro de los tumores es muy pequeña⁽¹⁹⁾ y, al igual que las células madre (CMs o *Stem Cells*, SCs) normales, se dividen por autorrenovación. Esto les permite generar toda la masa tumoral al tiempo que se mantiene una población constante de CMTs.

La cirugía suele ser el primer tratamiento en llevarse a cabo en la mayoría de los tumores colorectales. Consiste en extirpar aquel segmento del colon en el que se asienta el tumor junto con un tramo de tejido normal y los ganglios linfáticos correspondientes. Finalmente, se unen los extremos para mantener la continuidad del tubo digestivo. Todos los pacientes reciben quimioterapia independientemente de haber recibido tratamiento quirúrgico y el 70% evoluciona favorablemente. Sin embargo, el 30% recaerá pasados entre 5 y 10 años y, si superan esta recaída, vuelven a sufrir otra recaída 1-2 años después.

Con relación a los tratamientos quimioterapéuticos, los tratamientos de primera línea para pacientes de CRC pueden ser tratados con una combinación de 5-fluorouracilo + irinotecán o 5-fluorouracilo + oxaliplatino. El 5-fluorouracilo⁽²⁰⁾ está clasificado como antimetabolito antineoplásico y actúa inhibiendo la timidilato sintasa, de manera que interfiere con la síntesis de ADN y ARN. El irinotecán⁽²¹⁾ bloquea la replicación al inducir roturas en las cadenas simples del ADN ya que es un inhibidor específico de la topoisomerasa I y el oxaliplatino⁽²²⁾ interacciona con el ADN formando puentes intra e intercatenarios e interrumpiendo su síntesis. No están indicados específicamente para un determinado tipo de cáncer, sino que se administran según la respuesta del paciente al tratamiento, pudiendo intercambiarse en cualquier momento.

Dependiendo de si el paciente tiene o no mutación en RAS, familia de proteínas implicadas en la regulación de varias cascadas de señalización importantes en la diferenciación, supervivencia y proliferación⁽²³⁾, se puede añadir inmunoterapia. Tanto si RAS aparece mutado como si aparece en su forma nativa, se puede añadir bevacizumab⁽²⁴⁾, un anticuerpo monoclonal humanizado que se une al factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) e inhibe la unión a sus receptores (VEGFR), de forma que reduce la vascularización del tumor. Si RAS aparece en su forma nativa, se puede añadir panitumumab⁽²⁵⁾ en combinación con cetuximab⁽²⁶⁾. Panitumumab es un anticuerpo monoclonal humano y cetuximab es monoclonal quimérico, ambos se unen al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), bloqueando el crecimiento y la supervivencia de células tumorales que expresen EGFR. Su uso está indicado cuando han fracasado regímenes de quimioterapia convencionales.

En relación a las recaídas, los tumores suelen ser resistentes a la primera línea de tratamiento aplicada, por eso, como segunda línea se administran aquellas alternativas que no se utilizaron en el tumor primario.

Para tratamientos de tercera línea y sucesivas están aprobados regorafenib y Lonsurf®, aunque de menor eficacia que los empleados en líneas anteriores. Regorafenib⁽²⁷⁾ es un fármaco oral que bloquea varias proteinquinasas implicadas en la angiogénesis tumoral, la oncogénesis y el

microambiente tumoral, de forma que bloquea la proliferación celular tumoral. Lonsurf® es el nombre comercial para la combinación de fármacos trifluridina + tipiracil hidrocloreuro⁽²⁸⁾. La trifluridina es fosforilada por la timidina quinasa y metabolizada a un sustrato que se incorpora directamente al ADN, interfiriendo con su síntesis. El papel del tipiracil hidrocloreuro consiste en inhibir el enzima que degrada la trifluridina como consecuencia del primer paso hepático tras la administración oral.

1.1.3. Marcadores de células madre tumorales

La detección precoz del cáncer aumenta la supervivencia de los pacientes. Cuando éste se detecta temprano, los pacientes viven más tiempo y requieren menos tratamiento, evolucionando más favorablemente que aquellos en los que se detecta en un estadio más avanzado. Este hecho resalta el papel de los marcadores dentro de la detección del cáncer y su evolución. Y adquiere una relevancia aun mayor cuando lo que somos capaces de detectar precozmente es la recaída.

Un marcador (biomarcador) es un determinante, ya sea genético o proteico, que permite la identificación gracias a su expresión diferencial dentro de un órgano, tejido o conjunto de células. El uso de marcadores en oncología ha permitido la caracterización molecular del cáncer, desde la detección de una neoplasia incipiente hasta la jerarquización de los pacientes en diferentes estadios y la vigilancia de la enfermedad. Dependiendo de la aplicación, los biomarcadores son más útiles en unos campos que en otros. De esta forma, un biomarcador que permite la clasificación de los pacientes oncológicos según su sensibilidad farmacológica a un determinado tratamiento puede no ser igual de útil para predecir la probabilidad de sufrir cáncer de un paciente sano.

Si nos centramos en aquellos marcadores destinados a la detección sistemática en la población en riesgo alto, la prueba de detección debe ser lo menos invasiva y lo más exacta posible. Esto hace que los medios para el análisis se limiten a líquidos biológicos (saliva, sangre y orina) y a células accesibles, como pueden ser las epiteliales o las sanguíneas. Los biomarcadores proteicos en sangre son los que más se están desarrollando, además de la detección combinada de varios marcadores en lugar de proteínas individuales.

Según el modelo de las células madre tumorales, estas serían las responsables de la resistencia a los tratamientos y de las recidivas. El diseño de biomarcadores debería estar enfocado a la detección y aislamiento de esta población en sangre periférica. Sin embargo, la concentración de CMTs en el tumor es muy baja, por no hablar de la que se encuentra circulante en sangre, pudiendo producir falsos negativos al encontrarse en los límites de detección de los aparatos. Se han podido describir distintos marcadores de CMTs en diferentes tipos de tumores sólidos,

como cerebrales^(29,30), mama⁽¹⁷⁾, colon^(31,32), CRC⁽³³⁾, páncreas⁽³⁴⁾, próstata⁽³⁵⁾ y pulmón⁽³⁶⁾. Los marcadores de CMTs más frecuentes en la bibliografía para CRC son: EpCAM, CD133 y CD44.

Durante el desarrollo de este trabajo de fin de grado se analizaron las proteínas EpCAM y CD133, además de BCRP1 y CD34 como biomarcadores de interés. Respecto a la proteína CD133, se ha utilizado un anticuerpo contra el epítipo AC133, que en la bibliografía ha sido el más relacionado con las células iniciadoras de tumor⁽³⁷⁻³⁹⁾.

CD133, también conocida como prominina-1, es una glicoproteína de 120 kDa con 5 dominios transmembrana y está presente en muchos tumores. Está relacionada con la capacidad de autorrenovación, proliferación y diferenciación de las CMTs. AC133 es la forma glicosilada de la prominina-1 y los estudios realizados por Kemper y colaboradores demostraron la capacidad de este marcador para detectar CMTs⁽³⁹⁾.

EpCAM es una molécula de adhesión de las células epiteliales porque su detección en sangre periférica es un indicativo de presencia de células epiteliales en sangre. CellSearch® (Veridex) es el único test validado por FDA (*Food and Drug Administration*)⁽⁴⁰⁾. Utiliza anticuerpos acoplados a un ferrofluido dirigidos contra la proteína de superficie EpCAM para detectar y separar las células tumorales circulantes (CTCs) del resto de células sanguíneas en una muestra de biopsia líquida⁽⁴¹⁾ (sensibilidad 48% y especificidad 92%).

La familia de proteínas BCRP son transportadores transmembrana de tipo ABC (ATP-binding cassette). BCRP1/ABCG2 no está relacionada directamente con la capacidad de formación de tumores, sino con la resistencia a los tratamientos^(42,43). Su función principal es la de expulsar sustancias tóxicas, fármacos y compuestos generados en el metabolismo celular al medio extracelular.

CD34 aparece en aquellas células con capacidad pluripotencial. En 1990, Civin y colaboradores aislaron por primera vez las células madre hematopoyéticas usando anticuerpos anti-CD34⁽⁴⁴⁾. Aunque no se ha relacionado con las CMTs, se ha querido comprobar su presencia en líneas celulares inmortalizadas.

1.1.4. Proteína reguladora de la autorrenovación: PEDF

El factor derivado del epitelio pigmentado (PEDF o *Pigment epithelium-derived factor*) es una proteína de la familia de las serin-proteasas. Inicialmente se aisló en las células epiteliales de la retina humana^(45,46), y se ha demostrado su expresión en otros tejidos: cerebro, plasma, hígado, huesos, ojos, corazón y pulmones⁽⁴⁷⁾. Está implicada en la autorrenovación de las CMs sin afectar a la proliferación del sistema. Presenta diferentes efectos en la progresión de los tumores. Por

un lado, induce la diferenciación celular y la apoptosis tumoral; por otro lado, inhibe la proliferación tumoral, la vascularización, la migración celular, la invasión y la metástasis.

Honrubia y colaboradores han demostrado que la exposición de las células a derivados de esta proteína reduce la resistencia a los tratamientos aplicados en CRC, así como la concentración inhibitoria media máxima (IC50 o *Half maximal inhibitory concentration*)⁽³⁷⁾.

1.2. Objetivos e hipótesis

Los objetivos principales del trabajo de fin de grado aquí presentado son los siguientes:

1. Diseñar una batería de pacientes simulados como punto de partida en la elaboración de una base de datos que permita seleccionar el tratamiento que mejor se adapte a pacientes de cáncer colorrectal.
2. Establecer una relación entre el porcentaje de expresión de determinados marcadores neoplásicos con su capacidad de producción tumoral y de respuesta a diferentes tratamientos.

Con estos objetivos se pretende dar validez a la siguiente **hipótesis de trabajo**:

Elaborar una base de datos que recoja toda la información analizada y la relacione entre sí (porcentaje de expresión de marcadores que identifiquen la población de CMTs, velocidad de crecimiento de tumor y capacidad de respuesta a diferentes tratamientos) permitirá, cuando se diagnostique la recaída en un paciente de CRC, seleccionar el tratamiento que mejor se adapte según la firma molecular del tumor.

En el futuro, se espera obtener una base de datos completa, con un análisis de amplio espectro, que recoja la mayor cantidad de combinaciones moleculares posibles. Esto es un trabajo para verificar la validez de dicha herramienta, como prueba de concepto y poder poner en marcha un estudio más completo.

Capítulo 2: MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Líneas celulares y modelos multiclonicos

Para la realización de este estudio se han empleado células de tres líneas celulares que son: SW480, HT-29 y DLD-1.

Todas las líneas, que proceden de diferentes pacientes con adenocarcinoma colorrectal en distintos estadios, son células neoplásicas epiteliales de colon inmortalizadas. Las células de las líneas SW480 y DLD-1 tienen su origen en dos pacientes varones, con adenocarcinoma colorrectal en estadio II y III, respectivamente. La línea celular HT-29 tiene su origen en una mujer, no se ha especificado el estadio en el que se encontraba el CRC cuando se inmortalizó. Todas las líneas fueron suministradas por el Laboratorio de Genética Clínica de la Facultad de Medicina de Albacete.

Estas líneas celulares puras se mezclaron entre sí en distintas proporciones, para obtener líneas celulares modelo que simularan muestras obtenidas de pacientes. A estas líneas las llamamos modelos multiclonicos ya que se crean mediante la mezcla de las líneas celulares puras ya mencionadas. La **tabla 1** muestra las proporciones a las que se añadieron las líneas puras para crear los modelos multiclonicos: HT-29 (25%), HT-29 (50%), DLD-1 (25%) y DLD-1 (50%). En todos los modelos multiclonicos se usó de base la línea SW480 y se mezcló con HT-29 y con DLD-1 en diferentes concentraciones.

Tabla 1. Proporción de líneas celulares puras en los modelos multiclonicos.

Nombre	SW480	HT-29	DLD-1
HT-29 (25%)	75%	25%	0%
HT-29 (50%)	50%	50%	0%
DLD-1 (25%)	75%	0%	25%
DLD-1 (50%)	50%	0%	50%

2.2. Cultivos celulares

Tanto las líneas celulares puras como los modelos multiclonicos se cultivaron en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) con 4,5 mg/mL de glucosa, suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS, *Fetal Bovine Serum*), 1% de penicilina/estreptomicina (10.000/10.000 U/mL) y 1% de glutamina (200 mM).

Estas condiciones de cultivo, empleadas inicialmente para el desarrollo inicial celular se repiten para todos los experimentos realizados.

Independientemente de la línea, tanto para iniciar los cultivos como para mantener la línea celular durante los experimentos, las células fueron cultivadas en placas *petri* de 58 cm² de diámetro (p100) y mantenidas en incubador a una temperatura de 37 °C y 5% de CO₂, realizándose un cambio de medio cada 3 días y un pase cuando la confluencia era del 90% aproximadamente.

Estos tipos celulares crecen adheridos a la superficie de la placa. Para levantar las células de las p100 se empleó tripsina 1X, diluida en tampón fosfato salino (PBS, *Phosphate Buffer Saline*).

2.3. Marcaje con anticuerpos específicos de proteínas de superficie y citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica que permite el recuento y la clasificación de células según sus características morfológicas y la presencia de marcadores de membrana. Se basa en la reacción antígeno-anticuerpo, donde el anticuerpo está marcado con un fluoróforo que posteriormente se excita y detecta mediante un equipo de citometría de flujo, en nuestro caso utilizamos el MACSQuant[®] Analyzer 10. Si la célula expresa la proteína específica, el anticuerpo se unirá a ella y será registrada por el aparato.

Para la preparación de las muestras, las células se crecieron en p100 hasta obtener una confluencia cercana al 90%. Por cada línea celular, se levantaron de la p100 con tripsina 1X y se repartieron en 6 tubos Eppendorf[™] (5 marcadores + 1 control) de forma que hubiera cerca de 250.000 células por tubo. Los tubos se centrifugaron y el botón celular se diluyó en una disolución de leche en polvo para lactantes (Nutribén[®]) al 5% en PBS. Este paso tiene como objetivo el bloqueo de las proteínas de unión a proteínas (PBP o *Protein-Binding Protein*), responsables de las uniones inespecíficas de los anticuerpos. Tras esto, se procedió a la incubación con los anticuerpos específicos de unión a determinantes de membrana. Dichos anticuerpos se muestran en la **tabla 2**. Como controles se emplearon anticuerpos secundarios, que reconocían los anticuerpos específicos de las proteínas de superficie, marcados con fluoróforos que no interfieren con el espectro de absorción-emisión del anticuerpo primario.

Tabla 2. Anticuerpos utilizados para el estudio por citometría de flujo.

ANTICUERPO	CLON	CASA COMERCIAL	DILUCIÓN	TIEMPO DE INCUBACIÓN	λ ABSORCIÓN-EMISIÓN
Anti-BCRP1-PE	5D3	eBioscience	1:10	10 min	563-576
Anti-EpCAM-PE	G8.8	eBioscience	1:10	10 min	563-576
Anti-AC133-FITC	AC133	Miltenyi Biotec	1:10	10 min	409-591
Anti-CD34-APC	AC136	Miltenyi Biotec	1:10	10 min	650-660

Tras esta incubación, las muestras se lavaron con PBS para eliminar el exceso de anticuerpo no unido a su antígeno y se preservó la integridad celular usando PFA 1% (paraformaldehído) como fijador. El análisis citométrico se realizó con el MACSQuant® Analyzer 10 de Miltenyi Biotec y el posterior análisis informático se realizó mediante el paquete informático MACSQuantify.

2.4. Estudio de la viabilidad celular

2.4.1. Elaboración de curvas dosis-respuesta

Los experimentos de viabilidad celular y respuesta a tratamientos se realizaron en placas multi-pocillo de 96 pocillos (p96). De esta forma se puede estudiar la supervivencia de las células tumorales, tanto líneas puras como modelos multiclonicos, en estudio, a dosis seriadas de oxaliplatino (OXA), un quimiofármaco empleado en el tratamiento del CRC.

En la **figura 1** se muestra cómo se dispusieron las p96 para el desarrollo de los experimentos de dosis-respuesta. En todos los casos se dispuso de una densidad celular de 15.000 células por pocillo y se esperaba un tiempo de 24 horas entre la siembra de la placa y la administración de los tratamientos.

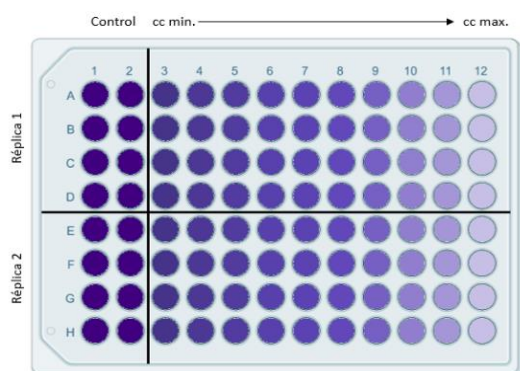


Figura 1. Diseño experimental del estudio de supervivencia celular con concentraciones crecientes de oxaliplatino. Esta disposición se repitió para todas las líneas celulares y modelos multiclonicos, con una densidad inicial de 15.000 células/pocillo. Creado con BiorRender.com (URL: <https://app.biorender.com/>)

En la **tabla 3** se muestran las concentraciones máximas administradas a cada conjunto de células. Se hicieron diluciones seriadas 1:2 a partir de la concentración máxima hasta alcanzar la concentración mínima, un total de 10 tratamientos por réplica biológica con 4 réplicas técnicas por tratamiento. Los controles son células sin tratamiento.

Tabla 3. Concentraciones máximas administradas a las líneas celulares y a los modelos multiclonicos.

LÍNEA CELULAR	CONCENTRACIÓN MÁXIMA ADMINISTRADA	MODELO MULTICLÓNICO	CONCENTRACIÓN MÁXIMA ADMINISTRADA
SW480	6,4 mg/μL	HT-29 (25%)	6,4 mg/μL
HT-29	12,8 mg/μL	HT-29 (50%)	6,4 mg/μL
DLD-1	24 mg/μL	DLD-1 (25%)	12 mg/μL
		DLD-1 (50%)	12 mg/μL

2.4.2. Ensayos MTT

Este ensayo determina el efecto citotóxico de un agente sobre las líneas celulares tumorales, tanto puras como modelos multiclonales, mediante el cálculo de la IC50 (concentración de fármaco necesaria para eliminar el 50% de las células). Se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por el enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul, formazán. Esto permite determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células y evaluar la supervivencia y proliferación celular de forma que la cantidad de formazán producido es proporcional a la cantidad de células vivas. Los cristales de formazán se disuelven añadiendo dimetil sulfóxido (DMSO) y se mide su absorbancia a una longitud de onda de 540 nm.

El MTT (Sigma Aldrich) 0,5 mg/mL se incubó durante 45 minutos a 37 °C, después se solubilizaron los cristales de formazán con DMSO (Sigma Aldrich®). La absorbancia se midió a su punto óptimo de absorción que es 540 nm en un lector de placa Spark® de la casa comercial TECAN.

2.5. Ensayos *in vivo* con animales de experimentación

Para estos ensayos se dispusieron de ratones *nude* (Charles River®), cedidos por el Instituto de Salud Carlos III, para estudiar la velocidad de progresión tumoral de las líneas celulares y de los modelos multiclonales. Estos ratones presentan una mutación que origina un fenotipo inmunodeficiente, mutación *nude* (*un*), que origina ausencia de pelo y timo. Estos ratones no presentan rechazo de injerto, por lo que resultan de gran utilidad en los trasplantes de tumores, incluso de tumores humanos.

Se realizaron dos ensayos en los que las células se diluyeron en 200 µL de una solución de Matrigel® (Invitrogen). El primer ensayo se llevó a cabo con 10 animales y a una densidad celular de 150.000 células/tumor. El segundo ensayo se llevó a cabo con 11 animales y a una densidad celular de 10.000 células/tumor. Los trasplantes se diseñaron de forma que ningún ratón tuviera dos veces el mismo tumor. El volumen de los tumores fue calculado mediante la fórmula:

$$V = 2 * L_1 * L_2 * 0,52$$

Donde L_1 y L_2 hace referencia a la longitud mayor y longitud menor, ambas en milímetros.

2.6. Obtención de medios condicionados con el extremo C-terminal de la proteína PEDF

Para la obtención de medios condicionados con el dominio C-terminal de la proteína PEDF se transfectaron células HEK-293T empleando 15 µg de ADN plasmídico. La transfección se realizó usando el kit comercial Lipofectamine 3000 Reagent®, de la casa comercial Invitrogen, siguiendo

las instrucciones del fabricante. Las células transfectadas permanecieron en cultivo entre 3 y 5 días a 37 °C, 5% de CO₂.

2.6.1 Western blot

La presencia y cuantificación de la proteína recombinante presente en el medio de cultivo se realizó mediante western blot. Para ello, las muestras de los medios condicionados obtenidas fueron cargadas y migradas en geles al 40% de SDS-PAGE y el proceso se llevó a cabo en *Bolt™ Mini Gel Tank* (Invitrogen) a 120 V durante 40 minutos. Tras la separación de las proteínas, se realizó la transferencia a membranas de nitrocelulosa empleando el equipo de transferencia seca *iBlot™ 2* (Invitrogen). Tras esto, se procedió al bloqueo de las PBPs presentes en la membrana de nitrocelulosa con la disolución de leche en polvo para lactantes (Nutribén®) al 5% en PBS, durante 30 minutos en agitación orbital a temperatura ambiente.

Una vez finalizado el bloqueo de las PBPs, se realizó una incubación convencional con el anticuerpo primario anti-c-myc (Mouse monoclonal IgG1, Santa Cruz) a una dilución 1:1.000 durante toda la noche a 4 °C. La mañana siguiente, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario anti-mouse conjugado con HRP (Goat anti-mouse Ig-G-HRP, Santa Cruz) a una dilución 1:30.000 durante 45 minutos a temperatura ambiente. Ambas disoluciones fueron preparadas en PBS al 1% de leche en polvo.

Para terminar, las membranas, ya incubadas, se revelaron mediante el uso de la cámara CCD de quimioluminiscencia *ImageQuant LAS 500* (GE Healthcare) y la exposición al sustrato de quimioluminiscencia *SuperSignal™ West Pico PLUS* (Thermo Scientific) durante 3 minutos.

2.7. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante la utilización de diferentes pruebas:

- Prueba t de Student. Prueba paramétrica aplicada cuando no se conoce la desviación típica poblacional, la distribución de la muestra es normal y su tamaño es superior a 30. Para la prueba t de Student se emplearon los restrictores de 2 colas con muestras de varianzas diferentes.
- Prueba de U de Mann-Whitney. Prueba no paramétrica aplicada a dos muestras independientes. Es la versión no paramétrica de la prueba t de Student. La prueba de Mann-Whitney se usa para comprobar la heterogeneidad de dos muestras ordinales y tiene igual fortaleza que la t de Student en su campo de aplicación.

Capítulo 3: RESULTADOS

3.1. Citometría de flujo

Para estudiar la firma molecular de los tumores, se analizaron, mediante citometría de flujo, las proteínas de superficie: BCRP1, EpCAM, AC133 y CD34, en las líneas celulares puras SW480 y HT-29 y en los modelos multiclonales HT-29 (25%), DLD-1 (25%) y DLD-1 (50%). El número de réplicas analizadas fue dos en todos los casos.

El porcentaje de células positivas para BCRP1 es 0,83% en SW480, 0,97% en HT-29, 0,88% en HT-29 (25%), 1,58% en DLD-1 (25%) y 2,62% en DLD-1 (50%). EpCAM es detectado en todas las líneas excepto en SW480 con un porcentaje de células positivas de 0,10% para HT-29, 0,05% para HT-29 (25%), 17,89% para DLD-1 (25%) y 19,67% para DLD-1 (50%). El porcentaje de células positivas para AC133 es 1,22% en SW480, 0,21% en HT-29, 0,46% en HT-29 (25%), 4,04% en DLD-1 (25%) y 5,59% en DLD-1 (50%). Finalmente, el porcentaje de células positivas CD34 se encuentra al 0,38% en SW480, 0,46% en HT-29, 1,11% en HT-29 (25%), 0,13% en DLD-1 (25%) y 1,21% en DLD-1 (50%). Las **figuras 2 y 3** (página siguiente) muestran los resultados obtenidos para cada marcador en las líneas celulares SW480, HT-29 y HT-29 (25%) y SW480, DLD-1 y DLD-1 (25%), respectivamente.

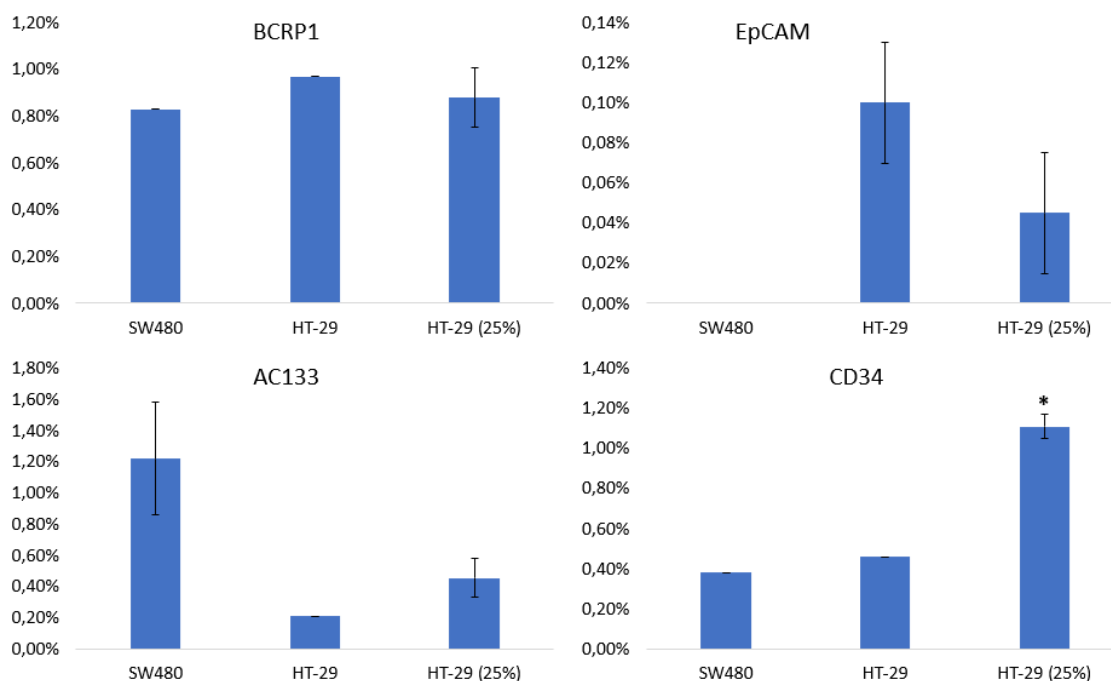


Figura 2. Porcentaje de expresión positiva de los marcadores BCRP1, EpCAM, AC133 y CD34 en las líneas SW480, HT-29 y HT-29 (25%). Se muestran las medias (n=2) del porcentaje de expresión de las proteínas BCRP1 (izquierda arriba), EpCAM (derecha arriba), AC133 (izquierda abajo) y CD34 (derecha abajo). Las barras de error muestran el error estándar de cada porcentaje ($p < 0,05$ *).

No se observan diferencias significativas en la expresión de los marcadores BCRP1, EpCAM y AC133, aunque sí se observa un aumento significativo ($p < 0,05\%$) en la expresión de CD34, que pasa de ser positivo en el 0,38% de SW480 y en el 0,46% de HT-29, a ser positivo en el 1,11% de HT-29 (25%).

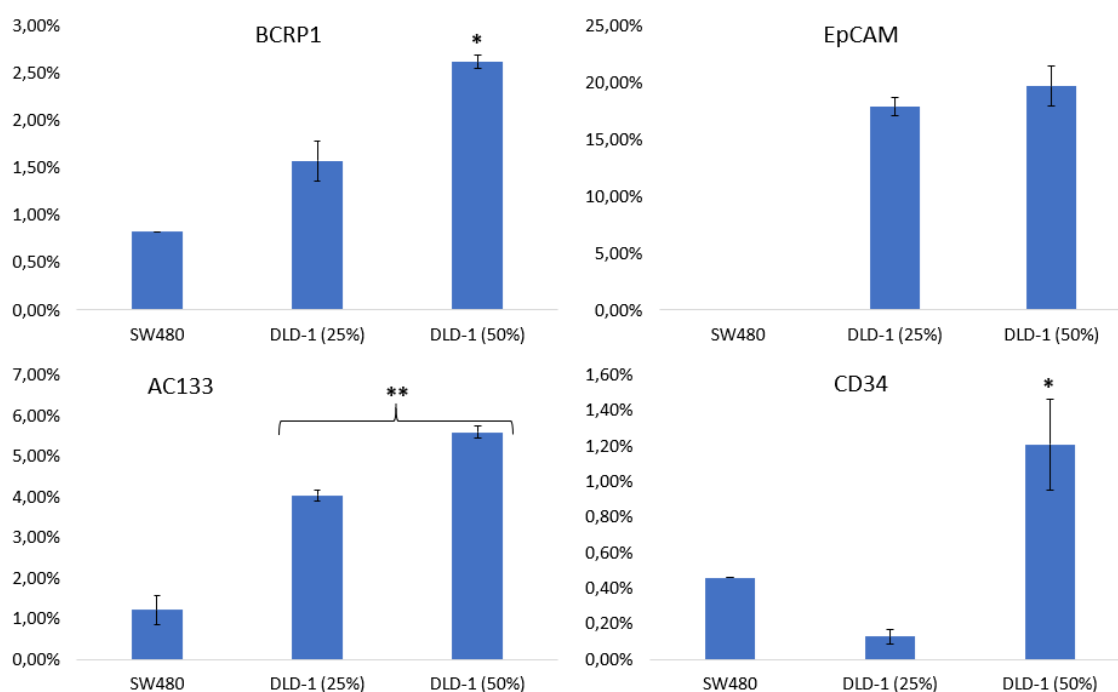


Figura 3. Porcentaje de expresión positiva de los marcadores BCRP1, EpCAM, AC133 y CD34 en las líneas SW480, DLD-1 (25%) y DLD-1 (50%). Se muestran las medias ($n=2$) del porcentaje de expresión de las proteínas BCRP1 (izquierda arriba), EpCAM (derecha arriba), AC133 (izquierda abajo) y CD34 (derecha abajo). Las barras de error muestran el error estándar en cada porcentaje ($p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **).

En cuanto a la expresión de los mismos marcadores, si comparamos los datos obtenidos para SW480 con los obtenidos para DLD-1 (25%) y DLD-1 (50%), se puede observar cómo la presencia de DLD-1 en la mezcla de líneas celulares aumenta de forma significativa ($p < 0,05$; $p < 0,01$) el porcentaje de célula positivas. La **tabla 4** resume la media de células positivas para cada marcador.

Tabla 4. Porcentaje de células positivas para marcadores relacionados con CMTs en líneas de CRC.

LÍNEA CELULAR	MARCADORES			
	BCRP1	EpCAM	AC133	CD34
SW480	0,8%	0%	1%	0,4%
HT-29	1%	0,1%	0,2%	0,5%
HT-29 (25%)	0,9%	0,05%	0,5%	1%
DLD-1 (25%)	2%	18%	4%	0,1%
DLD-1 (50%)	3%	20%	6%	1%

3.2. Ensayos *in vivo* con animales de experimentación

Para estudiar la velocidad de crecimiento de los tumores analizados en las curvas dosis-respuesta se realizaron dos experimentos. En el primero se plantea la hipótesis de si existen diferencias significativas en las velocidades de crecimiento entre líneas celulares puras y modelos multiclónicos. En el segundo experimento se redujo la cantidad de células inyectadas para comprobar si existe una población mínima capaz de producir un tumor.

3.2.1. Experimento 1

Se plantea este experimento para ver si existen diferencias significativas entre la velocidad de crecimiento entre los tumores analizados en función del tipo celular inyectado. Se analizaron siete tipos de tumores estudiados con una $n=3$ cada uno, por lo que se analizaron 21 tumores en total, repartidos entre 10 ratones nude. Únicamente hubo un deceso al comienzo del experimento, el resto de ratones sobrevivieron hasta su finalización. De los 7 grupos inyectados, finalmente se obtuvieron 2 tumores SW480, 2 tumores HT-29, 2 tumores DLD-1, 2 tumores HT-29 (25%), 3 tumores HT-29 (50%), 3 tumores DLD-1 (25%) y 2 tumores DLD-1 (50%). En la **figura 4** se muestran las curvas de crecimiento y sus pendientes para SW480, HT-29 y DLD-1. Se puede observar que los tumores SW480 (pendiente = $0,095 \pm 0,007$) tienen una velocidad de crecimiento significativamente superior ($p < 0,05$) a los tumores HT-29 (pendiente = $0,050 \pm 0,008$) y DLD-1 (pendiente = $0,071 \pm 0,005$). En la **figura 5** (página siguiente) se puede observar la progresión de los tumores correspondientes a las líneas celulares puras (SW480, HT-29 y DLD-1) a diferentes tiempos durante el transcurso del experimento 1.

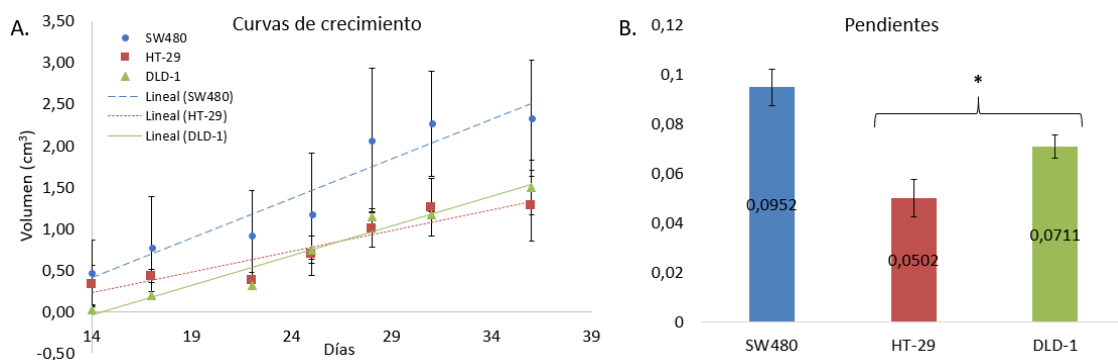


Figura 4. Curvas de crecimiento de los tumores SW480, HT-29 y DLD-1 y sus pendientes. A) Se muestran las medias de las curvas de crecimiento de las líneas SW480 (punto), HT-29 (cuadrado) y DLD-1 (triángulo). Las barras de error representan el error estándar en cada punto. **B)** Se muestran las medias de las pendientes para cada línea celular (SW480 en azul, HT-29 en rojo y DLD-1 en verde). Las barras de error representan el error estándar de todas las pendientes obtenidas ($p < 0,05$ *).

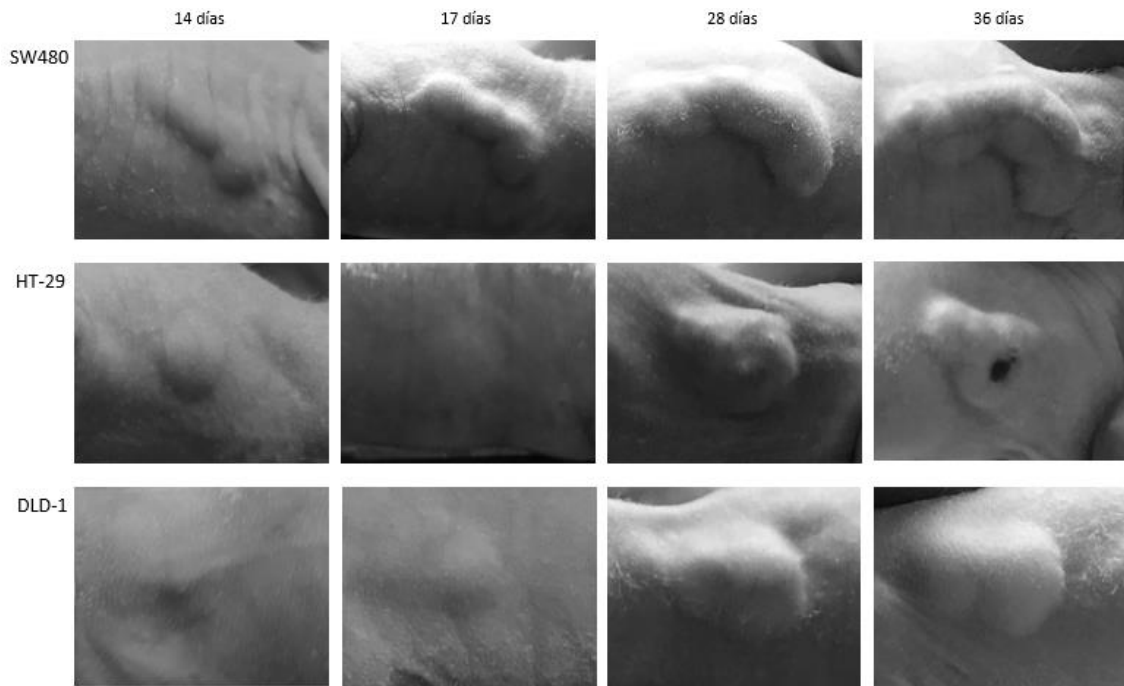


Figura 5. Progresión de los tumores SW480, HT-29 y DLD-1. Se muestra una serie de imágenes ejemplo obtenidas durante el transcurso del experimento 1 a diferentes tiempos: 14 días, 17 días, 28 días y 36 días, para los tumores SW480, HT-29 y DLD-1, que dan lugar a la figura 4 anteriormente mostrada.

En la **figura 6** se comparan los resultados obtenidos para los tumores HT-29 (25%) y HT-29 (50%) con los resultados de HT-29. No se observan diferencias significativas entre las tres pendientes: $0,050 \pm 0,008$ (HT-29); $0,04 \pm 0,01$ (HT-29 (25%)) y $0,061 \pm 0,006$ (HT-29 (50%)).

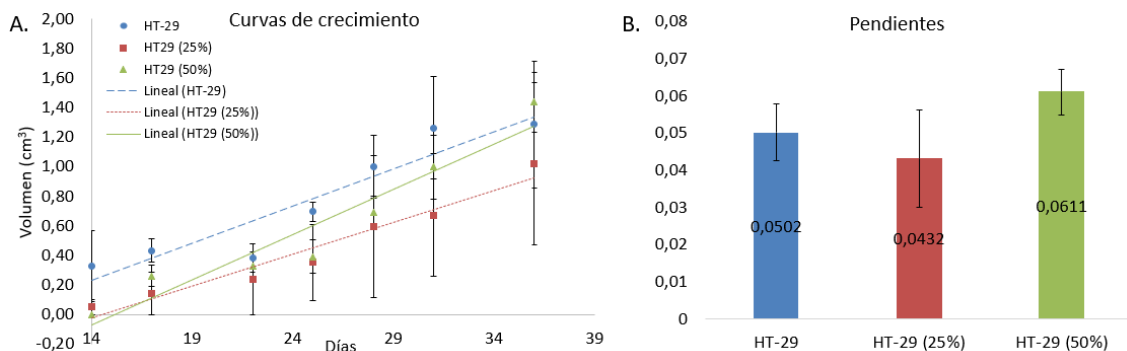


Figura 6. Curvas de crecimiento de los tumores HT-29, HT-29 (25%) y HT-29 (50%) y sus pendientes. A) Se muestran las medias de las curvas de crecimiento de las líneas HT-29 (punto), HT-29 (25%) (cuadrado) y HT-29 (50%) (triángulo). Las barras de error representan el error estándar en cada punto. **B)** Se muestran las medias de las pendientes para cada línea celular (HT-29 en azul, HT-29 (25%) en rojo y HT-29 (50%) en verde). Las barras de error representan el error estándar de todas las pendientes obtenidas.

En la **figura 7** (página siguiente) se comparan los resultados obtenidos para los tumores DLD-1 (25%) con los resultados de DLD-1. No se observan diferencias significativas entre ambas pendientes: $0,071 \pm 0,005$ (DLD-1) y $0,12 \pm 0,04$ (DLD-1 (25%)). Sin embargo, si se observa una tendencia a una mayor pendiente de crecimiento al añadir la línea SW480 de crecimiento más rápido.

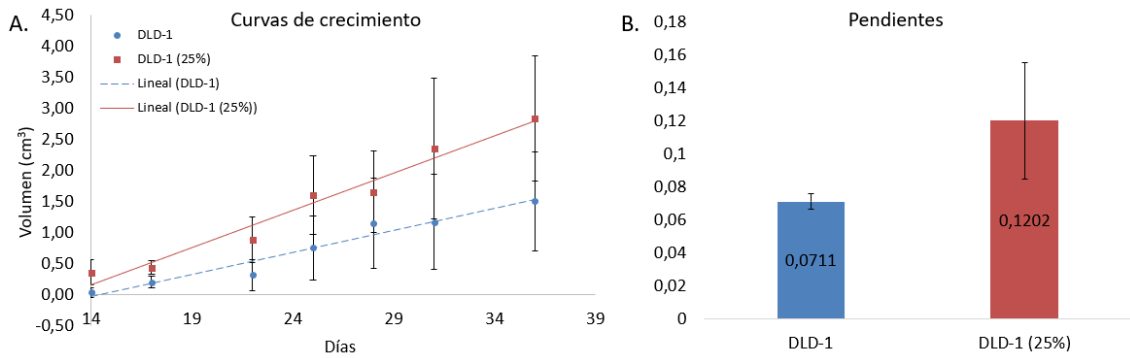


Figura 7. Curvas de crecimiento de los tumores DLD-1 y DLD-1 (25%) y sus pendientes. **A)** Se muestran las medias de las curvas de crecimiento de las líneas DLD-1 (punto) y DLD-1 (25%) (cuadrado). Las barras de error representan el error estándar en cada punto. **B)** Se muestran las medias de las pendientes para cada línea celular (DLD-1 en azul y DLD-1 (25%) en rojo). Las barras de error representan el error estándar de todas las pendientes obtenidas.

3.2.2. Experimento 2

Se plantea este experimento para estudiar si existe una población mínima capaz de reproducir el tumor, de forma que se redujo la cantidad de células inyectadas. Se volvieron a analizar los 7 tipos de tumores analizados en las curvas dosis-respuesta, 3 réplicas por cada línea pura y 4 réplicas por cada modelo multiclonal, un total de 25 tumores repartidos en 11 ratones nude. Dos de los ratones murieron al inicio del experimento y finalmente se obtuvieron los siguientes tumores: 1 tumor SW480, 1 tumor HT-29, 1 tumor DLD-1, 3 tumores HT-29 (25%), 4 tumores HT-29 (50%), 3 tumores DLD-1 (25%) y 4 tumores DLD-1 (25%). Al obtener únicamente 1 única réplica por tumor, no se muestran los datos referentes a los tumores procedentes de las líneas celulares puras SW480, HT-29 y DLD-1. La **figura 8** muestra las curvas de crecimiento y las pendientes de los tumores HT-29 (25%) y HT-29 (50%). Se observa un aumento significativo ($p < 0,01$) en la velocidad de crecimiento del modelo multiclonal cuando la proporción de SW480 es mayor, pasando de $0,040 \pm 0,003$ (HT-29 (50%)) a $0,07 \pm 0,01$ (HT-29 (25%)).

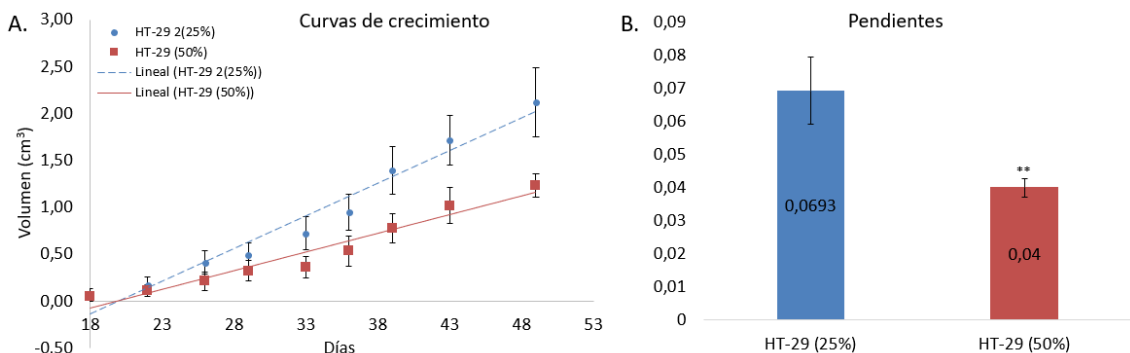


Figura 8. Curvas de crecimiento de los tumores HT-29 (25%) y HT-29 (50%) y sus pendientes. **A)** Se muestran las medias de las curvas de crecimiento de las líneas HT-29 (25%) (punto) y HT-29 (50%) (cuadrado). Las barras de error representan el error estándar en cada punto. **B)** Se muestran las medias de las pendientes para cada línea celular (HT-29 (25%) en azul y HT-29 (50%) en rojo). Las barras de error representan el error estándar de todas las pendientes obtenidas ($p < 0,01$ **).

La **figura 9** muestra las curvas de crecimiento y las pendientes de los tumores DLD-1 (25%) y DLD-1 (50%). Se observa una tendencia al descenso de la velocidad de crecimiento del modelo multiclonico aunque, debido al pequeño tamaño de las muestras, no esta diferencia no es estadísticamente significativa. Cuando la proporción de SW480 es mayor, la pendiente de crecimiento de los tumores pasa de $0,053 \pm 0,008$ (DLD-1 (50%)) a $0,73 \pm 0,01$ (DLD-1 (25%)).

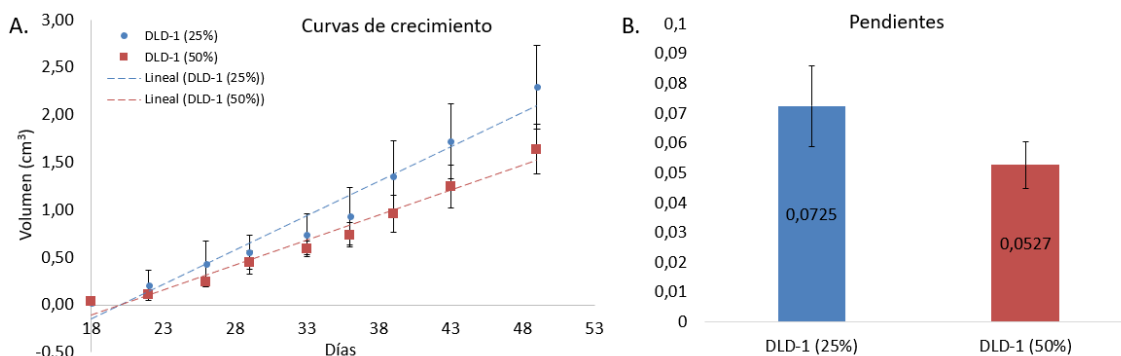


Figura 9. Curvas de crecimiento de los tumores DLD-1 (25%) y DLD-1 (50%) y sus pendientes. **A)** Se muestran las medias de las curvas de crecimiento de las líneas DLD-1 (25%) (punto) y DLD-1 (50%) (cuadrado). Las barras de error representan el error estándar en cada punto. **B)** Se muestran las medias de las pendientes para cada línea celular (DLD-1 (25%) en azul y DLD-1 (50%) en rojo). Las barras de error representan el error estándar de todas las pendientes obtenidas.

3.3. Estudio de la viabilidad celular

Para observar el efecto de los tratamientos y cómo la combinación de diferentes líneas celulares afecta a la respuesta, se diseñaron ensayos de viabilidad celular. Al mismo tiempo, se quiere analizar la población resistente a dosis fisiológica máxima, aquella que resiste al tratamiento y sobrevive debido a la imposibilidad de aumentar la dosis de fármaco.

Se han elaborado curvas dosis-respuesta utilizando diferentes concentraciones de oxaliplatino, uno de los fármacos quimioterapéuticos de uso común en el tratamiento del cáncer colorrectal. En todos los casos, se mantuvieron los tratamientos durante un periodo de 3 días.

3.2.1. Líneas celulares puras

La **figura 10** (página siguiente) muestra los resultados obtenidos tras la realización de los experimentos (n=3) en las líneas celulares puras SW480, HT-29 y DLD-1, alcanzando una dosis máxima de 6,4 mg/μL, 12,8 mg/μL y 24 mg/μL, respectivamente. En la figura 2 sólo se muestran los resultados obtenidos hasta el rango de concentraciones 6-6,4 mg/μL.

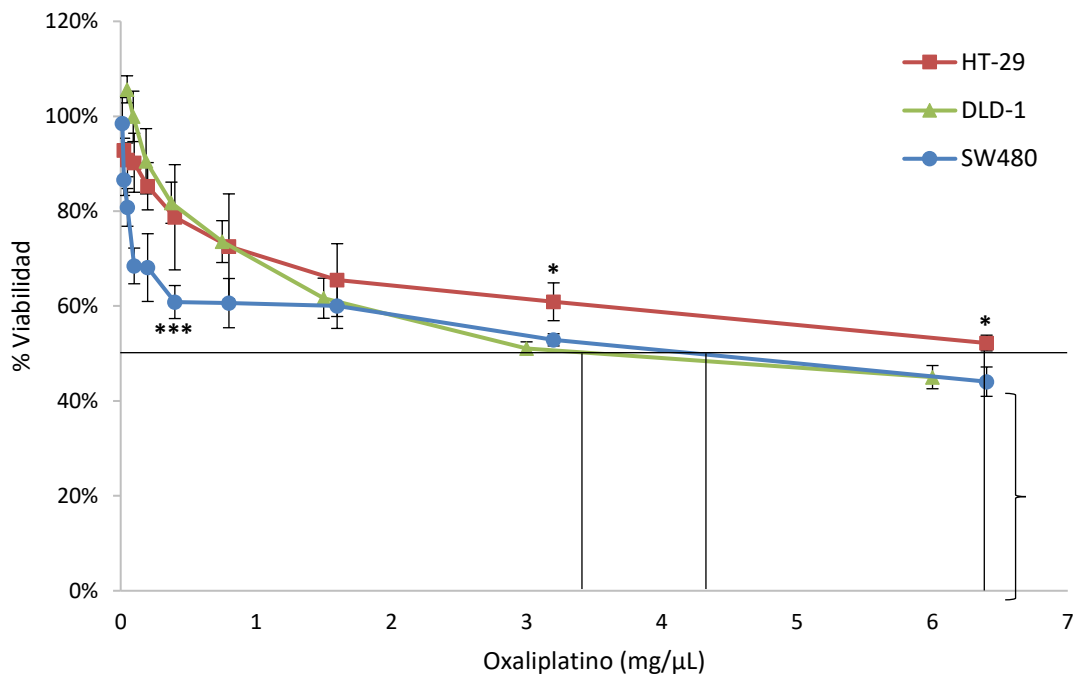


Figura 10. Supervivencia de las líneas celulares SW480, HT-29 y DLD-1 tratadas con oxaliplatino. Se muestra la respuesta a dosis crecientes de oxaliplatino sobre las líneas celulares puras (SW480, HT-29 y DLD-1) durante 3 días en cultivo. La línea horizontal representa el 50% de supervivencia y las líneas verticales, la IC50 de cada línea celular. La llave muestra la población resistente de SW480 a dosis fisiológica máxima. Se han representado las medias de una n=3 y las barras de error representan el error estándar en cada punto ($p < 0,05$ *; $p < 0,001$ ***).

Se aprecia una bajada significativa de la supervivencia en SW480 ($p < 0,001$) a dosis bajas en relación con HT-29 y DLD-1. En el rango de concentraciones 0,185-0,2 mg/μL, la supervivencia de SW480 se encuentra al $61,01\% \pm 0,07$, la de DLD-1 al $91,51\% \pm 0,07$ y la de HT-29, al $85,25\% \pm 0,04$. Luego estas dos líneas son más resistentes al tratamiento.

A medida que aumenta la concentración de oxaliplatino, la respuesta de SW480 y DLD-1 es similar, con una IC50 en el rango de 3,2-4,2 mg/μL; y diferente de la respuesta de HT-29 ($p < 0,05$), cuya IC50 se alcanza a 6,4 mg/μL. El tratamiento para SW480 a dosis fisiológica máxima deja una población resistente del $44,07 \pm 0,03\%$.

3.2.2. Modelos multiclonales de DLD-1: DLD-1 (25%) y DLD-1 (50%)

La **figura 11** (página siguiente) compara los resultados obtenidos en la respuesta de los modelos multiclonales DLD-1 (25%) y DLD-1 (50%) ($n=3$) con los resultados en la respuesta de la línea celular pura DLD-1. Se alcanzaron dosis máximas de 24 mg/μL. En la figura 11 sólo se muestran los resultados obtenidos hasta la concentración de 12 mg/μL.

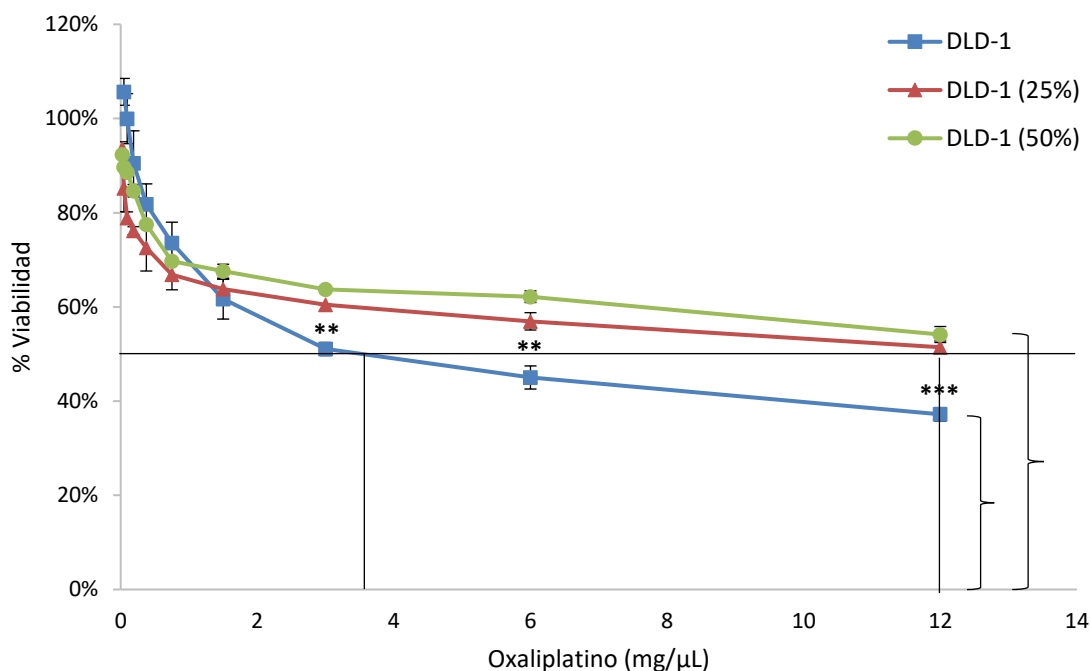


Figura 11. Supervivencia de la línea celular DLD-1 y los modelos multiclonicos DLD-1 (25%) y DLD-1 (50%) tratados con oxaliplatino. Se muestra la respuesta a dosis crecientes de oxaliplatino sobre los modelos multiclonicos DLD-1 (25%) y DLD-1 (50%), junto con la respuesta de la línea celular pura DLD-1, durante 3 días en cultivo. La línea horizontal representa el 50% de supervivencia y las líneas verticales, la IC50 de cada línea celular. Las llaves muestran la población resistente a dosis fisiológica máxima. Se han representado las medias de una n=3 y las barras de error representan el error estándar en cada punto ($p < 0,01$ **; $p < 0,001$ ***).

No se aprecia una diferencia significativa en la respuesta de los modelos con respecto a la línea celular pura a dosis bajas (rango de concentraciones 0,05-1,5 mg/μL). A medida que aumenta la dosis de oxaliplatino, se pueden observar diferencias significativas ($p < 0,01$) al comparar la línea celular pura DLD-1 con sus modelos multiclonicos DLD-1 (25%) y DLD-1 (50%), siendo mayor ($p < 0,001$) a dosis fisiológica máxima. En la **tabla 5** se muestran los cambios significativos en la supervivencia celular y la población resistente a dosis fisiológica máxima.

Tabla 5. Porcentajes de viabilidad celular de DLD-1, DLD-1 (25%) y DLD-1 (50%) a concentraciones de 3, 6 y 12 mg/μL (concentración fisiológica máxima).

CONCENTRACIÓN OXA	LÍNEA CELULAR	% VIABILIDAD	p-valor
3 mg/μL	DLD-1	51,06% ± 0,06	0,01
	DLD-1 (25%)	60,473% ± 0,001	
	DLD-1 (50%)	63,756% ± 0,003	
6 mg/μL	DLD-1	45,02% ± 0,02	0,01
	DLD-1 (25%)	56,94% ± 0,02	
	DLD-1 (50%)	62,17% ± 0,01	
12 mg/μL (dosis fisiológica máxima)	DLD-1	37,20% ± 0,01	0,001
	DLD-1 (25%)	51,43% ± 0,01	
	DLD-1 (50%)	54,14% ± 0,02	

3.2.3. Modelos multiclonicos de HT-29: HT-29 (25%) y HT-29 (50%)

La **figura 12** compara los resultados obtenidos en la respuesta de los modelos multiclonicos HT-29 (25%) y HT-29 (50%) (n=3) con los resultados en la respuesta de la línea celular pura HT-29. Se alcanzaron dosis máximas de 6,4 mg/ μ L.

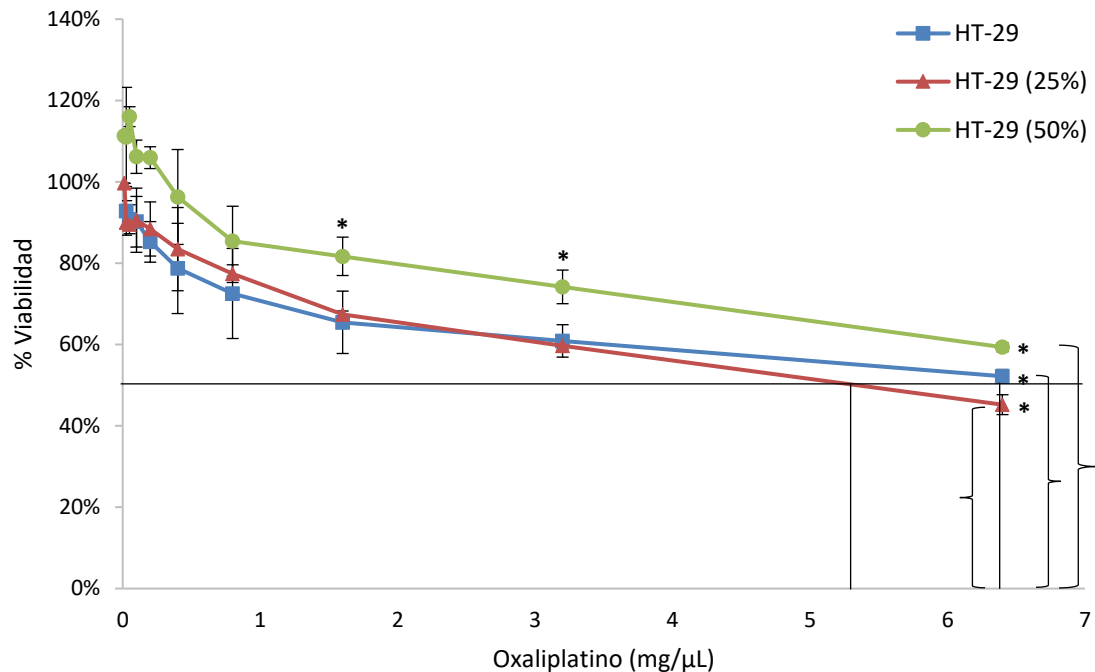


Figura 12. Supervivencia de la línea celular HT-29 y los modelos multiclonicos HT-29 (25%) y HT-29 (50%) tratados con oxaliplatino. Se muestra la respuesta a dosis crecientes de oxaliplatino sobre los modelos multiclonicos HT-29 (25%) y HT-29 (50%), junto con la respuesta de la línea celular pura HT-29, durante 3 días en cultivo. La línea horizontal representa el 50% de supervivencia y las líneas verticales, la IC50 de cada línea celular. Las llaves muestran la población resistente a dosis fisiológica máxima. Se han representado las medias de una n=3 y las barras de error representan el error estándar en cada punto ($p < 0,05$ *).

Se puede observar un comportamiento similar entre HT-29 y HT-29 (25%) dentro del rango de concentraciones 0,025-3,2 mg/ μ L, no se aprecian diferencias significativas entre los porcentajes de viabilidad. Al aumentar hasta el 50% la concentración de SW480 en la población de HT-29 para obtener el modelo multiclonico HT-29 (50%), se puede apreciar un aumento significativo ($p < 0,05$) de la supervivencia celular en el rango de concentraciones 1,6-3,2 mg/ μ L. A dosis fisiológica máxima (6,4 mg/ μ L) las diferencias en la viabilidad de la población resistente son significativas ($p < 0,05$) y se encuentra al 52,21% \pm 0,02 en el caso de HT-29, al 45,22% \pm 0,09 en el caso de HT-29 (25%) y al 59,35% \pm 0,01 en el caso de HT-29 (50%).

Capítulo 4: DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

4.1. Discusión

El cáncer de tipo colorrectal es la segunda causa de muerte por esta enfermedad en el mundo moderno; no obstante, los tratamientos para primeras líneas son cada vez más eficaces por lo que el problema que ahora se debe afrontar son las recaídas y la metástasis.

Un tumor no es una masa homogénea de células, sino que se componen de diferentes clones, productos de la inestabilidad genética que otorga una mutación conductora⁽¹³⁾. Fruto de esta inestabilidad aparecen las células madre tumorales⁽¹⁴⁾, células que se dividen de forma lenta por autorrenovación. Cuando una CMT se divide, aparece una célula de rápida división y otra CMT que mantiene constante su población. Esta capacidad les permitiría generar un tumor al trasplantar células tumorales de pacientes en ratones inmunodeprimidos, como observaron O'Brien y colaboradores en un estudio realizado 2007⁽³¹⁾.

La agresividad de un tumor se ha relacionado con la cantidad de CMTs que contiene y sus características moleculares⁽⁴⁸⁾. Para poder entender cómo se comportará un tumor, tanto velocidad de crecimiento como respuesta a los tratamientos, es necesario una firma molecular con la cual relacionar dicho comportamiento. Por esta razón, se ha estudiado tanto los posibles marcadores de superficie, que pueden definir un comportamiento del tumor, como el comportamiento de dichas células en un modelo *in vivo*. Además, se ha estudiado su respuesta ante distintos tratamientos quimioterapéuticos. Los resultados obtenidos dan pautas para poder discutir y mejorar la base de datos de pacientes simulados, que es el objetivo de este trabajo.

4.1.1. Estudio de marcadores, velocidad de crecimiento tumoral y respuesta a tratamiento

De las líneas celulares analizadas, DLD-1 contiene los niveles más altos de BCRP1, EpCAM, AC133 y CD34. En la **tabla 4** se observa cómo la presencia de DLD-1 en los modelos multiclonales aumenta el porcentaje de células positivas para dichos marcadores, siendo mayor cuanto mayor es el porcentaje de DLD-1 en la muestra.

La expresión de los transportadores de tipo ABC se encuentra aumentada en algunos tipos de cáncer. Algunos autores sugieren la detección de esta sobreexpresión en CMTs como forma de rastrear esta población⁽⁴⁹⁾. La función transportadora de BCRP1 juega un papel muy importante en la resistencia y supervivencia de las CMTs y, por ende, en la agresividad del tumor^(50,51). El porcentaje de células positivas en DLD-1 (25%) y DLD-1 (50%) para BCRP1 es mayor que en las

otras líneas celulares, prediciendo una mayor resistencia. Como se puede comprobar en la **figura 11**, estos dos modelos multiclonicos tienen la mayor IC50 de todas las líneas analizadas, así como la mayor población final resistente (**tabla 5**). Del mismo modo, el estudio *in vivo* del crecimiento tumoral muestra que DLD-1 es, junto con HT-29, una línea de crecimiento más lento. Hay diferencias estadísticamente significativas entre las velocidades del crecimiento *in vivo* de los tumores de ambas líneas respecto a los tumores SW480 (**figura 4**). En las **figuras 7 y 9**, aunque las diferencias no sean significativas, sí se puede observar una tendencia mayor en el crecimiento de las líneas con mayor presencia SW480 como demuestran los experimentos previos. La presencia de una población más rápida dentro del modelo multiclonico provocaría un aumento en la velocidad de crecimiento. Estos datos concuerdan con el hecho de que la línea celular DLD-1 es la más agresiva de las tres líneas analizadas seguida de HT-29 y SW480, en este orden, y responde peor a los tratamientos. Predeciblemente también producirá mayor índice de recaídas, pero para comprobar esto deberíamos continuar nuestros experimentos con inyecciones de células de los modelos multiclonicos después de los tratamientos (no contemplado en nuestros objetivos iniciales).

El porcentaje de células positivas en SW480 y HT-29 para BCRP1 es muy similar y cercano al 1%, ligeramente superior en HT-29 (**tabla 4**). Aunque la diferencia en la expresión de BCRP1 no sea significativa, sí aumenta la resistencia en HT-29 y sus modelos multiclonicos, HT-29 (25%) y HT-29 (50%), aumentando la IC50 (**figuras 10 y 12**). Esto pone de manifiesto que la agresividad tumoral no viene definida únicamente por la presencia de BCRP1, sino también por la ratio de división celular. Células de ciclo celular más rápido se afectan más por la quimioterapia.

Como ya se ha comentado con anterioridad, en el estudio *in vivo* de las líneas celulares SW480 y HT-29 se aprecian diferencias significativas en la velocidad de crecimiento tumoral. En el experimento 1, no se observan diferencias entre las velocidades de crecimiento entre HT-29, HT-29 (25%) y HT-29 (50%), especialmente entre ambos modelos multiclonicos, posiblemente debido al elevado número de células inyectadas. Sin embargo, en el experimento 2, las velocidades de crecimiento de HT-29 (25%) y HT-29 (50%) si muestran un cambio de tendencia apreciable. Las células tumorales interaccionan con su entorno de forma que crean un microambiente que les permite dividirse, diferenciarse y sobrevivir dentro del tejido⁽¹⁵⁾. Un cambio en el microambiente celular, causado por las diferencias en el número de células trasplantadas, podría ser el responsable de estas diferencias. Este hecho sería similar al que ocurre cuando se pone en cultivo un número muy bajo de células en una superficie demasiado amplia, el cultivo no progresa de igual forma que lo haría si la cantidad de células inicial fuera mayor.

4.1.1.1. EpCAM

A pesar de ser el único método validado para la detección de células madre tumorales, CellSearch® de Veridex tiene una sensibilidad del 48% y una especificidad del 92% (parámetros calculados según los estudios realizados en pacientes con CRC y sujetos control⁽⁴¹⁾). La heterogeneidad con la que EpCAM se presenta en la superficie celular es una gran limitación de este método diagnóstico. Mediante esta prueba más de la mitad de los pacientes con CRC no son diagnosticados correctamente; no obstante, la probabilidad de que el resultado sea un falso positivo es del 8% (VPP=85,71%; VPN=63,89%). Este marcador se ha incluido en el estudio para tener una comparativa directa con lo actualmente validado por la FDA. En la mayoría de los hospitales este marcador ha caído en desuso (comunicación personal de varios jefes de servicio de oncología de grandes hospitales madrileños).

4.1.1.2. CD133/AC133

Existe mucha controversia en cuanto al uso de CD133/AC133 como marcador para la detección de CMTs debido a que su expresión no es exclusiva de este tipo de células. Además, se ha documentado tanto el fallo de una población CD133⁽⁺⁾ para originar un tumor en un xenotransplante, como la capacidad de una población CD133⁽⁻⁾ para generarlo⁽⁵²⁾. Sin embargo, estudios recientes^(53,54) aseguran que se trata de un marcador útil en la predicción y desarrollo del CRC y la supervivencia de los pacientes, no individualmente, sino combinado con CD44⁽⁵⁵⁾.

Este marcador no se expresa de manera homogénea entre la población de CMTs dentro de un tumor, por ello, en palabras de Wang y colaboradores: *“The absence of surface molecule(s) on CSCs will make it even more difficult to track and target this group of minority cells”*, la ausencia de moléculas de superficie en las células madre tumorales hará incluso más difícil detectar y atacar este grupo minoritario de células.

4.1.2. El efecto de la proteína recombinante PEDF sobre la quimiorresistencia y recaída

La población resistente a dosis fisiológica máxima es aquella población de células que sobrevive a la dosis máxima que se le puede administrar a un paciente. En estudios recientes, Honrubia y colaboradores detectaron el efecto sinérgico de una proteína transgénica recombinante del factor derivado del epitelio pigmentado (PEDF) con el tratamiento del CRC. Los resultados obtenidos fueron una bajada en la concentración inhibitoria media máxima, una reducción de la población resistente a dosis fisiológica máxima y una disminución de la población a dosis mínima. El efecto quimioterapéutico de los tratamientos anti-cáncer sólo actúan sobre las células en rápida división. Como consecuencia de esto, los pacientes sufren caída del cabello y daños en el epitelio intestinal, entre otros efectos secundarios. Las CMTs son células de división

lenta, su ciclo celular se encuentra detenido hasta que se dividen de forma asimétrica. El fármaco no puede actuar en ellas y por tanto resisten al tratamiento.

Los tratamientos y ciclos largos de quimioterapia están destinados a eliminar el 100% de las células tumorales; sin embargo, el 30% de los pacientes de CRC recaen a los 5-10 años. Se ha propuesto que las CMTs son las responsables de dicha recaída. El tratamiento no es efectivo sobre esta población, que permanece durmiente hasta que recibe un nuevo estímulo y se divide.

Tras observar la reducción de la IC50 en modelos *in vivo*, no sólo *in vitro*, Honrubia y colaboradores proponen el uso de esta proteína como adyuvante en los tratamientos quimioterapéuticos⁽³⁷⁾. Experimentos futuros deberían ir encaminados a estudiar más en detalle la sinergia entre la ruta de señalización de la proteína PEDF y los tratamientos quimioterapéuticos actualmente en uso clínico.

4.1.3. Validez de la elaboración de una batería de modelos multiclónicos tumorales como estrategia de medicina personalizada

Los tumores se han clasificado según su localización y estadio en el que se encuentran, sin embargo, dos tumores localizados en dos órganos distintos pueden metastatizar el mismo órgano. Cada tumor es un mundo, y su clasificación se debería realizar por la presencia o ausencia de determinados marcadores moleculares que lo definan. De esta manera podremos estudiar si existe una base molecular para que dos tumores distintos se comporten de manera similar.

Partiendo de esta base, en este TFG se muestra el análisis de los marcadores moleculares de superficie estudiados en la bibliografía sobre una batería de modelos multiclónicos tumorales con el fin de obtener una firma molecular que los caracterice. Se ha observado una asociación entre un determinado comportamiento (con relación a velocidad de crecimiento) y la respuesta a los tratamientos. Esto es un estudio piloto que da pie a completar la base de datos generada con nuevos casos de simulaciones de pacientes. De esta forma se podrá determinar previamente cuál será el tratamiento más efectivo sobre la futura recaída.

4.1.4. Discusión sobre las dificultades de las técnicas empleadas.

El estudio de los marcadores relacionados con las CMTs, tanto en las líneas celulares como en los modelos multiclónicos, está limitado por la cantidad de células que sobreviven al proceso de marcado y análisis. No todas las células son igual de resistentes, ni se dividen a la misma velocidad. Se ha podido observar un aumento de la muerte celular en la población de células no CMTs que aumenta la proporción de CMTs (más resistentes) dentro de la población total. Esto

crea artefactos al medir un porcentaje de células positivas mayor al real. La **figura 13** muestra el efecto de la muerte celular sobre la proporción de células positivas analizadas para BCRP1 en SW480. Es muy importante controlar en los distintos experimentos, que la población viva es suficientemente representativa de la población inicial. Se ha considerado que los experimentos deben tener al menos un 60% de población viable para considerarse para el análisis. Esta dificultad se puede hacer frente aumentando el número de repeticiones de los experimentos.

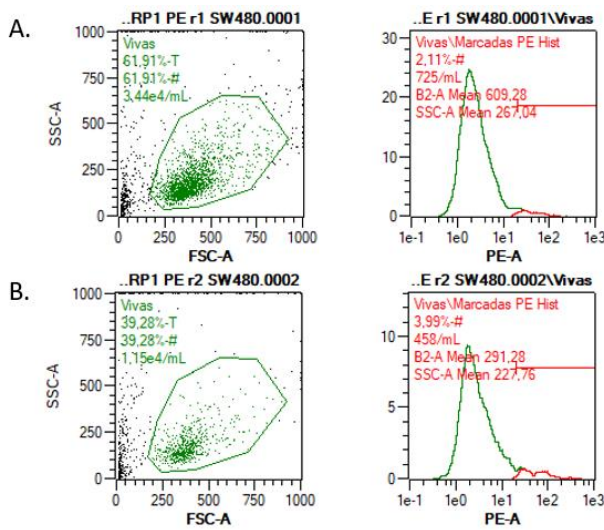


Figura 13. Efecto de la muerte celular sobre la proporción de células positivas analizadas para BCRP1 en SW480. Las células vivas se muestran en verde, las células positivas para BCRP1 se muestran en rojo. La disminución de la supervivencia celular, del 61,91% (13.A izquierda) al 39,28% (13.B izquierda), provoca un aumento en la proporción de células positivas para BCRP1, que pasa del 2,11% (13.A derecha) al 3,99% (13.B derecha).

4.2. Conclusiones

Las conclusiones del trabajo son:

1. Caracterizar la firma molecular de los modelos multiclonicos tumorales simulados ha permitido elaborar una base de datos piloto que informa sobre el mejor tratamiento para cada tipo de tumor dependiendo de su firma molecular.
2. Los modelos multiclonicos generados apuntan a una mayor agresividad tumoral y resistencia a los tratamientos cuanto mayor es la expresion de AC133 y BCRP1, y más lenta la velocidad de crecimiento tumoral.
3. La agresividad de un tumor está definida por estas características moleculares en sus células madre tumorales. Es necesario adaptar los tratamientos para acabar con dicha población, y el uso sinérgico de la proteína recombinante de PEDF supone un primer paso para acabar con la recaída.
4. En este trabajo se ha realizado una base de datos como proyecto piloto, con información sobre la relación existente entre las características moleculares de los tumores y su respuesta a la quimioterapia antes de que estos aparezcan. Esto va a suponer un gran avance en el tratamiento oncológico personalizado.

BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization. *Colorectal cancer Source: Globocan 2018 Number of new cases in 2018, both sexes, all ages*. (2018).
2. Agencia Española Contra el Cáncer. *Las cifras del cáncer en España*. (2019).
3. Yusof, A. S., Isa, Z. M. & Shah, S. A. Dietary Patterns and Risk of Colorectal Cancer: A Systematic Review of Cohort Studies (2000-2011). *Asian Pacific J. Cancer Prev.* **13**, 4713–4717 (2012).
4. Masri, O. A., Chalhoub, J. M. & Sharara, A. I. Role of vitamins in gastrointestinal diseases. *World J. Gastroenterol.* **21**, 5191 (2015).
5. Tian, Y. *et al.* Familial colorectal cancer risk in half siblings and siblings: nationwide cohort study. *BMJ* l803 (2019). doi:10.1136/bmj.l803
6. Keller, D. S., Windsor, A., Cohen, R. & Chand, M. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: review of the evidence. *Tech. Coloproctol.* **23**, 3–13 (2019).
7. Cross, A. J. *et al.* Metabolites of tobacco smoking and colorectal cancer risk. *Carcinogenesis* **35**, 1516–1522 (2014).
8. Fedirko, V. *et al.* Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies. *Ann. Oncol.* **22**, 1958–1972 (2011).
9. Aykan, N. F. Red meat and colorectal cancer. *Oncol. Rev.* **9**, 288 (2015).
10. Dong, Y. *et al.* Abdominal obesity and colorectal cancer risk: systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Biosci. Rep.* **37**, BSR20170945 (2017).
11. Luo, S. *et al.* Diabetes mellitus increases the risk of colorectal neoplasia: An updated meta-analysis. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* **40**, 110–123 (2016).
12. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
13. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
14. Ricci-Vitiani, L., Fabrizio, E., Palio, E. & De Maria, R. Colon cancer stem cells. *J. Mol. Med.* **87**, 1097–1104 (2009).
15. Paduch, R. Theories of cancer origin. *Eur. J. Cancer Prev.* **24**, 57–67 (2015).
16. Bonnet, D. & Dick, J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* **3**, 730–7 (1997).
17. Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J. & Clarke, M. F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 3983–3988 (2003).
18. Galli, R. *et al.* Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res.* **64**, 7011–21 (2004).

19. Moghbeli, M., Moghbeli, F., Forghanifard, M. M. & Abbaszadegan, M. R. Cancer stem cell detection and isolation. *Med. Oncol.* **31**, 69 (2014).
20. Vidal Vademecum Spain. Fluorouracilo. Available at: <https://www.vademecum.es/principios-activos-fluorouracilo-L01BC02>. (Accessed: 19th June 2019)
21. Vidal Vademecum Spain. Irinotecán. Available at: <https://www.vademecum.es/principios-activos-irinotecan-L01XX19>. (Accessed: 19th June 2019)
22. Vidal Vademecum Spain. Oxaliplatino. Available at: <https://www.vademecum.es/principios-activos-oxaliplatino-l01xa03>. (Accessed: 19th June 2019)
23. Zhou, B., Der, C. J. & Cox, A. D. The role of wild type RAS isoforms in cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* **58**, 60–9 (2016).
24. Vidal Vademecum Spain. Bevacizumab. Available at: <https://www.vademecum.es/principios-activos-bevacizumab-L01XC07>. (Accessed: 19th June 2019)
25. Vidal Vademecum Spain. Panitumumab. Available at: <https://www.vademecum.es/principios-activos-panitumumab-L01XC08>. (Accessed: 19th June 2019)
26. Vidal Vademecum Spain. Cetuximab. Available at: <https://www.vademecum.es/principios-activos-cetuximab-L01XC06>. (Accessed: 19th June 2019)
27. Vidal Vademecum Spain. Regorafenib. Available at: <https://www.vademecum.es/principios-activos-regorafenib-L01XE21>. (Accessed: 19th June 2019)
28. Vidal Vademecum Spain. Trifluridina + tipiracilo. Available at: <https://www.vademecum.es/principios-activos-trifluridina + tipiracilo-L01BC59+P1>. (Accessed: 19th June 2019)
29. Hemmati, H. D. *et al.* Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 15178–83 (2003).
30. Liu, G. *et al.* Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol. Cancer* **5**, 67 (2006).
31. O'Brien, C. A., Pollett, A., Gallinger, S. & Dick, J. E. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* **445**, 106–110 (2007).
32. Ricci-Vitiani, L. *et al.* Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* **445**, 111–5 (2007).
33. Dalerba, P. *et al.* Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 10158–10163 (2007).

34. Li, C. *et al.* Identification of Pancreatic Cancer Stem Cells. *Cancer Res.* **67**, 1030–1037 (2007).
35. Collins, A. T., Berry, P. A., Hyde, C., Stower, M. J. & Maitland, N. J. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res.* **65**, 10946–51 (2005).
36. Eramo, A. *et al.* Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ.* **15**, 504–14 (2008).
37. Honrubia-Gómez, P. *et al.* Pedf derived peptides affect colorectal cancer cell lines resistance and tumour re-growth capacity. *Oncotarget* **10**, 2973–2986 (2019).
38. Sgambato, A. *et al.* Post-translational modulation of CD133 expression during sodium butyrate-induced differentiation of HT29 human colon cancer cells: Implications for its detection. *J. Cell. Physiol.* **224**, n/a-n/a (2010).
39. Kemper, K. *et al.* The AC133 Epitope, but not the CD133 Protein, Is Lost upon Cancer Stem Cell Differentiation. *Cancer Res.* **70**, 719–729 (2010).
40. Allard, W. J. *et al.* Tumor Cells Circulate in the Peripheral Blood of All Major Carcinomas but not in Healthy Subjects or Patients With Nonmalignant Diseases. *Clin. Cancer Res.* **10**, 6897–6904 (2004).
41. *Circulating Tumor Cell Kit (Epithelial).*
42. Ma, L. *et al.* ABCG2 is required for self-renewal and chemoresistance of CD133-positive human colorectal cancer cells. *Tumor Biol.* **37**, 12889–12896 (2016).
43. Liu, H. *et al.* Correlation between Membrane Protein Expression Levels and Transcellular Transport Activity for Breast Cancer Resistance Protein. *Drug Metab. Dispos.* **45**, 449–456 (2017).
44. Civin, C. I. *et al.* Positive stem cell selection--basic science. *Prog. Clin. Biol. Res.* **333**, 387–401; discussion 402 (1990).
45. Steele, F. R., Chader, G. J., Johnson, L. V. & Tombran-Tink, J. Pigment epithelium-derived factor: neurotrophic activity and identification as a member of the serine protease inhibitor gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 1526–1530 (1993).
46. Tombran-Tink, J., Pawar, H., Swaroop, A., Rodriguez, I. & Chader, G. J. Localization of the Gene for Pigment Epithelium-Derived Factor (PEDF) to Chromosome 17p13.1 and Expression in Cultured Human Retinoblastoma Cells. *Genomics* **19**, 266–272 (1994).
47. Ek, E. T. H., Dass, C. R. & Choong, P. F. M. Pigment epithelium-derived factor: a multimodal tumor inhibitor. *Mol. Cancer Ther.* **5**, 1641–1646 (2006).
48. Pece, S. *et al.* Biological and Molecular Heterogeneity of Breast Cancers Correlates with Their Cancer Stem Cell Content. *Cell* **140**, 62–73 (2010).
49. Begicevic, R.-R. & Falasca, M. ABC Transporters in Cancer Stem Cells: Beyond Chemoresistance. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, (2017).

50. Xie, Z.-Y., Lv, K., Xiong, Y. & Guo, W.-H. ABCG2-mediated multidrug resistance and tumor-initiating capacity of side population cells from colon cancer. *Oncol. Res. Treat.* **37**, 666–8, 670–2 (2014).
51. Hsu, H.-H. *et al.* Oxaliplatin resistance in colorectal cancer cells is mediated via activation of ABCG2 to alleviate ER stress induced apoptosis. *J. Cell. Physiol.* **233**, 5458–5467 (2018).
52. Glumac, P. M. & LeBeau, A. M. The role of CD133 in cancer: a concise review. *Clin. Transl. Med.* **7**, 18 (2018).
53. Kazama, S. *et al.* Expression of the stem cell marker CD133 is related to tumor development in colorectal carcinogenesis. *Asian J. Surg.* **41**, 274–278 (2018).
54. Wang, B.-B. *et al.* Clinical significance of stem cell marker CD133 expression in colorectal cancer. *Histol. Histopathol.* **31**, 299–306 (2016).
55. Wang, C. *et al.* Evaluation of CD44 and CD133 as cancer stem cell markers for colorectal cancer. *Oncol. Rep.* **28**, 1301–8 (2012).