



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Programa de Doctorado en Medicina

TESIS DOCTORAL

Desregulación del eje de señalización SET/PP2A por los microARNs 199b y 19b y su impacto clínico en estadios tempranos de carcinoma colorrectal y en cáncer de recto localmente avanzado.

Memoria presentada para la obtención del grado de Doctor en
Medicina y Cirugía por Jaime Rubio Pérez

Dirigida por el Dr. Ion Cristóbal y la Dra. Cristina Caramés y
tutelada por el Dr. Jesús García Foncillas

Presentada como compendio de publicaciones.

Madrid, 10 septiembre 2021

D. Ion Cristóbal Yoldi, Doctor en Bioquímica por la Universidad de Navarra e investigador del Instituto de Investigación Sanitaria – Fundación Jiménez Díaz

y

D. Cristina Caramés Sánchez, Doctora en Medicina y Cirugía por la Universidad Autónoma de Madrid, Médico especialista en Oncología Médica en el Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz.

y

D. Jesús García-Foncillas López, jefe de Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz, director del Oncohealth Institute y Profesor titular de la Universidad Autónoma de Madrid

certifican:

que Jaime Rubio Pérez ha realizado, bajo nuestra dirección, el trabajo titulado “Desregulación del eje de señalización SET/PP2A por los microARNs 199b y 19b y su impacto clínico en estadios tempranos de carcinoma colorrectal y en cáncer de recto localmente avanzado.”

para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Dicho trabajo reúne, a nuestro juicio, las condiciones de originalidad y rigor necesarios y, por tanto, avalamos su presentación para ser juzgado.

Para que conste, firmamos el presente certificado en:

Madrid, a 10 de septiembre de 2021

Dr. Ion Cristóbal Yoldi

D. Cristina Caramés Sánchez

Prof. Jesús García-Foncillas López

AGRADECIMIENTOS

Como decía una amiga, si te dan, agradece, así de simple es la vida y yo quiero empezar este trabajo agradeciendo a los que me han impulsado a publicar esta tesis.

En primer lugar, me gustaría agradecerle a Jesús García-Foncillas la oportunidad de formarme en este Servicio de Oncología que me ha permitido llegar hasta aquí hoy. A lon porque todo este trabajo no habría salido adelante sin tu dura supervisión, por ayudarme en cada paso del camino y por ser un referente en el laboratorio para los oncólogos, sin ti habría tirado la toalla mil y una veces. A Cristina por bajarme al laboratorio hace años y haberme demostrado que durante la residencia se puede conseguir investigar. A Blanca, antecesora de este trabajo en equipo, y a Andrea por ser la mejor compañera que podía pedir en el laboratorio, por escuchar mis quejas y por esos cafés de media mañana.

En segundo lugar, me gustaría agradecer el trabajo tan duro y tan bonito que hacen los oncólogos con los que me he formado durante estos 5 años, adjuntos y residentes, por recordarme que empezamos en este trabajo con ilusión y con ganas de ayudar a los demás. No olvido la responsabilidad personal que me habéis enseñado en el día a día y me llevo un poco de cada uno par el futuro, me habéis enseñado todo lo que sé y solo espero seguir encontrándonos en el camino.

En cuarto lugar, a mis amigos, aquí en Madrid me habéis dado fuerza estos años para continuar este proyecto. A los “conchitos”, lo mejor de la Fundación Jiménez Díaz, a los “medicinos” y a los de siempre, esto es gracias a vosotros. Gracias a Pilar, a Bea y a Tere porque todo es más divertido con vosotras. Y sobretodo gracias a Rober y a Ana Belén, porque siempre me habéis apoyado profesional y personalmente, os leéis mis artículos y escucháis mis casos, y porque para mi sois la familia que se elige, la lealtad es impagable para mi.

Por último, y no menos importante, a mi padre, que sin quererlo puso la oncología como mi meta en la vida y a los pacientes como mi centro; a mi madre por enseñarme la definición de perseverancia y sacrificio personal y por mostrarme que es lo realmente importante en la vida y que a veces lo mejor para tu familia es lo más difícil para uno

mismo y anteponer las necesidades propias a las de los demás. Y gracias a Pablo, mi marido, por ser el motor de mi vida, por serlo todo para mí, por todo lo que hemos luchado juntos y por apoyarme en mis sueños. Y quiero concluir agradeciéndoselo a mi abuela, yaya sin ti no habría llegado hoy aquí, por ser todo lo que aspiro a ser, por ser la mejor persona que he conocido, por tu pasión por la cultura y por tu humanidad, nunca olvidaré todo lo que me has enseñado. Por ti yaya.

RESUMEN

El carcinoma colorrectal (CCR) es una enfermedad multifactorial, con una elevada prevalencia a nivel global, y representa la tercera causa de fallecimiento por cáncer en el mundo occidental. La carcinogénesis es un proceso molecularmente muy complejo y ligado al desequilibrio entre oncogenes y genes supresores de tumores. En dicho proceso, la regulación a nivel epigenético a través de microARNs (miRs) ha demostrado jugar un papel fundamental. Los miRs son moléculas de ARN monocatenario de pequeño tamaño (entre 19 y 25 nucleótidos) que, aunque no codifican proteínas, son capaces de regular la expresión génica de determinados genes diana mediante su unión al ARN mensajero, con la consiguiente inhibición de la traducción a proteínas de dichos genes. Con la caracterización de los subtipos moleculares el abordaje terapéutico está empezando a cambiar y la descripción cada vez más precisa de las rutas moleculares que subyacen al cáncer y de sus mecanismos de regulación es esencial. La proteína fosfatasa 2A (PP2A) es un complejo holoenzimático con actividad serina/treonina fosfatasa que actúa como un supresor tumoral y regula vías de señalización con gran relevancia para el correcto mantenimiento de la homeostasis celular. La proteína SET se ha descrito como un inhibidor endógeno de PP2A y, por tanto, su sobreexpresión impulsa la carcinogénesis. Unos niveles elevados de SET, se han asociado con un peor pronóstico y supervivencia global (SG) en pacientes con carcinoma colorrectal metastásico (CCRm), así como con una pobre respuesta a la quimioterapia (QT) convencional basada en 5-fluorouracilo (5-FU) y oxaliplatino. De este modo, una baja expresión del miR-199b, el cual actúa como inhibidor post transcripcional de SET, se ha relacionado con progresión tumoral y desarrollo de metástasis a distancia, así como con quimiorresistencia de las células tumorales a diversos agentes terapéuticos, confiriendo un peor pronóstico de la enfermedad. Por lo tanto, el eje de señalización miR-199b/SET representa una potencial diana terapéutica.

Esta tesis doctoral se presenta como un compendio de publicaciones; en la primera de ellas, constatamos que la sobreexpresión de SET se asocia a progresión tumoral y predice mal pronóstico en pacientes con CCR localizado, exhibiendo en este sentido un comportamiento similar al descrito previamente en CCRm, aunque con una prevalencia de esta alteración menor a la descrita para pacientes con enfermedad metastásica, lo que

probablemente se deba a que supone una ventaja adaptativa durante la progresión del CCR localmente avanzado a enfermedad metastásica. Además, describimos como la modulación de la expresión de SET afecta tanto a la migración y agresividad celular como al fenotipo de transición epitelio-mesénquima (TEM) en líneas celulares de CCR. Por tanto, esta alteración permitiría definir un subgrupo de pacientes con pronóstico muy desfavorable, que podrían beneficiarse del uso de antagonistas de SET o de tratamientos más intensivos. En la segunda publicación constatamos que los datos obtenidos sobre el impacto clínico de la expresión del miR-199b en CCRm se observan también en CCR localizado, donde los bajos niveles de expresión del miR-199b predicen un peor pronóstico en términos de supervivencia libre de progresión (SLP) y supervivencia global (SG). Igualmente, los resultados obtenidos indican que la expresión disminuida de este miR es un evento molecular de mayor prevalencia que la sobreexpresión de SET y actúa como un biomarcador independiente de SET que determina un subgrupo de pacientes con CCR localizado con muy mal pronóstico. En la tercera publicación se llevó a cabo una evaluación de la capacidad del miR-199b de regular la sensibilidad a 5-FU en líneas celulares de CCR, observando que la sobreexpresión ectópica del miR lleva no sólo a un incremento de la sensibilidad a dicho agente quimioterápico, sino a la reversión de la resistencia en un modelo de resistencia adquirida al mismo. Además, se pudo comprobar que este efecto es dependiente de SET, lo cual confirma la relevancia del eje miR-199b/SET como regulador de la respuesta a tratamientos basados en 5-FU. Estos resultados funcionales se validaron también a nivel clínico en una cohorte de pacientes con cáncer de recto localmente avanzado (CRLA) viendo que la baja expresión del miR-199b es un marcador independiente que determina tanto una falta de respuesta a quimiorradioterapia neoadyuvante como una peor SLP y SG. En definitiva, es necesaria la validación del eje miR199b/SET como factor predictivo de respuesta en modelos ex vivo e in vivo, paso previo a la exploración de su posible papel terapéutico. Finalmente, en el cuarto artículo quisimos analizar miRs alternativos al miR-199b cuya desregulación pudiera afectar al estado de activación de PP2A, puesto que este supresor tumoral es el responsable último de determinar la respuesta a tratamientos basados en 5-FU en la ruta SET/PP2A. Así mismo, nuestro grupo había demostrado previamente que el estado de activación per se de PP2A es un marcador de muy mal pronóstico en pacientes con CCR metastásico, y que la baja expresión de su subunidad reguladora PPP2R5E constituye un

mecanismo de disminución de la actividad PP2A en esta enfermedad. Del mismo modo, nos planteamos que el miR-19b, que es un regulador de PPP2R5E, podría tener también un impacto clínico en pacientes con CRLA. En nuestro estudio pudimos observar que los niveles bajos del miR-19b se asocian con un menor tamaño tumoral ($p=0.003$), un estadio patológico temprano ($p=0.003$) y una ausencia de recurrencia en nuestra cohorte ($p=0.001$). Esto sirvió para predecir una respuesta patológica positiva ($p<0.001$) y una mejor supervivencia global ($p=0.003$) y libre de evento ($p=0.023$), y además los análisis multivariados determinaron su impacto como marcador predictivo independiente para estas variables. Por último, se pudo demostrar una clara correlación inversa entre los niveles de expresión del miR-19b y *PPP2R5E*, que apoya la hipótesis de la relevancia del eje miR-19b/PP2A y su potencial utilidad como diana terapéutica en esta enfermedad.

ÍNDICE

	<i>página</i>
<u>Abreviaturas</u>	17
<u>Introducción</u>	21
A. Cáncer colorrectal:	23
1- Epidemiología y factores de riesgo y preventivos	23
2- Fisiopatología	25
a. Oncogenes	28
b. Genes supresores de tumores	30
c. Genes de la vía de reparación del ADN	32
d. Alteraciones epigenéticas	32
3- Presentación clínica, diagnóstico y estadiaje	33
4- Tratamiento del CCR	36
A. Tratamiento del cáncer de colon no metastásico	37
B. Tratamiento del cáncer de recto no metastásico	38
C. Tratamiento del CCR metastásico	41
B. PP2A	44
a. Estructura del complejo PP2A	44
b. Funciones	45
c. PP2A y cáncer	47
C. SET: un inhibidor endógeno de PP2A	48
a- Funciones de SET	49
b- Regulación de SET	51
c- SET y cáncer	52
D. MicroARNs (miRs) y su papel como reguladores del eje SET/PP2A	55
a- Mecanismo de acción y su papel en la carcinogénesis	55
b- MiRs y cáncer colorrectal	56
c- MiRs y cáncer de recto	58
1- MiRs y resistencia a 5-FU	59
2- MiRs y resistencia a radioterapia	60
3- MiRs y resistencia a la QTRT	61

d- MiR-199b y carcinoma colorrectal	62
e- MiR-19b y carcinoma colorrectal	63
<u>Objetivos</u>	65
<u>Resultados</u>	69
<i>Publicaciones científicas</i>	
1- Cristóbal I [†] , Torrejón B [†] , Rubio J , Santos A, Pedregal M, Caramés C, Zazo S, Luque M, Sanz-Álvarez M, Madoz-Gúrpide J, Rojo F and García-Foncillas J. Deregulation of SET is Associated with Tumor Progression and Predicts Adverse Outcome in Patients with Early-Stage Colorectal Cancer. J Clin Med. 2019, 8 (3), 346.	71
2- Cristóbal I [†] , Rubio J [†] , Torrejón B, Santos A, Caramés C, Luque M, Sanz-Álvarez M, Alonso R, Zazo S, Madoz-Gúrpide J, Rojo F, García-Foncillas J. MicroRNA-199b deregulation shows a strong SET-independent prognostic value in early-stage colorectal cancer. J Clin Med. 2020, 9 (8), 2419.	99
3- Cristóbal I [†] , Rubio J [†] , Santos A, Torrejón B, Caramés C, Imedio L, Mariblanca S, Luque M, Sanz-Álvarez M, Zazo S, Madoz-Gúrpide J, Rojo F and García-Foncillas J. MicroRNA-199b Downregulation Confers Resistance to 5-Fluorouracil Treatment and Predicts Poor Outcome and Response to Neoadjuvant Chemoradiotherapy in Locally Advanced Rectal Cancer Patients. Cancers (Basel). 2020, 12 (6), 1655.	117
4- Rubio J [†] , Cristóbal I [†] , Santos A, Caramés C, Luque M, Sanz-Álvarez M, Zazo S, Madoz-Gúrpide J, Rojo F, García-Foncillas J. Low MicroRNA-19b Expression Shows a Promising Clinical Impact in Locally Advanced Rectal Cancer. Cancers (Basel). 2021, 13 (6), 1456.	137
<u>Discusión</u>	155
<u>Conclusiones</u>	171
<u>Bibliografía</u>	175

ESTRUCTURA

Esta tesis doctoral se presenta como un compendio de las siguientes publicaciones destinadas a responder a los 4 objetivos principales del trabajo de investigación:

Artículo 1

Cristóbal I[†], Torrejón B[†], **Rubio J**, Santos A, Pedregal M, Caramés C, Zazo S, Luque M, Sanz-Álvarez M, Madoz-Gúrpide J, Rojo F and García-Foncillas J. Deregulation of SET is Associated with Tumor Progression and Predicts Adverse Outcome in Patients with Early-Stage Colorectal Cancer. *J Clin Med*. 2019, 8 (3), 346.

Artículo 2

Cristóbal I[†], **Rubio J**[†], Torrejón B, Santos A, Caramés C, Luque M, Sanz-Álvarez M, Alonso R, Zazo S, Madoz-Gúrpide J, Rojo F, García-Foncillas J. MicroRNA-199b deregulation shows a strong SET-independent prognostic value in early-stage colorectal cancer. *J Clin Med*. 2020, 9 (8), 2419.

Artículo 3

Cristóbal I[†], **Rubio J**[†], Santos A, Torrejón B, Caramés C, Imedio L, Mariblanca S, Luque M, Sanz-Álvarez M, Zazo S, Madoz-Gúrpide J, Rojo F and García-Foncillas J. MicroRNA-199b Downregulation Confers Resistance to 5-Fluorouracil Treatment and Predicts Poor Outcome and Response to Neoadjuvant Chemoradiotherapy in Locally Advanced Rectal Cancer Patients. *Cancers (Basel)*. 2020, 12 (6), 1655.

Artículo 4

Rubio J[†], Cristóbal I[†], Santos A, Caramés C, Luque M, Sanz-Álvarez M, Zazo S, Madoz-Gúrpide J, Rojo F, García-Foncillas J. Low MicroRNA-19b Expression Shows a Promising Clinical Impact in Locally Advanced Rectal Cancer. *Cancers (Basel)*. 2021, 13 (6), 1456.

ABREVIATURAS

5-FU: 5-Fluorouracilo

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

APC: Adenomatous Polyposis Coli

ARN: Ácido Ribonucleico

ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero

BCL-2: B-Cell Lymphoma 2

BMP-3: Bone Morphogenetic Protein 3

BRAF: B Rapidly Accelerated Fibrosarcoma

BRCA: Breast Cancer Associated

CAPOX: Capecitabina-oxaliplatino

CEA: Carcinoembryonic Antigen

CCR: Cáncer colorrectal

CCRm: Cáncer colorrectal metastásico

CCRHNP: Cáncer colorrectal hereditario no polipósico

CDK1: Cyclin-Dependent Kinase 1

CTCs: Circulating Tumor Cells

CIP2A: Cancerous inhibitor of protein phosphatase 2A

CMS: Consensus Molecular Subtypes

CRLA: Cáncer de recto localmente avanzado

CTLA-4: Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4

CTNNB1: Catenin beta-1

DCC: Deleted in colorectal carcinoma

ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor

ERK: Extracellular-signal-Regulated Kinase

EII: Enfermedades Inflamatorias Intestinales

EMT: Escisión Mesorectal Total

EVI-1: Ecotropic Virus Integration site-1

FDA: Food and Drugs Administration

FOLFOX: Fluorouracilo (bolo e infusión)-leucovorin-oxaliplatino

FLOX: Fluorouracilo (bolo)-leucovorin-oxaliplatino

GDP: Guanosina difosfato
GTP: Guanosina trifosfato
hMLH 1/3: MutL Homology 1/3
HAT: Histona acetiltransferasa
HER-2: Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
hMSH : Somatic hypermutation in muts homologue
IMS: Inestabilidad de microsatélites
INHAT: Inhibidor histona acetiltransferasa
kDa: Kilodalton
KRAS: Kirsten Rat Sarcoma Viral oncogene homolog
KSR1: Kinase Suppressor Of Ras 1
LMA: Leucemia mieloide aguda
MCL-1: Myeloid Cell Leukemia-1
mTOR: Mechanistic Target Of Rapamycin
MEK: Mitogen-activated protein kinase kinase
miRs: microARNs
NCCN: National Comprehensive Cancer Network
NDRG4: N-Myc downstream-regulated gene 4
NHEJ: Nonhomologous end joining
NGS: Next generation sequencing
CPNPC: Cáncer de pulmón no de célula pequeña
PAF: Poliposis adenomatosa familiar
PI3KCA: Phosphatidylinositol 3-kinase
POLE: Polimerasa ϵ del ADN
QT: Quimioterapia
QTRT: Quimiorradioterapia
PD-1: Proteína de muerte celular programada 1
PP1: Protein phosphatase 1
PP2A: Protein phosphatase 2A
RAF: Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
RC: Respuesta completa

RCp: Respuesta completa patológica
RM: Resonancia magnética
RH: Recombinación homóloga
RP: Respuesta parcial
RT: Radioterapia
SBRT: Stereotactic body radiation therapy
SETBP1: SET binding protein 1
SG: Supervivencia global
SLE: Supervivencia libre de enfermedad
SLP: Supervivencia libre de progresión
SOH: Sangre oculta en heces
SPJ: Síndrome de poliposis juvenil
TC: Tomografía computarizada
TCF-4: Transcription Factor 4
TNM: Tumor Node Metastasis
TEM: Transición epitelio-mesénquima
TGF- β : Transforming growth factor beta
TKI: Inhibidor tirosina kinasa
TMB: Tumor mutational burden
TRO: Tasa de respuestas objetivas
TS: Timidilato sintasa
VEGFR: Factor de crecimiento endotelial vascular
W-W: "Watch and Wait"
WNT: Wingless-related integration

INTRODUCCIÓN

A. Cáncer colorrectal

1. Epidemiología y factores de riesgo y preventivos

El cáncer colorrectal (CCR) es una enfermedad altamente prevalente y con una gran mortalidad asociada. Es la tercera causa de cáncer más frecuente en el mundo en ambos sexos con una incidencia de casi 2 millones de casos anuales (Figura 1), 44.000 de ellos en España. Se estima una mortalidad de 900.000 pacientes al año en el mundo, casi 15.000 en nuestro país, siendo la cuarta causa de muerte por cáncer en el territorio nacional (1). Las tasas de incidencia más altas se encuentran en los países desarrollados como Australia, Nueva Zelanda, Europa y Norte América donde se acumulan el 45% de los casos totales, siendo mucho menos frecuentes en África y en el suroeste asiático (2). Esta desigualdad geográfica se atribuye al envejecimiento mayor de la población, a diferencias en la dieta y a factores ambientales que favorecen el desarrollo del cáncer sobre la susceptibilidad genética individual.

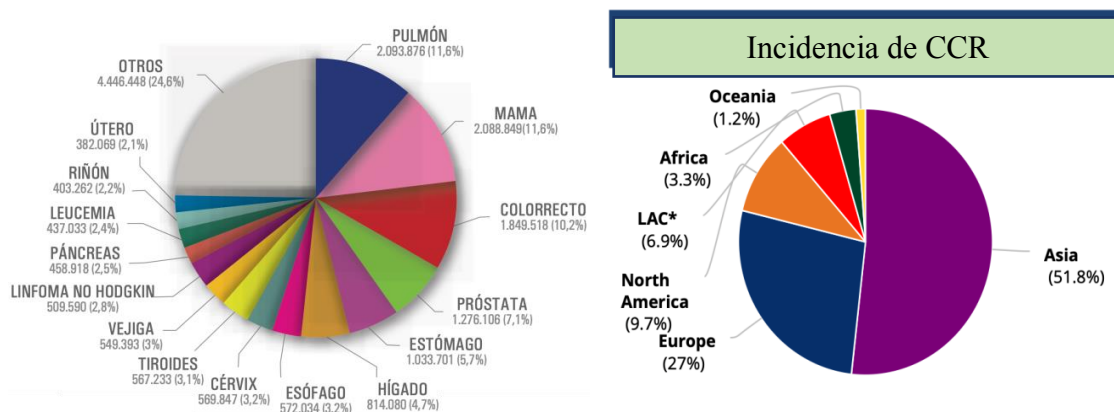


Figura 1. Visión general del cáncer colorrectal. (A) Incidencia de CCR en el mundo respecto del resto de tumores; (B) Incidencia de CCR estratificada por continentes.

Se trata por tanto de una enfermedad multifactorial, consecuencia del estilo de vida, de factores genéticos y ambientales. Existen CCR hereditarios (en el que subyace el factor genético) y no hereditarios, mucho más frecuentes y fruto del resultado de la suma de mutaciones somáticas en respuesta a factores externos (3). Se estima que en torno al 30% presentan agregación familiar, siendo el 70% restante producto de factores ambientales (4).

El principal factor de riesgo asociado con el desarrollo del CCR es la edad, siendo progresivamente más frecuente en mayores de 70 años. También, se observa más en varones, en los que el diagnóstico es además en edades más tempranas y con mayor mortalidad (5). En Estados Unidos se ha visto una mayor incidencia en afroamericanos sin poder determinarse si esta diferencia racial es puramente biológica o debido a un acceso más limitado de esta población a programas sanitarios de detección precoz (6). La agregación familiar asociada o no a un síndrome hereditario supone un factor de riesgo para el desarrollo de CCR. Las enfermedades genéticas conocidas constituyen el 5% de todos los CCR, siendo más frecuentes los síndromes no polipósicos, véase el síndrome de Lynch, que los polipósicos, como la poliposis adenomatosa familiar (PAF), o los síndromes polipósicos hamartomatosos (como el síndrome de Peutz-Jeghers, la poliposis juvenil o el síndrome de Cowden) (7). Se ha asociado mayor riesgo en otras patologías, como la enfermedad inflamatoria intestinal (8), o con diversos factores ambientales como la radioterapia abdominal en la infancia (9), la toma de inmunosupresores (10), la diabetes (11,12) o el tratamiento con deprivación androgénica en largos supervivientes a cáncer de próstata (13). Pero la alta incidencia y prevalencia de esta enfermedad en pacientes sin clara predisposición, es reflejo de un tumor muy ligado al estilo de vida. De hecho, el consumo de tabaco tiene relación causal en cerca del 20% de los casos de CCR (14) y el alto consumo de alcohol aumenta en un 60% el riesgo de CCR en comparación con no bebedores (15). Por el contrario, hay factores preventivos modificables que favorecen una reducción del riesgo. Con suficiente evidencia podemos señalar algunos como el ejercicio físico, la adherencia a una dieta mediterránea (baja en carnes, rica en pescados, legumbres, lácteos y fibra) (16,17) y la supresión de productos alimenticios ultraprocesados (18). Estos cambios en el estilo de vida pueden reducir entre un 11 y un 15% la incidencia de CCR (19).

Diferentes modelos de predicción de riesgo de cáncer colorrectal han sido útiles para comprender mejor el impacto de los diversos factores en el riesgo de desarrollo de CCR (20), sin embargo, se necesitan más estudios prospectivos. Los principales factores de riesgo asociados con el CCR se resumen en la Tabla 1.

Factores sociodemográficos	
Edad	Aumenta el riesgo
Sexo masculino	Aumenta el riesgo
Raza negra	Aumenta el riesgo
Países desarrollados	Aumento el riesgo
Historial médico	
Síndromes hereditarios	Aumenta el riesgo
Historia familiar	Aumenta el riesgo
Enfermedades inflamatorias intestinales (EII)	Aumenta el riesgo
Radioterapia abdominal	Aumenta el riesgo
Inmunosupresión	Aumenta el riesgo
Diabetes	Aumenta el riesgo
Tratamiento de deprivación androgénica	Aumenta el riesgo
Factores ambientales	
Tabaco	Aumenta el riesgo
Consumo de alcohol	Aumenta el riesgo
Obesidad	Aumenta el riesgo
Dieta rica en carne	Aumenta el riesgo
Dieta rica en legumbres	Disminuye riesgo
Dieta rica en fibra, pescado y lácteos	Disminuye riesgo
Ejercicio físico	Disminuye riesgo

Tabla 1. Factores de riesgo para el desarrollo del CCR.

En los últimos años, los investigadores han centrado su atención en los mecanismos que subyacen a estos factores y en cómo implementar medidas orientadas a la prevención y el tratamiento de esta enfermedad. El descenso en la incidencia que comienza a visualizarse en los países desarrollados es mayoritariamente debido a los programas de detección temprana actuales (sangre oculta en heces (SOH), colonoscopia con polipectomía regladas...) y al tratamiento precoz de lesiones preneoplásicas (21).

2. *Fisiopatología*

En los carcinomas hereditarios, las mutaciones germinales específicas son las responsables del inicio de la oncogénesis, mientras que una acumulación escalonada de mutaciones somáticas parece subyacer a la mayoría de los casos esporádicos (22). Se presupone que el acúmulo secuencial de algunos cambios genéticos específicos, heredados o adquiridos, desencadenan la transición de epitelio colónico normal a células cancerígenas. Estas mutaciones confieren ventaja adaptativa en cuanto a la proliferación, migración o capacidad invasiva, permitiendo una evolución clonal (23).

El modelo descrito por Fearon y Vogelsteis en 1990 ya defiende una teoría de evolución clonal de la carcinogénesis humana (secuencia adenoma-carcinoma) (Figura 2). Acorde a este modelo, la ventaja de crecimiento adquirida por una sola célula mutada confiere a sus descendientes una ventaja evolutiva sobre el resto de células. A mayor división celular más fácil es que se genere una segunda mutación, confiriéndole a esa, una ventaja adaptativa frente a las demás. Con esa adquisición secuencial de mutaciones se genera una heterogeneidad tumoral, asociada a una desorganización celular, que confiere a dichas células una mayor capacidad de invasión local y a distancia. Se considera que son múltiples genes, entre los que se incluyen oncogenes, genes supresores tumorales y genes de reparación del ADN, los que participan en la carcinogénesis colorrectal (24).

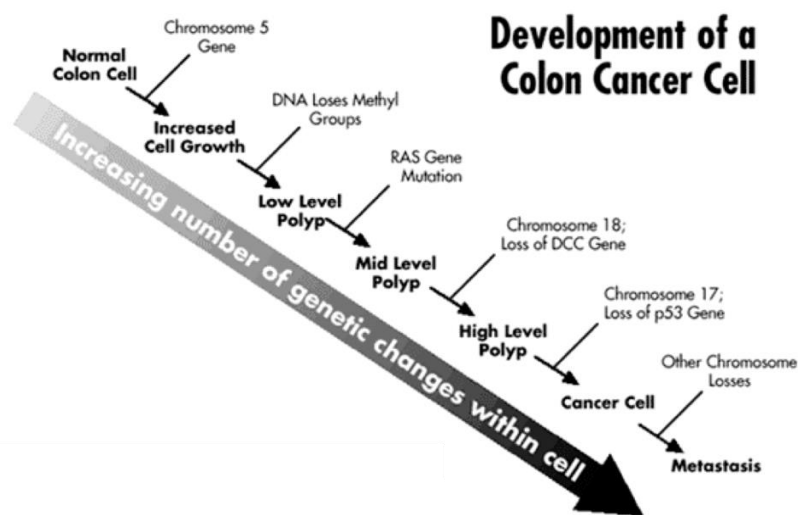


Figura 2. Modelo de carcinogénesis de la secuencia adenoma-carcinoma (adaptada de Marx *et al.*, 1991).

Estudios posteriores basados en técnicas de secuenciación masiva o NGS (next generation sequencing) han permitido matizar más profundamente esta hipótesis y realizar una clasificación molecular que se ha ido modificando hasta la concepción actual. Defienden que no es fundamental la secuencia mutacional sino más bien el acúmulo de dichas mutaciones. Si bien hay mutaciones que ocurren en estadios iniciales como las mutaciones en el gen Adenomatous Polyposis Coli (APC), descrito en tumores hereditarios, familiares y esporádicos, otras aparecerían en etapas más tardías como es el caso del gen p53. Además de mutaciones puntuales se producen distintas alteraciones

génicas como reordenamientos, amplificaciones, sobreexpresiones o deleciones y cambios epigenéticos (25). También proponen que cada tumor es el acúmulo de 2 a 8 mutaciones génicas conductoras o “driver” sucedidas a lo largo del tiempo y según las mutaciones presentes lo dividen en diferentes subtipos.

El CCR es una enfermedad heterogénea con diferentes patrones de progresión y diferentes respuestas a los tratamientos. Actualmente es fundamental destacar la clasificación molecular del cáncer de colon por consenso de Guinney y colaboradores (25) que permite clasificar en 4 subtipos al CCRm con diferentes vías oncogénicas, pronóstico y con implicaciones terapéuticas, los consensus molecular subtypes o CMS. Esta clasificación se ha elaborado por expertos correlacionando datos clínicos y moleculares de varias firmas genómicas con la intención de predecir las diferentes respuestas terapéuticas en el CCR.

Esta clasificación distingue entre 4 subtipos, el CMS 1 o inmune supone el 14% y destaca por la presencia de inestabilidad de microsatélites, la alteración en los mecanismos de reparación del ADN, el estado hipermutado con hiperactivación del sistema inmune y la hipermetilación. Se asocia con mutaciones de BRAF y destaca una infiltración de linfocitos TH1 y linfocitos citotóxicos. El CMS 2 o canónico es el más frecuente y se encuentra en el 37% de los casos. Este subtipo asocia inestabilidad cromosómica, diferenciación epitelial y activación de genes clásicamente relacionados con la carcinogénesis del CCR como WNT y MYC (27) o la amplificación del factor de transcripción HNF4A. El CMS 3 o metabólico supone el 13% de los casos y presenta diferenciación epitelial asociado a desregulación y enriquecimiento de firmas metabólicas con un 30% de hipermutaciones. Se asocia con mutaciones del gen KRAS. Y por último el CMS 4 o mesenquimal que corresponde con el 23% de los tumores y se asocia con una alta expresión de genes implicados en la transición epitelio mesénquima (TEM), como TGF- β , con importante invasión estromal y con genes implicados en la angiogénesis. El 13% de los casos restantes son mixtos y pueden suponer transiciones de un subtipo a otro. No presentan alteraciones específicas o patognomónicas, sino más bien una firma genómica conjunta, pero si en los CMS 1 y 3 destaca la activación de la vía de las MAP quinasas y del receptor tirosina kinasa.

En esta clasificación se realizaron también estudios de microARNs para determinar la concordancia en los subgrupos, que son fundamentales como mecanismo

postranscripcional (26), identificando asociaciones por subgrupos. Así en el subgrupo CMS 2 presentaban una sobreexpresión de los microARNs agrupados 17-92, entre los que se encuentran el miR17, 18, 19, 20 y 92, todos ellos diana postranscripcional de MYC. En el CMS 3 destaca una baja expresión de los microARNs de la familia let-7 que se asocian con alta expresión de KRAS y en el CMS 4 una disminución de la familia miR-200 que regulan la TEM.

Esta distribución se correlaciona además con variables clínicas y pronósticas. De hecho, los tumores CMS 1 son más frecuentes en mujeres, en tumores de colon derecho y con mayor grado histológico y tienen mal pronóstico a la recaída de un tumor localizado, mientras que los CMS2 se dan más en colon izquierdo y tienen mejor supervivencia global (SG) y supervivencia libre de recaída (SLR). Los CMS4 se diagnostican más avanzados y mostraron peor SG y SLR.

En resumen, esta clasificación muestra las marcadas diferencias en los fundamentos biológicos intrínsecos de cada subtipo y respalda la nueva taxonomía de esta enfermedad que facilitará la investigación futura en este campo.

CMS1 o IMS Inmune	CMS2 o canónico	CMS3 o metabólico	CMS4 o mesenquimal
14%	37%	13%	23%
- Hipermutado - Inestabilidad de microsatélites (IMS) - Fenotipo metilador de la isla CpG	- Alta prevalencia de mutaciones somáticas	- Baja prevalencia de mutaciones somáticas - Baja metilación de islas CpG - Estado mixto de IMS	- Alta prevalencia de mutaciones somáticas
Mutaciones de BRAF		Mutaciones de KRAS	
Infiltración inmune e hiperactivación	Activación WNT y MYC	Desregulación metabólica	Infiltración estromal Activación de TGF- β Angiogénesis
Peor SG tras recaída			Peor SG y SLR

Tabla 2. Subtipos moleculares de cáncer de colon y sus características principales (adaptado de Guinney y colaboradores, 2015 (25)).

a. Oncogenes

Un oncogén es aquel gen que participa en la división celular o como regulador del ciclo celular y que, a través de una mutación con ganancia de función, puede producir una proliferación incontrolada u otros efectos que favorezcan el comportamiento tumoral (29).

El oncogén RAS tiene gran importancia en el CCR y se presenta en tres variantes celulares, HRAS, KRAS y NRAS. Las tres tienen capacidad de transformar a la célula normal en tumoral, pero es KRAS el que muta con más frecuencia en el CCR humano, seguido por NRAS (30). Los oncogenes RAS codifican unas proteínas homólogas con las proteínas G y regulan la transducción de señales celulares actuando como un interruptor para la transmisión de señales de crecimiento extracelular al núcleo. Dichas proteínas normalmente alternan un estado inactivo, unido a difosfato de guanosina (GDP); y un estado activo, unido a trifosfato de guanosina (GTP) según el momento del ciclo celular. La mutación de RAS genera una resistencia a la hidrólisis de GTP por la GTPasa, quedando así activada de forma continua, estimulando esa vía celular sin control negativo (31) (Figura 3).

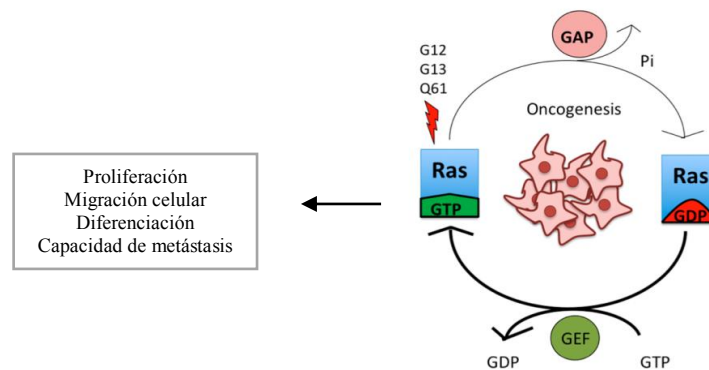


Figura 3. Mecanismo de acción de la vía RAS/GTP y sus funciones celulares (adaptado de Vigil *et al.*, 2010 (31)).

Estas proteínas participan en la regulación de la proliferación, migración, y diferenciación celular, así como en la apoptosis (32). Son, por tanto, una importante diana terapéutica en el desarrollo de múltiples tumores actualmente (33,34), incluido el CCR (35), donde la mutación se estima hasta en el 50% de los pacientes (36). La mayoría de las mutaciones son en los codones 12 y 13 donde se están estudiando fármacos inhibidores específicos (33). Además de una diana terapéutica, KRAS es un factor predictivo negativo de respuesta a tratamiento con fármacos anti-EGFR (factor de crecimiento epidérmico) como panitumumab o cetuximab (37–39). Igualmente, KRAS es un factor pronóstico en sí mismo en estadio Dukes C, en metastásicos y predictor de respuesta pobre a QTRT pero no se ha demostrado su valor pronóstico en estadio B de Dukes (40). Por tanto, en la práctica habitual se recomienda un estudio expandido del gen KRAS para un mejor manejo del paciente, incluyendo la detección de mutaciones en

los exones 2,3 y 4 del gen KRAS (codones 12, 13, 59, 61, 117 y 146), así como mutaciones en los exones 2-4 del gen NRAS (codones 12, 13, 59, 61 y 117) (41). Además, aunque continua en estudio, hay otros usos del análisis del oncogén KRAS, como su presencia en materia fecal junto con el análisis de áreas promotoras de BMP3 y NDRG4 aberrantemente metiladas o de la beta-actina en combinación con la SOH como screening precoz del CCR (42).

Por otro lado, las mutaciones de esta vía de señalización celular en puntos posteriores de la vía RAS/RAF/MEK/ERK, concretamente del gen BRAF, han sido muy estudiadas. Esta mutación se da en 9% de los CCR metastásicos, siendo una mutación excluyente con las mutaciones de RAS (43). El 80% de ellas se dan por la sustitución de una molécula de valina por una de ácido glutámico en el residuo 600 (V600E), y es un factor pronóstico negativo *per se* con peores datos de SG y SLP (38). Tanto es así, que la media de supervivencia para los pacientes con CCR metastásico (CCRM) con mutación BRAF es de 10,4 meses frente a 34,7 meses para los pacientes sin esa mutación (44). Es además, un factor predictivo negativo de respuesta a los inhibidores de EGFR (43,45,46); aunque controvertido años atrás, la mayoría de las sociedades científicas rechazan el uso de fármacos anti-EGFR alegando la falta de efecto terapéutico en tumores con la mutación BRAF en combinación con quimioterapia (47). En cambio, si se utiliza los inhibidores de EGFR en estos tumores con nuevas estrategias de combinación con inhibidores de BRAF y MEK porque Modelos preclínicos con inhibición de BRAF demostraron que el fallo a la doble inhibición era porque secundariamente se producía una rápida activación por retroalimentación a través de EGFR (48).

b. Genes supresores de tumores

Los genes supresores son aquellos con una función reguladora inhibitoria del ciclo celular y otras funciones celulares, por lo que si se inactivan y pierden su función suelen favorecer el comportamiento tumoral. Son genes recesivos, por tanto, la función de la proteína se pierde cuando ambos alelos del gen se inactivan por mutaciones (puntuales, reordenamientos o deleciones) (49), lo cual basándose en la teoría de Knudson puede ocurrir frecuentemente. Esta hipótesis del “two-hit” defiende que una vez se inactiva uno

de los alelos es más probable que se inactive el otro, promoviendo la división celular incontrolada y por tanto la carcinogénesis (50).

Varios son los genes supresores estudiados en CCR, como APC o p53, aunque ninguno es factor predictivo o diana terapéutica. La mutación más temprana que se da bialélica en el 80% de los CCR es la mutación del gen APC situada en el cromosoma 5q21. Ésta se describió en la etapa precoz de la carcinogénesis al demostrarse que lesiones premalignas carecen frecuentemente de ambos alelos (51). Este gen es responsable de la PAF cuando existe una mutación en un alelo en línea germinal. Por ello, debe ser estudiado en pacientes con más de 100 pólipos colónicos para estudio de familiares y plantear al paciente realizar una colectomía total/subtotal profiláctica precoz (52).

El gen p53 es el más frecuentemente mutado a nivel de la carcinogénesis de todos los subtipos tumorales y, específicamente, está implicado en el 70% de los CCR. Curiosamente no hay pérdida de la expresión de este gen en lesiones premalignas, lo que sugiere que la pérdida de la función de p53 representa un evento relativamente tardío en la oncogénesis colorrectal (53). La proteína p53, también llamada el guardián del genoma, se une al ADN y activa la transcripción de genes inhibidores del crecimiento celular en situaciones de estrés o de daño del material genético. De esta manera, p53 al detener el ciclo celular permite la reparación del ADN o la apoptosis celular (54) y, aunque hay controversia, se considera un factor de peor pronóstico y de peor respuesta al tratamiento en CCR.

Además, el CCR también se ha descrito dentro de los síndromes BRCA, principalmente asociado a mutaciones de la proteína BRCA1, que opera tanto en la reparación del ADN como punto de control de la división celular. Este es previo a BRCA2, el cual actúa en el mecanismo primario de recombinación homóloga (55,56).

Por último, se han descrito para el CCR alteraciones en otros supresores tumorales, algunos de ellos comunes a otros tipos de tumores como es el caso de la proteína fosfatasa 2A (PP2A). Las alteraciones en estos genes confieren mayor agresividad y aportan una ventaja adaptativa al tumor favoreciendo la proliferación celular y aumentando su capacidad de diseminación, así como la resistencia a los

tratamientos de quimioterapia actuales. Más adelante en esta tesis doctoral demostraremos la importancia de la vía de señalización SET/PP2A en este sentido.

c. Genes de la vía de reparación del ADN

Los genes de reparación del ADN son responsables de subsanar errores ocurridos durante la duplicación del ADN en la división celular. Entre ellos los más estudiados y que tienen una aplicación en la práctica clínica son: *hMSH2*, *hMSH6*, *hMLH1* y *hMLH3*, *hPMS1* y *hPMS2* (57). Una mutación en línea germinal de uno de estos genes produce el 95% de los casos del conocido síndrome de Lynch o cáncer colorrectal hereditario no asociado a poliposis (CCRHNP) y el 15% del CCR no hereditario. Se trata de un síndrome de predisposición al cáncer que necesita de la inactivación del otro alelo a lo largo de la vida, ya sea por silenciamiento epigenético hipermetilando el promotor del gen, por mutación puntual o por pérdida de heterocigosis. Todo esto provoca un aumento en la tasa de mutaciones, proceso conocido como inestabilidad genómica, debido a que no se reparan los desajustes del ADN. Estas alteraciones ocurren comúnmente en regiones de secuencias de nucleótidos repetitivas llamadas microsatélites. Por tanto, un rasgo característico de la pérdida de un gen de la vía de reparación del ADN es la expansión o contracción de los microsatélites en el tumor, en comparación con el tejido normal, lo que llamamos inestabilidad de microsatélites o IMS (58).

d. Alteraciones epigenéticas

La epigenética es el estudio de modificaciones en la expresión de los genes y de la cromatina, que no se deben a alteraciones del ADN y, por tanto, no son heredables. Estas alteraciones son muy frecuentes en todos los tumores, incluyendo el CCR, y se ha asociado sobretodo con eventos iniciadores de la carcinogénesis (59). Las alteraciones más frecuentes son la metilación, acetilación e hidroxilación del ADN, la modificación anormal de histonas, los cambios de estructura de la cromatina y las alteraciones en niveles de expresión de pequeños ARNs no codificantes entre los que se incluye los miRs (60). Un ejemplo muy conocido y descrito es la metilación de islas de CpG en los promotores de los genes. La metilación del nucleótido de citosina es un proceso epigenético llevado a cabo por una enzima conocida como ADN metiltransferasa. Esta enzima metila las citosinas con intención de silenciar su expresión, ya sea para

diferenciación celular o durante el desarrollo embrionario. La hipermetilación del dinucleótido CpG (es decir, donde una citosina es seguida por una guanina) de los promotores de genes impiden la transcripción a ARN por lo que silencia el gen sin modificar la estructura genómica (61).

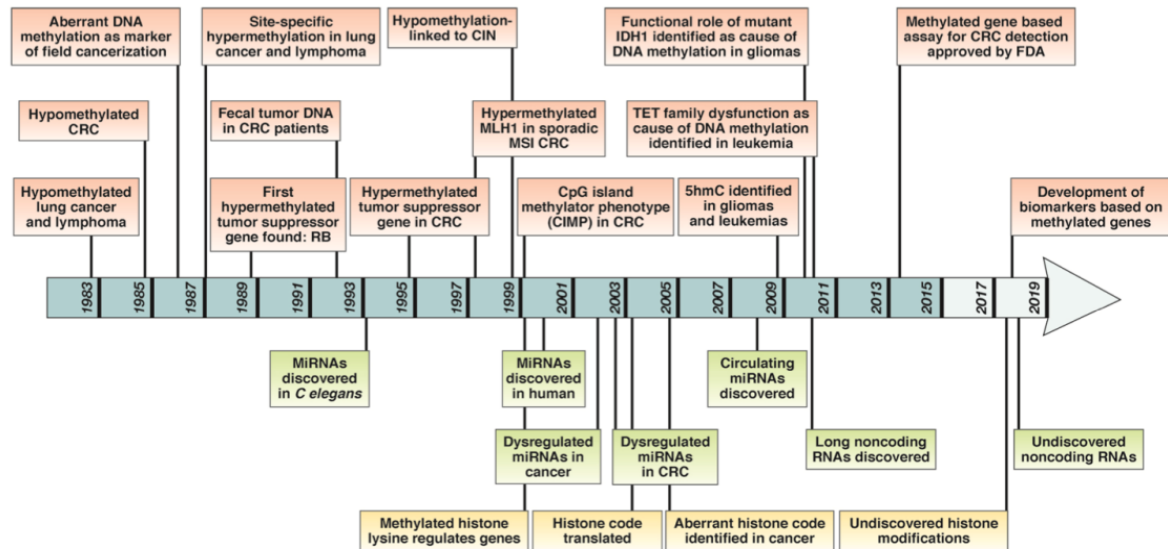


Figura 4. Alteraciones epigenéticas descritas cronológicamente en CCR (adaptado de Okugawa *et al.*, 2015 (60))

Los avances en la comprensión de la historia natural del CCR y la epigenética de los pólipos de colon y del CCR (Figura 4) han llevado al desarrollo de estudios de biomarcadores epigenéticos para el diagnóstico, el pronóstico y la predicción de la respuesta al tratamiento del CCR. Las últimas dos décadas de investigación han demostrado el potencial de la metilación aberrante del ADN y las alteraciones en los ARN no codificantes para su uso como biomarcadores. La investigación continúa en esta clase de biomarcadores y promete conducir a ensayos de alto rendimiento que se puedan utilizar para prevenir y tratar los tumores colorrectales (62).

3. Presentación clínica, diagnóstico y estadiaje

A pesar de los programas de screening, el CCR se diagnostica en el 70-90% de los casos en presencia de síntomas tales como la hematoquecia, las melenas, el dolor abdominal, la anemia o cambios del ritmo intestinal, siendo mucho menos frecuentes otros síntomas como la distensión abdominal, las náuseas o el tenesmo rectal. En el 7% de los casos el debut es a raíz de un cuadro urgente con intervención quirúrgica a raíz de

una obstrucción abdominal o una perforación, siendo en sí mismo, un factor de peor pronóstico. El 10-30% restante suelen ser diagnósticos más precoces dentro de programas de cribado poblacionales (63).

El diagnóstico histológico es mandatorio, no solo por la confirmación anatomopatológica sino también para la caracterización de factores moleculares pronósticos y predictivos de respuesta a tratamiento como son el BRAF, KRAS, NRAS y la IMS. Una vez se evidencia la presencia de un CCR, una colonoscopia total debe ser realizada, y en su defecto se realizará una colonoscopia virtual. En la mayoría de los casos se obtendrá la muestra histológica en el momento, exceptuando aquellos casos con debut asociado a una complicación urgente. Hasta el 5% de los casos se acompañan de otro tumor colónico sincrónico. Histopatológicamente, la mayoría de los cánceres que surgen en el colon y el recto son adenocarcinomas (64).

El estadiaje es el mismo en el cáncer de colon y el de recto, pero el manejo es diferente, ya que en tumores localmente avanzados el manejo cambia según la localización. Principalmente en cáncer de recto, la estadificación local exacta en el momento del diagnóstico es esencial y es la base para decidir si realizar un tratamiento neoadyuvante. Aparte de la distancia exacta desde el borde anal, es importante definir la extensión del tumor local (T). La ecografía endoscópica es precisa para la determinación del estadio T del cáncer de recto y es el método de elección en los tumores regionales para diferenciar entre neoplasias invasivas y no invasivas y para valorar la afectación ganglionar (N). Sin embargo, el método más utilizado y estandarizado para definir estadios T y el margen de resección circunferencial es una resonancia magnética (RM) (65).

En ambos casos se debe completar el estudio diagnóstico de imagen con una tomografía computerizada (TC) toracoabdominopélvica, ya que hasta el 20% de los nuevos casos de CCR debutan como estadio IV con metástasis a distancia (6). Estudios más dirigidos como la RM hepática, gammagrafía ósea o RM cerebral no se recomiendan de manera rutinaria en todos los pacientes, pero si en aquellos casos con alta sospecha de afectación a ese nivel y un TC no concluyente (66).

Los CCR se clasifican según el sistema de estadificación *Tumor Node Metastasis* (TNM) del *American Joint Committee of Cancer* (AJCC), que se basa en tres criterios fundamentales (Tabla 3):

- La profundidad de la invasión local (estadio **T**) (Figura 5)
- La afectación de los ganglios linfáticos (estadio **N**)
- La presencia de metástasis a distancia (estadio **M**)

Estas etapas se combinan con una definición del estadio (Tabla 4), que proporciona la base para las decisiones terapéuticas según las guías de las sociedades médicas de referencia. El estadio TNM es el mejor factor pronóstico de la supervivencia del paciente con una buena correlación al diagnóstico (Tabla 5).

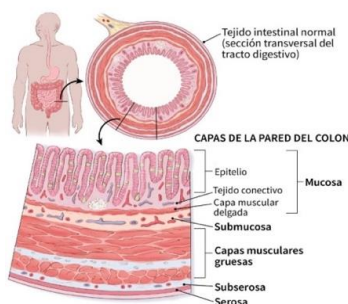


Figura 5. Capas de la pared colónica para la caracterización de la invasión local (T) (adaptado de guías ASCO 2018).

Tumor primario (T)	
Tx	Tumor primario desconocido
T0	No hay evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma in situ. Tumor intraepitelial o que invade la lámina propia
T1	Tumor que invade submucosa
T2	Tumor que invade <i>muscularis propria</i>
T3	El tumor invade la subserosa
T4	El tumor invade directamente otros órganos o estructuras y / o perfora el peritoneo visceral
T4a	El tumor penetra en la superficie del peritoneo visceral
T4b	El tumor invade otros órganos
Ganglios linfáticos regionales (N)	
Nx	No se puede asegurar invasión en ganglios linfáticos regionales
N0	No hay metástasis de los ganglios linfáticos pericólicos
N1a	Metástasis en un ganglio regional
N1b	Metástasis en dos o tres ganglios regionales
N1c	Depósito tumoral en la subserosa, mesenterio o en tejidos perirectales o pericólicos sin metástasis en los ganglios regionales.
N2a	Metástasis entre cuatro y seis ganglios regionales
N2b	Metástasis en más de siete ganglios regionales
Metástasis a distancia (M)	
Mx	No se puede asegurar afectación a distancia

M0	Sin metástasis a distancia
M1a	Con metástasis a distancia en un órgano (pulmón, hígado, ovario, afectación linfática a distancia no regional sin afectación peritoneal)
M1b	Metástasis en más de un órgano sin estar afectado el peritoneo
M1c	Metástasis en peritoneo sin/con afectación de otros órganos

Tabla 3. Clasificación de CCR en base al sistema TNM. AJCC UICC 8ª edición (adaptado de Brierley *et al.*, 2017 (67)).

Estadio	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
II	T3/T4	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
III	Cualquier T	N1, N2	M0
IIIA	T1/T2	N1	M0
	T1	N2a	M0
IIIB	T1, T2	N2b	M0
	T2, T3	N2a	M0
	T3, T4a	N1	M0
IIIC	T3, T4a	N2b	M0
	T4a	N2a	M0
	T4b	N1, N2	M0
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1
IVA	Cualquier T	Cualquier N	M1a
IVB	Cualquier T	Cualquier N	M1b
IVC	Cualquier T	Cualquier N	M1c

Tabla 4. Estadio TNM del carcinoma colorrectal AJCC UICC 8ª edición (adaptado de Brierley *et al.*, 2017 (67)).

Estadio	TNM	Supervivencia a 5 años
0,I	Tis, T1N0	>90%
I	T2N0	80-85%
II	T3-4N0	70-75%
IIIA	T1/T2N1 T1N2a	70-75%
IIIB	T1-2 N2b T2-3 N2a T3T4a N1	50-65%
IIIC	T3T4a N2b T4aN2a T4bN1-2	25-45%
IV	TxNxM1	8%

Tabla 5. Supervivencia a 5 años según estadio TNM (adaptado de la AJCC 8ª edición).

4. Tratamiento del CCR

El recto es por definición la continuación del colon sigmoide, mide ente 12 y 15 cm y se continúa hasta la línea dentada en el que continúa el canal anal. En la mujer está

próximo a la pared posterior de la vagina y el cérvix, mientras que en el varón está posterior a la vejiga, las vesículas seminales y la próstata (68). El tratamiento de la enfermedad localmente avanzada tiene un manejo diferente según se trate de un cáncer de colon o un cáncer de recto, aunque con algunas similitudes que matizaremos.

A- Tratamiento del cáncer de colon no metastásico

La cirugía es el único tratamiento curativo para la enfermedad localizada siendo necesaria la resección completa del tumor, el pedículo vascular y el drenaje linfático del segmento del colon afecto. Este será el tratamiento indicado en el 80% de los diagnósticos de CCR, en los estadios I, II y III siempre y cuando no haya contraindicaciones quirúrgicas absolutas (69). En los tumores sobre pólipos la polipectomía endoscópica puede ser un tratamiento definitivo, siempre que los márgenes estén limpios de enfermedad, no sean tumores invasivos desdiferenciados, no sean carcinomas invasivos sobre pólipos sésiles planos con características de agresividad o T2 (70).

La quimioterapia (QT) adyuvante o postoperatoria está indicada con el objetivo de eliminar la micrometástasis, reducir la posibilidad de recurrencia y aumentar las tasas de curación. Su administración se recomienda entre las 6 y las 8 semanas después de la cirugía (71). Los primeros estudios con adyuvancia en CCR se realizaron a finales de los años 80 con QT basadas en 5-FU (72) y demostraron un aumento de la supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global (SG) en los estadios III, siendo controvertido el tratamiento en los estadios II. Posteriormente se corroboró que la formulación oral con capecitabina no era inferior a las formulaciones intravenosas (73). Los estudios MOSAIC (74) y NSABP C-07 (75) demostraron que la adición de oxaliplatino a esquemas basados en fluoropirimidinas suponía una reducción del riesgo de recaída del 21-23% en comparación con la monoterapia con 5-FU, siendo menos tóxico y referencia desde entonces el esquema FOLFOX. Del mismo modo se evidenció la equivalencia con el esquema CAPOX (capecitabina y oxaliplatino) con diferente perfil de toxicidad (76) pero, al contrario que en el escenario metastásico, no se consiguió demostrar el beneficio de la adición del irinotecan a los esquemas de fluoropirimidinas en la adyuvancia (77-79) o la adición de fármacos anti-EGFR (cetuximab) (80) o anti-VEGFR (Bevacizumab) (81,82) al esquema FOLFOX.

En relación a la duración de los esquemas de QT, estos han ido variando en los últimos años. Inicialmente los esquemas de fluoropirimidinas eran administrados durante 12 meses, reduciéndose a 6 meses con la adición del oxaliplatino. Los resultados del estudio IDEA han permitido plantear una desescalada de dosis en pacientes seleccionados (83). Se trata de un estudio que pretendía demostrar la equivalencia de los esquemas FOLFOX/CAPOX durante 3 meses versus FOLFOX/CAPOX durante 6 meses con menor toxicidad asociada. Basándose en los resultados, por un lado, las guías recomiendan mantener el esquema durante 6 meses en tumores de alto riesgo T4 o N2 por una pequeña diferencia estadísticamente significativa en la SG (74.1 frente a 72 % a cinco años). Por otro lado, plantean ofrecer una reducción de la QT a 3 meses en tumores de bajo riesgo T1-3N1 con una SG de 88.9 con 6 meses versus 89.6 con 3 meses y con menor tasa de neurotoxicidad (84). Por último, en este estudio se destacó que, en aquellos pacientes con alto riesgo tratados durante 6 meses, el esquema CAPOX podía ser ligeramente superior a FOLFOX, evitando además el uso de infusor.

En lo referente a los estadios II no se recomienda de manera estandarizada la administración de QT adyuvante a todos los pacientes. Se debe individualizar el riesgo de los pacientes según su estado general y las comorbilidades junto con el beneficio de cada uno. En tumores estadio II, pero con alto riesgo de recaída, si se recomienda administrar la QT. Se considera alto riesgo a los que debutan con obstrucción ó perforación, que infiltran o tengan adherencias a estructuras vecinas (T4), aquellos pobremente diferenciados, en casos de cirugía subóptima (márgenes afectos o menos de 13 ganglios en la linfadenectomía), CEA elevado persistente tras la intervención o los que tienen invasión linfática, venosa o perineural (85–87). A estos pacientes de alto riesgo y si no existen otras contraindicaciones médicas, se les aconseja tratamiento adyuvante igual que en el estadio III valorando más los riesgos por el menor beneficio asociado.

B- Tratamiento del cáncer de recto no metastásico

El tratamiento quirúrgico del cáncer de recto tiene varios matices diferenciadores si lo comparamos con el cáncer de colon, esto se debe principalmente al mayor riesgo de recidiva local del cáncer de recto estadio II y a que la cirugía radical (amputación

abominoperineal) se asocia a una alta morbilidad con impacto negativo en la calidad de vida del paciente. Así mismo, el diagnóstico suele ser más precoz y el patrón de metástasis es diferente y más fácil de determinar. Además, la técnica quirúrgica de elección en la mayoría de los casos es la escisión mesorrectal total (EMT). La cirugía conservadora es una buena opción en la mayoría de los casos de cáncer de recto localmente avanzado (CRLA), siempre que sea en centros de referencia con experiencia (88,89).

También, para favorecer el control local de la enfermedad y disminuir la tasa de recaídas en los CRLA, el planteamiento realizado hasta ahora ha sido el abordaje con quimiorradioterapia (QTRT) concurrente prequirúrgico o neoadyuvante, principalmente en los estadios II-III (T3-4 y/o N+) (90). Es planteable no realizar radioterapia adyuvante en aquellos tumores T3N0 de tercio superior, sin datos histológicos de agresividad y cirugía oncológica correcta, sobre todo si son pacientes mayores o con comorbilidades donde el riesgo de una QTRT puede superar el escaso beneficio en una población con un 10% de recaídas (91).

Aunque se están implantando nuevas estrategias en este campo, la QTRT neoadyuvante es el tratamiento estándar aceptado para el CRLA. Esto se ha ido modificando a lo largo de los últimos años dependiendo del estadio TNM, por lo que es fundamental un manejo multidisciplinar de esta patología individualizando cada caso (92). En 2004, a raíz del artículo de Sauer y colaboradores (90), se implantó el tratamiento neoadyuvante con 50 Grays de RT fraccionada en 28 sesiones. Se administra con quimioterapia basada en fluoropirimidinas coadyuvante en tumores T3-4 y/o N+ o cT2N0 distales, alcanzando mejor control local y sin aumento de la toxicidad. No obstante, con este abordaje se llega a alcanzar solamente un 10-30% de respuestas completas patológicas (RCp), pero que implica un aumento de la SLP y SG a largo plazo (93). Tras la cirugía se puede consolidar con quimioterapia adyuvante adicional, según el estadio inicial, independientemente del estadio tumoral residual. Esto es muy controvertido y hay resultados dispares al respecto, sobretodo por la dificultad de completar el tratamiento adyuvante tras la QTRT y la cirugía, pero la mayoría de las guías lo recomiendan (94).

Cada vez con más frecuencia se están planteando nuevos abordajes neoadyuvantes en casos concretos. Uno de ellos es el llamado ciclo corto de radioterapia, 25 Grays en 5 sesiones únicas. Esta estrategia es válida en aquellos pacientes que se cree que no tolerarán la QTRT de ciclo completo, o antes de la cirugía rectal en el contexto de una enfermedad metastásica, para minimizar los retrasos en el inicio de la terapia sistémica. Sin embargo, en la mayoría de las instituciones, la QTRT de ciclo largo todavía se considera el enfoque preferido para la mayoría de los pacientes, en particular para aquellos con tumores voluminosos o con enfermedad ganglionar extensa (95,96).

La neoadyuvancia total basada en QT de inducción con FOLFOX, seguido de QTRT y posterior cirugía puede ser una aproximación válida para tumores voluminosos de alto riesgo (T4N2). Su interés radica en que existe una mayor probabilidad de completar la quimioterapia sistémica si se administra antes de la cirugía debido a la morbilidad postoperatoria y la toxicidad relacionada con el tratamiento. Con este abordaje se debe reevaluar precozmente y plantear, si no hay respuesta clínica evidente, cambiar al tratamiento a QTRT y cirugía, principalmente en casos donde se prevea una resistencia basal al tratamiento neoadyuvante como en tumores con IMS (97). Aún quedan bastantes dudas por resolver en relación a la QT neoadyuvante, ya que se están intentando nuevos abordajes para aumentar la tasa de RCp como marcador indirecto de una mayor SLE y SG (98,99). Entre ellos, podría suponer un cambio de paradigma el estudio RAPIDO (100), un fase III con resultados positivos en tumores de alto riesgo como T4 o N2 donde se aplicaba un tratamiento innovador con ciclo corto de RT seguido de QT neoadyuvante con CAPOX o FOLFOX y cirugía con EMT. En este estudio se vio menor recaídas tumorales y menos metástasis a distancia en la rama del tratamiento experimental. También se han presentado recientemente los datos del estudio PRODIGE-23 (101), que demuestra la mayor eficacia de una intensificación del tratamiento con QT neoadyuvante con FOLFIRINOX seguido de QTRT y posteriormente de EMT y QT adyuvante demostrando una mayor supervivencia libre de enfermedad a los 3 años del tratamiento (76 vs 69%).

Cabe destacar nuevas estrategias que se están estudiando con el objetivo de preservar del recto evitando el abordaje quirúrgico en CRLA. Estos estudios plantean eliminar la cirugía del esquema terapéutico debido a la comorbilidad que a veces asocia.

A esta estrategia se la conoce como “*Watch and Wait*” (W-W) (102). A pesar de la falta de ensayos aleatorizados, el W-W se está convirtiendo en una alternativa aceptable para aquellos pacientes que experimentan un RCp a la terapia neoadyuvante, especialmente si se sigue el abordaje de neoadyuvancia total. Tras evidenciarse una respuesta completa en RM, clínica y anatomopatológica con biopsias a ciegas obtenidas por colonoscopia, se plantea un seguimiento estrecho que constata esa respuesta mantenida. En este seguimiento se están estudiando además nuevos biomarcadores como la biopsia líquida para medición del ADN circulante total o “*circulating tumor DNA*” (ctDNA). Debe enfatizarse que aún no se dispone de datos maduros para garantizar que los resultados de supervivencia sean equivalentes, y esto es importante por la historia natural del cáncer de recto y su tasa de recurrencias tardías hasta 10 años después de la resección. Las guías NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*) en 2020 establecen que para los pacientes que logran una RC puede plantearse un abordaje inicial no quirúrgico, siempre y cuando se explique al paciente las dos opciones y la falta de consenso actual y se decida conjuntamente junto con un equipo multidisciplinar (103,104).

C- Tratamiento del CCR metastásico

Hasta ahora el CCRm tiene un abordaje similar independientemente del origen, salvo la adición de la radioterapia para el control local en el cáncer de recto, por el mayor riesgo de obstrucción en estos tumores. El 20% de los pacientes debutan con enfermedad metastásica y son los pacientes con peor pronóstico basal, aunque cabe recalcar que este pronóstico ha cambiado radicalmente con el abordaje quirúrgico del paciente oligometastásico y con el desarrollo de la estrategia “*continuum of care*”. Esta estrategia parte de considerar el tratamiento como un proceso continuo que incluye planes de tratamiento personalizados que ofrecen mantenimiento y/o terapias intermitentes y resección quirúrgica de metástasis en pacientes seleccionados con tratamientos locales sobre las metástasis. Destacar la importancia de que todos los pacientes reciben el mayor número de tratamientos posibles, según el perfil del paciente, incluyendo: fluoropirimidinas, irinotecan, oxaliplatino, bevacizumab, cetuximab, panitumumab, aflibercept, regorafenib y TAS-102 (105).

Es fundamental comenzar el tratamiento basándose en la decisión de un equipo multidisciplinar que determina el abordaje a llevar a cabo en cada caso (106). Todos los especialistas deben valorar, según la escala ECOG, la comorbilidad del paciente y el estadio TNM, la estrategia a seguir en cada caso. Una de las funciones del equipo multidisciplinar será determinar el potencial de curación y valorar si es un CCR irresecable o aquellos que se pueden convertir en resecables después de que se haya logrado una respuesta con poliquimioterapia. Por tanto, el objetivo del tratamiento, en este último grupo de pacientes, será convertir el CCRm inicialmente irresecable en enfermedad resecable. Las guías consenso del grupo europeo (ESMO) clasifican a los pacientes metastásicos según el abordaje a plantear y según el objetivo terapéutico en pacientes aptos y no aptos para tratamiento (48).

El paciente que se considera que presenta una enfermedad potencialmente resecable ha ido variando en los últimos años por las mejoras en las técnicas quirúrgicas. Inicialmente se definía por la existencia de 5 metástasis en hasta 2 o 3 localizaciones viscerales (hígado, pulmones, peritoneo u ovario). Actualmente, la mejor definición del paciente potencialmente resecable es aquel que, presentando una buena situación clínica y tras presentar una respuesta a la QT neoadyuvante, el cirujano cree que puede reseca completamente la enfermedad tumoral dejando un remanente de hígado sano suficiente. Si bien, la resección quirúrgica es la única opción potencialmente curativa se puede combinar este tratamiento con nuevas técnicas como la termoablación, la QT intraarterial hepática, la quimioembolización, la radioembolización o la SBRT (radioterapia estereotáctica corporal) para alcanzar mejores resultados.

Durante décadas, en el tratamiento del CCRm irresecable el 5FU fue el único agente activo. Esto ha cambiado notablemente en los últimos años, con la aprobación de más de 15 nuevos fármacos en CCRm. Aún no se ha establecido la mejor forma de combinar y secuenciar estos agentes (107) y hay muchas dianas terapéuticas en estudio con más de 600 ensayos clínicos en el momento actual para CCRm (108,109). Como ya se ha demostrado, los eventos genómicos críticos en el CCR afectan en la respuesta a agentes dirigidos que se desarrollaron inicialmente bajo el paradigma "un gen, un fármaco" de la medicina de precisión. Nuestro conocimiento actual de la complejidad del genoma del cáncer, los patrones de evolución clonal bajo la presión del tratamiento y los efectos

farmacodinámicos de la inhibición de la diana respaldan la transición de un enfoque de un gen, un fármaco a un modelo de 'múltiples genes y múltiples fármacos' al tomar decisiones terapéuticas. En el CCR con la descripción de los subtipos moleculares (25) este patrón de tratamiento ha cobrado una mayor importancia para la elección de la secuencia terapéutica (110). Así se ha planteado que para el CMS 1 o inmune se debería iniciar tratamiento con inmunoterapia (en monoterapia o combinación) o inhibidores de BRAF, mientras que en el subtipo 2 o canónico se podría iniciar una combinación de anti EGFR con inhibidores panERBB. Para el subtipo 3 o metabólico habría que identificar fármacos dirigidos a rutas metabólicas e inhibidores de RAS en desarrollo y para el 4 o mesenquimal se podría tratar con inmunoterapia en combinación con fármacos antiTGF.

Esto apoya la necesidad de innovación constante en el tratamiento del CCR, priorizando no tanto la secuencia, sino el “*continuum of care*”, administrando el mayor número de tratamientos activos combinados con cirugías y tratamientos locales (Figura 6). Para ello, es necesario un mayor conocimiento de las vías moleculares que subyacen al CCR. En las células normales, la fosforregulación está bajo el control de las proteínas quinasas y las fosfatasas y un equilibrio correcto entre las actividades de ambas es esencial. Se ha demostrado que las alteraciones que afectan la actividad de la quinasa son recurrentes en muchos cánceres. Además, los tratamientos que utilizan inhibidores de quinasas se han investigado progresivamente en la última década, pero no los fármacos que actúan sobre las fosfatasas. Por ello, el papel de las fosfatasas sigue siendo, en comparación, como el de las proteínas fosfatasa 1 y 2A, y estas vías deben estudiarse en el contexto del CCR.

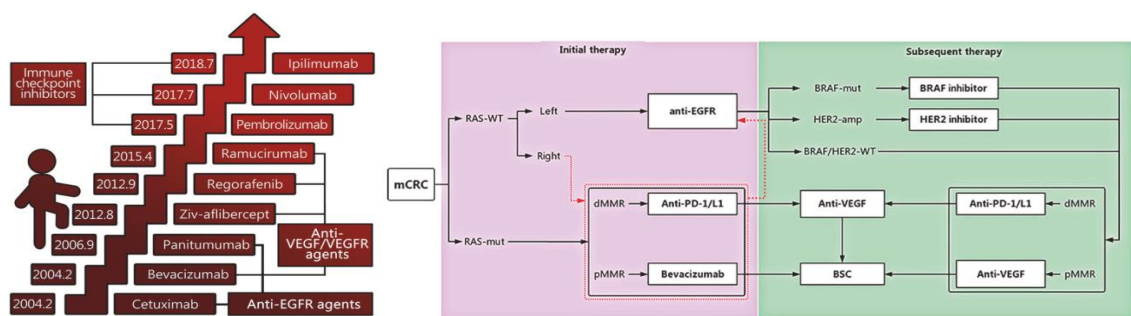


Figura 6. (A)Nuevas dianas terapéuticas de los últimos años en CCR. **(B)** Vías aprobadas de fármacos dirigidos para el tratamiento del CCR en la actualidad (adaptado de Xie *et al.*, 2020 (107)).

B. Proteína fosfatasa 2A (PP2A)

PP2A es un complejo oligomérico con actividad serina/treonina fosfatasa que actúa como supresor tumoral regulando vías de señalización celular fundamentales. Se ha constatado que constituye cerca del 1% de todas las proteínas celulares en mamíferos y, junto con la proteína fosfatasa 1 (PP1), representa más del 90% de la actividad serina/treonina fosfatasa de la célula (111). La capacidad supresora tumoral de PP2A se investigó por primera vez en los años 90 tras demostrarse que el ácido okadaico, un inhibidor selectivo pero no específico de PP2A, promovía el crecimiento tumoral en ratones (112,113). Está demostrada la asociación de la desregulación de PP2A como evento fundamental para el desarrollo de varios subtipos de cáncer, ya que controla varios procesos celulares, incluyendo proliferación celular, supervivencia, adhesión y la dinámica del citoesqueleto celular, entre otros muchos (114,115).

1- Estructura de PP2A

Es un complejo holoenzimático compuesto por 3 subunidades (Figura 7):

- Una subunidad catalítica (PP2Ac/PP2C) con dos isoformas descritas.
- Una subunidad estructural (PP2Aa/PR65/PP2R1) con dos isoformas descritas. Las subunidades catalítica y estructural, de forma conjunta, componen el núcleo enzimático.
- Una gran variedad de subunidades reguladoras B. Se han descrito 26 isoformas agrupadas en 4 familias. Otorgan la diversa especificidad enzimática del complejo y la localización de cada holoenzima.

Todas ellas generan el complejo heterotrimérico de PP2A con diversas especificidades celulares (Figura 8).

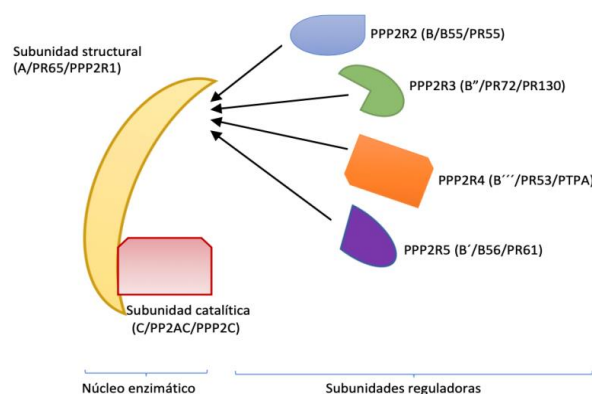


Figura 7. Estructura y subunidades del complejo PP2A (adaptado de Westermack y Hahn, 2008 (116)).

Los niveles de cada una de las subunidades que componen el complejo PP2A están estrechamente regulados en la célula a distintas escalas, y algunas de las subunidades reguladoras son tejidos específicos. Además, en ratones una pérdida de la subunidad catalítica ha demostrado ser letal, lo que confirma la importancia de esta molécula para la homeostasis celular (116). Hay que destacar que en este complejo cada subunidad ejerce una función específica dentro del mismo. Así, la actividad fosfatasa se lleva a cabo en la subunidad catalítica, mientras que las subunidades reguladoras son las encargadas de determinar tanto la especificidad de sustrato como la localización subcelular e incluso a nivel de tejido del complejo. Por último, la subunidad estructural es la que articula el complejo uniendo en el mismo al resto de subunidades y manteniendo su arquitectura (117).

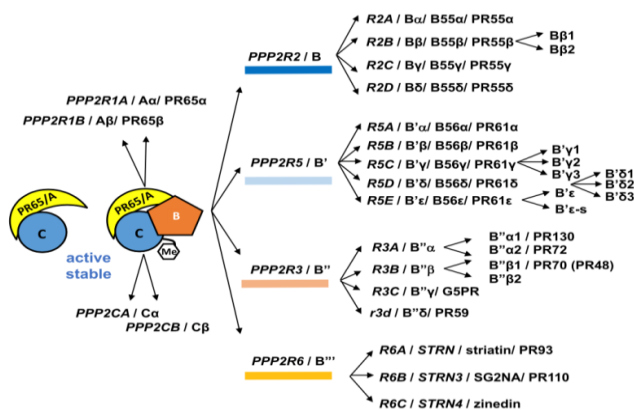


Figura 8. Variantes de las isoformas de PP2A (adaptado de Reynhout et al., 2019 (118)).

2- Funciones de PP2A

La mayoría de las vías de señalización requieren para activarse una cascada de eventos, que generalmente se llevan a cabo por la activación de quinasas específicas, y a su vez, son contrarrestadas por un número limitado de fosfatasa. PP2A revierte la acción de múltiples quinasas en un gran número de vías celulares. Por ejemplo, es un regulador de división del ciclo celular a nivel de G1/S. De hecho, impide la mitosis al inactivar CDK1, inhibiendo la supervivencia celular. CDK1 es una quinasa dependiente de ciclinas que, al unirse ambas, favorece el paso de la célula de la fase G1 a la fase S de la mitosis activando varios factores de transcripción. Al fosforilarse CDK1 a través de PP2A se produce el efecto contrario suprimiéndose la división celular (119).

PP2A también participa en la vía de RAF/MEK/ERK, que como hemos visto previamente es una vía desregulada en el CCR. PP2A puede activar o inhibir esta vía, dependiendo del tipo celular. La subunidad reguladora B (PR55-alfa) se une al complejo de membrana KSR1, RAF1 y a PP2Ac favoreciendo la interacción RAS/RAF (120). Esto produce la defosforilación e inactivación de KSR1, que es un inhibidor de MAPK por lo que se activa la vía MEK-ERK favoreciendo la división celular y un efecto antiapoptótico. Pero también, puede ocurrir que PP2A inhiba la actividad de c-SRC que es un activador de RAF, inhibiendo esta vía (121). Por la misma vía, PP2A puede inhibir la traducción de oncogenes como MCL-1 y c-MYC a través de la defosforilación de F4E, el cual ha sido descrito como un factor de transcripción que participa en la transformación celular, carcinogénesis y progresión metastásica (122).

Además, PP2A participa en la regulación negativa de la vía PI3K/AKT, de hecho, una pérdida funcional de PP2A induce la activación de esta vía favoreciendo la iniciación de la carcinogénesis (123). También se ha demostrado la actividad proapoptótica de PP2A a través de esta misma vía por la defosforilación de AKT, inactivándose la proteína antiapoptótica BCL-2 ampliamente estudiada en el linfoma folicular B (124).

Por último, PP2A también tiene un papel en la regulación de la vía WNT (de desarrollo embrionario, crecimiento celular y supervivencia de las células madre). WNT actúa sobre la β -catenina que actúa sobre el factor de transcripción TCF-4 favoreciendo la carcinogénesis. Aunque se ha demostrado que PP2A tiene efectos tanto positivos como negativos en esta vía, principalmente se considera un regulador negativo de la vía WNT, confirmándose su actividad antitumoral. De hecho, la inhibición de PP2A da como resultado un aumento en la transcripción de β -catenina (111).

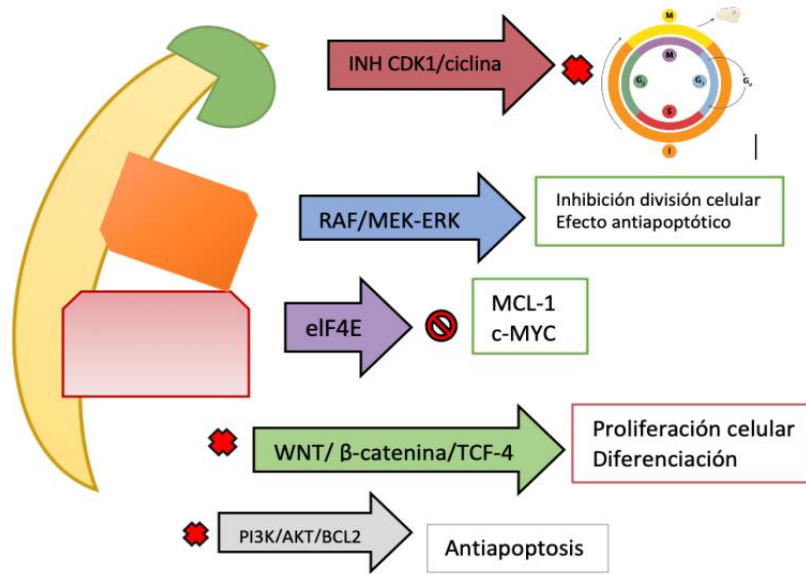


Figura 9. Resumen de vías de regulación celular mediadas por PP2A.

3- PP2A y cáncer

La evidencia acumulada en relación a las vías celulares sobre las que funcionalmente actúa, estableció el importante papel de PP2A como gen supresor tumoral. Como hemos indicado tanto su función como su regulación son complejas, por lo que la relación con los diferentes tumores dependerá, en gran medida, de la subunidad alterada (124). La pérdida específica de una subunidad de PP2A representa una causa mayor de desarrollo y progresión tumoral (125). Por tanto, se ha relacionado con la carcinogénesis de otros muchos tumores como CCR, cáncer de pulmón, mama (126), ovario, cervix (127), LMA (128) o melanoma (129).

Alteraciones en la regulación basal de PP2A y de las diferentes subunidades puede ser la causa de la carcinogénesis en muchos casos. Estas alteraciones pueden ser post-traduccionales, como la metilación o la fosforilación ya evidenciada en CCR. De hecho, se ha llegado a determinar que la reversión de esa alteración puede ser una prometedora diana terapéutica en muchos casos (130). Además, se han descrito otras modificaciones relacionadas con la aparición de tumores como la expresión de micro-ARNs que alteran la expresión de las subunidades de PP2A, o aumento de la expresión de inhibidores endógenos como SET o CIP2A (131–134).

En el CCR se ha descrito la inhibición de PP2A como un evento muy común en el desarrollo del tumor. Además, esta alteración confiere un peor pronóstico en CCRm en series de casos de nuestro grupo de trabajo (135). También se ha descrito en CCRm la hiperfosforilación de PP2A como una de las principales vías de inactivación de este complejo proteico (136), junto con la sobreexpresión de la proteína SET (137), y la disminución del microARN-199b (miR-199b), que comentaremos más adelante. Al mismo tiempo, en estos tumores se han caracterizado estas alteraciones como biomarcadores pronósticos y como marcadores predictivos de beneficio en respuesta a oxaliplatino (138). De hecho, se ha comprobado que revertir la inhibición de PP2A con fármacos como FTY720 o forskolina, por medio de la disolución de la unión de PP2A y su inhibidor SET, puede tener un efecto antitumoral (130).

C. SET: inhibidor endógeno de PP2A

La proteína SET, también conocida como inhibidor 2 de PP2A o I2PP2A/PHAP-II/TAF-I β , es una oncoproteína nuclear con un tamaño molecular de 39 kDa con múltiples funciones celulares y se codifica en el cromosoma 9q34. Se ha estudiado fundamentalmente como inhibidor endógeno de PP2A (139). El gen fue descrito en los años 90 en relación a un gen de fusión SET-CAN en un paciente con leucemia mieloide aguda (LMA), y también en un caso de fusión a la nucleoporina Nup214, también en LMA (140). Esta proteína se ha descrito también como parte de la familia de histonas chaperonas NAP1, expresada en numerosos tejidos (141).

Otro mecanismo de acción de SET es formando parte del complejo inhibitorio de histona-acetiltransferasas (INHAT), que se une de manera directa a las histonas y evita que puedan posicionarse como sustrato de las histona-acetiltransferasas (HAT), haciendo que el ADN quede compactado y no se traduzca a ARN, silenciando la expresión de determinados genes (142). En cuanto a la estructura de SET, *Muto et al.* la describen como una proteína articulada en dímeros formando una estructura tipo “auricular”, cada proteína tiene un segmento N-terminal, una hélice estructural y un dominio “orejera” C-terminal, muy similar a la ya comentada histona chaperona NAP1. La parte que participa

del INHAT es la “orejera” que se une tanto a las histonas en su región N-terminal como al ADN, evitando el reconocimiento por HAT (143).

1. Funciones de SET

Aunque inicialmente se definió como una proteína nuclear, se han descrito isoformas de la misma en la membrana celular y en el citoplasma y su función celular ha sido asociada con la supervivencia celular y la proliferación. Como hemos comentado antes en la división celular participan las ciclinas y CDKs. SET bloquea la acción de p21^{cip1}, un potente inhibidor del complejo CDK2-ciclina E (144). Este complejo participa en la regulación de la fase G1/S de la división celular. SET al inhibir p21^{cip1} estimula la división celular. Además, actúa sobre CDK1-ciclina B que es esencial para el paso de la fase G2 a la fase M del ciclo evitando la división en este punto (145). Por otra parte, SET es capaz de inhibir directamente p53, el superior de tumores, que es a su vez un activador de p21, promoviendo así la división celular (146).

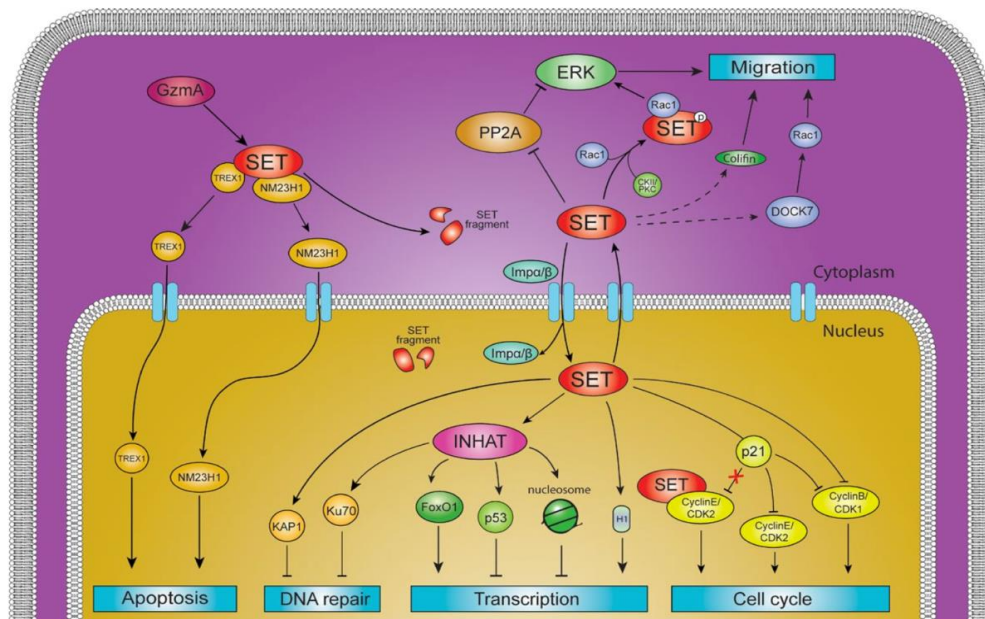


Figura 10. Funciones de SET y las cascadas celulares que regulan la migración celular, el ciclo celular, la apoptosis, la transcripción de genes y la reparación del ADN (adaptado de Bayarkhangai *et al.*, 2018 (147)).

SET también participa en la regulación de la transcripción de varios genes como p53 o Fox1 interactuando con las histonas. Al ser SET parte del INHAT, que impide la descompactación del ADN, es capaz de evitar la transcripción de algunos genes. Se ha demostrado que inhibiendo la actividad de la actividad acetiltransferasa de p300/CBP

deja compactado a los genes p53 (148) o FoxO1 (149), inhibiendo la apoptosis celular. Además SET, al ser parte de la familia de histonas chaperonas NAP1, es capaz de descompactar el ADN o compactarlo a través de su interacción con las histonas (150) expulsando a H1 del nucleosoma lo que favorece la incorporación de la ADN polimerasa II y la transcripción de los genes (147).

En células cancerosas, el estrés oxidativo causa aberraciones cromosómicas y daño en el ADN, generando mutaciones de proliferación y progresión tumoral (151). El mecanismo de reparación es la recombinación homóloga del ADN (RH) y la unión de extremos no homólogos (NHEJ). En este contexto, la proteína Ku70/80 se une a los extremos de la doble hebra fragmentada e inicia el proceso de reparación mediante NHEJ. SET es capaz de unirse a Ku70/80 impidiendo su acción y la reparación del material genético (152).

La GTPasa Rac1 controla la adhesión y migración celular. Esta GTPasa activada favorece la translocación de SET del núcleo al citoplasma para unirse a Rac1 y favorecer estas funciones amplificando la señal a través de las quinasas (153). Además, al inhibir PP2A, que a su vez regula negativamente Rac1, genera una retroalimentación positiva (154). Todas estas funciones llevan a la conclusión de que SET es un proto-oncogén y se encuentra sobreexpresado en múltiples tumores. Cristóbal y sus colaboradores probaron que la sobreexpresión de SET es frecuente en CCRm, demostrando que aproximadamente un 25% de los pacientes con alta expresión de esta proteína asociaban peor pronóstico y exhibían resistencia a oxaliplatino, planteándose por primera vez, un tratamiento con inhibidores de SET como beneficioso en CCRm (137).

Como se indicó anteriormente, una de las funciones descritas para SET de mayor relevancia es que este es un potente inhibidor endógeno de PP2A. Al inhibir esta proteína supresora de tumores es capaz de activar vías de proliferación celular y bloquear otras encargadas de regular la apoptosis, activando vías de señalización como las de c-MYC, WNT-B-catenina, ERK o PI3K-AKT (155,156). Esta función, por la importancia que adquiere tanto en cáncer como con el tema de esta tesis doctoral, será descrita con mayor detalle en el apartado 3 de esta sección.

2. Regulación de SET

Hay múltiples mecanismos de regulación de SET conocidos tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional, e incluso post-traducciona.

A nivel transcripcional se han descrito varias regiones previas al promotor de *SET* con regiones de unión para factores de transcripción como HSE, SP1 y NFκB, siendo estas dos últimas muy necesarias para la expresión de *SET* en modelos celulares de enfermedad de Alzheimer (157). De hecho, otro ejemplo es la existencia de una región del promotor de *SET* alterada en la leucemia mieloide aguda (LMA) donde se ha descrito que se une el complejo de regulación transcripcional compuesto por RUNX1, GATA2, SP1 y MYC que causan una sobreexpresión de *SET* (158). *EVI-1* es un oncogén que actúa en el desarrollo embrionario como un factor de transcripción fundamental regulando la angiogénesis y hematopoyesis. *EVI-1* se ha observado alterado en varios tipos de tumores, y con funciones asociadas de gran relevancia en tumores hematológicos como la LMA (159) Además, se ha visto que determina un peor pronóstico en numerosos tumores incluyendo el CCR (160–162). Cristóbal y sus colaboradores (125) demostraron que *EVI-1* funciona como un regulador positivo de *SET* en LMA, pero no se pudo demostrar si esta regulación es directa o indirecta puesto que el análisis funcional de luciferasa fue negativo en las regiones del promotor de *SET* estudiadas, pero quedan sitios de unión putativos para este factor de transcripción dentro del promotor de *SET* que aún no han sido analizados. En cualquier caso, la modulación ectópica de *EVI-1* se vio que implica una regulación de *SET* en el mismo sentido, por lo que *EVI-1* se propuso como un regulador positivo de *SET*, lo que iría de la mano con las funciones descritas en numerosos trabajos para cada uno de ellos.

Por otra parte, se ha descrito una regulación de *SET* a nivel post-transcripcional por miRs como el miR-199b (163) que constituye una parte esencial de esta tesis doctoral y que será tratado en un apartado propio más adelante. Otros miRs que participan en la regulación de *SET* a nivel post-transcripcional han sido descritos en numerosos trabajos como el miR-125b en cáncer de ovario (164) o el miR-21-5p en adenocarcinoma de pulmón (165).

A nivel post-traducciona SETBP1 es una oncoproteína de localización nuclear que se une a SET estabilizándolo y protegiéndolo de su corte por proteasas y posterior ubiquitinación y degradación en proteosoma. Por tanto, SETBP1 favorece la función de SET lo cual trae consigo una mayor inhibición de PP2A a través del eje SETBP1-SET-PP2A. Este es un mecanismo regulador de SET que si bien es importante en LMA (166,167) no ha demostrado su relevancia en CCRm. Esto es debido a la baja frecuencia de la sobreexpresión de SETBP1 en CCR o la ausencia de mutaciones activadoras en la cohorte de casos analizada de la misma (168). Estos resultados, aunque no son excluyentes de que SETBP1 pueda jugar un papel relevante en algunos casos de CCR favoreciendo la desregulación de SET, indican que éste sería un evento muy poco prevalente en CCR en comparación con lo descrito para LMA.

3. SET y cáncer

Inicialmente se describió que la expresión de SET se correlacionaba con la división celular, estando poco expresado en células quiescentes y muy elevado en células con rápida proliferación (169). Posteriormente se observó en modelos celulares de hepatocarcinoma y de leucemia que la expresión de SET aumenta con el crecimiento tumoral (169) y se correlacionó que el silenciamiento de SET disminuía la proliferación celular, probablemente por el aumento de la actividad de PP2A. Estas observaciones sugerían que SET participa en la iniciación y crecimiento del cáncer (170). Además, se ha asociado un incremento de SET en la resistencia a los tratamientos QT y un silenciamiento de SET con una resensibilización a los tratamientos en CCRm (137) en neoplasias hematológicas (171) o en cáncer de pulmón no célula pequeña (CPNCP) (170). Desde entonces la sobreexpresión de SET se ha evidenciado en numerosos tumores, desde LMA, tumores de cabeza y cuello, coriocarcinoma, sarcomas, cáncer de mama, pulmón, hepatocarcinoma o próstata y, por supuesto, en cáncer de colon. Además, en muchos casos se ha demostrado el impacto clínico de SET como marcador de mal pronóstico (Tabla 6).

LMA	No hay evidencia de tumor primario (125) (171)
Leucemia linfática crónica	Sobreexpresado y con progresión de la enfermedad más precoz (172).
Linfoma no Hodgkin	Sobreexpresado y asocia mayor agresividad (172).
Maduloblastoma	Sobreexpresado en tumores con activación de la vía sonic hedgehog a través de la inhibición de p53 (148).
Cabeza y cuello	Sobreexpresión en 98% de los tumores (173) y relacionado con quimiorrefractoriedad (174).
Tumores de glándula salivar	Sobreexpresión de SET y CIP2A en los adenocarcinomas y en los carcinomas adenoides quísticos (92%) (175).
Cáncer de mama luminal	Sobreexpresión en 60% de los tumores (176)
Cáncer de mama triple negativo	Sobreexpresión de SET y CIP2A que promueven la viabilidad celular, la invasión y la migración (177).
CPNCP	Sobreexpresión en 90% tumores, se asocia a mal pronóstico relacionado con expresión AKT con peor SG y SLP (170)
Hepatocarcinoma	Sobreexpresión 30.6% con peor SLP asociado a alteraciones de AKT (178)
Cáncer de colon	Sobreexpresado en 70.9% por PCR (179) y 24.8% por inmunohistoquímica en enfermedad metastásica con peor SLP y SG (137)
Cáncer gástrico	Sobreexpresión en el 46% de los pacientes y se asocia con peor SG y con progresión tumoral (180).
Cáncer de páncreas	Sobreexpresado en líneas celulares de cáncer de páncreas inhibiendo miRs supresores de tumores como let-7 (181,182).
Cáncer de vesícula biliar	Sobreexpresado por la inhibición del miR-502-3p con actividad inhibitoria de SET (183).
Cáncer de ovario	Sobreexpresado en carcinoma seroso ovario (184).
Coriocarcinoma	Presente en 86.7% (163).
Tumor de Wilms	Sobreexpresión con respecto a tejido sano (185)
Sarcoma alveolar de partes blandas	Sobreexpresado en 100 % casos (15/15) (186)
Cáncer de próstata	Sobreexpresado en 47.5%, asociado con aumento del riesgo de recidiva bioquímica y resistencia a la castración (187)
Melanoma	Sobreexpresado sobretodo en BRAF no mutados (188).

Tabla 6. La expresión de SET y su relevancia clínica en diferentes tumores.

Estos datos demuestran la potencial relevancia de SET como biomarcador en varios tipos de cáncer, así como el papel crítico que SET puede desempeñar en el desarrollo del cáncer a nivel funcional. Sin embargo, cabe señalar que la mayoría de los resultados se basaron en observaciones realizadas en pequeñas cohortes de pacientes sin validación externa. Además, no hay consenso sobre el método de detección y la definición de sobreexpresión de SET lo que dificulta la estandarización de la técnica. Se

necesitan más estudios con un mayor número de pacientes y un diseño de estudio sólido para confirmar la relevancia clínica de la expresión de SET en cáncer, pero la concordancia de los datos hasta ahora promete resultados interesantes. Sobre todo, es importante tener en cuenta la aplicación terapéutica que puede tener revertir la resistencia a los tratamientos actuales de quimioterapia en diferentes tumores a través de la inhibición de SET (130,170,178).

Todo esto sugiere que SET tiene potencial como objetivo farmacológico para futuros tratamientos contra el cáncer. Fingolimod o FTY720 es un análogo de esfingosina con efecto inmunosupresor aprobado para los pacientes con esclerosis múltiple (189) pero se ha demostrado que tiene un gran potencial antitumoral debido a su capacidad para bloquear la unión de SET con PP2A (190,191). Sin embargo, este fármaco es capaz de activar a PP2A a través de otros mecanismos, como por ejemplo, mediante la disminución de la expresión de CIP2A (otro inhibidor endógeno de PP2A) o mediante la hipofosforilación de PP2A en Y307 (192,193). El uso de este fármaco aumenta los niveles de actividad de PP2A y p53 produciendo apoptosis tumoral e inhibiendo otras vías tumorales como c-MYC, haciendo reversible la resistencia a la quimioterapia (194) (Figura 11). Esto promovió el desarrollo de derivados como OSU-2S, que tiene una mayor sensibilidad y especificidad, así como menores toxicidades relacionadas (195).

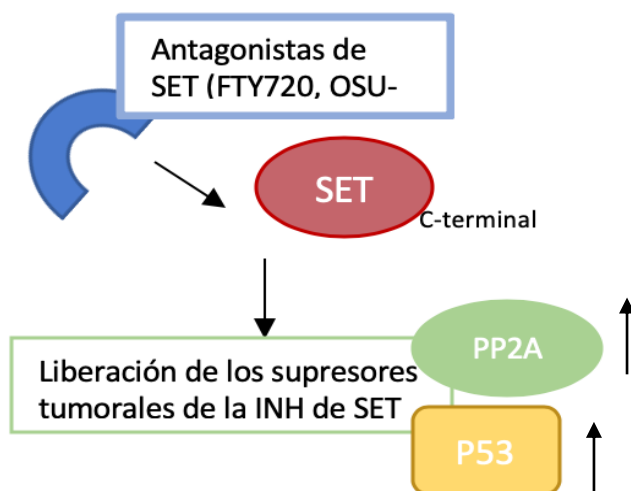


Figura 11. Mecanismo de acción de los inhibidores de SET.

D. MicroARNs (miRs) y su papel como reguladores del eje SET/PP2A

1. Mecanismo de acción y su papel en la carcinogénesis

Desde su identificación en 1993 (196) hasta el descubrimiento de su alta conservación evolutiva en la naturaleza en el año 2000, el número de investigaciones sobre su función y la contribución a la carcinogénesis ha crecido exponencialmente. Los miRs son moléculas de ARN monocatenario de pequeño tamaño (entre 19 y 25 nucleótidos) que, aunque no codifican para proteínas, son capaces de regular la expresión de otros genes. Se unen a secuencias específicas del ARN mensajero (ARNm) diana y modifican su traducción. De esta manera, los miRs actúan como oncogenes o como genes supresores de tumores dependiendo del gen al que reprima la traducción (197).

Hay más de un millar de miRs descritos y cada uno puede actuar sobre un gran número de ARNm, reflejando la complejidad de estos mecanismos de regulación. Participan en la diferenciación celular, en la proliferación, en la apoptosis o en la respuesta celular al estrés. Su función en el cáncer está en constante investigación y se conoce que participan en la biología de las células madre, en la angiogénesis, en la transición epitelio-mesénquima (TEM), en el desarrollo de metástasis e incluso en la resistencia a fármacos (198). Por tanto, la desregulación de un miR puede favorecer la carcinogénesis por múltiples mecanismos (Figura 12). Como la regulación del miR es dependiente de la expresión de su diana, el ARNm, que no siempre están expresados, la acción de cada miR es dependiente del tejido y las condiciones en las que actúe.

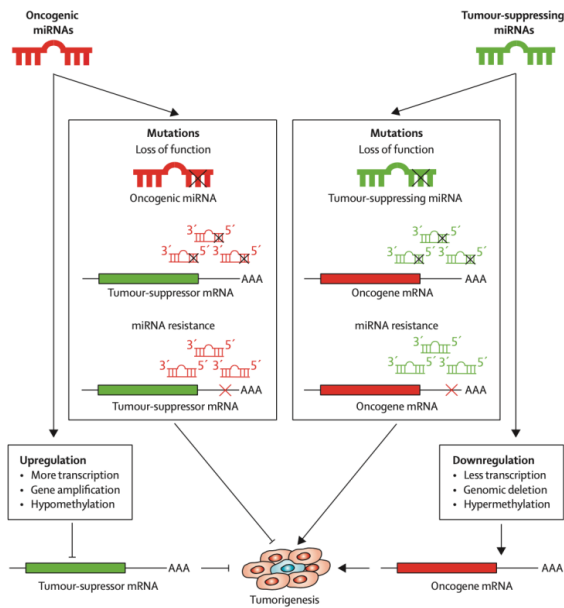


Figura 12. Carcinogénesis regulada por miRs a diferentes niveles. Este es el mecanismo por lo que los miRs pueden actuar favoreciendo el desarrollo de tumores, a través de genes supresores o de oncogenes (adaptado de Kong *et al.*, 2012 (198)).

El potencial clínico de los miRs es variado. Se pueden utilizar para facilitar la identificación de los diferentes subtipos de cáncer e incluso realizar clasificaciones exactas. De hecho, hay ya firmas de transcriptómica pronósticas (199) en estudio y al ser un material resistente a la degradación y del cual se necesita muy poca cantidad de muestra, las posibilidades futuras son infinitas, siendo ideales como marcadores diagnósticos y pronósticos (200). Varios miRs, como miR-127-3p, miR-92a, miR-486-3p y miR-378 predicen el estatus de KRAS y, por tanto, la resistencia primaria a inhibidores de EGFR (201). Estos resultados son muy reproducibles por lo que el uso de estos marcadores puede tener alta validez externa, lo que es muy necesario a la hora de estandarizar una técnica.

2. MiRs y cáncer colorectal

Son numerosos los estudios que han demostrado que los niveles de varios miRs están estrechamente relacionados con el tiempo de supervivencia de los pacientes con CCR localizado o metastásico, y también se ha descrito su impacto en cáncer de colon y recto por separado. Sin embargo, los resultados de diferentes investigaciones no siempre son consistentes. Como se ha mencionado anteriormente, el desarrollo, la progresión y la respuesta a la terapia del CCR están controlados por eventos genéticos y epigenéticos. Esos cambios epigenéticos incluyen alteraciones en determinados miRs. En el CCR hay

muchos miRs descritos como reguladores de distintas fases del desarrollo del CCR (Figura 13). Por ejemplo, en la vía de inicio de carcinogénesis APC/WNT/ β -catenina participan varios como el miR-135b, miR-17-92a clúster, miR-143 y miR-145 (202). Otras vías posteriores en la secuencia del CCR como son RAS-MAPK o PI3K/AKT están reguladas por otros microARNs específicos como miR-21, miR-31, miR-143 y let-7 sobre RAS y también la participación del miR-1 como regulador de la TEM, y el miR-143 sobre PI3K (203,204). Cabe destacar también que p53 que muta con la malignización del adenoma al adenocarcinoma, está a su vez controlado por otros miRs como el 34, 133a, 143 o el 145 (60).

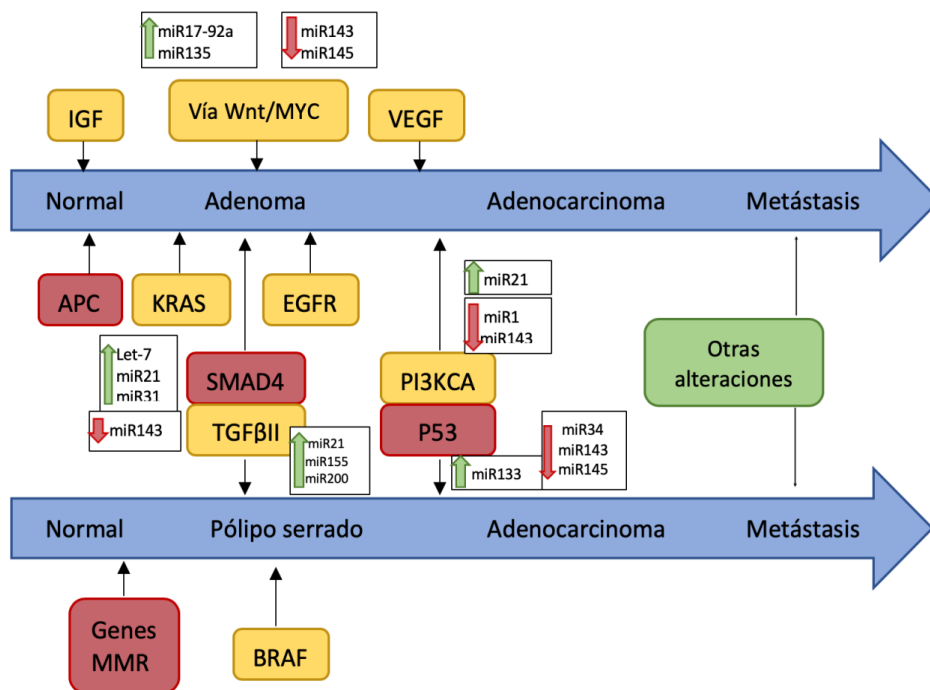


Figura 13. Resumen de la vía clásica de la carcinogénesis con algunos microARN que participan en la regulación de la carcinogénesis formando un complejo entramado.

Un claro ejemplo de la compleja funcionalidad de los miR lo encontramos en el miR-21. Su expresión elevada se ha asociado a la activación tanto de la vía RAS como de la de AKT, además con un peor pronóstico en pacientes con CCR en términos de peor supervivencia y resistencia a tratamientos tanto en enfermedad localizada como metastásica. Pero además, esta asociación de peor pronóstico está presente en otros tumores, como pulmonares, mama, gástrico o páncreas (192). En el escenario del CRLA, Caramés y colaboradores (206,207) correlacionaron un aumento de miR-21 y miR-31 con peores respuestas a la neoadyuvancia con QTRT basada en fluoropirimidinas.

Son muchos los miRs estudiados en CCR por su valor pronóstico diagnóstico, pronóstico y predictivo pero nuestro grupo pretende caracterizar aquellos que participan en la regulación de la vía SET/PP2A, así como determinar su valor funcional y como marcadores pronósticos y predictivos de respuesta a terapias estándar probando nuevos abordajes específicos en aquellos casos en los que podamos predecir una ausencia de respuesta a los mismos.

Aunque los datos presentados en esta tesis se han construido a partir de análisis del tumor por biopsia convencional, la biopsia líquida está en auge en el CCR. Si bien lo más utilizado hasta la actualidad es el análisis de células tumorales circulantes (CTCs) o de ADN circulante tumoral (ctDNA) cada vez se estudian más análisis en biopsias líquidas, tales como análisis de exosomas. Los exosomas son vesículas extracelulares que contienen varias moléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (ADN, ARN, miRs...) que reflejan las condiciones fisiológicas o fisiopatológicas del huésped (208). La función biológica de los miRs exosomales en el cáncer se ha ido confirmando gradualmente y se ha convertido en un punto clave en la investigación del cáncer (209). Están planteados diversos análisis en biopsia líquida de los miRs de nuestros estudios para futuros estudios de confirmación de resultados.

3. miRs y cáncer de recto

En el cáncer de recto, se han descrito varios miRs como biomarcadores con valor pronóstico y predictivo de respuesta al tratamiento QTRT pero, sin embargo, ninguno se ha establecido en la práctica clínica (210). Tanto el desarrollo de nuevos abordajes terapéuticos en cáncer de recto (ciclos cortos de RT, cirugía de entrada, estrategia “watch and wait”) como el incremento de nuevos biomarcadores están siendo muy estudiados actualmente. En este contexto es donde los miRs han resultado progresivamente prometedores en la última década (211). Son numerosos los marcadores descritos como específicos de vías de señalización celular del cáncer de recto y muchos son compartidos con el cáncer de colon. El CRLA requiere diferentes estrategias de tratamiento y es importante estudiarlo por separado. De hecho, se ha estudiado el conjunto de miRs del cáncer de recto, llamado microARNoma y se han encontrado 13 miRs diferenciadores del cáncer de recto (212), siendo ampliado posteriormente por Wu y colaboradores y por

diferentes grupos de trabajo (213). Un resumen de los diferentes miRs que influyen en las distintas vías de señalización del CRLA puede encontrarse en la Tabla 7.

Pathway	MiRNA	Role	Putative Target
PI3K/Akt	miR-141-3p	Oncogenic	PTEN
	miR-375	Oncogenic	Klf5
	miR-126	Oncogenic	p85 β
	miR-21	Oncogenic	PTEN
EGFR	let-7 family	Tumor suppressor	Ras and Myc
	mir-143	Tumor suppressor	Ras
Wnt	miR-101-3p	Tumor suppressor	β -catenin and TCF4
	miR-135a/b	Oncogenic	APC
IGFR	miR-145	Tumor suppressor	IRS-1
			IGF-IR
			IGF1
Other signaling pathways	miR-195	Tumor suppressor	BCL2, BCL2L12 and Mcl-1
	miR-125a-5p	Tumor suppressor	RECK and TIMP3
	miR-21	Oncogenic	SATB1 SPRY2 cdc25a

Tabla 7. miRs alterador en vías de señalización del cáncer de recto (adaptado de Imedio *et al.*, 2020 (214)).

También los miRs se han estudiado como potenciales dianas terapéuticas para tratar la quimio/radio resistencia en el CRLA y aumentar la tasa de respuestas completas patológicas (RCp) (215) como ya se ha demostrado in vitro en el CCRm (138). La ventaja de usar miRs sobre los medicamentos tradicionales contra el cáncer es que los miRs median un silenciamiento génico potente y específico y, hasta la fecha, no se ha informado de resistencia al tratamiento dirigido a miRs (216). Sin embargo, dado que un miR específico puede dirigirse a varios cientos de genes, puede ser difícil determinar el efecto carcinogénico global de ese miR y dilucidar la toxicidad y los efectos que pueden generar. Muchos son los miRs descritos como predictores de respuestas a la QTRT en CRLA, pero solo un número limitado de estudios ha demostrado el valor terapéutico (217).

A. miRs y resistencia a 5-FU

Uno de los principales problemas en el CRLA es la resistencia a los tratamientos de quimioterapia neoadyuvante. Varios son los factores y mecanismos que se han relacionado con estas resistencias. Se ha observado que el miR-450-5p está reducido en muestras de cáncer de recto resistentes a tratamientos con valores normales antes de la QTRT y que al sobreexpresar el miR suponía un aumento de la apoptosis celular en líneas de CCR. Este miR se relaciona con el factor SOX2, esencial en líneas de células madre

resistentes a tratamientos quimioterápicos. miR-450b-5p inhibe el desarrollo de la quimiorresistencia al 5-FU en las células del CCR, siendo una posible diana terapéutica (218). También se ha estudiado el papel de miR-577, que se encuentra disminuido en líneas celulares de colon resistentes a tratamiento y puede suponer igualmente una diana, ya que restaurando los niveles normales de este miR se inhibe la proliferación celular, el crecimiento tumoral y la formación de colonias (219).

Otros mecanismos conocidos recientemente, como que la regulación negativa de miR-375-3p supone una resistencia a los tratamientos con 5-FU, se ha descrito por la relación de este miR con la timidilato sintasa (TS), diana terapéutica del 5-FU (220). Además, también se ha descrito que la supresión del miR-139-5p está asociada a quimiorresistencia a través de la inhibición de NOTCH1 que reduce a su vez BCL-2 y MRP-1, ambos factores pro-apoptóticos, por lo que su restauración a niveles normales favorece la apoptosis y la sensibilidad a 5-FU (221).

Nuestro grupo de trabajo pretende valorar si la vía de señalización miR-199b/SET/PP2A que caracterizamos tiene también un valor pronóstico y terapéutico en la neoadyuvancia de CRLA, donde hasta la fecha no hay datos. Nuestra hipótesis acerca del potencial papel del miR-199b en este sentido se basa en su capacidad de regular a SET, y en el hecho de que SET ha sido descrita como una proteína con una función clave en la regulación de la sensibilidad y adquisición de un fenotipo de resistencia a 5-FU en células con CCR (137). Este efecto de SET está mediado por su capacidad de inhibición a PP2A, cuyo nivel de actividad parece, en último caso, ser el actor clave en la determinación de la respuesta a tratamientos basados en 5-FU (130)(136), lo cual nos llevó a evaluar el potencial impacto de miRs como el 19b, que regula la subunidad PPP2R5E, la cual nuestro grupo identificó como alterada en pacientes con CCR en un trabajo previo a esta tesis doctoral (130).

B. miRs y resistencia a la radioterapia (RT)

La radiorresistencia tiene un papel fundamental en el cáncer de recto y muchos han tratado de dilucidar las causas. Se cree que se asocia también a la presencia de células madre resistentes a los tratamientos. Ha Thi y colaboradores (222) observaron un claro aumento de miR-130a en células radiosensibles y relacionaron su elevación en

células radorresistentes con una disminución del crecimiento tumoral y una sensibilización del mismo a radioterapia, caracterizaron su actuación directa sobre SOX4 inhibiendo la reparación del ADN y aumentando la apoptosis.

También se ha estudiado SNAI1, un mediador de la TEM como supresor de la expresión de miR-145 asociado a SOX2 y otros factores de transcripción asociados a las células madres (223). Aunque estos son los más estudiados son muchos los descritos que pueden participar en la resistencia a la radioterapia y deben continuar estudiándose y validándose en otras series (224).

C. miRs y resistencia a la QTRT

La mayoría de los estudios que describen la quimiorradioresistencia mediada por miRs se han realizado en los últimos 5 años y plantean la combinación de QTRT y la actuación sobre los miRs como futura diana terapéutica. Por tanto, con la inhibición de un miR con actividad oncogénica o la expresión ectópica de un miR supresor de tumores se podría tratar de revertir la resistencia a los tratamientos actuales (Tabla 8). En 2019 Wang y colaboradores (225) relacionaron que un aumento ectópico de miR-195 bloquea la vía de PI3K/AKT y ejerce un efecto antitumoral. También recientemente se asoció por Caramés y colaboradores (207) un aumento del miR-31 con peores tasas de respuesta a terapia y con peor supervivencia global (SG) y se confirmó por otros trabajos que la inhibición de este puede ser otra diana. El mismo grupo de trabajo observó en la misma serie una correlación positiva entre el miR-21 y una mejor respuesta a la QTRT (206). Otros como miR-129-5p favorecen el crecimiento tumoral en CRLA y se ha caracterizado su inhibición como diana terapéutica a estudio (226). Al contrario, miR-144 se ha caracterizado como supresor de tumores y su aumento como otra posible diana, ya que suprime al oncogén ROCK1 (227) o el miR-381 que inhibe al oncogén UBE2C (228). Todos ellos tienen que continuar siendo estudiados y ser validados en nuevas series, pero los resultados son prometedores.

Therapeutic Impact	MiRNA	Target	Effect
Chemotherapy	miR-450b-5p	SOX2	Reduced cell viability and elevated DNA fragmentation levels and caspase-3 activity.
	miR-577	HSP27	Inhibited cell proliferation and colony formation.
	miR-375-3p	TYMS	Induced cell apoptosis and cell cycle arrest and inhibited cell growth, migration, and invasion.
Radiotherapy	miR-139-5p	NOTCH-1	Increased cell apoptosis and inhibited cell migration and invasion.
	miR-130a	SOX4	Suppressed cell growth and colony formation, reversed IR-induced EMT phenotype, and inhibited invasion and DNA damage repair.
	miR-145	OCT4, SOX2 and KLF4	Inhibited EM transition and stem cell phenotype.
Others	miR-122-5p	CCAR1	Sensitized HIEC cells to radiation, inhibited cell survival, and increased cell apoptosis, but increased radiation-induced rectal injury.
	miR-195	IGF1	Overexpression decreased cell viability, enhanced apoptosis, and reduced migratory and invasive capacities.
	miR-31		Increased proliferation and invasiveness.
	miR-129-5p	E2F7	Inhibited proliferation, invasion, and migration, while the apoptosis ability was enhanced. Inhibition of tumor growth.
	miR-144	ROCK1	Suppressed cell viability, migration, and proliferation.
	miR-381	UBE2C	Inhibited cell proliferation, invasion, and cell apoptosis.
	miR-19a-3p	FAS	Induced cell apoptosis through ROS accumulation. Reduced cell proliferation, migration, and invasion.

Tabla 8. MiRs relacionados con la quimio o radio resistencia en cáncer de recto localmente avanzado (CRLA) (adaptado de Imedio *et al.*, 2020 (214)).

Finalmente, se ha identificado en un estudio reciente el miR-19a-3p en relación a la resistencia a QTRT, el cual se encuentra disminuido en células resistentes y cuyo aumento induce la apoptosis a través de FAS, promoviendo la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (229).

4. miR-199b y carcinoma colorrectal

El miR-199b-5p se encuentra codificado en el cromosoma 9 dentro del gen *DNM1*, pero la transcripción no depende del promotor de dicho gen, sino que se regula de manera independiente al mismo. Se ha demostrado que bajos niveles de expresión de este miR se relacionan con una mayor capacidad de metástasis y resistencia a la quimioterapia en numerosos subtipos tumorales. Además, su alteración se asocia con peor pronóstico, por lo que se considera un supresor tumoral en LMA, cáncer de mama, de vejiga, CPNCP, tumores de cabeza y cuello (230–233). También, nuestro grupo de investigación lo corroboró en CCRm (138).

Este miR se describió ya como un inhibidor de SET en coriocarcinoma en el año 2010 y se han asociado bajos niveles de este con resistencia a fármacos quimioterápicos en cáncer de ovario y en leucemia mieloide crónica (234–236). Al ser un inhibidor de un oncogén se considera un supresor de tumores en varios subtipos incluido en el CCR donde se ha relacionado inversamente con los niveles de SET. También se ha demostrado que bajos niveles del miR-199b suponen una peor SLP y SG y que un aumento del miR-

199b aumenta la sensibilidad a la QT en CCRm al aumentar los niveles de actividad PP2A mediante el silenciamiento de la expresión de SET (138).

Además, el miR-199b-5p también funciona como supresor tumoral en meduloblastoma a través de la regulación negativa de HES1 (237); en carcinoma hepatocelular y cáncer de próstata a través de HIF1 α (238) y en cáncer de mama afectando a HER2 (239). Por tanto, todo lo anterior sugiere que este miR podría tener un impacto pronóstico en cáncer y tiene sentido continuar su estudio en CRLA, así como en estadios tempranos de CCR donde aún no se ha estudiado su potencial impacto clínico.

5. *miR-19b y carcinoma colorrectal*

El gen que codifica para el miR-19b se encuentra situado en el cromosoma 14, y su sobreexpresión se ha relacionado ampliamente con la carcinogénesis de varios tipos tumorales a través de diferentes vías de señalización. Se describió en líneas celulares HeLa y en modelos celulares de cáncer de mama un aumento del miR-19b junto con una supresión del gen p53, lo que suponía un descenso de BAX y p21 y un aumento de la capacidad de proliferación tumoral (240). También se ha relacionado con el tumor de Wilms donde se ha visto que miR-19b inhibe la vía PTEN aumentando PI3K/AKT, promoviendo un aumento de la proliferación y la capacidad de migración de la célula tumoral, así como un descenso de la apoptosis. Además, la inhibición de este miR mostraba efectos opuestos, lo cual valida en gran medida las observaciones anteriores (241). Concretamente en mieloma múltiple se ha visto un mecanismo similar en el que la inhibición de PTEN y el desequilibrio TSC1/mTOR por el miR-19b estimula la proliferación de células madre tumorales (242,243). Estos resultados adquieren importancia trasladándolos a otros tumores donde el miR-19b también participa aumentando la capacidad de metástasis y altera la TEM como en el hepatoblastoma, el colangiocarcinoma o en el cáncer renal de células claras (244–246).

Uno de los tumores donde el papel del miR-19b está más descrito es el CPNCP. El miR-19b está sobreexpresado en estos tumores y actúa inhibiendo la expresión de la subunidad reguladora de PP2A, PPP2R5E, favoreciendo la proliferación tumoral. También funciona inhibiendo BCL2L11, que codifica para BIM, una proteína proapoptótica. Ambos

son supresores de tumores y su inhibición desencadena un aumento de la actividad de la vía EGFR, siendo una acción tumoral regulada por este miR-19b. Esto llevó a estudiar una inhibición conjunta de un inhibidor tirosina quinasa (TKI) como gefitinib y un anti miR-19b, evidenciándose *in vitro* una disminución del crecimiento y de la migración celular (247). También se han descrito otros mecanismos de acción del miR-19b como inhibidor de TGF-beta, una proteína reguladora que participa en la inhibición del crecimiento celular. En este sentido, destaca la participación del oncogén c-MYC, que aumenta la expresión de miR-19b, como vía de regulación de TGF-beta (248).

En el CCR también se ha estudiado el miR-19b. En 2012 Kurokawa y colaboradores (249) describieron en líneas celulares una elevación conjunta del miR-19b y miR-21, y su relación directamente proporcional con la resistencia celular a tratamientos con 5-FU. Previamente, el grupo de Cristóbal y colaboradores (206) había descrito que la elevación de miR-21 predecía una resistencia a 5-FU y peor SLP y SG en CRLA, pero el papel del miR-19b continúa sin estudiarse en este grupo de pacientes. En CCRm también se ha relacionado una elevación del miR-19b con resistencia a tratamiento con oxaliplatino, mediada por SMAD4, y se demostró que esta alteración predecía una peor SLP y SG (250). De hecho, en CCRm se ha descrito que un aumento del cluster miR-17-92, que incluye al miR-19b, vía c-MYC inhiben la proteína proapoptótica BIM. El aumento del miR-19b inhibe, por tanto, la apoptosis. De este modo, una inhibición de c-MYC combinada con la inhibición del miR-19b podría suponer una futura diana con potencial impacto terapéutico en CCR (251).

OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo de investigación han sido los siguientes:

- 1- **Evaluar el papel funcional de la desregulación de SET en la progresión del CCR localizado y el impacto clínico de esta alteración en pacientes con dicha enfermedad.** Estudiar en líneas celulares de CCR cuál es el efecto in vitro de la modulación ectópica de los niveles de expresión de SET en migración celular, adquisición de un fenotipo de agresividad y transición epitelio mesénquima, todos ellos requeridos en el proceso de progresión tumoral hacia estadios avanzados de la enfermedad. Analizar la expresión de SET y la asociación que presenta con variables clínicas y moleculares, así como su impacto en la supervivencia y progresión de los pacientes. Por último, valorar la importancia del miR-199b como regulador post-transcripcional de SET en la cohorte en estudio.

- 2- **Explorar el impacto clínico del miR-199b en pacientes con estadios tempranos de CCR y analizar la dependencia del mismo respecto al poder predictivo de la sobreexpresión de SET.** Cuantificar en una serie de pacientes con CCR no metastásico al diagnóstico los niveles de expresión del miR-199b y su correlación con variables clínicas y moleculares. Determinar su valor como marcador pronóstico en nuestra cohorte de pacientes. Examinar su correlación con la expresión de SET en esta serie y su valor pronóstico independiente.

- 3- **Estudiar la relevancia clínica y funcional del miR-199b en CRLA, como regulador clave de la respuesta a 5-FU y marcador predictivo de respuesta al tratamiento con quimioterapia neoadyuvante y variables clínicas de progresión y supervivencia.** Examinar en una cohorte de pacientes con CRLA el potencial clínico terapéutico del miR-199b y analizar in vitro el papel de la expresión ectópica de este miR y su relación con SET.

- 4- **Analizar el potencial impacto clínico del miR-19b en una serie de pacientes con CRLA en base a su papel como regulador de PPP2R5E.** Describir la prevalencia de la alteración del miR-19b en pacientes con CRLA, su asociación con parámetros clínicos y

moleculares, su potencial predictor de respuesta al tratamiento QTRT, así como de la supervivencia de los pacientes, y su correlación con la expresión de PPP2R5E, subunidad reguladora de PP2A descrita como alterada en pacientes con CCR.

RESULTADOS:
Publicaciones Científicas

Artículo 1: Deregulation of SET is associated with tumor progression and predicts adverse outcome in patients with early-stage colorectal cancer

Aunque la desregulación de SET se ha descrito como una nueva diana molecular en CCR metastásico, su importancia e impacto clínico en estadios tempranos de CCR no está descrita.

En este artículo se analiza el papel de SET en procesos celulares necesarios para la progresión tumoral como son la migración celular y la adquisición de un fenotipo agresivo, así como la regulación de la transición epitelio-mesénquima. Tras la modulación ectópica de la expresión de SET, la migración se estudia a través de experimentos de cierre de herida y transwell, mientras que la capacidad de crecimiento celular con independencia de anclaje se evalúa mediante ensayos de formación de colonias en agar blando y la transición epitelio-mesénquima mediante western-blot de marcadores de la misma. El impacto clínico de SET se estudió mediante la valoración de su expresión por inmunohistoquímica en una cohorte de 231 pacientes con CCR localizado al diagnóstico.

En este trabajo destacamos, curiosamente, que la expresión de SET intensifica la migración celular, afecta en gran medida a la capacidad de formación de colonias, promueve TEM e induce la expresión del proto-oncogén c-MYC.

Por otro lado, se detectó un aumento de la expresión de SET en el 15,4% de los pacientes en nuestra serie y se asoció con un peor estado general (ECOG) con significación estadística ($p=0.021$) y con progresión en pacientes en estadio II ($p=0.008$). Igualmente, la sobreexpresión de SET predice una menor supervivencia global ($p<0.001$) y un menor tiempo a la metástasis de la enfermedad localmente avanzada ($p<0.001$), y su valor pronóstico fue más evidente en los pacientes mayores de 70 años.

Como se había reportado previamente la relación directa entre miR-199b y SET, la expresión del miR fue cuantificada mediante PCR a tiempo real en una serie pequeña de casos de nuestra cohorte con carácter generador de hipótesis. En esta serie se identificó la baja expresión del miR-199b como un mecanismo molecular que contribuye a la desregulación de SET en pacientes con CCR localizado.

En resumen, nuestros datos sugieren que la sobreexpresión de SET es frecuente en estadios tempranos de CCR, jugando un papel oncogénico asociado con progresión y agresividad, y favoreciendo un mal pronóstico. Por ello, SET emerge como un factor pronóstico válido y como una posible diana terapéutica con un gran impacto clínico en CCR localizado.



Aportación del doctorando:

Mi contribución como doctorando se basó en la elaboración de la base de datos clínica de todos los pacientes, colaborar en la extracción y análisis del ARN y proteínas de los experimentos clínicos de PCR en tiempo real y en los western blot, así como en los ensayos de migración celular por cierre de herida. Participación fundamental en la interpretación de los resultados y en la generación de hipótesis para los siguientes trabajos.



Article

Deregulation of SET is Associated with Tumor Progression and Predicts Adverse Outcome in Patients with Early-Stage Colorectal Cancer

Ion Cristóbal ^{1,2,*}, Blanca Torrejón ^{1,2,†}, Jaime Rubio ^{1,3}, Andrea Santos ², Manuel Pedregal ^{1,3}, Cristina Caramés ^{1,3} , Sandra Zazo ⁴, Melani Luque ⁴, Marta Sanz-Alvarez ⁴, Juan Madoz-Gúrpide ⁴, Federico Rojo ^{4,*}  and Jesús García-Foncillas ^{2,3,*}

¹ Cancer Unit for Research on Novel Therapeutic Targets, Oncohealth Institute, IIS-Fundación Jiménez Díaz-UAM, E-28040 Madrid, Spain; blanca.torrejón@quironsalud.es (B.T.); jaime.rubiop@quironsalud.es (J.R.); manuel.pedregal@quironsalud.es (M.P.); ccarames@fjd.es (C.C.)

² Translational Oncology Division, Oncohealth Institute, IIS-Fundación Jiménez Díaz-UAM, E-28040 Madrid, Spain; andreasantos.asc@gmail.com

³ Medical Oncology Department, University Hospital “Fundación Jiménez Díaz”, UAM, E-28040 Madrid, Spain

⁴ Pathology Department, IIS-Fundación Jiménez Díaz-UAM, E-28040 Madrid, Spain; szazo@fjd.es (S.Z.); melani.luque@quironsalud.es (M.L.); marta.sanza@quironsalud.es (M.S.-A.); jmadoz@fjd.es (J.M.-G.)

* Correspondence: ion.cristobal@fjd.es (I.C.); frojo@fjd.es (F.R.); jesus.garciafoncillas@oncohealth.eu (J.G.-F.); Tel.: +34-915504800 (ext. 2820) (I.C.); +34-915504800 (ext. 2448) (F.R.); +34-915504800 (ext. 2824) (J.G.-F.)

† These authors have contributed equally to this work.

Received: 12 February 2019; Accepted: 8 March 2019; Published: 12 March 2019



Abstract: SET nuclear proto-oncogene (SET) deregulation is a novel molecular target in metastatic colorectal cancer (CRC). However, its role in CRC progression and its potential clinical impact in early-stage CRC patients remain unknown. Here, we studied the biological effects of SET on migration using wound-healing and transwell assays, and anchorage-independent cell growth using soft agar colony formation assays after ectopic SET modulation. SET was analyzed by immuno-staining in 231 early-stage CRC patients, and miR-199b expression was quantified by real-time PCR in a set of CRC patients. Interestingly, SET enhances cell migration, markedly affects the colony-forming ability, promotes epithelial to mesenchymal transition, and induces the expression of the MYC proto-oncogene (c-MYC) in CRC cells. SET overexpression was detected in 15.4% of cases and was associated with worse Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) status ($p = 0.021$) and relapse in stage-II CRC patients ($p = 0.008$). Moreover, SET overexpression predicted shorter overall survival ($p < 0.001$) and time to metastasis ($p < 0.001$), and its prognostic value was particularly evident in elderly patients. MiR-199b downregulation was identified as a molecular mechanism to deregulate SET in patients with localized disease. In conclusion, SET overexpression is a common alteration in early-stage CRC, playing an oncogenic role associated with progression and aggressiveness, and portends a poor outcome. Thus, SET emerges as a novel potential molecular target with clinical impact in early-stage in CRC.

Keywords: SET; protein phosphatase 2A (PP2A); early-stage colorectal cancer (CRC)

1. Introduction

Colorectal cancer (CRC) has the highest incidence rate of all gastrointestinal cancers and is the third most commonly diagnosed of all cancer types and the fourth highest cause of cancer-related deaths worldwide [1]. Disease stage at diagnosis remains the single most critical factor determining

the patient outcome [2]. Though patients with metastatic disease have the worst prognosis, more than 70% of newly diagnosed cases have surgically resectable, localized disease [3–5]. Therefore, further improvements in our knowledge of the molecular mechanisms that govern CRC progression are necessary to prevent metastasis. In particular, identification of novel biomarkers and the development of alternative therapeutic strategies are required to impair disease progression.

The protein phosphatase 2A (PP2A) is a tumor suppressor that is frequently inactivated in human cancer due to its pivotal role in controlling the activation of critical signaling pathways for the tumor cell [6,7]. Several published works have reported that functional inactivation of PP2A is common and has great importance in CRC [8–11], and that overexpression of the endogenous PP2A inhibitor SET [12] is a key molecular mechanism to inhibit PP2A in this disease [13]. SET regulates a wide variety of molecular processes in the cell such as histone acetylation and transcription, migration, stemness, and cell-cycle regulation [14–18]. In addition, the oncoprotein SET modulates the activation status of the transcription factor activator protein-1 (AP-1) deregulates protein kinase B (AKT) signaling, inhibits the DNase activity of NM23-H1, and negatively regulates p53 activity [19–22].

Furthermore, SET has been found to be de-regulated in some solid tumors and leukemias [23–29], and it has been proposed as a novel target for anticancer therapy [30–35]. Of importance, some data in the literature indicate that SET could also be playing a relevant role in CRC through the regulation of the Wnt-type MMTV integration site family (WNT) signaling pathway [36]. Our group reported that SET deregulation determines poor outcome in metastatic CRC patients by promoting cell growth and decreasing sensitivity to standard chemotherapeutic agents such as oxaliplatin and 5-fluorouracil [12]. Regarding the molecular mechanisms responsible for SET deregulation, the transcription factor ecotropic virus integration site-1 (EVI-1) has been reported to promote SET expression in acute myeloid leukemia, and miR-199b has been found to be negatively regulate SET in choriocarcinoma [24,37]. Interestingly, SET was identified as a direct target of miR-199b, and the downregulation of this microRNA was described as the molecular mechanism responsible for SET overexpression in around half of metastatic CRC patients with high SET levels [38].

In this study, we further explore the role of SET in CRC progression and evaluate, for the first time, its potential clinical impact in CRC patients with localized disease. We observed that SET promotes cell migration, colony-forming ability, and epithelial to mesenchymal transition (EMT) in CRC cells. To determine its clinical relevance, we quantified SET in a series of 231 CRC patients without metastatic disease at diagnosis, observing that SET overexpression is a common alteration that is associated with relapse and predicts shorter overall survival and time to metastasis. Moreover, we identified miR-199b downregulation as a contributing molecular mechanism to deregulate SET in early-stage CRC patients.

2. Experimental Section

2.1. Cell Cultures and Transfection

The human CRC cell lines SW480 (ATCC CCL-228) and HT-29 (ATCC HTB-38) were purchased from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Authentication was done by the authors in all cases (LGC Standards, Wesel, Germany). Cell lines were maintained in RPMI-1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) with 10% fetal bovine serum (FBS) and were grown at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. Media were supplemented with penicillin G (100 U/mL), and streptomycin (0.1 mg/mL). For transfection experiments, CRC cells were seeded in 6-well plates and transfected with 10 µL of Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and 2 µg of plasmidic vectors or 75 nM of SET-specific siRNAs designed and synthesized by Dharmacon RNA Technologies (Dharmacon, Lafayette, CO, USA).

2.2. Patient Samples

Primary colorectal tissues were surgical resection specimens from CRC tumors obtained from Fundacion Jimenez Diaz Biobank (BFJD, Madrid, Spain). The study comprised consecutive

formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tumor samples from 247 CRC patients without metastatic CRC, retrospectively selected from 2001 to 2012 according to the following criteria: Adenocarcinoma, operable disease, no neo-adjuvant therapy, sufficient available tissue, available clinical follow-up data, and metastatic disease. Tumor, Node, Metastases (TNM) staging was performed using the 7th American Joint Committee on Cancer (AJCC) staging system for CRC. Clinical data were collected from medical records by oncologists (MP, CC, and JR). KRAS proto-oncogene, GTPase (KRAS) mutational status was determined by Cobas KRAS Mutation Test kit (Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, CA, USA) following the manufacturer's procedures. Tissue microarrays (TMA) were constructed. Representative areas of each tumor were carefully selected and three tissue cores (1 mm diameter) were obtained using a TMA workstation (T1000 Chemicon). Samples were taken anonymously. The ethical committee and institutional review board approved the project.

2.3. Wound-Healing Assay

A total of 8×10^5 cells per well were seeded in 6-well plates and allowed to adhere for 24 h in complete medium. The monolayer was artificially injured by scratching across the plate with a 10 μ L pipette tip. Wells were then washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) to remove detached cells and wound healing was monitored using a Leica DMI1 (Leica, Wetzlar, Germany) microscope and the image acquisition software Leica Application Suite version 4.5. Images were captured at the beginning and at regular intervals during cell migration to close the wound. Comparisons were performed to quantify the migration rate of the cells between the different experimental conditions. Relative cell migration are represented in the histograms considering the percentage of healed area after ectopic SET silencing or overexpression and compared to control conditions.

2.4. Transwell Migration Assay

Migration assays were performed using 24-well plates with transwell permeable supports of 6.5 mm insert and a polycarbonate membrane with an 8- μ m pore size (Costar 3422, Corning Inc., Corning, NY, USA). Cells were seeded in the upper chamber at 2×10^4 cells/mL in 0.1 mL of serum-free RPMI-1640 media. A volume of 0.8 mL of media supplemented with 10% FBS was placed in the bottom well as a chemo-attractant. After incubation for 24 h at 37 °C in an atmosphere containing 5% CO₂, migrated cells on the lower surface were stained using crystal violet and counted under a light microscope.

2.5. Colony-Forming Assay

Experiments were performed in 6-well plates coated with 3 mL of 0.6% soft agarose (Sigma, St. Louis, MO, USA) in medium. A total of 5×10^3 cells were suspended in 0.3% agarose in medium and plated in triplicates over the pre-coated wells. Fresh medium was supplied twice a week. After 10 days, colonies were stained with MTT (M-565, Sigma, St. Louis, MO, USA) for 4 h at 37 °C. Then, colonies were fixed by adding dimethyl sulfoxide (DMSO) overnight at 37 °C. Colony numbers were determined from triplicates and three independent experiments were carried out for each condition and cell line.

2.6. Western Blot Analysis

Protein extracts were isolated using TRIzol Reagent (Invitrogen) following manufacturer's indications, clarified (12,000 \times g, 15 min, 4 °C), denatured and subjected to SDS-PAGE and Western-blot. Antibodies used were rabbit polyclonal anti-SET (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), rabbit polyclonal anti-E-cadherin (24E10), anti-N-cadherin (D4R1H) and anti-Vimentin (D21H3) (Cell Signaling Technology, Leide, The Netherlands), rabbit polyclonal anti-c-myc (Ab32072) (Abcam, Cambridge, UK), and mouse monoclonal anti- β -actin (Sigma, St. Louis, MO, USA). Proteins were detected with the appropriate secondary antibodies conjugated to alkaline phosphatase (Sigma, St. Louis, MO, USA) by chemiluminescence using Tropix CSPD and Tropix Nitro Block II (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

2.7. Immunohistochemistry

Tissue sections (3 μm) were mounted on positively charged glass slides. After de-paraffinization in xylene and graded alcohols, heat antigen retrieval was performed in EDTA-based buffer, pH9 (Dako). Endogenous peroxidase was blocked by 0.03% hydrogen peroxide for 5 min. Slides were incubated with the same primary antibody used against SET as described above, for 60 min at room temperature, followed by appropriate anti-Ig horseradish peroxidase-conjugated polymer (Flex+, Dako). Sections were visualized with 3,3'-diaminobenzidine as a chromogen. All staining's were performed in a Dako Autostainer. Sections incubated with normal non-immunized rabbit immunoglobulins were used as negative controls. As a positive control, a section of colorectal tumor with known expression of SET was used. SET antibody sensitivity (1:5000) had been calculated in a range of crescent dilutions of the primary antibody. Specificity was confirmed in a set of paired fresh frozen and FFPE samples were processed by Western blot and immunohistochemistry (IHC). Only the membrane of epithelial cells, but not stromal cells, was evaluated for SET expression by two pathologists blinded to clinical data (FR and SZ). A semi-quantitative histoscore was calculated by estimating the percentage of tumor cells positively stained with low, medium, or high staining intensity. The final score was determined after applying a weighting factor to each estimate. The following formula was used: $\text{Histoscore} = (\text{low } \%) \times 1 + (\text{medium } \%) \times 2 + (\text{high } \%) \times 3$ and the results ranged from 0 to 300.

2.8. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using SPSS 20 for windows (SPSS Inc, Chicago, IL USA). Overall survival (OS) was defined as the time from the date of surgery to the date of death from any cause or last follow-up. Time to metastasis (TTM) was defined as the time from surgery until distant recurrence in those cases with metachronous metastases. Kaplan-Meier plots and survival comparisons were performed by means of log-rank test if the proportional hazard assumption was fulfilled and Breslow otherwise. The Cox proportional hazards model was adjusted taking into consideration significant parameters in the univariate analysis. The cutoff point for SET expression was determined as previously described for metastatic CRC [12]. This work was carried out in accordance with Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies (REMARK) guidelines [39]. Data represented for transfection experiments are mean of three independent experiments \pm s.d. Statistical comparisons were carried out by 2-sided *t*-test analyses. A *p*-value less than 0.05 was considered statistically significant.

2.9. Quantification of miRNA Expression Levels

Total RNA was isolated using RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation kit (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) according to manufacturer's instructions. Samples were reverse transcribed using the TaqManHMicrorna Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and mature miRNAs were quantified by quantitative real-time RT-PCR using TaqMan MicroRNA Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), specific for miR-199b and U6B as an internal control. Analysis of relative gene expression data was performed using the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method [40], where $\Delta\Delta C_T = (C_{T,\text{Target Gene}} - C_{T,U6B})_{\text{Cell Line}} - (C_{T,\text{Target Gene}} - C_{T,U6B})_{\text{Normal Control}}$.

3. Results

3.1. SET Plays a Relevant Role in Regulating Cell Migration of CRC cells

To investigate the biological significance of SET in CRC progression, we first assessed the effects of an ectopic SET modulation on cell migration. Interestingly, we observed significantly decreased migration in SW480 cells after SET silencing in comparison with those cells transfected with a negative control siRNA (Figure 1A). Similar results were obtained with the HT-29 cell line (Figure S1A). In concordance with these results, SET overexpression in both SW480 and HT-29 cells enhanced cell migration compared

to cells transfected with an empty vector (Figure 1B and Figure S1B). In order to exclude a possible functional effect on off-targets, we performed a rescue experiment with a SET expression vector, as well as a time-course analysis in both SW480 (Figure S2) and HT-29 cells (Figure S3), observing that ectopic SET expression restored migration capability in both cell lines after SET silencing.

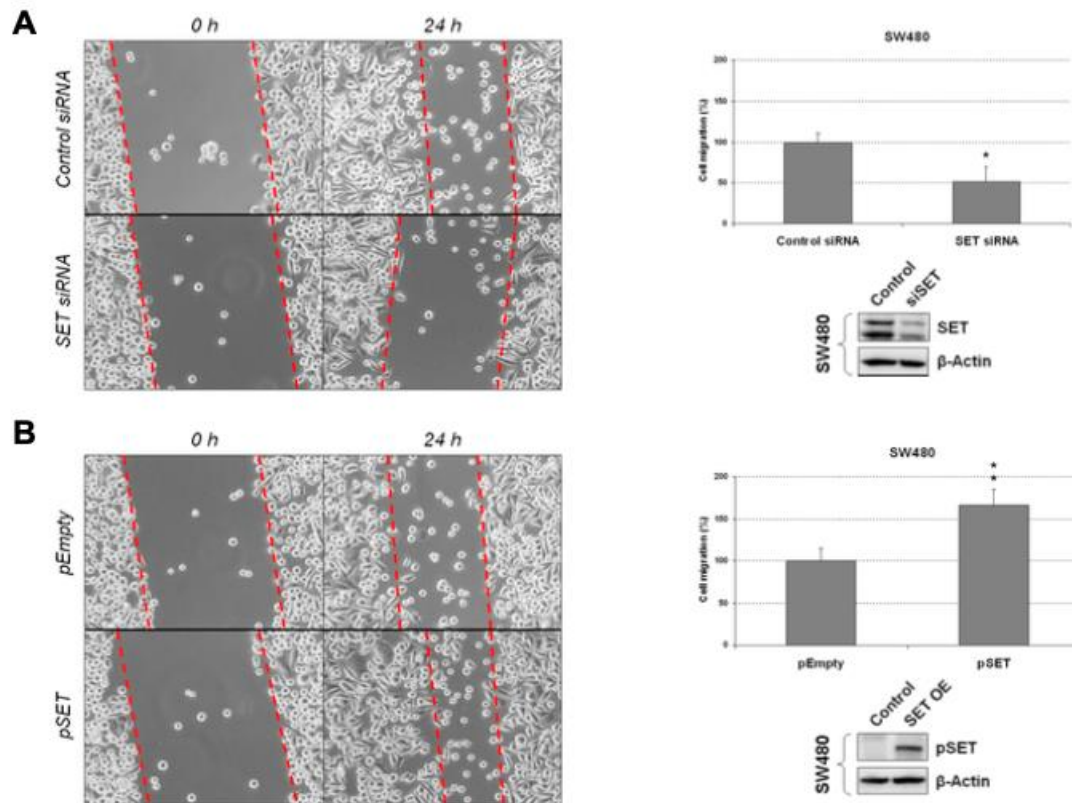


Figure 1. SET modulates cell migration in colorectal cancer (CRC) cells. Wound-healing assay showing migration in SW480 cells after ectopic (A) SET silencing or (B) SET overexpression. Dashed lines represent the migration border; OE: Overexpression; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

To further confirm the role of SET in modulating cell migration in CRC cells, we carried out a transwell migration assay using SW480 and HT29 cells. Interestingly, SET silencing dramatically decreased transwell migration in both cell lines compared to negative control cells (Figure 2), thereby evidencing that SET deregulation plays a relevant role in regulating the migration of CRC cells. In order to exclude a possible functional effect on off-targets we performed a rescue experiment of transwell with a SET expression vector. As expected, we observed that ectopic expression of SET restored cell migration to levels similar to control conditions in both SW480 and HT-29 cells (Figure S4).

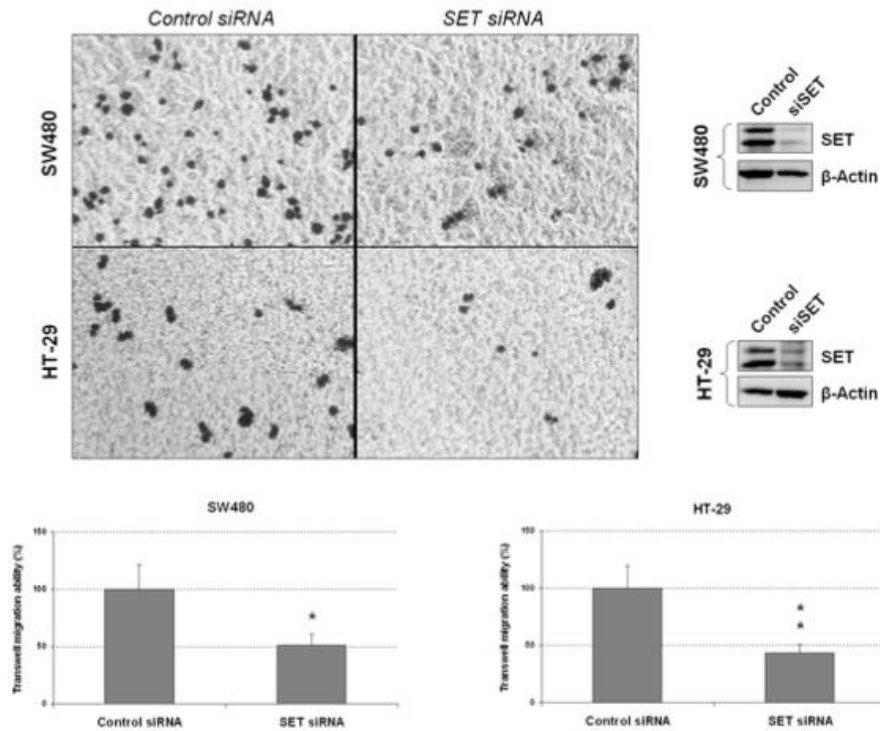


Figure 2. SET silencing inhibits transwell migration in CRC cells. Transwell migration assay in SW480 and HT-29 cells after SET silencing; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

3.2. Deregulation of SET Markedly Affects Colony-Forming Ability and Regulates EMT of CRC Cells

In order to further explore the potential significance of SET in CRC progression and aggressiveness, we next performed colony-formation assays in soft agar to analyze whether SET deregulation can alter the malignancy of CRC cells measured as anchorage-independent cell growth. We observed that colony formation was markedly impaired in HT-29 cells after SET silencing; conversely, colony-forming ability was found to be significantly enhanced in HT-29 cells ectopically expressing SET compared to normal controls (Figure 3). While these experiments were also performed in SW480 cells, this cell line failed to form colonies in any of the conditions tested.

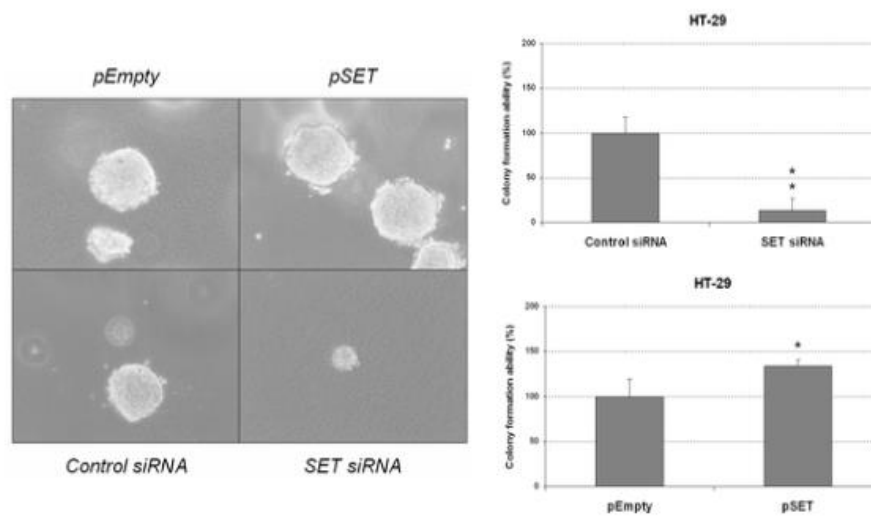


Figure 3. SET deregulation affects CRC colony-forming ability. Colony-forming assays showing the effect of SET silencing and SET overexpression on the anchorage-independent cell growth of HT-29 cells; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Furthermore, we analyzed the potential role of SET regulating EMT and proteins involved in CRC progression and metastasis such as c-MYC. Interestingly, we found that SET silencing resulted in higher E-cadherin levels concomitant with a decrease in the expression of proteins of a mesenchymal phenotype such as N-cadherin and vimentin in SW480 and HT-29 cells. In concordance with these results, ectopic SET expression decreased E-cadherin levels and increased N-cadherin and vimentin expression (Figure S5). Moreover, we also analyzed the expression levels of c-MYC, an oncoprotein largely involved in progression to metastatic disease since it positively regulates EMT during carcinogenesis [41]. Interestingly, we observed that SET positively regulates c-MYC expression in both SW480 and HT-29 cell lines (Figure S5). Altogether, these results appear to indicate that SET is involved in CRC aggressiveness by promoting colony-forming ability and EMT of CRC cells.

3.3. Prevalence of SET Overexpression in Early-Stage CRC and Its Association with Molecular and Clinical Parameters

To study the prevalence and clinical significance of SET overexpression, we quantified the expression of SET by immunohistochemistry in a cohort of 247 CRC patients without metastatic disease at diagnosis. Patient characteristics are presented in Table S1, and immuno-histochemical detection of SET is shown in Figure S6A. Interestingly, SET overexpression was found in 34 of 231 cases (15.4%). We found this alteration to be associated with worse ECOG performance status (33.3% vs. 13.2%, $p = 0.021$). As ECOG status is influenced by tumor stage and age, we also analyzed the association of ECOG status with these parameters, observing a correlation between high ECOG and stage III ($p = 0.014$). Moreover, these patients are mainly older, but in this case, statistical significance was not achieved ($p = 0.060$), probably due to the low number of cases with high ECOG (Table S2). While the prevalence of SET overexpression was higher in patients with stage III than in those cases with stage I-II disease, the differences did not reach statistical significance in this case (17.7% vs. 11%, $p = 0.156$). The association between SET overexpression and molecular and clinical parameters are included in Table 1.

Table 1. Association between SET and clinical and molecular parameters in 247 CRC patients without metastatic disease at diagnosis.

	No. Cases	No. SET Low (%)	No. SET High (%)	<i>p</i>
SET	247	209 (84.6)	38 (15.4)	
Sex	247	209	38	0.674
Male	155	130 (83.9)	25 (16.1)	
Female	92	79 (85.9)	13 (14.1)	
Age	236	199	37	0.349
<70	86	70 (81.4)	16 (18.6)	
>70	150	129 (86)	21 (14)	
ECOG	223	190	33	0.021
0–1	205	178 (86.8)	27 (13.2)	
2–3	18	12 (66.7)	6 (33.3)	
T	247	209	38	0.824
1	7	6 (85.7)	1 (14.3)	
2	48	43 (89.6)	5 (10.4)	
3	155	128 (82.6)	27 (17.4)	
4	29	25 (86.2)	4 (13.8)	
x	8	7 (87.5)	1 (12.5)	

Table 1. Cont.

	No. Cases	No. SET Low (%)	No. SET High (%)	<i>p</i>
N	247	209	38	0.421
0	117	102 (87.2)	15 (12.8)	
1	67	56 (83.6)	11 (16.4)	
2	44	34 (77.3)	10 (22.7)	
x	19	17 (89.5)	2 (10.5)	
Stage	247	208	38	0.302
I-II	117	102 (87.2)	15 (12.8)	
III	130	107 (82.3)	23 (17.7)	
Site of primary tumor	241	203	38	0.699
Colon	165	140 (84.8)	25 (15.2)	
Rectum	76	63 (82.9)	13 (17.1)	
Progression (local or distant)	247	209	38	0.144
No	156	136 (87.2)	20 (12.8)	
Yes	91	73 (80.2)	18 (19.8)	

We also analyzed the potential association of SET overexpression with relapse (local or distant), though our findings were not statistically significant. We next stratified our cohort by stage; to our surprise, we found that SET overexpression strongly associates with relapse in those CRC patients with stage II at diagnosis ($p = 0.008$), whereas significance was far from being achieved in the subgroup of CRC patients with stage III disease ($p = 0.882$) (Table 2).

Table 2. Association between SET and progression (local or distant) in 207 stages II-III CRC patients.

Stage II	No. Cases	No. SET Low (%)	No. SET High (%)	<i>p</i>
Progression	77	66	11	0.008
No	59	54 (81.8)	5 (45.5)	
Yes	18	12 (18.2)	6 (54.5)	
Stage III	No. Cases	No. SET low (%)	No. SET high (%)	<i>p</i>
Progression	130	107	23	0.882
No	64	53 (49.5)	11 (47.8)	
Yes	66	54 (50.5)	12 (52.2)	

3.4. Clinical Significance of SET Overexpression in Early-Stage Colorectal Cancer

For survival analyses, we included 149 cases with stages II and III for whom clinical follow-up data were available, 89 were male and 60 female, with a median of age and OS of 72 years (range: 36–93) and 66.4 months, respectively. Patients with stage I CRC were excluded due to the limited number of cases with clinical data available. Interestingly, we found that the subgroup of patients in whom SET was overexpressed showed a substantially shorter OS (57 vs. 113.2 months, $p < 0.001$) (Figure 4A). We observed that in the subgroup of cases that developed metachronous metastases ($n = 87$), SET overexpression predicted a significantly shorter time to metastasis ($p < 0.001$) (Figure 4B). As in previous reported data showing that SET overexpression predicts poor outcome in metastatic CRC, this alteration was also predictive of shorter time to progression from metastatic diagnosis ($p = 0.001$) (Figure S6B). Moreover, multivariate analysis demonstrated that SET overexpression is an independent predictor of poor outcome in our cohort (Table 3).

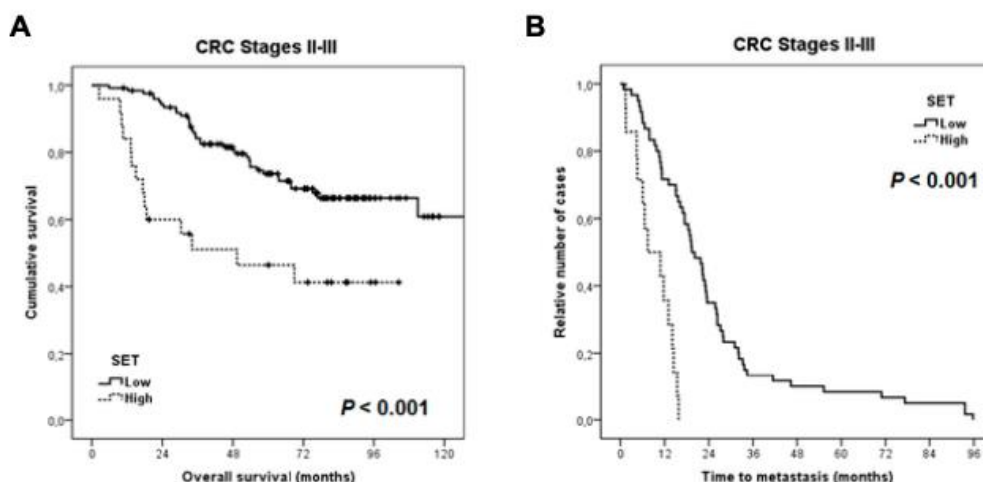


Figure 4. Kaplan-Meier analyses for SET expression in early-stage CRC patients: (A) Overall survival; and (B) time to metastasis ($n = 87$).

Table 3. Univariate and multivariate Cox analyses in the cohort of 149 patients with early-stage CRC.

	Univariate OS Analysis			Multivariate OS Cox Analysis				
	HR	95% CI		<i>p</i>	HR	95% CI		<i>p</i>
		Lower	Upper			Lower	Upper	
Age				0.319				-
<70	1.000							
>70	1.352	0.747 to 2.445			-	-		0.235
Stage				0.003				
II	1.000				1.000			
III	3.421	1.540 to 7.601			1.956	0.646 to 5.926		
ECOG				<0.001				<0.001
0–1	1.000				1.000			
2–3	2.797	1.975 to 3.961			2.653	1.845 to 3.814		
T				0.002				0.057
1–2	1.000				1.000			
>2	1.785	1.226 to 2.599			1.488	0.989 to 2.240		
N				0.001				0.275
0–1	1.000				1.000			
2–x	1.599	1.223 to 2.091			1.263	0.830 to 1.921		
SET				0.001				0.010
No	1.000				1.000			
Yes	2.873	1.547 to 5.335			2.387	1.229 to 4.634		

OS: overall survival; CI: confidence interval, and HR: hazard-ratio. Bold: $p < 0.01$.

We next analyzed the clinical impact of SET overexpression after stratifying our cohort by age. Interestingly, we observed that the prognostic impact of SET was significant in the subgroup of elderly patients (45.4 vs. 103.9 months, $p < 0.001$), whereas significance was not achieved in the subgroup of younger patients (45.4 vs. 103.9 months, $p < 0.001$) (Figure S6C). Of note, multivariate analysis demonstrated that SET overexpression was an unfavorable independent factor associated with OS in the subgroup of elderly patients (Table S3).

3.5. MiR-199b Downregulation is a Contributing Alteration to Deregulate SET in Localized Colorectal Cancer

Previous data reporting that miR-199b directly targets SET in CRC and that miR-199b downregulation is a frequent event that facilitates SET overexpression in metastatic CRC prompted us to analyze the potential contribution of this alteration to deregulate SET also in early-stage CRC.

Thus, we analyzed the expression levels of miR-199b in 29 patients from our cohort with sufficient available material. Patient characteristics are presented in Table S4. We observed SET overexpression in seven cases and miR-199b downregulation in four out of 29 cases. Interestingly, we found that miR-199b downregulation was significantly associated with SET overexpression ($p = 0.010$) (Table S5). To further investigate the potential role of miR-199b in regulating SET, we next compared the miR-199b expression profiles between the subgroups of SET-overexpressing and non-overexpressing patients. In a noteworthy finding, we observed that miR-199b was significantly downregulated in the subgroup of cases with high SET expression ($p = 0.004$) (Figure S7). Therefore, miR-199b downregulation is a molecular mechanism that contributes to SET deregulation in CRC patients without metastatic disease at diagnosis.

4. Discussion

The upregulation of the SET oncogene has been described in several tumor models, and over time it has emerged as a promising molecular target for alternative therapeutic strategies in these cancers [23–35]. Our previous findings showed that PP2A inhibition is a frequent event in CRC, and we identified SET deregulation as a key mechanism to inhibit PP2A [8]. Moreover, we observed that SET promotes cell proliferation and colonosphere formation, impairing PP2A antitumor activities and modulating the sensitivity of CRC cells to oxaliplatin treatment. Clinically, we showed that SET overexpression is a recurrent alteration that predicts adverse outcome and induces decreased sensitivity to oxaliplatin in metastatic CRC. However, its potential significance in CRC progression and in early-disease stages remains to be investigated. Altogether, existing data led us to hypothesize that SET could also play an important oncogenic role in CRC progression, regulating both migration and colony-forming capabilities, as well as having clinical impact in the early stages of the disease.

In order to study the functional relevance of SET deregulation in CRC progression, we ectopically modulated SET in two different CRC cell lines and observed that SET silencing induced a decrease in cell migration and anchorage-independent cell growth in both cell lines. In contrast, SET-overexpressing CRC cells showed increased migration, colony-forming abilities, and EMT and c-MYC levels (Figures 1–3 and Figures S1–S5). These results indicate that SET deregulation plays a potential oncogenic role in CRC progression.

To further investigate the significance of SET deregulation in CRC, we evaluated its expression in earlier stages of CRC, studying a cohort of 231 CRC patients without metastatic disease. Interestingly, SET overexpression had a lower prevalence in this cohort (15.4%) (Table 1) compared to that previously reported for metastatic CRC (24.8%) [12]. In agreement with previous data on metastatic CRC, SET overexpression was found to be associated with worse ECOG performance. However, this alteration was significantly associated with those metastatic CRC cases with colon tumors (31.8% vs. 11.8%), whereas, in the present study, we observed even higher frequency in the subgroup of patients with rectal tumors (15.2% vs. 17.1%). Therefore, the prevalence of this alteration does not undergo significant changes in rectal cancer, but seems to progressively enhance its prevalence during the disease progression in patients with colon tumors. The potential significance of this observation should be explored in future investigations. Moreover, the prevalence of SET overexpression in the subgroup of patients with metachronous metastases was 16.1%, which is markedly lower than the prevalence of 28.1% previously reported in CRC patients with synchronous metastases at diagnosis [12].

The fact that SET overexpression only associates with relapse in those cases with stage-II disease could be due to the fact that stage III encompasses patients with more advanced disease, where the presence of this alteration could be a less relevant event in the effort to determine relapse than in those cases with stage-II CRC. However, the number of cases with stage II and progression included in our study is still very low and represents a relevant limitation. Therefore, further validation of our observations in forthcoming studies is required to confirm the clinical impact of SET predicting relapse in CRC stage II. In addition, overexpression of SET was significantly associated with shorter time to metastasis and with time to progression from metastatic diagnosis in the subgroup of patients who

develop distant relapse (Figure 4), further suggesting that this alteration indicates more aggressive disease. Our results also show that SET overexpression predicts shorter overall survival and that the clinical impact on prognosis is especially significant in the subgroup of patients older than 70 years of age. Despite the fact that CRC is a disease of the elderly, with a median age of over 70 years, gradual improvements in therapy have mainly impacted the subgroup of younger patients, likely due to both patient and disease-specific factors. It would therefore be very relevant to identify novel alterations that can aid in predicting prognosis in this subgroup of CRC patients and can be used to develop novel targeted therapies. Our results suggest that SET overexpression predicts poor outcome in elderly CRC patients and that this overexpression could also be predictive of a clinical benefit derived from the use of SET targeting therapies such as the PP2A activator FTY720 or specific SET antagonists [30–34].

As with previous observations in metastatic CRC, which evidenced how miR-199b was downregulated in around 50% of SET-overexpressing cases, here we observed that miR-199b downregulation was significantly associated with SET overexpression and that 4 out of 7 CRC patients with SET overexpression showed reduced miR-199b levels (Table S4). Moreover, total miR-199b expression levels were inversely correlated with SET in our cohort (Figure S6), a finding which further strengthens the case for the role played by miR-199b in regulating SET in early-stage CRC patients. These results may also indicate that other molecular alterations contribute to the deregulation of SET in those cases with SET OE and normal miR-199b expression, though this issue will be investigated in forthcoming papers.

Interestingly, our findings demonstrate a key role of SET in cancer progression mediating cell migration, colony-formation and EMT but these observations for SET in CRC have to be also evaluated in other tumor models with SET deregulation. Moreover, these findings are in concordance with the previously reported role of SET in migration [15], but the potential role of Rac-1 in this case remains to be explored in future studies. Furthermore, we show here the potential impact of SET as a novel molecular target in CRC. In this regard, the use of SET antagonists such as OP449 and FTY720 have emerged in the last years as novel therapeutic approaches in human tumors with SET overexpressed and could also be useful in early-stage CRC patients. OP449 is a specific, cell-penetrating peptide against SET, which has shown anticancer properties in leukemia, prostate, breast and gastric cancers [18,35,42,43], but its potential usefulness in CRC remains to be evaluated. FTY720 is an immunosuppressant currently used in the sclerosis multiple, which has demonstrated potent antitumor effects in many cancers, including CRC [44].

5. Conclusions

In conclusion, we show that SET overexpression is a common alteration that contributes to CRC progression, thereby enhancing both cell migration and anchorage-independent cell growth of CRC cells. Moreover, SET overexpression predicts poor outcome, and its prognostic value is particularly significant in patients older than 70 years of age. We have further identified the key function likely played by miR-199b downregulation as a molecular mechanism involved in SET deregulation in many of the SET-overexpressing cases. Our results indicate that SET could be used to anticipate undesirable relapses in stage-II CRC patients and highlight the potential impact of SET inhibition as a novel therapeutic strategy in CRC, which needs to be fully clarified in forthcoming studies.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2077-0383/8/3/346/s1>, Figure S1: SET modulates cell migration in CRC cells, Figure S2: Time-course analysis of a wound healing assay in SW480 cells with SET silenced and with or without ectopic SET expression, Figure S3: Time-course analysis of a wound healing assay in HT-29 cells with SET silenced and with or without ectopic SET expression, Figure S4: Ectopic SET expression restores transwell migration in CRC cells with SET silenced, Figure S5: Clinical impact of SET in time to progression from metastatic diagnosis and in the cohort stratified by age, Figure S6: Box-plot showing miR-199b expression levels in patients with ($n = 7$) and without ($n = 22$) SET overexpression, Table S1: Clinical and molecular characteristics of a series of 231 CRC patients without metastatic disease at diagnosis, Table S2: Association of ECOG status with age and stage parameters, Table S3: Univariate and multivariate Cox analyses in the subgroup of elderly patients with early-stage CRC ($n = 81$), Table S4: Statistical correlation between SET overexpression and miR-199b downregulation in 29 early-stage CRC.

Author Contributions: Conceptualization, I.C. and J.G.-F.; methodology, I.C., A.S., S.Z. and B.T.; software, M.P. and J.R.; formal analysis, I.C., M.L. and M.S.-A.; investigation, I.C., B.T., A.S.; writing, original draft preparation, I.C. and C.C.; writing, review and editing, J.M.-G. and F.R.; funding acquisition, F.R. and J.G.-F.

Funding: This research was funded by PI15/00934 and PI16/01468 grants from “Instituto de Salud Carlos III FEDER”.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

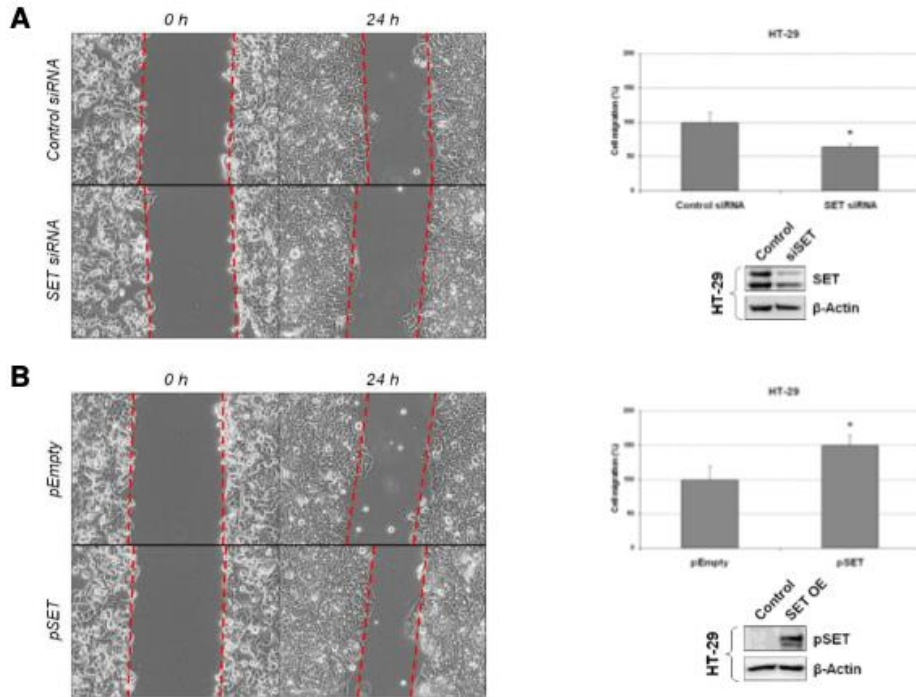
- Jemal, A.; Bray, F.; Center, M.M.; Ferlay, J.; Ward, E.; Forman, D. Global cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* **2011**, *61*, 69–90. [[CrossRef](#)]
- El Zouhairi, M.; Charabaty, A.; Pishvaian, M.J. Molecularly targeted therapy for metastatic colon cancer: Proven treatments and promising new agents. *Gastrointest. Cancer Res.* **2011**, *4*, 15–21. [[PubMed](#)]
- Lermos, C.; Sack, U.; Schmid, F.; Juneja, M.; Stein, U. Anti-metastatic treatment in colorectal cancer: Targeting signaling pathways. *Curr. Pharm. Des.* **2013**, *19*, 841–863. [[CrossRef](#)]
- Lombardi, L.; Morelli, F.; Cinieri, S.; Santini, D.; Silvestris, N.; Fazio, N.; Orlando, L.; Tonini, G.; Colucci, G.; Maiello, E. Adjuvant colon cancer chemotherapy: Where we are and where we’ll go. *Cancer Treat. Rev.* **2010**, *36*, S34–S41. [[CrossRef](#)]
- Gill, S.; Blackstock, A.W.; Goldberg, R.M. Colorectal cancer. *Mayo Clin. Proc.* **2007**, *82*, 114–129. [[CrossRef](#)]
- Mumby, M. PP2A: Unveiling a reluctant tumor suppressor. *Cell* **2007**, *130*, 21–24. [[CrossRef](#)]
- Westermarck, J.; Hahn, W.C. Multiple pathways regulated by the tumor suppressor PP2A in transformation. *Trends Mol. Med.* **2008**, *14*, 152–160. [[CrossRef](#)]
- Cristóbal, I.; Manso, R.; Senin, C.; Borrero, A.; Martínez-Useros, J.; Rodríguez, M.; Zazo, S.; Aguilera, O.; Rojo, F.; García-Foncillas, J. PP2A inhibition is a common event in colorectal cancer and its restoration using FTY720 shows promising therapeutic potential. *Mol. Cancer Ther.* **2014**, *13*, 938–947. [[CrossRef](#)]
- Carmen Figueroa-Aldariz, M.; Castañeda-Patlán, M.C.; Santoyo-Ramos, P.; Zentella, A.; Robles-Flores, M. Protein phosphatase 2A is essential to maintain active Wnt signaling and its A β tumor suppressor subunit is not expressed in colon cancer cells. *Mol. Carcinog.* **2014**, *54*, 1430–1441. [[CrossRef](#)]
- Cristobal, I.; Manso, R.; Rincon, R.; Carames, C.; Zazo, S.; Del Pulgar, T.G.; Cebrián, A.; Madoz-Gúrpide, J.; Rojo, F.; Garcia-Foncillas, J. Phosphorylated protein phosphatase 2A determines poor outcome in patients with metastatic colorectal cancer. *Br. J. Cancer* **2014**, *111*, 756–762. [[CrossRef](#)]
- Cristóbal, I.; Rincón, R.; Manso, R.; Madoz-Gúrpide, J.; Caramés, C.; Del Puerto-Nevado, L.; Rojo, F.; García-Foncillas, J. Hyperphosphorylation of PP2A in colorectal cancer and the potential therapeutic value showed by its forskolin-induced dephosphorylation and activation. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1842*, 1823–1829. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Cristobal, I.; Rincon, R.; Manso, R.; Carames, C.; Zazo, S.; Madoz-Gurpide, J.; Rojo, F.; García-Foncillas, J. Deregulation of the PP2A inhibitor SET shows promising therapeutic implications and determines poor clinical outcome in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* **2015**, *21*, 347–356. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Li, M.; Makkinje, A.; Damuni, Z. The myeloid leukemia-associated protein SET is a potent inhibitor of protein phosphatase 2A. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 11059–11062. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Seo, S.B.; McNamara, P.; Heo, S.; Turner, A.; Lane, W.S.; Chakravarti, D. Regulation of histone acetylation and transcription by INHAT, a human cellular complex containing the set oncoprotein. *Cell* **2001**, *104*, 119–130. [[CrossRef](#)]
- ten Klooster, J.P.; Leeuwen, I.; Scheres, N.; Anthony, E.C.; Hordijk, P.L. Rac1-induced cell migration requires membrane recruitment of the nuclear oncogene SET. *EMBO J.* **2007**, *26*, 336–345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Canela, N.; Rodriguez-Vilarrupla, A.; Estanyol, J.M.; Diaz, C.; Pujol, M.J.; Agell, N.; Bachs, O. The SET protein regulates G2/M transition by modulating cyclin B-cyclin-dependent kinase 1 activity. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 1158–1164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Cervoni, N.; Detich, N.; Seo, S.B.; Chakravarti, D.; Szyf, M. The oncoprotein Set/TAF-1beta, an inhibitor of histone acetyltransferase, inhibits active demethylation of DNA, integrating DNA methylation and transcriptional silencing. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 25026–25031. [[CrossRef](#)]

18. Enjoji, S.; Yabe, R.; Tsuji, S.; Yoshimura, K.; Kawasaki, H.; Sakurai, M.; Sakai, Y.; Takenouchi, H.; Yoshino, S.; Hazama, S.; et al. Stemness Is Enhanced in Gastric Cancer by a SET/PP2A/E2F1 Axis. *Mol. Cancer Res.* **2018**, *16*, 554–563. [[CrossRef](#)]
19. Al-Murrani, S.W.; Woodgett, J.R.; Damuni, Z. Expression of I2PP2A, an inhibitor of protein phosphatase 2A, induces c-Jun and AP-1 activity. *Biochem. J.* **1999**, *341*, 293–298. [[CrossRef](#)]
20. Fan, Z.; Beresford, P.J.; Oh, D.Y.; Zhang, D.; Lieberman, J. Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell* **2003**, *112*, 659–672. [[CrossRef](#)]
21. Kim, J.Y.; Lee, K.S.; Seol, J.E.; Yu, K.; Chakravarti, D.; Seo, S.B. Inhibition of p53 acetylation by INHAT subunit SET/TAF-I β represses p53 activity. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 75–87. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Liu, G.-P.; Wei, W.; Zhou, X.; Zhang, Y.; Shi, H.-H.; Yin, J.; Yao, X.-Q.; Peng, C.-X.; Hu, J.; Wang, Q.; et al. I(2)(PP2A) regulates p53 and Akt correlatively and leads the neurons to abort apoptosis. *Neurobiol. Aging* **2012**, *33*, 254–264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Neviani, P.; Santhanam, R.; Trotta, R.; Notari, M.; Blaser, B.W.; Liu, S.; Mao, H.; Chang, J.S.; Galiotta, A.; Uttam, A.; et al. The tumor suppressor PP2A is functionally inactivated in blast crisis CML through the inhibitory activity of the BCR/ABL-regulated SET protein. *Cancer Cell* **2005**, *8*, 355–368. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Cristobal, I.; Garcia-Orti, L.; Cirauqui, C.; Cortes-Lavaud, X.; Garcia-Sanchez, A.; Calasanz, M.J.; Odero, M.D. Overexpression of SET is a recurrent event associated with poor outcome and contributes to protein phosphatase 2A inhibition in acute myeloid leukemia. *Haematologica* **2012**, *97*, 543–550. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Ekmekci, S.S.; Ekmekci, C.G.; Kandilci, A.; Gulec, C.; Akbiyik, M.; Emrence, Z.; Abaci, N.; Karakas, Z.; Agaoglu, L.; Unuvar, A.; et al. SET oncogene is upregulated in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Tumori* **2012**, *98*, 252–256. [[CrossRef](#)]
26. Leopoldino, A.M.; Squarize, C.H.; Garcia, C.B.; Almeida, L.O.; Pestana, C.R.; Sobral, L.M.; Uyemura, S.A.; Tajara, E.H.; Silvio Gutkind, J.; Curti, C. SET protein accumulates in HNSCC and contributes to cell survival: Antioxidant defense, Akt phosphorylation and AVOs acidification. *Oral Oncol.* **2012**, *48*, 1106–1113. [[CrossRef](#)]
27. Christensen, D.J.; Chen, Y.; Oddo, J.; Matta, K.M.; Neil, J.; Davis, E.D.; Volkheimer, A.D.; Lanasa, M.C.; Friedman, D.R.; Goodman, B.K.; et al. SET oncoprotein overexpression in B-cell chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphoma: A predictor of aggressive disease and a new treatment target. *Blood* **2011**, *118*, 4150–4158. [[CrossRef](#)]
28. Hung, M.-H.; Chen, Y.-L.; Chu, P.-Y.; Shih, C.-T.; Yu, H.-C.; Tai, W.-T.; Shiau, C.-W. Upregulation of the oncoprotein SET determines poor clinical outcomes in hepatocellular carcinoma and shows therapeutic potential. *Oncogene* **2016**, *35*, 4891–4902. [[CrossRef](#)]
29. Zheng, G.; Lu, M.; Liu, H.; Gu, Y.; Wang, H.; Yin, J.; Zhang, Z.; Wang, C.; He, Z. Overexpression of PP2A inhibitor SET oncoprotein is associated with tumor progression and poor prognosis in human non-small cell lung cancer. *Oncotarget* **2015**, *6*, 14913–14925.
30. Switzer, C.H.; Cheng, R.Y.S.; Vitek, T.M.; Christensen, D.J.; Wink, D.A.; Vitek, M.P. Targeting SET/I2PP2A oncoprotein functions as a multi-pathway strategy for cancer therapy. *Oncogene* **2011**, *30*, 2504–2513. [[CrossRef](#)]
31. Mukhopadhyay, A.; Tabanor, K.; Chaguturu, R.; Aldrich, J.V. Targeting inhibitor 2 of protein phosphatase 2A as a therapeutic strategy for prostate cancer treatment. *Cancer Biol. Ther.* **2013**, *14*, 962–972. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Hung, M.-H.; Wang, C.-Y.; Chen, Y.-L.; Chu, P.-Y.; Hsiao, Y.-J.; Tai, W.-T.; Chao, T.-T.; Yu, H.-C.; Shiau, C.-W. SET antagonist enhances the chemosensitivity of non-small cell lung cancer cells by reactivating protein phosphatase 2A. *Oncotarget* **2016**, *7*, 638–655. [[CrossRef](#)]
33. Cheneval, O.; D'Souza, C.; Henriques, S.T.; Wang, C.K.; Chan, L.Y.; Bokil, N.J.; Sweet, M.J.; Craik, D.J. Using the MCoTI-II Cyclotide Scaffold To Design a Stable Cyclic Peptide Antagonist of SET, a Protein Overexpressed in Human Cancer. *Biochemistry* **2016**, *55*, 396–405.
34. Hung, M.H.; Chen, K.F. Reprogramming the oncogenic response: SET protein as a potential therapeutic target in cancer. *Expert Opin. Ther. Targets* **2017**, *21*, 685–694. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Shlomai, G.; Zelenko, Z.; Antoniou, I.M.; Stasinopoulos, M.; Tobin-Hess, A.; Vitek, M.P.; Leroith, D.; Gallagher, E.J. OP449 inhibits breast cancer growth without adverse metabolic effects. *Endocr. Relat. Cancer* **2017**, *24*, 519–529. [[CrossRef](#)]

36. Dong, L.; Zhu, J.; Wen, X.; Jiang, T.; Chen, Y. Involvement of SET in the Wnt signaling pathway and the development of human colorectal cancer. *Oncol. Lett.* **2014**, *7*, 1203–1208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Chao, A.; Tsai, C.-L.; Wei, P.-C.; Hsueh, S.; Chao, A.-S.; Wang, C.-J.; Tsai, C.-N.; Lee, Y.-S.; Wang, T.-H.; Lai, C.-H. Decreased expression of microRNA-199b increases protein levels of SET (protein phosphatase 2A inhibitor) in human choriocarcinoma. *Cancer Lett.* **2010**, *291*, 99–107. [[CrossRef](#)]
38. Cristóbal, I.; Caramés, C.; Rincón, R.; Manso, R.; Madoz-Gúrpide, J.; Torrejón, B.; González-Alonso, P.; Rojo, F.; García-Foncillas, J. Downregulation of microRNA-199b predicts unfavorable prognosis and emerges as a novel therapeutic target which contributes to PP2A inhibition in metastatic colorectal cancer. *Oncotarget* **2017**, *8*, 40169–40180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. McShane, L.M.; Altman, D.G.; Sauerbrei, W.; Taube, S.E.; Gion, M.; Clarck, G.M. Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 9067–9072. [[CrossRef](#)]
40. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408. [[CrossRef](#)]
41. Cho, K.B.; Cho, M.K.; Lee, W.Y.; Kang, K.W. Overexpression of c-myc induces epithelial mesenchymal transition in mammary epithelial cells. *Cancer Lett.* **2010**, *293*, 230–239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Agarwal, A.; MacKenzie, R.J.; Pippa, R.; Eide, C.A.; Oddo, J.; Tyner, J.; Sears, R.; Vitek, M.P.; Odero, M.D.; Christensen, D.J.; et al. Antagonism of SET using OP449 enhances the efficacy of tyrosine kinase inhibitors and overcomes drug resistance in myeloid leukemia. *Clin. Cancer Res.* **2014**, *20*, 2092–2103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Farrell, A.S.; Allen-Petersen, B.; Daniel, C.J.; Wang, X.; Rodriguez, S.; Impey, S.; Oddo, J.; Vitek, M.P.; Lopez, C.; Christensen, D.J.; et al. Targeting inhibitors of the tumor suppressor PP2A for the treatment of pancreatic cancer. *Mol. Cancer Res.* **2014**, *12*, 924–939. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Cristobal, I.; Madoz-Gúrpide, J.; Manso, R.; González-Alonso, P.; Rojo, F.; García-Foncillas, J. Potential anti-tumor effects of FTY720 associated with PP2A activation: A brief review. *Curr. Med. Res. Opin.* **2016**, *32*, 1137–1141. [[CrossRef](#)]

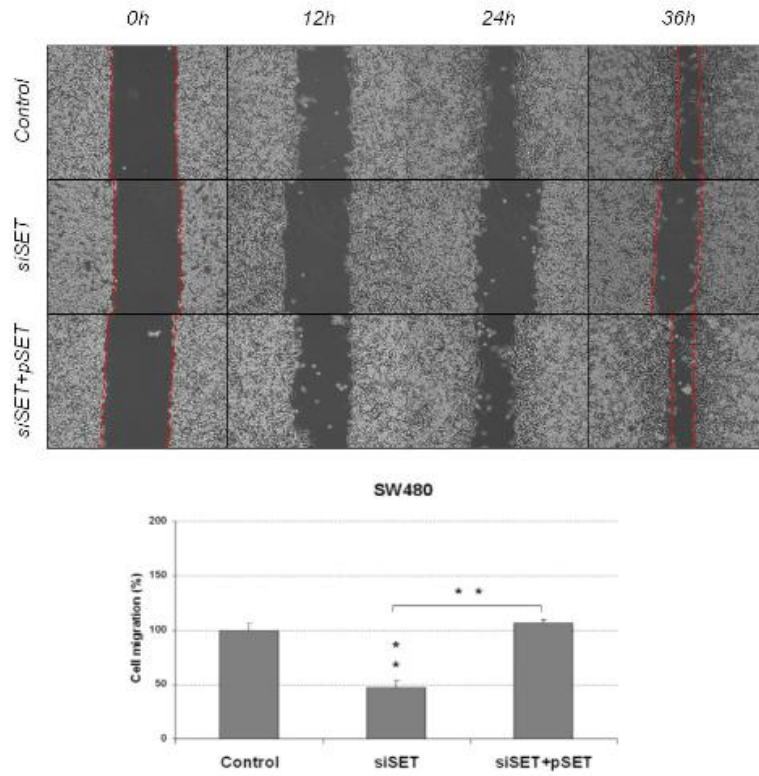


© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



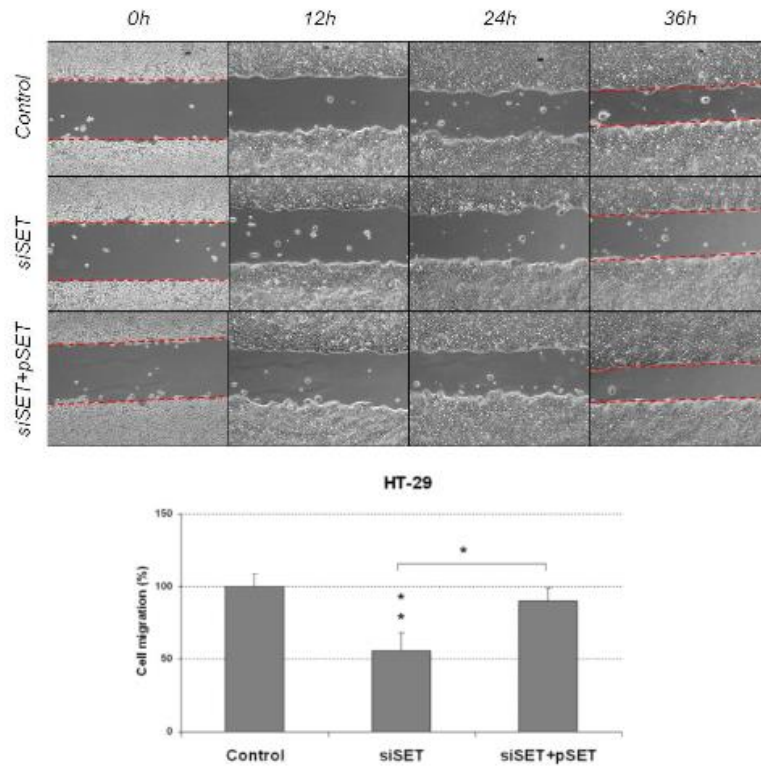
Supplementary Figure 1

Figure S1. SET modulates cell migration in CRC cells. Wound- healing assay showing migration in HT-29 cells after ectopic (A) SET silencing or (B) SET overexpression. Dashed lines represent the migration border; OE: overexpression; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.



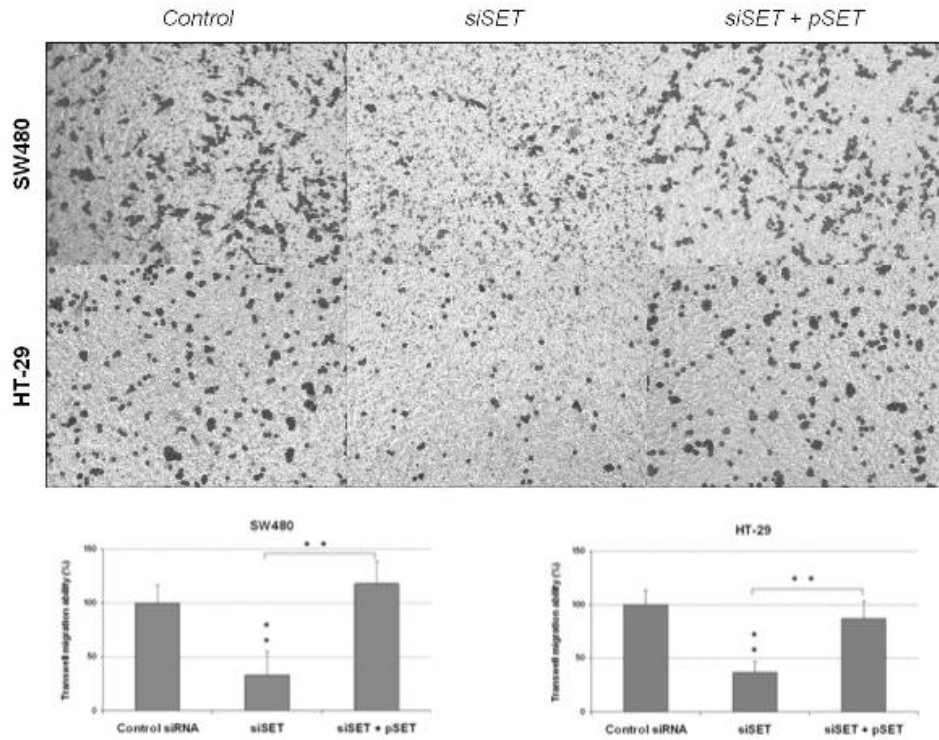
Supplementary Figure 2

Figure S2. Time-course analysis of a wound healing assay in SW480 cells with SET silenced and with or without ectopic SET expression. Dashed lines represent the migration border; OE: overexpression; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.



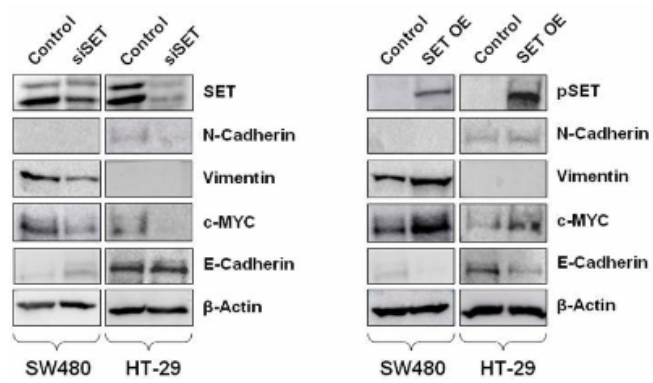
Supplementary Figure 3

Figure S3. Time-course analysis of a wound healing assay in HT-29 cells with SET silenced and with or without ectopic SET expression. Dashed lines represent the migration border; OE: overexpression; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.



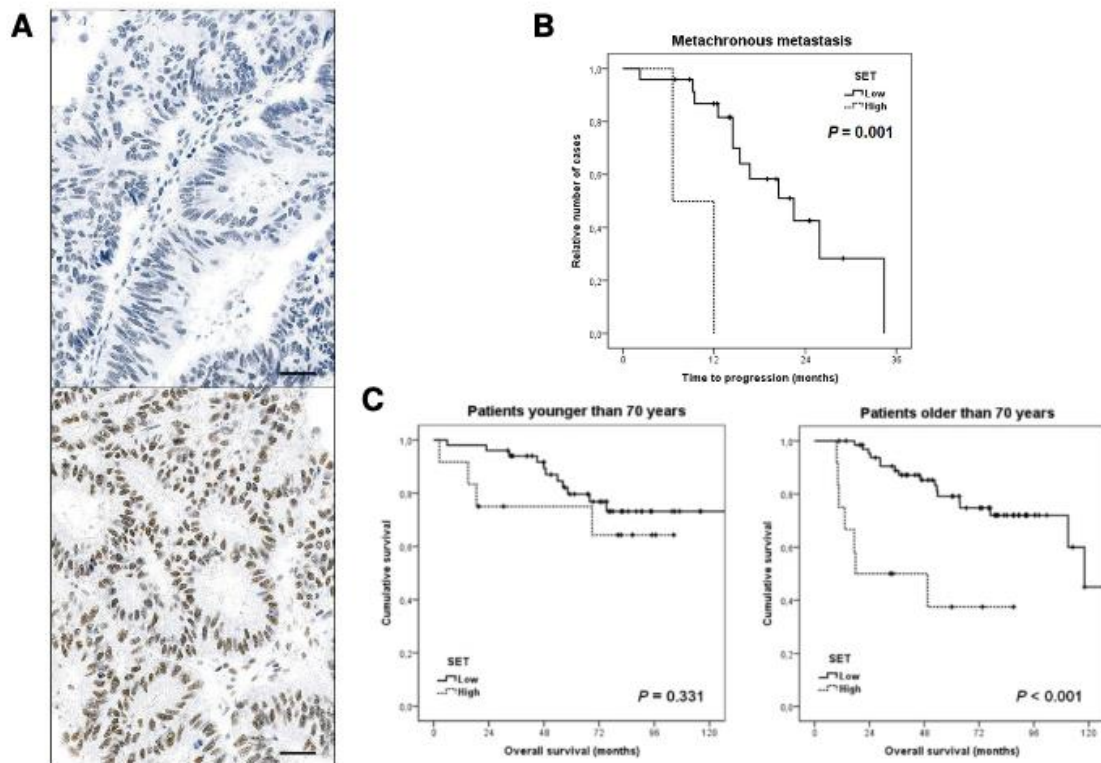
Supplementary Figure 4

Figure S4. Ectopic SET expression restores transwell migration in CRC cells with SET silenced. Transwell migration assay in SW480 and HT-29 cells after SET silencing with or without SET overexpression; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.



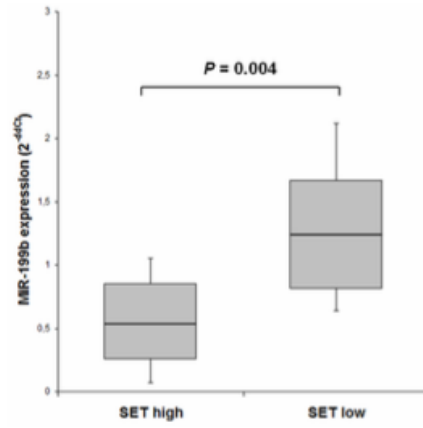
Supplementary Figure 5

Figure S5. SET modulates the expression of c-MYC and EMT proteins.



Supplementary Figure 6

Figure S6. (A) Immunohistochemical detection of SET expression in patients with early-stage CRC showing SET-negative and -positive stainings. The line shows 25 μm. Original magnification x400. (B) Time to progression from metastatic diagnosis in the subgroup of patients with metachronous metastases (C) Kaplan-Meier analyses of OS in the subgroups of patients younger ($N = 62$) and older than 70 years ($N = 79$).



Supplementary Figure 7

Figure S7. Box-plot showing miR-199b expression levels in patients with ($N = 7$) and without ($N = 22$) SET overexpression.

Table S1. Clinical and molecular characteristics of a series of 231 CRC patients without metastatic disease at diagnosis.

		No. (%)
Sex		
	Male	155 (62.8)
	Female	92 (37.2)
Age		
	<70	86 (36.4)
	≥70	150 (62.8)
ECOG		
	0-1	205 (91.9)
	2-3	18 (8.1)
T		
	1	7 (2.8)
	2	48 (19.4)
	3	155 (62.7)
	4	29 (11.8)
	x	8 (3.3)
N		
	0	117 (47.4)
	1	67 (27.1)
	2	44 (17.8)
	x	19 (7.7)
Stage		
	I	39 (15.8)
	II	78 (31.6)
	III	130 (52.6)
Site of primary tumor		
	Colon	165 (68.5)
	Rectum	76 (31.5)
Progression (local or distant)		
	No	156 (63.2)
	Yes	91 (36.8)

Table S2. Association of ECOG status with age and stage parameters.

ECOG	No. Cases	No. ECOG 0-1 (%)	No. ECOG 2-3 (%)	<i>p</i>
Age	223	205	18	0.060
<70	83	80 (81.9)	3 (18.1)	
>70	140	125 (87.1)	15 (12.9)	
Stage	223	205	18	0.014
I-II	99	96 (89)	3 (11)	
III	124	109 (82.3)	15 (17.7)	

Table S3. Univariate and multivariate Cox analyses in the subgroup of elderly patients with early-stage CRC (N= 81).

	Univariate OS analysis				Multivariate OS Cox analysis			
	HR	95% CI		Significance	HR	95% CI		Significance
		Lower	Upper			Lower	Upper	
Stage				0.041				0.173
II	1.000				1.000			
III	3.068	1.046 to 8.998			2.158	0.714 to 6.524		
ECOG				0.001				0.004
0-1	1.000				1.000			
2-3	2.477	1.474 to 4.162			2.223	1.294 to 3.819		
T				0.470				-
1-2	1.000							
>2	1.292	0.644 to 2.593			-	-		
N				0.165				-
0-1	1.000							
2-x	1.307	0.896 to 1.908			-	-		
SET				0.001				0.007
No	1.000				1.000			
Yes	4.924	1.984 to 12.223			3.677	1.438 to 9.400		

OS: overall survival; CI: confidence interval, HR: hazard ratio.

Table S4. Clinical and molecular characteristics of the subgroup of 29 cases with both SET and miR-199b data.

		No. (%)	
Sex			
	Male	21	(72.4)
	Female	8	(27.6)
Age			
	<70	10	(38.5)
	≥70	16	(61.5)
T			
	1	0	(0)
	2	6	(20.7)
	3	17	(58.6)
	4	5	(17.2)
	x	1	(3.5)
N			
	0	10	(34.5)
	1	11	(37.9)
	2	7	(24.1)
	x	1	(3.5)
Stage			
	I-II	10	(34.4)
	III	19	(65.6)
Site of primary tumor			
	Colon	20	(69)
	Rectum	9	(31)
SET			
	Low	22	(75.9)
	High	7	(24.1)

Table S5. Statistical correlation between SET overexpression and miR-199b downregulation in 29 early-stage CRC.

	Total	SET		<i>p</i>
		Low (%)	High (%)	
MiR-199b	29	22	7	0.010
Low	4	1 (25)	3 (75)	
High	25	21 (84)	4 (16)	

Artículo 2: MicroRNA-199b deregulation shows a strong SET-independent prognostic value in early-stage colorectal cancer.

Hasta este momento nuestro grupo había descrito la sobreexpresión de SET como un evento molecular que determina un peor pronóstico no sólo en pacientes con CCRm sino también en aquellos con estadios precoces de la enfermedad y el miR-199b ha sido descrito en numerosos artículos como un supresor de tumores que se encuentra inhibido en numerosos tipos de cáncer. También se ha descrito en CCR que la sobreexpresión ectópica del miR-199b induce una disminución de la viabilidad celular y un aumento de la sensibilidad a quimioterapias de inducción, principalmente a través de la inhibición de SET. Además, se había identificado la menor expresión del miR-199b como una alteración recurrente en CCRm que predice muy mal pronóstico, así como un mecanismo responsable de la sobreexpresión de SET en al menos la mitad de casos con CCRm que portan esta alteración. Por tanto, el siguiente paso fue evaluar el potencial impacto clínico de la expresión del miR-199b en una cohorte de pacientes con CCR localizado al diagnóstico, ya que en este grupo de casos aún no se había investigado.

En este estudio se cuantificaron los niveles de expresión del miR-199b en una cohorte de 171 pacientes con CCR en estadio temprano. Se encontró que el 21,6% de los casos analizados (37 de 171) mostraban una baja expresión de este miR, alteración que se asoció significativamente con aquellos pacientes con un peor estado general, analizado con el Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) ($p = 0,045$).

Además, la baja expresión del miR-199b mostró un gran impacto como marcador predictivo de una menor SG ($p < 0,001$) y SLP ($p = 0,015$) en la cohorte de pacientes en estudio. Para verificar la importancia del eje de señalización miR-199b/SET, se analizó a continuación el estado de expresión de SET por inmunohistoquímica. Se encontró una asociación muy significativa entre la sobreexpresión de SET con niveles disminuidos del miR-199b en nuestra cohorte, aunque el análisis multivariante demostró que el miR-199b es un biomarcador independiente de mal pronóstico en CCR en estadio temprano y con un valor predictivo más fuerte que SET. En conclusión, nuestros resultados destacan la posible utilidad

clínica de miR-199b y sugieren que podría representar una nueva diana molecular en esta enfermedad.

Aportación del doctorando:

Mi aportación en este manuscrito fue llevar a cabo las diferentes bases de datos de pacientes y extraer la información clínica. Me encargué de la extracción de ARN y de su cuantificación junto con A.S. Colaboré en el planteamiento del desarrollo del artículo y en la estadística con SPSS. Finalmente, contribuí a la redacción del artículo escribiendo algunos apartados y en la corrección del artículo.



Article

MicroRNA-199b Deregulation Shows a Strong SET-Independent Prognostic Value in Early-Stage Colorectal Cancer

Ion Cristóbal ^{1,2,*†}, Jaime Rubio ^{1,3,†}, Blanca Torrejón ^{1,2}, Andrea Santos ^{1,2}, Cristina Caramés ^{1,3}, Melani Luque ⁴, Marta Sanz-Álvarez ⁴, Ruth Alonso ⁴, Sandra Zazo ⁴, Juan Madoz-Gúrpide ⁴, Federico Rojo ^{4,*} and Jesús García-Foncillas ^{2,3,*}

¹ Cancer Unit for Research on Novel Therapeutic Targets, Oncohealth Institute, IIS- Fundación Jiménez Díaz-UAM, E-28040 Madrid, Spain; jaime.rubiop@quironsalud.es (J.R.); blanca.torreonmoreno@gmail.com (B.T.); andreasantos.asc@gmail.com (A.S.); ccarames@fjd.es (C.C.)

² Translational Oncology Division, Oncohealth Institute, IIS- Fundación Jiménez Díaz-UAM, E-28040 Madrid, Spain

³ Medical Oncology Department, University Hospital “Fundación Jiménez Díaz”, UAM, E-28040 Madrid, Spain

⁴ Pathology Department, IIS-Fundación Jiménez Díaz-UAM, E-28040 Madrid, Spain; melani.luque@quironsalud.es (M.L.); marta.sanza@quironsalud.es (M.S.-A.); ruthalonsoalonso@gmail.com (R.A.); szazo@fjd.es (S.Z.); jmadoz@fjd.es (J.M.-G.)

* Correspondence: ion.cristobal@fjd.es (I.C.); frojo@fjd.es (F.R.); jesus.garciafoncillas@oncohealth.eu (J.G.-F.); Tel.: +34-915504800 (I.C. & F.R. & J.G.-F.)

† These authors have contributed equally to this work.

Received: 30 June 2020; Accepted: 24 July 2020; Published: 28 July 2020

Abstract: The endogenous PP2A inhibitor SET Nuclear Proto-Oncogene (SET) has been reported to play oncogenic roles and determines poor outcomes in colorectal cancer (CRC). Our group previously showed that miR-199b is deregulated in metastatic CRC, and reduced the cell viability and enhanced the sensitivity of CRC cells to standard induction chemotherapy drugs, mainly through direct negative SET regulation. Clinically, miR-199b downregulation was identified as the molecular mechanism responsible for SET overexpression in around half of metastatic CRC patients. However, the potential clinical value of miR-199b in early-stage CRC remains totally unknown. Thus, here we explored the expression levels of this microRNA in a cohort of 171 early-stage CRC patients using real-time polymerase chain reactions. MiR-199b downregulation was found in 21.6% of cases (37 out of 171) and was significantly associated with those patients with a worse Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) status ($p = 0.045$). Moreover, miR-199b downregulation predicted shorter overall ($p < 0.001$) and progression-free survival ($p = 0.015$). As expected, we next immunohistochemically analyzed SET, observing that it was significantly associated with miR-199b in our cohort. However, multivariate analyses showed that miR-199b was an independent biomarker of poor outcomes in early-stage CRC with a predictive value stronger than SET. In conclusion, our results highlight the potential clinical usefulness of miR-199b and suggest that it could represent a novel molecular target in this disease.

Keywords: miR-199b; SET; early-stage CRC; tumor suppressor; prognosis

1. Introduction

Colorectal cancer (CRC) represents the most frequent gastrointestinal cancer and one of the major causes of morbidity and mortality worldwide; it is the second-most common cause of cancer-related deaths, with around 900,000 deaths annually. The pathology of CRC involves both genetic and epigenetic events, together with environmental determinants, such as dietetic habits, which all contribute to the development of this disease. [1]. The stage of the disease at diagnosis represents a critical relevant prognostic factor, and those cases with metastatic development still have very poor outcomes [2,3]. Thus, more than 70% of newly diagnosed CRC patients have a surgically resectable and not a metastatic disease at the beginning [4,5], but only 15–25% of cases with liver metastases are candidates for surgery [6]. Therefore, it is necessary to better understand the molecular basis of this disease to anticipate and prevent metastatic progression [7].

MicroRNAs (miRs) are a class of single-stranded and small non-coding RNAs (18 to 25 nucleotides) that posttranscriptionally inhibit specific genes. This inhibition is due to the sequence complementarily binding through the “seed region” of the miR, consisting of 7–8 nucleotides located at the 5' end, to the 3' untranslated region (3'UTR) of the mRNA target, and leading to its degradation or its transcriptional blocking. Their roles in human cancer have been largely reported since miRs function as regulators of signaling pathways that are crucial for the tumor cell and are involved in proliferation, apoptosis, or cell differentiation. In fact, depending on their specific targets, miRs could act as oncogenes or tumor suppressors [8]. Although miR-199b has been largely reported as a tumor suppressor that is commonly downregulated in several types of human cancers [9–19], only a few studies about miR-199b in CRC have been published to date. In concordance with the tumor suppressor role reported for miR-199b in other tumor types, miR-199b downregulation was found to contribute to CRC progression through the modulation of the SIRT1/CREB/KISS1 pathway via SIRT1 activation [20]. Moreover, circNSD2 has been reported to target miR-199b, thereby leading to the activation of DDR1/JAG1 signaling, which promotes the development of CRC metastatic disease [21]. MiR-199b has been shown to directly target SET Nuclear Proto-Oncogene (SET) in choriocarcinoma [22], and our group demonstrated that SET is also a direct target of this miR in CRC. MiR-199b downregulation led to the reactivation of the tumor suppressor PP2A, which reduced cell growth and enhanced the sensitivity to oxaliplatin in CRC cells. In addition, miR-199b downregulation was predictive of poor outcomes in metastatic CRC and was proposed as the molecular event responsible for SET deregulation in around half of SET-overexpressing patients [23]. Finally, two recent works have analyzed the role of miR-199b in locally advanced rectal cancer (LARC). Of note, Baek and colleagues reported that high levels of both tissue and exosomal miR-199a/b would be correlated with better responses to chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer [24]. Moreover, our group confirmed that miR-199b downregulation has a predictive value regarding responses to neoadjuvant chemoradiotherapy (CRT) in LARC. This observation was probably due to the deregulation of the miR-199b/SET signaling axis since both miR-199b and SET were found to regulate the 5-FU resistance phenotype [25]. However, it remains to be determined whether miR-199b expression levels also have clinical and therapeutic relevance in the subgroup of early-stage CRC patients.

In the present work, we analyzed for the first time the potential clinical value of miR-199b deregulation in CRC patients without metastatic disease at diagnosis. MiR-199b was quantified in a cohort of 171 CRC patients with localized disease and we found that miR-199b downregulation was a recurrent molecular event that strongly determined poor overall (OS) and progression-free survival (PFS) in this disease in a SET-independent manner.

2. Materials and Methods

2.1. Patient Samples

All the samples used in this research study were kindly supplied by Fundacion Jimenez Diaz Biobank (Madrid, Spain) (PT13/0010/0012). This work included a cohort of 171 consecutive formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tumor samples from CRC patients without metastatic disease at diagnosis, and selected from 2001 to 2014 in a retrospective manner. The selection criteria were as

follows: adenocarcinoma, absence of neoadjuvant therapy, operable disease, enough material, clinical follow-up data available, and lack of metastatic disease. TNM (tumor, node, metastases) staging was performed based on the 7th American Joint Committee on Cancer (AJCC) staging system established for CRC. Clinical information from each patient was obtained from medical records by two oncologists involved in this study (JR and CC). We performed tissue microarrays (TMA) by carefully selecting representative areas of each tumor sample and obtaining three tissue cores of 1 mm diameter each by using a TMA workstation (T1000 Chemicon). All specimens were taken anonymously and both the Ethical Committee and Institutional Review Board of the Fundacion Jimenez Diaz Hospital evaluated and approved the project (reference number 16/18). Written informed consent was obtained in all cases for the use of biological samples for research purposes.

2.2. Nucleic Acid Isolation

Isolation of total RNA from the FFPE tumor samples was carried out using the RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's recommendations. The FFPE tumor sections were obtained from the interior of the paraffin block to avoid potential contaminations or nucleic acid damage during their storage. For the RNA isolation procedure, we used two consecutive 10 μm sections from the tumor blocks of each patient cut in a microtome. The sections were included in positively charged glass slides and tumor areas were carefully selected by a pathologist. Next, we removed the non-tumor circundant tissue before starting the nucleic acid isolation. Briefly, tumor tissue was included in a 1.5 mL tube and 1 mL of xylene was added to remove the paraffin from the sample; then, the tissue was vortexed and incubated for 30 min at 60 °C before being centrifuged at maximum speed for 2 min at room temperature to pellet the tumor tissue and remove the supernatant that contained the xylene. The next step consisted of two ethanol washes to totally remove the xylene from the samples. Next, 1 mL of ethanol is added to each sample, followed by 2 min of incubation and centrifugation at maximum speed, and the tumor tissue turned opaque. The ethanol was removed after the second wash and the sample was dried at 40 °C for 20 min. Then, 100 μL of digestion buffer and 4 μL of protease was added per sample, mixed gently with a pipette, and incubated at 50 °C for 15 min, followed by another incubation at 80 °C for 15 min. Next, 120 μL of isolation additive and 295 μL of ethanol was added to each sample and mixed by pipetting up and down. A filter cartridge was placed in one of the supplied collection tubes and the sample mixture was applied to the filter cartridge, centrifuged at 10,000 $\times g$ for 30 s, the flow-through was discarded, and the filter cartridge was re-inserted into the same collection tube. Then, 700 μL of wash 1 was added to the filter cartridge and centrifuged at 10,000 $\times g$ for 30 s, and the flow-through was discarded. Next, 500 μL of washes 2 and 3 were added to the same filter cartridge, centrifuged at 10,000 $\times g$ for 30 s, the flow-through was discarded, and the Filter cartridge was re-inserted into the same collection tube. An additional centrifugation was performed at 10,000 $\times g$ for 30 s to remove residual washing fluids from the filter. For nuclease digestion, 60 μL of the following mix was added to the center of the filter cartridge of each tissue sample: 6 μL 10 \times DNase buffer + 4 μL DNase + 50 μL nuclease-free water, and then incubated for 30 min at room temperature. Next, 700 μL of wash 1 was added to the filter cartridge and centrifuged at 10,000 $\times g$ for 30 s, and the flow-through was discarded. Then, 500 μL of washes 2 and 3 were added to the same filter cartridge, centrifuged at 10,000 $\times g$ for 30 s, and the flow-through was discarded. The steps with washes 2 and 3 were repeated a second time. After the last centrifugation, the filter cartridge was transferred to a clean collection tube. Next, 40 μL of the elution solution was applied to the center of the filter cartridge, incubated for 2 min at room temperature, the cap was closed, and the sample was centrifugated at 10,000 $\times g$ for 1 min. The elution was conserved but the last step was repeated with the other 20 μL of the elution solution. Finally, the concentration of the total isolated RNA was determined by measuring its absorbance at 260 nm in a NanoDrop Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

2.3. Quantification of miRNA Expression Levels

Taqman MicroRNA Assays are highly selective since they are delivered in two tubes containing an miR-specific stem-loop reverse transcription (RT) primer to produce a template for the real-time PCR and the PCR primer set, respectively. The samples included in this study were reverse transcribed using the TaqManHMicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The RT reaction mix included the following in each sample: 6 μL of RT primer pool, 0.30 μL of dNTPs with dTTP (100 mM), 3 μL of MultiScribe reverse transcriptase (50 U/ μL), 1.50 μL of 10 \times RT buffer, 0.19 μL of RNase inhibitor (20 U/ μL), and 1.01 μL of nuclease-free water. The mix was prepared on ice with a total volume of 12 μL per sample and inverted several times to mix it properly; then, it was centrifuged to collect all the components at the bottom of the tube. Next, 3 μL of total RNA at a concentration of 1 to 20 ng/ μL was added and the reaction was sealed in a 96-well plate or capped tubes, centrifuged to mix all the components, and incubated for 5 min at room temperature. The tubes or 96-well plate was placed into a thermal cycler and the following reaction conditions were applied: 30 min at 16 $^{\circ}\text{C}$, 30 min at 42 $^{\circ}\text{C}$, 5 min at 85 $^{\circ}\text{C}$, and held at 4 $^{\circ}\text{C}$ until the reaction stopped. Next, the quantification of mature miRNAs was carried out using a quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) with TaqMan MicroRNA Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), which are specific for miR-199b (reference number: miR-199b-5p_000500). U6B was used as a housekeeping gene for data normalization. The PCR reaction mix was prepared in a total volume of 10 μL by adding the following components: 0.08 μL of cDNA from the RT product obtained in the previous step, 0.5 μL of 20 \times TaqMan MicroRNA Assays, 5 μL of PCR Master Mix, and 4.42 μL of nuclease-free water. The samples were inverted several times to mix them properly and they were centrifuged briefly to collect all the reaction components at the bottom of the tube. Next, 10 μL of the PCR reaction mix was added to each well of a 96-well plate. The plates were then sealed using MicroAmp Optical Adhesive Films (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), mixed, and centrifuged to collect all the reaction components at the bottom of the wells. The plate was placed into a thermal cycler and the amplification reaction was initiated. All the amplification reactions were carried out in an Applied Biosystems 7500 Sequence Detection System. The conditions for each amplification assay were: 95 $^{\circ}\text{C}$ for 10 min for enzyme activation, followed by 45 cycles of 95 $^{\circ}\text{C}$ for 15 s (denature), and 60 $^{\circ}\text{C}$ for 1 min (anneal and extend). The relative gene expression data were analyzed using the $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ method, as previously described [25], where $\Delta\Delta\text{CT} = (\text{C}_{\text{T,Target Gene}} - \text{C}_{\text{T,U6B}})_{\text{Tumor}} - (\text{C}_{\text{T,Target Gene}} - \text{C}_{\text{T,U6B}})_{\text{Control}}$. We considered miR-199b downregulation had occurred when its expression levels in a specific patient sample were lower than the mean value of miR-199b expression minus standard deviation (SD) in the entire patient cohort as previously described [25].

2.4. Immunohistochemistry

Positively charged glass slides were used to include tumor tissue sections that were 3 μm in size. Tumor specimens were then deparaffinized using xylene and graded alcohols, and heat antigen retrieval was carried out in a Dako EDTA-based buffer with a pH of 9 (Agilent, Santa Clara, CA, USA). The blocking of endogenous peroxidase was performed via incubation in 0.03% hydrogen peroxide for 5 min. Next, the slides were incubated with a specific rabbit polyclonal anti-SET (Abcam, Cambridge, UK), as previously described [23], at room temperature for 60 min and followed by incubation with an appropriate anti-Ig horseradish peroxidase-conjugated polymer (Flex+, Dako). 3,3'-Diaminobenzidine was used as a chromogen to visualize the processed tissue sections. All stainings were carried out using a Dako Autostainer. Sections incubated with normal non-immunized rabbit immunoglobulins were used as negative controls. As a positive control, a section of a colorectal tumor with a known expression of SET was used. The SET antibody sensitivity (1:5000) was calculated in a range of crescent dilutions of the primary antibody. Only the membrane of epithelial cells, but not the stromal cells, was evaluated for the SET expression by two pathologists blinded to the clinical data (SZ and FR). Through the estimation of the percentage of tumor cells showing positive staining with low, medium, or high intensity, we calculated a semiquantitative

histoscore. To calculate the final score, a weighting factor estimate was applied for each of them. The formula used was as follows: $\text{histoscore} = (\text{low } \%) \times 1 + (\text{medium } \%) \times 2 + (\text{high } \%) \times 3$ and the results ranged from 0 to 300.

2.5. Statistical Analysis

The SPSS 20 bioinformatic tool for windows (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) was used to perform the statistical analyses. The overall survival (OS) was calculated as the time from the date of diagnosis to the date of death from any cause or the last follow-up. The progression-free survival (PFS) was calculated as the time from the date of diagnosis until any primary, regional, or distant recurrence, the appearance of a secondary tumor, death, or the last follow-up. The time to metastasis (TTM) was calculated as the time from diagnosis until a distant recurrence in those cases with metachronous metastases. Metachronous metastases were considered in those cases who developed distant progression after one year from the date of diagnosis. Kaplan–Meier plots were used to evaluate survival and comparisons were carried out using a log-rank test if the proportional hazard assumption was fulfilled and a Breslow test otherwise. Significant parameters in the univariate analysis were taken into consideration to adjust the Cox multivariate analyses. The cutoff point for miR-199b expression was determined as previously described for metastatic CRC [23]. This work was carried out in accordance with the Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies (REMARK) guidelines [26]. A *p*-value of less than 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Prevalence of MiR-199b Deregulation and Its Association with Molecular and Clinical Parameters in Early-Stage CRC Patients

To evaluate its clinical impact, we measured the expression levels of this miR-199b using real-time PCR in a series of 171 CRC patients without metastatic disease at diagnosis. The patient characteristics of the cohort studied can be found in Table S1. We observed that miR-199b was downregulated in 37 out of 171 cases (21.6%), and this alteration was associated with a worse Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status (45.9% versus 19.7%, *p* = 0.045). Statistical analyses showing the association between molecular and clinical parameters of our cohort and miR-199b expression are included in Table 1.

Table 1. Association between miR-199b and clinical and molecular characteristics in 171 colorectal cancer (CRC) patients with localized disease at diagnosis.

Parameters	No. Cases	High MiR-199b (%)	Low MiR-199b (%)	<i>p</i>
MiR-199b	171	134 (78.4)	37 (21.6)	
Sex	171	134	37	0.478
Male	107	82 (76.6)	25 (23.4)	
Female	64	52 (81.2)	12 (18.8)	
Age	168	132	36	0.616
<70	62	50 (81.9)	12 (18.1)	
≥70	106	82 (77.4)	24 (22.6)	
ECOG	168	132	36	0.045
0–1	157	126 (80.3)	31 (19.7)	
2–3	11	6 (54.1)	5 (45.9)	
T	171	134	37	0.333
1	3	3 (100)	0 (14.3)	
2	40	34 (85)	6 (15)	
3	108	80 (74.1)	28 (25.9)	
4	19	16 (84.2)	3 (16.8)	
x	1	1 (100)	0 (0)	
<i>n</i>	171	134	37	0.848
0	82	64 (78)	18 (22)	

1	46	37	(80.4)	9	(19.6)	
2	30	24	(80)	6	(20)	
x	13	9	(69.2)	4	(30.8)	
Stage	171	134		37		0.924
I–II	82	64	(78)	18	(22)	
III	89	70	(78.7)	19	(21.3)	
Site of primary tumor	166	131		35		0.643
Colon	123	96	(78)	27	(22)	
Rectum	43	35	(81.4)	8	(18.6)	
Metachronous metastasis	171	134		37		0.825
No	127	99	(78)	28	(22)	
Yes	44	35	(79.5)	9	(20.5)	

ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group.

Next, we evaluated the potential association of miR-199b downregulation with relapse (local or distant), but it was not statistically significant. After stratifying our cohort by stage, we found that this alteration showed a similar and not statistically significant association in all stages (Table S2).

3.2. Clinical Significance of MiR-199b Downregulation in Early-Stage Colorectal Cancer

To perform the statistical analyses of survival, we studied a cohort of 157 cases (96 male and 61 female) with available clinical follow-up data; these patients had a median of age of 73 years (range: 38–91) and an OS of 71.5 months. Of importance, a markedly shorter OS ($p < 0.001$) and PFS ($p = 0.015$) were found in those cases with downregulated miR-199b expression (Figure 1). In those cases who developed metachronous metastases ($n = 44$), miR-199b downregulation correlated with a slightly shorter time to metastasis (17.2 vs. 21.2 months), but significance was not achieved ($p = 0.397$) (Figure S1).

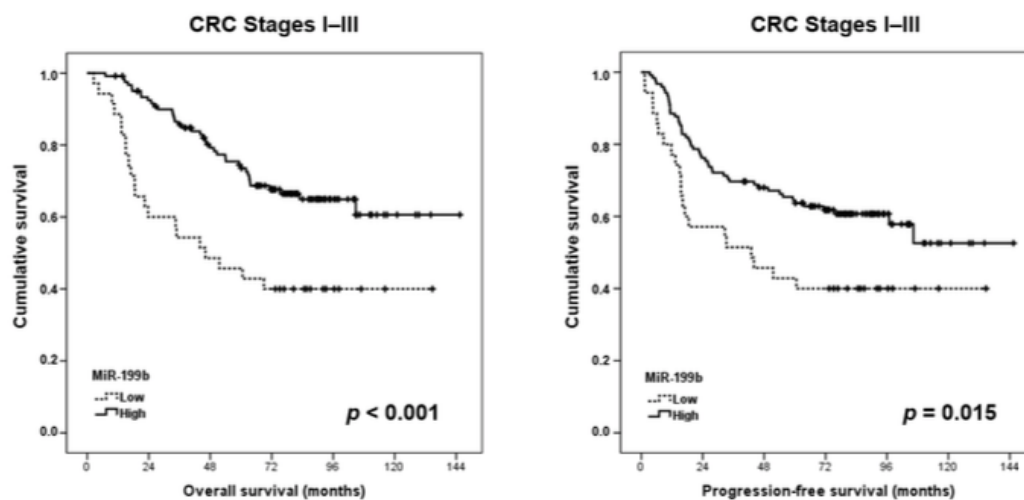


Figure 1. Survival analyses using Kaplan–Meier plots for miR-199b expression in early-stage CRC patients, showing both the overall survival and progression-free survival. CRC, colorectal cancer.

Next, we studied whether miR-199b downregulation could have clinical relevance after stratifying our cohort into patients younger and older than 60 years. Interestingly, we observed that miR-199b showed a significant prognostic value in both subgroups of younger and elderly patients (Figure 2).

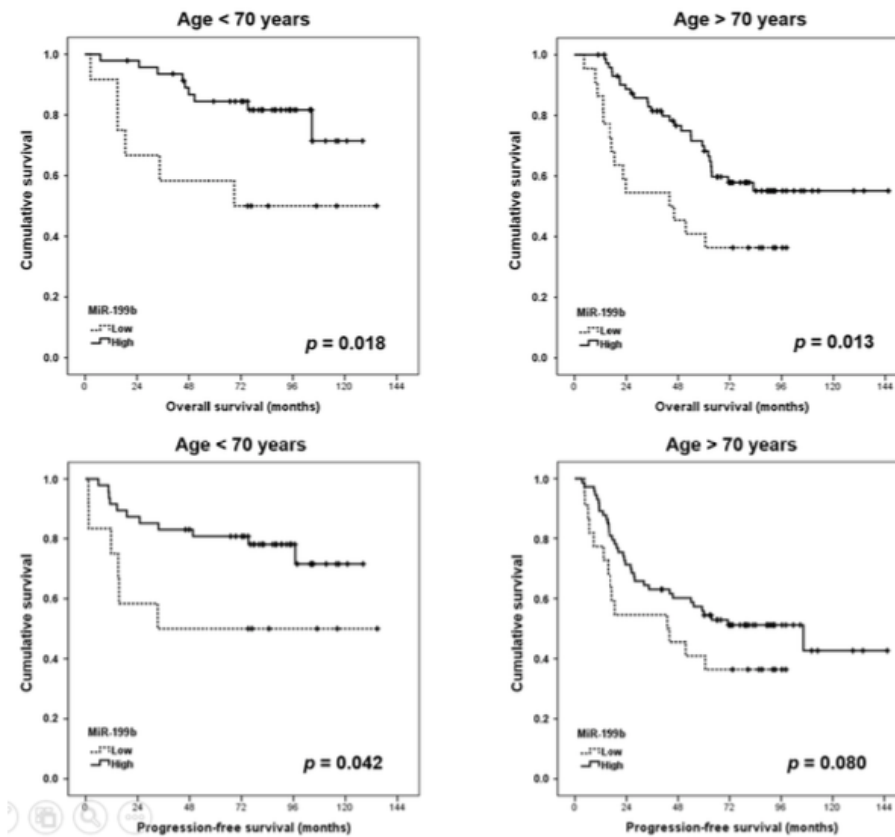


Figure 2. Kaplan–Meier analyses for miR-199b in the cohort of 157 early-stage CRC patients stratified by age.

In addition, we analyzed the prognostic value of miR-199b after stratifying our cohort by stage. Although miR-199b downregulation predicted shorter OS in both subgroups of stages I–II ($p < 0.001$) and stage III ($p = 0.017$) patients, significance was only achieved in the subgroup of stages I–II for PFS ($p = 0.006$ vs. $p = 0.118$) (Figure S2).

3.3. MiR-199b Correlated with SET but Showed an Independent Prognostic Value

The fact that SET has previously been reported as a key miR-199b target in metastatic CRC prompted us to analyze its expression levels using immunohistochemistry in 144 cases from our cohort. We found SET overexpression in 32 out of 144 cases (15.3%). As expected, we observed that SET overexpression significantly correlated with miR-199b downregulation ($p = 0.004$) (Table 2). For the survival analyses, we included 131 cases with available clinical follow-up data. In concordance with previous studies, we found that SET overexpression determined a significantly worse OS ($p = 0.020$) and PFS ($p = 0.015$) (Figure S3).

Table 2. Association between miR-199b and SET in 144 early-stage CRC patients.

	No. Cases	High MiR-199b (%)	Low MiR-199b (%)	<i>p</i>
SET	144	112	32	0.004
Low	122	100 (82)	22 (18)	
High	22	12 (54.5)	10 (45.5)	

SET, SET Nuclear Proto-Oncogene; CRC, colorectal cancer.

However, 22 out of 32 cases with low miR-199b levels showed low SET levels and 12 out of 22 cases with SET overexpression showed high miR-199b levels, indicating that the subgroups of cases covered by these alterations were considerably different. Notably, multivariate analysis demonstrated that miR-199b downregulation was an independent predictor of poor outcome in our cohort in both overall ($p = 0.002$) and progression-free survival ($p = 0.023$), with even higher

significance that SET in the case of overall survival. In fact, SET did not reach statistical significance in the multivariate analyses for overall survival ($p = 0.082$). However, SET overexpression was an independent prognosticator in multivariate analyses regarding progression-free survival and with even more significance than miR-199b in this case ($p = 0.014$) (Table 3 and Table S3).

Table 3. Univariate and multivariate Cox analyses in the cohort of 157 patients with early-stage CRC.

Parameters	Univariate OS Analysis			Multivariate OS Cox Analysis			
	HR	95% CI		p	HR	95% CI	
		Lower	Upper			Lower	Upper
Gender							0.576
Male	1.000						
Female	0.862	0.512 to 1.451					
Age							0.011
<70	1.000			1.000			0.022
>70	2.147	1.189 to 3.380		2.193	1.120 to 4.293		
Stage							0.015
I–II	1.000			1.000			0.184
III	1.934	1.137 to 3.287		1.661	0.786 to 3.512		
ECOG							<0.001
0–1	1.000			1.000			<0.001
2–3	2.274	1.588 to 3.256		2.069	1.388 to 3.085		
T							0.224
1–2	1.000						
>2	1.217	0.887 to 1.670					
n							0.046
0–1	1.000			1.000			0.447
2–x	1.727	1.009 to 2.954		1.297	0.663 to 2.536		
SET							0.023
Low	1.000			1.000			0.082
High	2.121	1.112 to 4.046		1.843	0.926 to 3.666		
MiR-199b							0.001
Low	1.000			1.000			0.002
High	0.399	0.234 to 0.678		0.378	0.207 to 0.693		

OS: Overall Survival; CI: Confidence Interval, HR: Hazard Ratio.

4. Discussion

The tumor suppressor miR-199b has been described as being downregulated in many tumor types and it has also been recently proposed as a novel molecular target with therapeutic value [27]. Moreover, miR-199b has been described as showing prognostic value in hepatocellular carcinoma, acute myeloid leukemia, breast and bladder cancers, and metastatic colorectal cancer [23,28–31]. To explore the clinical impact of miR-199b deregulation in early-stage CRC, we quantified this miR in a cohort of 171 CRC patients without metastatic disease at diagnosis. Of importance, we found that miR-199b downregulation is a molecular event that predicts poor outcomes in this disease (Figure 1). Interestingly, our group previously reported that miR-199b downregulation had a prevalence of 25% in metastatic CRC, which is slightly higher than the 21.8% observed in CRC patients with localized disease. These issues could be explained by the fact that miR-199b downregulation contributes to disease aggressiveness and represents a secondary alteration acquired in the progression of the disease, similar to what has been proposed for SET overexpression [23]. Interestingly, in both studies, the prevalence of miR-199b downregulation was lower in rectal cancer than in colon cancer cases (22% vs. 18.6% in localized CRC and 26.4% vs. 20% in metastatic CRC), but the differences did not reach statistical significance. Moreover, the association between miR-199b and ECOG observed in the present work ($p = 0.045$) (Table 1) was not found in metastatic CRC patients ($p = 0.175$) [23]. In concordance with the results shown here, our group has recently reported that miR-199b downregulation confers shorter overall survival in locally advanced rectal cancer (LARC) patients,

which was a subgroup of cases who received preoperative 5-fluorouracil (5-FU)-based neoadjuvant chemoradiotherapy (CRT). We observed that the miR-199b/SET axis plays a key role in determining 5-FU resistance, and both miR-199b and SET predicted the responses to CRT in our LARC cohort [32]. Although SET overexpression has also been described as able to predict worse prognoses in early-stage CRC [33], several differences highlight the prognostic value of miR-199b. This issue is based on the fact that this miR contributes to CRC progression toward the regulation of several other targets besides SET, and that miR-199b was found to be downregulated in around only 50% of cases with metastatic CRC and high SET expression [23]. In fact, here we obtained similar results, where miR-199b downregulation was observed in 10 out of 22 SET-overexpressing patients. Although both alterations were found to be correlated with worse ECOG performance status, SET overexpression was higher in those cases with stage III and the prevalence of miR-199b downregulation was similar in patients with stage III than in those cases with stages I–II (Table 1). Next, we observed a lack of correlation between miR-199b levels and relapse (local or distant) (Table S2), in contrast with the strong SET association with this parameter. In addition, in contrast with our findings here, a high expression of SET significantly determined a shorter time to metastasis, where its prognostic clinical impact was especially marked in those patients older than 60 years [23]. However, we found here that miR-199b downregulation shows prognostic value in both subgroups of younger and elderly patients (Figure 2). Therefore, there were significant differences between miR-199b downregulation and SET overexpression, and the fact that the first one was more prevalent (21.6% vs. 15.3%) further highlights that miR-199b would be including cases with poor outcomes and normal SET levels. It has been recently suggested the relevant value of miR-199b can be used as a prognostic marker in liquid biopsies in a group of 69 LARC patients [24], and it would be very interesting to confirm its potential usefulness in both early-stage and metastatic CRC in forthcoming studies. As SET is a key direct miR-199b target, we evaluated whether the prognostic value of miR-199b was dependent on its association with SET. Notably, we observed in this work that miR-199b was an independent prognosticator with higher significance than SET, probably because miR-199b is a tumor suppressor that regulates additional targets, which strengthens its clinical impact. However, a recent publication showing that SET is a key miR-199b target for mediating 5-FU resistance in LARC [32] indicates that miR-199b could also be regulating additional cell functions observed for SET, such as migration, invasion, and the epithelial to mesenchymal transition, and this issue should be evaluated in future research works. Another relevant issue that remains to be investigated is to determine the molecular mechanisms involved in miR-199b deregulation in CRC. In this regard, miR-199b has been reported to be downregulated through epigenetic silencing in ovarian cancer [13] and long non-coding RNAs in cervical and non-small cell lung cancers [34,35]. In addition, a recent study has investigated the role of the NSD2 circular RNA in the miR-199b inhibition in CRC [21]. However, the identification and clarification of the relevance of these mechanisms that govern miR-199b regulation in cancer, specifically in CRC, remains to be further investigated.

5. Conclusions

In conclusion, we found here that miR-199b downregulation was a common event in early-stage CRC that independently predicts worse overall and progression-free survival, thereby defining a subgroup of cases with very poor prognosis. However, the use of a unique cohort of 171 cases represents a relevant limitation of this study such that conclusions have to be taken with caution. Moreover, the widely used RNU6B as a housekeeping gene for data normalization could represent another limitation since its expression was shown to be unstable [36]. Therefore, further validation in forthcoming studies including independent large cohorts, as well as several internal controls, would be required to validate our observations and establish the potential usefulness of this novel biomarker in the clinical routine for early-stage CRC patients.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/2077-0383/9/8/2419/s1. Figure S1: Clinical impact of miR-199b over time to metastasis. Figure S2: Kaplan–Meier analyses for miR-199b expression in the cohort of 157 CRC cases stratified by stage. Figure S3: Clinical significance of SET in the cohort of 157 early-stage CRC patients. (a) Immunohistochemical images of SET in LARC patients representing low,

medium, and high staining. The line shows 25 μm . Original magnification 400 \times . (b) Kaplan–Meier analyses for SET expression in early-stage CRC patients. Table S1: Clinical and molecular characteristics of a series of 171 CRC patients without metastatic disease at diagnosis. Table S2: Association between miR-199b and progression (local or distant) in 171 stage I–III CRC patients. Table S3: Univariate and multivariate Cox analyses in the cohort of 157 patients with early-stage CRC.

Author Contributions: Conceptualization, I.C. and J.G.-F.; methodology, I.C., J.R., A.S., S.Z., and B.T.; software, J.R. and R.A.; formal analysis, I.C., M.L., and M.S.-A.; investigation, I.C., J.R., and A.S.; writing—original draft preparation, I.C. and C.C.; writing—review and editing, J.M.-G. and F.R.; funding acquisition, F.R. and J.G.-F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by PI18/00382 and PI16/01468 grants from “Instituto de Salud Carlos III FEDER.”

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Jemal, A.; Bray, F.; Center, M.M.; Ferlay, J.; Ward, E.; Forman, D. Global cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* **2011**, *61*, 69–90.
- Lermos, C.; Sack, U.; Schmid, F.; Juneja, M.; Stein, U. Anti-metastatic treatment in colorectal cancer: Targeting signaling pathways. *Curr. Pharm. Des.* **2013**, *19*, 841–863.
- Gill, S.; Blackstock, A.W.; Goldberg, R.M. Colorectal cancer. *Mayo Clin. Proc.* **2007**, *82*, 114–129.
- Lombardi, L.; Morelli, F.; Cinieri, S.; Santini, D.; Silvestris, N.; Fazio, N.; Orlando, L.; Tonini, G.; Colucci, G.; Maiello, E. Adjuvant colon cancer chemotherapy: Where we are and where we’ll go. *Cancer Treat. Rev.* **2010**, *36*, S34–S41.
- Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Fedewa, S.A.; Ahnen, D.J.; Meester, R.G.S.; Barzi, A.; Jemal, A. Colorectal cancer statistics, 2017. *CA Cancer J. Clin.* **2017**, *67*, 177–193.
- Engstrand, J.; Nilsson, H.; Strömberg, C.; Jonas, E.; Freedman, J. Colorectal Cancer Liver Metastases—A Population-Based Study on Incidence, Management and Survival. *BMC Cancer* **2018**, *18*, 78.
- Ewing, I.; Hurley, J.J.; Josephides, E.; Millar, A. The molecular genetics of colorectal cancer. *Frontline Gastroenterol.* **2014**, *5*, 26–30.
- Kong, Y.W.; Ferland-McCollough, D.; Jackson, T.J.; Bushell, M. MicroRNAs in cancer management. *Lancet Oncol.* **2012**, *13*, e249–e258.
- Favreau, A.J.; Cross, E.L.; Sathyanarayana, P. miR-199b-5p directly targets PODXL and DDR1 and decreased levels of miR-199b-5p correlate with elevated expressions of PODXL and DDR1 in acute myeloid leukemia. *Am. J. Hematol.* **2012**, *87*, 442–446.
- Torres, A.; Torres, K.; Pesci, A.; Ceccaroni, M.; Paszkowski, T.; Cassandrini, P.; Zamboni, G.; Maciejewski, R. Deregulation of miR-100, miR-99a and miR-199b in tissues and plasma coexists with increased expression of mTOR kinase in endometrioid endometrial carcinoma. *BMC Cancer* **2012**, *12*, 369.
- Fang, C.; Zhao, Y.; Guo, B. MiR-199b-5p targets HER2 in breast cancer cells. *J. Cell Biochem.* **2013**, *114*, 1457–1463.
- Shang, W.; Chen, X.; Nie, L.; Xu, M.; Chen, N.; Zeng, H.; Zhou, Q. MiR199b suppresses expression of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) in prostate cancer cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 8422–8436.
- Liu, M.X.; Siu, M.K.; Liu, S.S.; Yam, J.W.; Ngan, H.Y.; Chan, D.W. Epigenetic silencing of microRNA-199b-5p is associated with acquired chemoresistance via activation of JAG1-Notch1 signaling in ovarian cancer. *Oncotarget* **2014**, *5*, 944–958.
- Joshi, D.; Chandrakala, S.; Korgaonkar, S.; Ghosh, K.; Vundinti, B.R. Down-regulation of miR-199b associated with imatinib drug resistance in 9q34.1 deleted BCR/ABL positive CML patients. *Gene* **2014**, *542*, 109–112.
- Sousa, L.O.; Sobral, L.M.; Matsumoto, C.S.; Saggiaro, F.P.; López, R.V.; Panepucci, R.A.; Curti, C.; Silva, W.A., Jr.; Greene, L.J.; Leopoldino, A.M. Lymph node or perineural invasion is associated with low miR-15a, miR-34c and miR-199b levels in head and neck squamous cell carcinoma. *BBA Clin.* **2016**, *6*, 159–164.
- Zhou, S.J.; Liu, F.Y.; Zhang, A.H.; Liang, H.F.; Wang, Y.; Ma, R.; Jiang, Y.H.; Sun, N.F. MicroRNA-199b-5p attenuates TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Br. J. Cancer* **2017**, *117*, 233–244.
- Lai, Y.; Quan, J.; Lin, C.; Li, H.; Hu, J.; Chen, P.; Xu, J.; Guan, X.; Xu, W.; Lai, Y.; et al. miR-199b-5p serves as a tumor suppressor in renal cell carcinoma. *Exp. Ther. Med.* **2018**, *16*, 436–444.

18. Wu, A.; Chen, Y.; Liu, Y.; Lai, Y.; Liu, D. miR-199b-5p inhibits triple negative breast cancer cell proliferation, migration and invasion by targeting DDR1. *Oncol. Lett.* **2018**, *16*, 4889–4896.
19. Li, G.L.; Yuan, J.H.; Zhuang, G.D.; Wu, D.Q. miR-199b exerts tumor suppressive functions in hepatocellular carcinoma by directly targeting JAG1. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2018**, *22*, 7679–7687.
20. Shen, Z.L.; Wang, B.; Jiang, K.W.; Ye, C.X.; Cheng, C.; Yan, Y.C.; Zhang, J.Z.; Yang, Y.; Gao, Z.D.; Ye, Y.J.; et al. Downregulation of miR-199b is associated with distant metastasis in colorectal cancer via activation of SIRT1 and inhibition of CREB/KISS1 signaling. *Oncotarget* **2016**, *7*, 35092–35105.
21. Chen, L.Y.; Zhi, Z.; Wang, L.; Zhao, Y.Y.; Deng, M.; Liu, Y.H.; Qin, Y.; Tian, M.M.; Liu, Y.; Shen, T.; et al. NSD2 circular RNA promotes metastasis of colorectal cancer by targeting miR-199b-5p-mediated DDR1 and JAG1 signalling. *J. Pathol.* **2019**, *248*, 103–115.
22. Chao, A.; Tsai, C.L.; Wei, P.C.; Hsueh, S.; Chao, A.S.; Wang, C.J.; Tsai, C.N.; Lee, Y.S.; Wang, T.H.; Lai, C.H. Decreased expression of microRNA-199b increases protein levels of SET (protein phosphatase 2A inhibitor) in human choriocarcinoma. *Cancer Lett.* **2010**, *291*, 99–107.
23. Cristóbal, I.; Caramés, C.; Rincón, R.; Manso, R.; Madoz-Gúrpide, J.; Torrejón, B.; González-Alonso, P.; Rojo, F.; García-Foncillas, J. Downregulation of microRNA-199b predicts unfavorable prognosis and emerges as a novel therapeutic target which contributes to PP2A inhibition in metastatic colorectal cancer. *Oncotarget* **2017**, *8*, 40169–40180.
24. Baek, D.W.; Kim, G.; Kang, B.W.; Kim, H.J.; Park, S.Y.; Park, J.S.; Choi, G.S.; Kang, M.K.; Hur, K.; Kim, J.G. High expression of microRNA-199a-5p is associated with superior clinical outcomes in patients with locally advanced rectal cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2020**, *146*, 105–115.
25. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408.
26. McShane, L.M.; Altman, D.G.; Sauerbrei, W.; Taube, S.E.; Gion, M.; Clarck, G.M. Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 9067–9072.
27. Jin, H.; Jang, Y.; Cheng, N.; Li, Q.; Cui, P.F.; Zhou, Z.W.; Jiang, H.L.; Cho, M.H.; Westover, K.D.; Tan, Q.Y.; et al. Restoration of mutant K-Ras repressed miR-199b inhibits K-Ras mutant non-small cell lung cancer progression. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2019**, *38*, 165.
28. Wang, C.; Song, B.; Song, W.; Liu, J.; Sun, A.; Wu, D.; Yu, H.; Lian, J.; Chen, L.; Han, J. Underexpressed microRNA-199b-5p targets hypoxia-inducible factor-1 α in hepatocellular carcinoma and predicts prognosis of hepatocellular carcinoma patients. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2011**, *26*, 1630–1637.
29. Favreau, A.J.; McGlaflin, R.E.; Duarte, C.W.; Sathyanarayana, P. miR-199b, a novel tumor suppressor miRNA in acute myeloid leukemia with prognostic implications. *Exp. Hematol. Oncol.* **2016**, *5*, 4.
30. Fang, C.; Wang, F.B.; Li, Y.; Zeng, X.T. Down-regulation of miR-199b-5p is correlated with poor prognosis for breast cancer patients. *Biomed. Pharmacother.* **2016**, *84*, 1189–1193.
31. Sakaguchi, T.; Yoshino, H.; Yonemori, M.; Miyamoto, K.; Sugita, S.; Matsushita, R.; Itesako, T.; Tatarano, S.; Nakagawa, M.; Enokida, H. Regulation of ITGA3 by the dual-stranded microRNA-199 family as a potential prognostic marker in bladder cancer. *Br. J. Cancer* **2017**, *116*, 1077–1087.
32. Cristóbal, I.; Rubio, J.; Santos, A.; Torrejón, B.; Caramés, C.; Imedio, L.; Mariblanca, S.; Luque, M.; Sanz-Alvarez, M.; Zazo, S.; et al. MicroRNA-199b Downregulation Confers Resistance to 5-Fluorouracil Treatment and Predicts Poor Outcome and Response to Neoadjuvant Chemoradiotherapy in Locally Advanced Rectal Cancer Patients. *Cancers* **2020**, *12*, 1655.
33. Cristóbal, I.; Torrejón, B.; Rubio, J.; Santos, A.; Pedregal, M.; Caramés, C.; Zazo, S.; Luque, M.; Sanz-Alvarez, M.; Madoz-Gúrpide, J.; et al. Deregulation of SET is Associated with Tumor Progression and Predicts Adverse Outcome in Patients with Early-Stage Colorectal Cancer. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 346.
34. Chen, W.J.; Xiong, L.; Yang, L.; Yang, L.J.; Li, L.; Huang, L.; Liang, X.Q.; Xue, J.; Tan, B.Z. Long Non-Coding RNA LINC01783 Promotes the Progression of Cervical Cancer by Sponging miR-199b-5p to Mediate GBP1 Expression. *Cancer Manag. Res.* **2020**, *12*, 363–373.

35. Peng, W.; He, D.; Shan, B.; Wang, J.; Shi, W.; Zhao, W.; Peng, Z.; Luo, Q.; Duan, M.; Li, B.; et al. LINC81507 act as a competing endogenous RNA of miR-199b-5p to facilitate NSCLC proliferation and metastasis via regulating the CAV1/STAT3 pathway. *Cell Death Dis.* **2019**, *10*, 1–15.
36. DAS, M.K.; Andreassen, R.; Haugen, T.B.; Furu, K. Identification of Endogenous Controls for Use in miRNA Quantification in Human Cancer Cell Lines. *Cancer Genom. Proteom.* **2016**, *13*, 63–68.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Table S1. Clinical and molecular characteristics of a series of 171 CRC patients without metastatic disease at diagnosis.

		No. (%)	
Sex			
	Male	107	(62.6)
	Female	64	(37.4)
Age			
	<70	62	(36.9)
	≥70	106	(63.1)
ECOG			
	0-1	157	(93.5)
	2-3	11	(6.5)
T			
	1	3	(1.8)
	2	40	(23.4)
	3	108	(63.1)
	4	19	(11.1)
	x	1	(0.6)
N			
	0	82	(48)
	1	46	(26.9)
	2	30	(17.5)
	x	13	(7.6)
Stage			
	I	31	(18.1)
	II	51	(29.8)
	III	89	(52.1)
Site of primary tumor			
	Colon	123	(71.9)
	Rectum	43	(28.1)
Metachronous metastasis			
	No	127	(74.3)
	Yes	44	(25.7)

CRC, colorectal cancer.

Table S2. Association between miR-199b and progression (local or distant) in 171 stage I-III CRC patients.

Stage I	No. Cases	High miR-199b (%)		Low miR-199b (%)		p
Progression	31	27		4		0.605
No	26	23	(88.5)	3	(11.5)	
Yes	5	4	(80)	1	(20)	
Stage II	No. Cases	High miR-199b (%)		Low miR-199b (%)		p
Progression	51	37		14		0.663
No	42	31	(73.8)	11	(26.2)	
Yes	9	6	(66.7)	3	(33.3)	
Stage III	No. Cases	High miR-199b (%)		Low miR-199b (%)		p
Progression	89	70		19		0.609
No	56	45	(80.4)	11	(19.6)	
Yes	33	25	(75.8)	8	(24.2)	

Table S3. Univariate and multivariate Cox analyses in the cohort of 157 patients with early-stage CRC.

	Univariate PFS Analysis			Multivariate PFS Cox Analysis				
	HR	95% CI Lower Upper		Significance	HR	95% CI Lower Upper		Significance
Gender				0.210				-
Male	1.000							
Female	0.729	0.445 to 1.195			-	-		
Age				0.007				0.009
<70	1.000				1.000			
≥70	2.145	1.235 to 3.726			2.254	1.220 to 4.165		
Stage				0.005				0.037
I-II	1.000				1.000			
III	2.028	1.243 to 3.309			1.887	1.040 to 3.423		
ECOG				<0.001				<0.001
0-1	1.000				1.000			
2-3	2.232	1.466 to 3.181			1.976	1.352 to 2.889		
T				0.542				-
1-2	1.000							
>2	1.089	0.828 to 1.431			-	-		
N				0.084				-
0-1	1.000							
2-x	1.569	0.941 to 2.618			-	-		
SET				0.017				0.014
Low	1.000				1.000			
High	2.111	1.142 to 3.902			2.270	1.182 to 4.359		
MiR-199b				0.016				0.023
Low	1.000				1.000			
High	0.535	0.320 to 0.892			0.519	0.295 to 0.913		

PFS: progression-free survival; CI: confidence interval, HR: hazard-ratio.

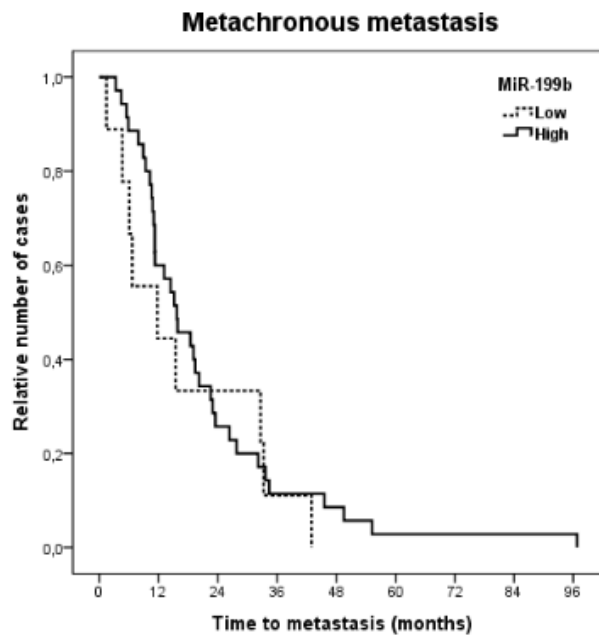


Figure S1. Clinical impact of miR-199b over time to metastasis.

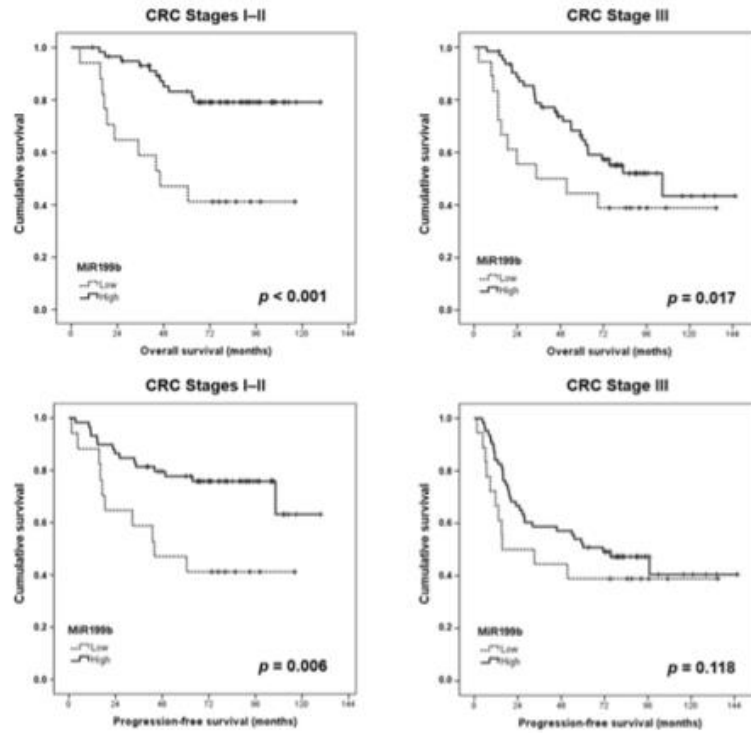
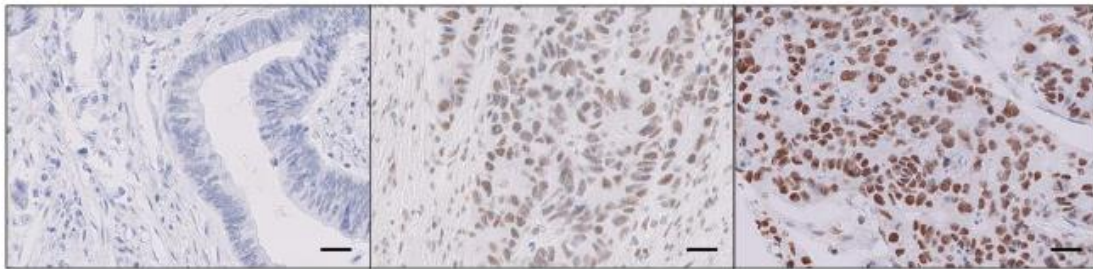
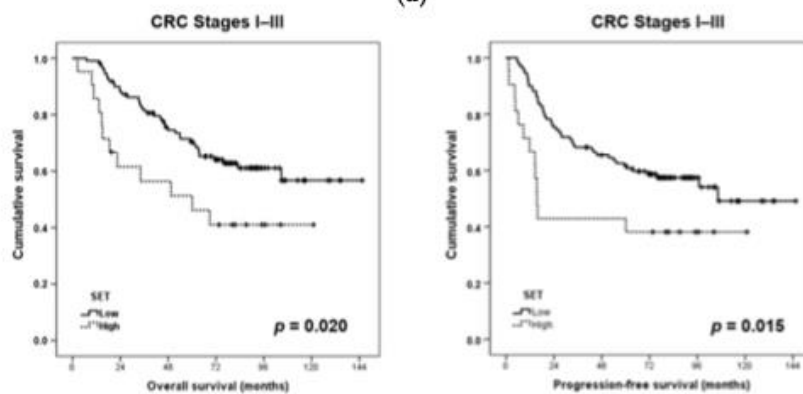


Figure S2. Kaplan–Meier analyses for miR-199b expression in the cohort of 157 CRC cases stratified by stage. CRC, colorectal cancer.



(a)



(b)

Figure S3. Clinical significance of SET in the cohort of 157 early-stage CRC patients. (a) Immunohistochemical images of SET in LARC patients representing low, medium, and high staining. The line shows 25 μ m. Original magnification 400 \times . (b) Kaplan–Meier analyses for SET expression in early-stage CRC patients. SET, SET Nuclear Proto-Oncogene; LARC, locally advanced rectal cancer.

Artículo 3 - MicroRNA-199b Downregulation Confers Resistance to 5-Fluorouracil Treatment and Predicts Poor Outcome and Response to Neoadjuvant Chemoradiotherapy in Locally Advanced Rectal Cancer Patients

En el CRLA el tratamiento estándar actualmente es quimioterapia neoadyuvante basada en 5-FU y concurrente con radioterapia, seguido de la escisión mesorrectal total. Hay aproximadamente un 30% de los pacientes que no se benefician de este abordaje ya que sus tumores son quimiorradioresistentes y esto supone un problema ya que no se dispone de biomarcadores predictivos de respuesta para seleccionar aquellos pacientes que no responderán a este esquema de tratamiento. Dado que nuestro grupo había demostrado en trabajos anteriores que el miR-199b es capaz de modular la sensibilidad a 5-FU a través de la inhibición de SET, nos planteamos que podría ser un marcador de gran impacto clínico para predecir respuesta a terapia neoadyuvante en pacientes con CRLA.

A nivel funcional, realizamos estudios in vitro de sensibilidad a 5-FU mediante una modulación ectópica de los niveles de expresión del miR-199b, observando que incrementa la sensibilidad a los tratamientos de manera dependiente de su actividad reguladora sobre SET, y que es capaz de revertir la resistencia en un modelo de resistencia adquirida a 5-FU. Además, se cuantificó su expresión mediante PCR en tiempo real en una cohorte de 110 pacientes con CRLA para evaluar su posible importancia clínica.

Pudimos observar en nuestra serie de pacientes unos niveles bajos de expresión del miR-199b en el 26,4% de los casos, así como una asociación de dicha alteración con mayor tamaño tumoral ($p=0.015$), persistencia de afectación ganglionar tras la quimiorradioterapia ($p = 0,006$) y con un estadio patológico más alto ($p=0,029$). Además bajos niveles del miR-199b determinaron una peor SG y supervivencia libre de eventos, y demostró en análisis multivariados ser un marcador independiente de mala respuesta al tratamiento quimiorradioterápico ($p = 0,004$).

En conclusión, nuestros hallazgos destacan el impacto clínico del miR-199b así como la potencial utilidad del eje miR-199b/SET en CRLA como nueva diana molecular para revertir la resistencia al 5-FU en el subgrupo de pacientes de mal pronóstico.

Aportación del doctorando

En este trabajo mi aportación se centró en el diseño y contextualización clínica del estudio, y a nivel experimental colaboré con los cultivos celulares y ensayos de sensibilidad a 5-FU, y elaboré la base de datos de pacientes tratados con QTRT en nuestro centro los últimos años. Además, colaboré en la recopilación de muestras y extracciones de ARN. Participé también en el análisis preliminar de datos con SPSS.

Article

MicroRNA-199b Downregulation Confers Resistance to 5-Fluorouracil Treatment and Predicts Poor Outcome and Response to Neoadjuvant Chemoradiotherapy in Locally Advanced Rectal Cancer Patients

Ion Cristóbal ^{1,2,*}, Jaime Rubio ^{1,3,†}, Andrea Santos ^{1,2}, Blanca Torrejón ^{1,2}, Cristina Caramés ^{1,3}, Laura Imedio ^{1,2}, Sofía Mariblanca ^{1,2}, Melani Luque ⁴, Marta Sanz-Alvarez ⁴, Sandra Zazo ⁴, Juan Madoz-Gúrpide ⁴, Federico Rojo ⁴ and Jesús García-Foncillas ^{2,3,*}

¹ Cancer Unit for Research on Novel Therapeutic Targets, Oncohealth Institute, IIS- Fundación Jiménez Díaz-UAM, E-28040 Madrid, Spain; jaime.rubiop@quironsalud.es (J.R.); andreasantos.asc@gmail.com (A.S.); blanca.torreonmoreno@gmail.com (B.T.); ccarames@fjd.es (C.C.); lauraimedio@gmail.com (L.I.); sofiamariblanca18@gmail.com (S.M.)

² Translational Oncology Division, Oncohealth Institute, IIS-Fundación Jiménez Díaz-UAM, E-28040 Madrid, Spain

³ Medical Oncology Department, University Hospital “Fundación Jiménez Díaz”, UAM, E-28040 Madrid, Spain

⁴ Pathology Department, IIS-Fundación Jiménez Díaz-UAM, E-28040 Madrid, Spain; melani.luque@quironsalud.es (M.L.); marta.sanza@quironsalud.es (M.S.-A.); Szazo@fjd.es (S.Z.); jmadoz@fjd.es (J.M.-G.); frojo@fjd.es (F.R.)

* Correspondence: ion.cristobal@fjd.es (I.C.); jesus.garciafoncillas@oncohealth.eu (J.G.-F.); Tel.: +34-915504800 (I.C. & J.G.-F.)

† These authors have contributed equally to this work.

Received: 08 May 2020; Accepted: 18 June 2020; Published: 22 June 2020

Abstract: Neoadjuvant 5-fluorouracil (5-FU)-based chemoradiotherapy followed by mesorectal excision is the current standard treatment in locally advanced rectal cancer (LARC) and the lack of complete response represents a major problem that compromises long-term patient survival. However, there is a lack of robust established markers predictive of response to this preoperative treatment available in the clinical routine. The tumor suppressor microRNA (miR)-199b directly targets the PP2A inhibitor SET, which has been involved in 5-FU resistance, and its downregulation has been found to correlate with poor outcome in metastatic colorectal cancer. Here, we studied the functional effects of miR-199b on 5-FU sensitivity after its ectopic modulation, and its expression was quantified by real-time-PCR in a cohort of 110 LARC patients to evaluate its potential clinical significance. Interestingly, our findings demonstrate that miR-199b enhances the sensitivity of colorectal cancer cells to 5-FU in a SET-dependent manner, and that both miR-199b overexpression and SET inhibition are able to overcome resistance to this drug using an acquired 5-FU-resistant model. MiR-199b was found downregulated in 26.4% of cases and was associated with positive lymph node levels after chemoradiotherapy (CRT, $p = 0.007$) and high pathological stage ($p = 0.029$). Moreover, miR-199b downregulation determined shorter overall ($p = 0.003$) and event-free survival ($p = 0.005$), and was an independent predictor of poor response to preoperative CRT ($p = 0.004$). In conclusion, our findings highlight the clinical impact of miR-199b downregulation predicting poor outcome and pathological response in LARC, and suggest the miR-199b/SET signaling axis as a novel molecular target to prevent the development of resistance to 5-FU treatment.

Keywords: MiR-199b; SET; locally advanced rectal cancer; prognosis; pathological response

1. Introduction

Colorectal cancer (CRC) is a gastrointestinal cancer with the highest incidence rate and is the fourth leading cause of cancer-related death worldwide [1], with rectal cancer accounting for approximately 30% of all colorectal tumors [2]. The guidelines of the National Comprehensive Cancer Network recommend a multidisciplinary approach consisting of 5-fluorouracil (5-FU)-based preoperative CRT followed by total mesorectal excision (TME) surgery that represents the treatment of choice for locally advanced rectal cancer (LARC) [3,4]. Although 5-FU is more used, the oral 5-FU prodrug capecitabine has recently been defined as a useful alternative option [5]. This therapeutic regimen has improved the management of LARC patients and was established after several studies demonstrating that CRT before TME led to lower local recurrence rates than TME followed by adjuvant CRT or TME alone [6,7]. In addition, there is an increasing interest in a novel “watch and wait” approach where highly selected patients with a complete response after neoadjuvant CRT can escape surgery in order to improve their quality of life [8]. The pathological response after the introduction of preoperative CRT is of high clinical relevance since those patients who achieve a complete pathological response are expected to experience significantly improved long-term survival rates compared to others with residual tumor [9,10]. Unfortunately, distant metastases are developed in more than one-third of patients within 10 years from diagnosis and complete pathological response only occurs in less than 20% of cases [11]. The lack of effective biomarkers established in clinical practice able to predict pathological tumor response before treatment represents a major current limitation in LARC clinical management. Some postsurgical prognostic factors have been proposed [12,13], but only limited data about potential markers of response to preoperative CRT have been reported to date [14–16]. Therefore, the identification of patients who have a higher possibility of responding to preoperative CRT would be of high relevance in order to improve patient outcomes, reduce both treatment morbidity and delays in the resection of the primary tumor, and allow potential nonresponders to receive alternative therapeutic strategies.

MicroRNAs (miRs) are small noncoding single-stranded RNAs that post-transcriptionally inhibit specific target genes. MiRs have been largely reported to play key roles in human cancer, and they can act as oncogenes or tumor suppressors depending on their targets [17]. Due to the ability to be easily detected in both tumor tissue and blood, miRs have been proposed as promising markers with clinical impact in rectal cancer [18,19]. Despite the well-known role of miR-199b as a tumor suppressor in human cancer, only a limited number of studies have explored the role of miR-199b in CRC. This miR has been reported to contribute to CRC progression through the regulation of the SIRT1/CREB/KISS1 signaling pathway [20], and circNSD2 was found to target miR-199b in CRC cells thereby leading to DDR1/JAG1 activation and facilitating the development of metastatic disease [21]. SET is an endogenous inhibitor of the tumor suppressor PP2A [22]. SET has been reported to play oncogenic roles and be overexpressed in a large number of tumor types. In fact, its inhibition has been proposed as a novel anticancer strategy [23]. Our group reported that miR-199b directly targets SET leading to the activation of the tumor suppressor PP2A, and affects cell viability and oxaliplatin sensitivity in CRC cells. In addition, miR-199b downregulation was found as a frequent alteration predictive of poor outcome in metastatic CRC [24], and a very recent study has shown that high levels of both tissue and exosomal miR-199a/b could be associated with better response to CRT in LARC [25]. However, its potential clinical and therapeutic significance in this disease remains to be fully clarified.

In this study, we investigate the role of miR-199b determining resistance to 5-fluorouracil treatment and analyze its potential clinical impact in the subgroup of LARC patients. We observed that miR-199b enhances 5-FU antitumor properties in a SET-dependent manner, and that acquired resistance to 5-FU is overcome by ectopic expression of miR-199b, SET silencing or treatment with the SET inhibitor compound FTY720. To evaluate its clinical relevance, we quantified miR-199b in a

cohort of 110 LARC patients, observing that miR-199b downregulation is a common alteration that independently predicts poor outcome and pathological response to neoadjuvant chemoradiotherapy.

2. Experimental Section

2.1. Cell Cultures and Transfection

The human colorectal cancer cell lines SW480 (ATCC CCL-228) and HT-29 (ATCC HTB-38), were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Authentication was performed by the authors in all cases (LGC Standards). Cell lines were maintained in RPMI-1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) with 10% fetal bovine serum (FBS) and were grown at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. Media were supplemented with penicillin G (100 U/mL), and streptomycin (0.1 mg/mL). Cells were treated with 5-FU (Calbiochem, San Diego, CA, USA) and FTY720 (Calbiochem) at the indicated concentrations for each experimental condition. For transfection experiments, CRC cells were seeded in 6-well plates and transfected with 10 µL of Lipofectamine 2000 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and 2 µg of SET plasmidic vector, 75 nM of SET-specific siRNAs designed and synthesized by Dharmacon RNA Technologies or 20 nM of a miR-199b specific mirVana™ miRNA Mimic and Inhibitor (Ambion, Cambridge, UK). To generate 5-FU-resistant cells, SW480 cells were cultured in the presence of increasing doses of 5-FU (three subculturing doses per concentration), starting at 0.1 µM. In order to assess the evolution of resistance, we determined IC₅₀ after every 5-FU concentration point, by using an MTS assay (Promega, Madison, WI, USA) after 24 h of treatment. The resistance of every 5-FU-resistant clone was defined as the ratio between resistant and parental cells IC₅₀ values.

2.2. Patient Samples and Pathologic Response

We retrospectively selected and included in this study a total of 110 consecutive specimens from patients with a histological diagnosis of LARC who were treated with preoperative CRT between 2006 and 2014 at the University Hospital Fundación Jiménez Díaz, (Madrid, Spain). All cases had an accurate preoperative locoregional staging based on a magnetic resonance image (MRI) of the pelvis and/or transrectal ultrasound (TRUS). A full-body computed tomography scan (FBCTS) was carried out in all patients in order to exclude metastatic disease. The patients were treated with chemoradiotherapy regimens based on 5-FU and underwent surgery 6 to 8 weeks after neoadjuvant CRT completion. All participants gave written informed consent for tissue storage and analysis at Fundación Jiménez Díaz biobank, Madrid (Spain). The ethical committee institutional review board of Fundación Jiménez Díaz University Hospital reviewed and approved the project (2018/54).

All tumor specimens derived from the surgical resection were classified according to the College of American Pathologist guidelines for invasive carcinomas (TNM, 7th ed.). Two independent pathologists who were blinded to patient outcome evaluated tumor regression grade according to the modified Ryan classification that categorizes tumors into four levels of response: complete response, moderate response, minimal response and poor response. Complete response score 0 indicates no viable cancer cells; moderate score 1 indicates single cells or little groups of cancer cells; minimal score 2 indicates residual cancer outgrown by fibrosis; and poor response score 3 indicates minimal or no tumor kill with extensive residual cancer. According to clinical guidelines, every regression grade was compared with the primary tumor [26].

2.3. Nucleic Acid Isolation

Total RNA was isolated from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tumor biopsies, applying RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation kit Ambion (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) following manufacturer's instructions. Total RNA obtained was quantified using a NanoDrop Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

2.4. Quantification of miRNA Expression Levels

Total RNA was isolated using the RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation kit (Ambion) according to the manufacturer's instructions. Samples were reverse transcribed using the TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and mature miRNAs were quantified by quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) using TaqMan MicroRNA Assays (Applied Biosystems) specific for miR-199b (miR-199b-5p_000500) and U6B as an internal control. Reactions were carried out using an Applied Biosystems 7500 Sequence Detection System. Conditions: 95 °C for 10 min, followed by 45 cycles of 95 °C for 15 s, and 60 °C for 1 min. Analysis of relative gene expression data was performed using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [27], where $\Delta\Delta CT = (CT, \text{Target Gene-CT}, U6B) \text{ Tumor} - (CT, \text{Target Gene-CT}, U6B) \text{ Normal Control}$. As previously described [24], downregulation of miR-199b was considered when the expression in a sample was lower than the mean minus standard deviation (SD) of the patient cohort, corresponding to 0.266 fold change.

2.5. Cell Viability Assay

Cell proliferation was measured in triplicate wells by the MTS assay in 96-well plates using the CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega), according to the manufacturer's instructions.

2.6. Analysis of Caspase Activation

Quantification of caspase-3/7 activities was performed using the caspase Glo-3/7 assay kit (Promega Corp, Madison, WI, USA). Briefly, 5×10^3 cells were seeded in a black-walled 96-well plate, and the Z-DEVD reagent, the luminogenic caspase-3/7 substrate containing a tetrapeptide Asp-Glu-Val-Asp, was added with a 1:1 ratio of reagent to sample. After 90 min at room temperature, the substrate cleavage by activated caspase-3 and -7, and the intensity of a luminescent signal was measured by a FLUOstar OPTIMA luminometer (BMG Labtech, Cary, NC, USA). Differences in caspase-3/7 activity are expressed as fold change in luminescence.

2.7. Western Blot Analysis

Protein extracts were isolated using TRIzol Reagent (Invitrogen) following the manufacturer's indications, clarified ($12,000 \times g$, 15 min, 4 °C), denatured and subjected to SDS-PAGE and Western blot. Antibodies used were rabbit polyclonal anti-SET (Abcam, Cambridge, UK) and mouse monoclonal anti- β -actin (Sigma, St. Louis, MO, USA). Proteins were detected with the appropriate secondary antibodies conjugated to alkaline phosphatase (Sigma) by chemiluminescence using Tropix CSPD and Tropix Nitro Block II (Applied Biosystems).

2.8. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using SPSS 20 for windows (SPSS Inc, Chicago, IL USA). We applied the χ^2 test (Fisher exact test) based on the bimodal distribution of data to analyze the correlation between miR-199b downregulation and the clinical and pathological variables.

Overall survival (OS) was defined as the time from the date of diagnosis to the date of death or last follow-up. Event-free survival (EFS) was defined as the time from diagnosis until any primary, local or distant recurrence, death or last follow-up. Kaplan–Meier plots and survival comparisons were performed by means of a log-rank test if the proportional hazard assumption was fulfilled and Breslow otherwise. The Cox proportional hazards model was adjusted taking into consideration significant parameters in the univariate analysis. The cutoff point for miR-199b expression was determined as previously described [24]. This work was carried out in accordance with Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies (REMARK) guidelines [28]. Data represented for transfection experiments are mean of three independent experiments \pm s.d. Statistical comparisons were carried out by two-sided *t*-test analyses; $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. MiR-199b Sensitizes to 5-FU Treatment in a SET-Dependent Manner

To fully clarify the biological relevance of miR-199b regulating 5-FU efficacy, we first confirmed previous findings reporting that miR-199b overexpression enhances 5-FU antitumor effects. As expected, we observed that miR-199b overexpression significantly enhanced 5-FU-induced antitumor properties in both SW480 and HT-29 cells in comparison with those cells transfected with a negative control miRNA (Figure 1A). As the effects of miR-199b downregulation have not been previously reported we transfected both cell lines with a specific anti-miR-199b to further validate the observations overexpressing miR-199b. Interestingly, we observed a reduction in sensitivity to 5-FU in both cases (Figure 1B). These results confirm that miR-199b is involved in modulating the sensitivity of CRC to 5-FU treatment.

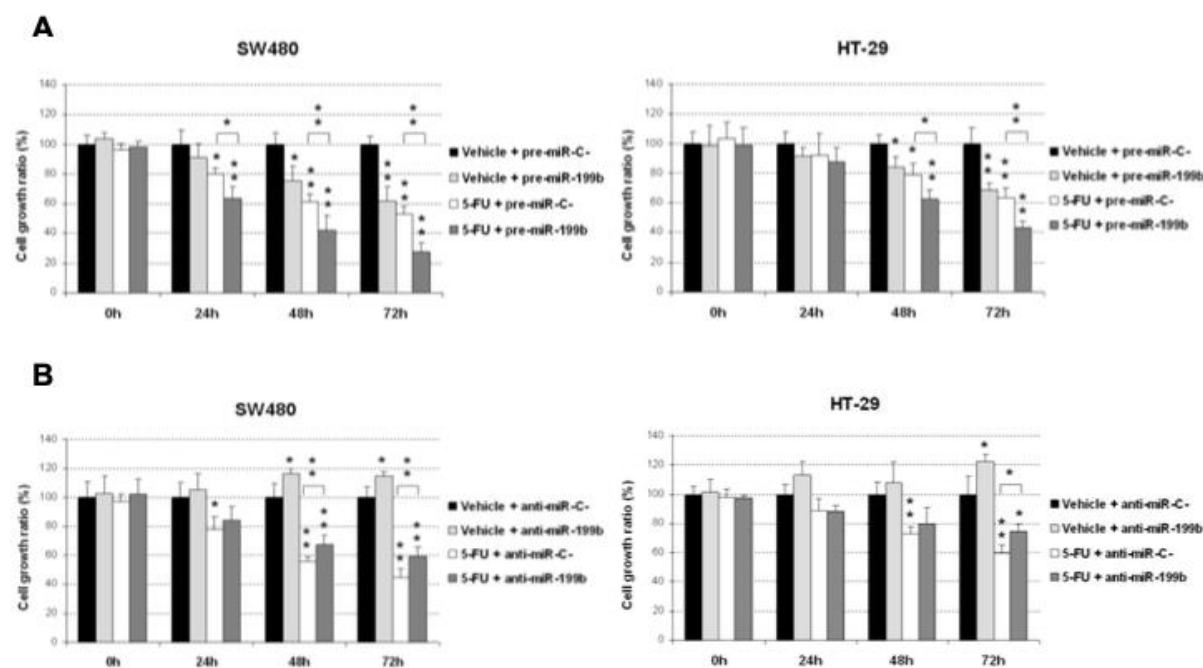


Figure 1. MiR-199b enhances sensibility to 5-fluorouracil (5-FU) treatment. MTS assay showing cell growth in SW480 and HT-29 cells treated with 5-FU (1 μ M) and transfected with (A) pre-miR-199b or (B) anti-miR-199b; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

As SET is a miR-199b target which has been previously described to play a key role in miR-199b-mediated oxaliplatin resensitization in metastatic CRC, we next analyzed the potential role of SET in the effects observed on 5-FU treatment after modulation of miR-199b expression. Interestingly, we observed that the ectopic expression of SET completely restored the enhanced 5-FU antitumor effects induced by miR-199b overexpression in SW480 cells in both cell growth and caspase-dependent apoptosis. However, when we silenced SET in SW480 cells ectopically expressing miR-199b, we observed that the cell growth reduction after 5-FU treatment was even greater. In concordance, both miR-199b expression and SET silencing markedly enhanced cell apoptosis (Figure 2A). Similar results were found in HT-29 cells (Figure 2B). Altogether, these results would indicate that SET regulation is a key event that mediates miR-199b-induced effects on 5-FU sensitivity.

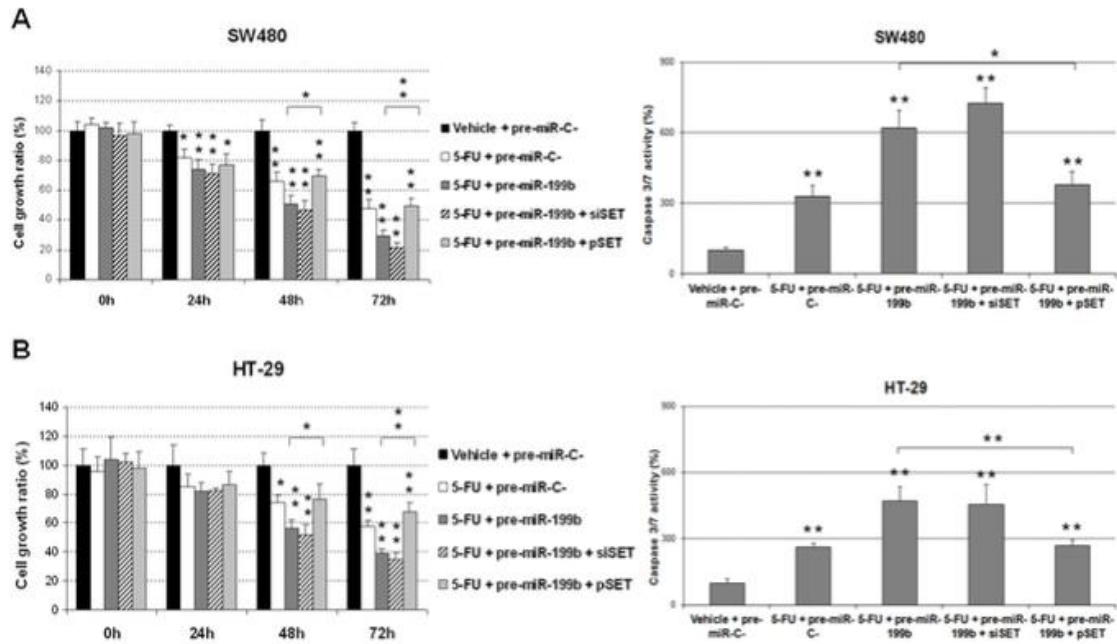


Figure 2. MTS and caspase 3/7 assays showing the effects of an ectopic SET modulation in miR-199b-dependent 5-FU resensitization in (A) SW480 and (B) HT-29 cells; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

3.2. The miR-199b/SET Axis Emerges as a Novel Target to Overcome 5-FU Resistance

To further explore the potential relevance of miR-199b in determining a 5-FU resistance phenotype, we treated SW480 and SW480R cells with different 5-FU concentrations (0.5 and 1 μM) for 72 h and observed that the ectopic expression of miR-199b resensitized SW480R cells to 5-FU at levels similar to SW480 cells (Figure 3).

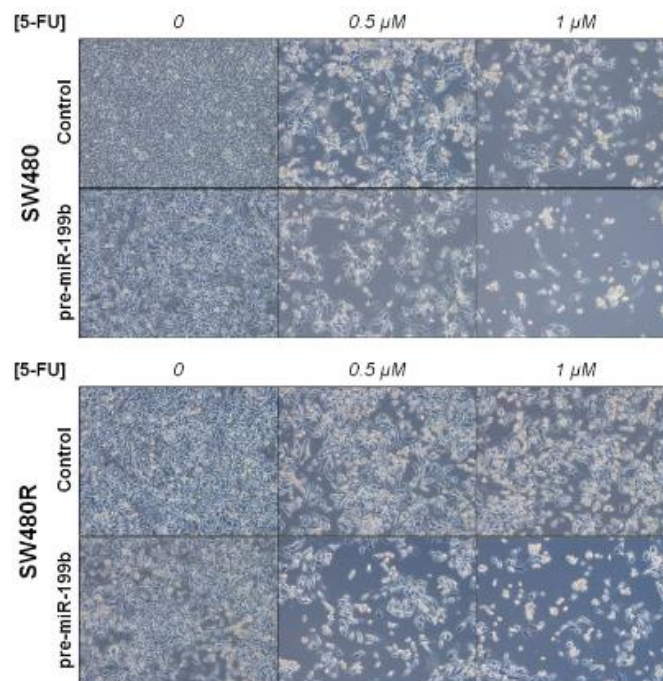


Figure 3. Optical microscope images (magnification $\times 100$) showing miR-199b-induced changes in cell viability after 5-FU treatment in SW480 and SW480R.

Next, we analyzed miR-199b levels in SW480 cells with acquired resistance to 5-FU treatment (SW480R), observing an almost three-fold decrease in miR-199b expression in these cells in

comparison with parental SW480 (5-FU-sensitive, Figure 4A). In concordance with these results, SW480R cells showed a marked increase in SET expression levels (Figure 4B). In order to investigate whether SET plays a role in determining miR-199b-dependent sensitivity to 5-FU treatment and its potential value as a novel target to overcome 5-FU resistance, we performed an MTS assay in SW480R cells treated with 5-FU. In concordance with our last observations, we found that miR-199b overexpression markedly resensitized SW480R cells to 5-FU. Moreover, we observed that both genomic and pharmacological SET inhibition had similar effects (Figure 4C). To further confirm these observations, caspase activation assays were carried out, observing that miR-199b overexpression and SET inhibition strongly enhanced 5-FU-induced cell apoptosis in SW480R cells (Figure 4D). Two different siRNAs were used for SET silencing and similar effects were observed (Figure S1A). No differences were found between controls including pre-miR-C-, siRNA-C- and DMSO (Figure S1B). Altogether, these results appear to indicate that the miR-199b/SET signaling axis is involved in 5-FU resistance and emerges as a novel druggable target to overcome that resistance using compounds such as FTY720.

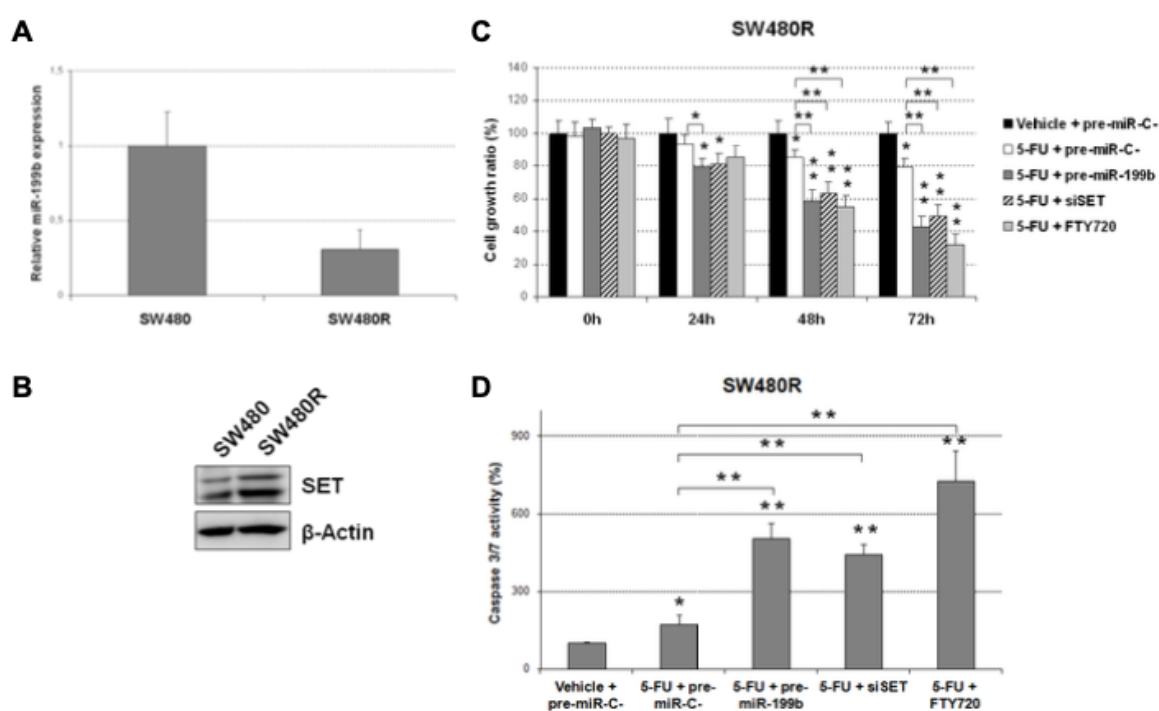


Figure 4. The miR-199b/SET axis is involved in 5-FU resistance. (A) Real-time PCR showing relative miR-199b expression in SW480 and SW480R cells; (B) Western blot analysis of SET expression in SW480 and SW480R cells; (C) MTS assay and (D) caspase 3/7 assay showing effects of miR-199b overexpression or SET inhibition in SW480R cells treated with 5-FU (1 μ M); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Detailed information about western blot can be found in Figure S2.

3.3. Prevalence of miR-199b Downregulation and Its Association with Molecular and Clinical Parameters

To study the prevalence and clinical relevance of miR-199b, we quantified the expression of this miR in a cohort of 110 LARC patients, observing miR-199b downregulation in 26.4% of cases (29 out of 110). Patient characteristics are shown in Table S1. Next, we analyzed the association of low miR-199b levels with clinical and molecular characteristics in 82 LARC patients from our cohort with clinical follow-up data available. MiR-199b downregulation correlated with positive lymph node levels after CRT ($p = 0.007$) and high pathological stage ($p = 0.029$). Moreover, patients with low

miR-199b levels had higher tumor size after CRT, however, statistical significance was not achieved ($p = 0.143$). The association between miR-199b expression and molecular and clinical parameters are included in Table 1.

Table 1. Association between miR-199b and clinical and molecular parameters in 82 locally advanced rectal cancer (LARC) patients.

Parameters	No. Cases	No. miR-199b High (%)	No. miR-199 Low (%)	<i>p</i>
MiR-199b	82	58 (70.7)	24 (29.3)	
Age	82	58	24	0.407
< 70	42	28 (48.3)	14 (58.3)	
≥ 70	40	30 (51.7)	10 (41.7)	
ECOG¹	82	58	24	0.370
0	52	35 (60.3)	17 (70.8)	
1–2	30	23 (39.7)	7 (29.2)	
Clinical Stage Pre-CRT²	82	58	24	0.638
II	5	4 (6.9)	1 (4.2)	
III	77	54 (93.1)	23 (95.8)	
Grade Pre-CRT	73	50	23	0.185
Low	21	12 (24)	9 (39.1)	
Moderate-High	52	38 (76)	14 (60.9)	
ypT³	82	58	24	0.143
0	11	10 (17.2)	1 (4.2)	
1	11	10 (17.2)	1 (4.2)	
2	26	16 (27.6)	10 (41.6)	
3	27	19 (32.8)	8 (33.4)	
4	4	2 (3.4)	2 (8.3)	
x	3	1 (1.8)	2 (8.3)	
ypN⁴	82	58	24	0.007
N0	64	50 (86.2)	14 (58.3)	
N1	14	5 (8.6)	9 (37.5)	
N2	4	3 (5.2)	1 (4.2)	
Pathological Stage	82	58	24	0.029
yp0	11	10 (17.2)	1 (4.2)	
ypI	32	25 (43.1)	7 (29.2)	
ypII	21	15 (25.9)	6 (25)	
ypIII	18	8 (13.8)	10 (41.6)	

¹ ECOG = Eastern Cooperative Oncology Group; ² CRT = chemoradiotherapy; ³ ypT = tumor size after CRT; ⁴ ypN = pathological lymph node after CRT.

Since we observed differences in both tumor size and lymph node positivity between high and low miR-199b expression, we next analyzed which patient subgroups are different. We observed that those cases with low tumor size ($p = 0.015$) and lack of lymph nodes ($p = 0.006$) significantly associated with miR-199b downregulation (Table S2).

3.4. MiR-199b Predicts Pathological Response to Neoadjuvant CRT in Locally Advanced Rectal Cancer

To investigate the potential predictive value of response to preoperative CRT of miR-199b, we grouped our patient cohort into responders and nonresponders. Interestingly, we observed that low miR-199b expression is strongly associated with a lack of response (70.8% vs. 34.5%, $p = 0.004$, Table 2). In concordance with these observations, low miR-199b expression significantly associated with a lack of downgrading when we compared the grade pre and post-CRT in 60 cases with clinical data available (Table S3).

Table 2. Association between miR-199b expression levels and pathological response to neoadjuvant CRT in LARC patients.

MiR-199b Expression	Responders vs. Nonresponders			
	No. Cases	MiR-199b Low (%)	MiR-199b High (%)	<i>p</i>
Response	82	24	58	0.004
Nonresponse ¹	37	17 (70.8)	20 (34.5)	
Response ²	45	7 (29.2)	38 (65.5)	

¹ Nonresponse: poor or minimal pathological response; ² Response: moderate or complete pathological response.

Furthermore, we quantified SET by RT-PCR in 76 out of 82 cases with enough material available. We found SET overexpressed in 22.4% of cases and significantly correlated with low miR-199b expression ($p = 0.004$, Table S4) and lack of response to neoadjuvant CRT ($p = 0.015$, Table S5). To further confirm the inverse correlation between SET and miR-199b expression, we analyzed SET by immunohistochemistry in a set of 20 LARC cases, observing SET overexpression associated with those patients with low miR-199b levels (Figure 5A and Table S6).

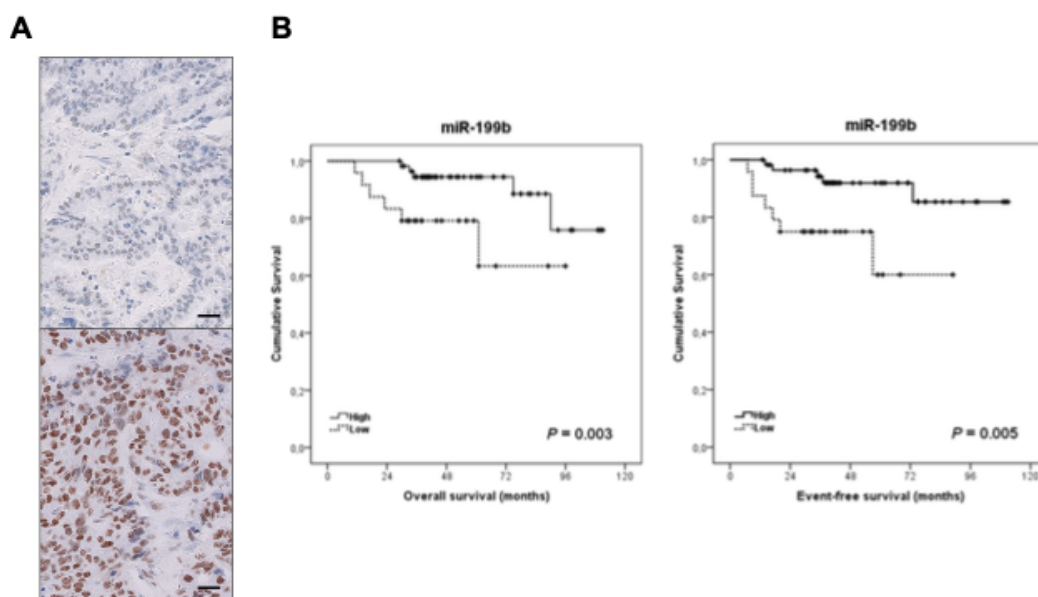


Figure 5. Clinical significance of the miR-199b/SET axis in LARC. (A) Immunohistochemical detection of SET in LARC patients showing SET-negative and positive stainings. The line shows 25 μm . Original magnification $\times 400$; (B) Kaplan–Meier analyses for miR-199b expression in LARC patients.

Notably, multivariate analysis demonstrated that preoperative miR-199b expression is an independent predictor of response to neoadjuvant CRT in our cohort of LARC patients ($p = 0.004$, Table 3).

Table 3. Univariate and multivariate logistic analyses for pathological response in 82 LARC patients.

Response ¹ vs. Nonresponse ²	Univariate Analysis				Multivariate Analysis			
	OR ⁴	95% CI ³		p	HR	95% CI		p
		Lower	Upper			Lower	Upper	
Age				0.192				0.095
< 70	1.000				1.000			
≥ 70	1.796	0.746	4.327		2.275	0.868	5.968	
Gender				0.193				-
Male	1.000							
Female	0.549	0.222	1.354		-	-		
Clinical Stage				0.551				-
II	1.000							
III	1.307	0.543	3.144		-	-		
Grade Pre-CRT ⁵				0.605				-
Low	1.000							
Moderate-High	1.185	0.623	2.252		-	-		
ECOG ⁶				0.501				-
0	1.000							
1–2	1.364	0.553	3.363		-	-		
MiR-199b				0.004				0.002
High	1.000				1.000			
Low	4.614	1.642	11.969		5.332	1.813	13.679	

¹ Response: moderate or complete pathological response; ² Nonresponse: poor or minimal pathological response; ³ CI: confidence interval; ⁴ OR: odds ratio; ⁵ CRT: chemoradiotherapy; ⁶ ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group.

3.5. Clinical Significance of miR-199b Downregulation in Locally Advanced Rectal Cancer

To further investigate the impact of miR-199b in LARC, we next analyzed its potential value predicting clinical outcome. For survival analyses we included those 82 LARC cases with clinical follow-up data available, 49 were male and 33 female, with a median of age of 69 years (range: 46–85). Interestingly, we found that the subgroup of patients with low miR-199b had a substantially shorter OS (59 vs. 94 months, $p = 0.003$) and EFS (65 vs. 102 months, $p = 0.005$, Figure 5B).

Interestingly, multivariate analysis demonstrated that low miR-199b levels are an unfavorable independent factor associated with both OS and EFS in our cohort (Table 4 and Table S7).

Table 4. Univariate and multivariate Cox analyses in the cohort of 82 LARC patients.

Parameters	Univariate OS ¹ Analysis				Multivariate OS Cox Analysis			
	HR ³	95% CI ²		p	HR	95% CI		p
		Lower	Upper			Lower	Upper	
Age				0.261				0.184
< 70	1.000				1.000			
≥ 70	1.914	0.617	5.937		2.249	0.680	7.436	
Pathological Stage				0.206				-
0–I	1.000							
II–III	2.063	0.672	6.632		-	-		
ypT ⁴				0.204				-
0–2	1.000							
3–4	1.274	0.877	1.850		-	-		
ypN ⁵				0.048				0.108
N-	1.000				1.000			
N+	3.336	1.011	11.005		2.243	0.861	4.544	
ECOG ⁶				0.434				-
0	1.000							
1–2	1.549	0.518	4.632		-	-		
MiR-199b				0.014				0.040
High	1.000				1.000			
Low	4.036	1.328	12.261		3.478	1.059	11.425	

¹ OS: overall survival; ² CI: confidence interval; ³ HR: hazard ratio; ⁴ ypT: tumor size after chemoradiotherapy (CRT); ⁵ ypN: pathological lymph node after CRT; ⁶ ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group.

4. Discussion

There is an urgent need to establish robust markers predictive of response to neoadjuvant CRT in LARC. Although some gene signatures and specific miR profiles have shown potential prognostic value, none of them have been well-validated and incorporated in the clinical routine [15,19]. We previously reported that miR-199b deregulation is a common alteration in metastatic CRC and demonstrated that the PP2A inhibitor SET is a direct target of this miR [24]. PP2A is a key tumor suppressor in human cancer due to its regulatory role in signaling pathways crucial for the tumor cells [29,30]. Several studies have shown the high relevance of PP2A inhibition in CRC [31,32], and the overexpression of its endogenous inhibitor SET [22] as a primary alteration to inactivate PP2A in this disease [33]. Our group reported that SET overexpression induces cell growth and decreases the sensitivity of CRC cells to standard chemotherapeutic agents such as oxaliplatin and 5-FU. As expected with the reported role of SET modulating sensitivity of CRC cells to oxaliplatin and 5-FU [33], miR-199b was found to also increase the effects of both treatments [24]. Considering that preoperative CRT regimens in LARC are based on 5-FU, we hypothesized that this miR could have a potential clinical and therapeutic impact on this disease. Thus, our results in Figure 1A are concordant with previous observations indicating that miR-199b overexpression sensitizes CRC cells to 5-FU treatment [24]. Moreover, we also used a specific anti-miR-199b, observing an expected reduction in the 5-FU antitumor effects in both CRC cell lines tested (Figure 1B) which further confirmed the role of miR-199b modulating sensitivity to this drug. The fact that the observed effects with the anti-miR-199b were of less intensity is probably due to the fact that both SW480 and HT-29 cells have a low basal miR-199b expression. Next, we showed that miR-199b sensitizes to 5-FU in a SET-dependent manner (Figure 2), similarly to the observations previously reported with oxaliplatin [24]. In order to demonstrate the involvement of SET we ectopically overexpressed SET in miR-199b-expressing CRC cells using a plasmidic vector without the 3'UTR region and the specific miR-199b "seed region", which makes miR-199b unable to inhibit the ectopic SET. In these conditions, SET completely restored the miR-199b-induced effects demonstrating that this miR modulates 5-FU sensitivity at least partially through its target SET. However, we cannot claim other contributing targets in addition to SET and the total reversion could also be due to the high ectopic overexpression levels achieved. In fact, SIRT1 is another miR-199b target which has been shown to contribute to 5-FU resistance in CRC cells [34,35]. In addition, the enhanced effects after FTY720 treatment could be explained by additional antitumor effects to SET inhibition such as CIP2A downregulation [31] or by the fact that miR-199b overexpression does not lead to a total endogenous SET inhibition [36]. In order to demonstrate the potential therapeutic value of the miR-199b/SET axis, we generated an acquired resistant model of CRC cells to 5-FU observing that both miR-199b overexpression and genetic or pharmacologic SET inhibition are able to overcome 5-FU resistance (Figure 4), which suggests that these alterations could serve as novel targets for alternative therapeutic strategies in LARC patients with a lack of response to standard preoperative CRT. In fact, the use of SET antagonists such as FTY720 and OP449 have shown promising effects in SET-overexpressing human tumors and could be useful in LARC patients [37,38]. Previous findings have shown that miR-199b downregulation predicts poor outcome in metastatic CRC. Moreover, our group recently reported that miR-199b downregulation was significantly associated with SET overexpression in a set of 29 CRC patients without metastatic disease. Notably, seven out of 29 cases had SET overexpressed, and three out of those seven SET-overexpressing cases showed a concomitant miR-199b downregulation, which suggests that this alteration is a contributing mechanism to deregulate SET in early-stage CRC [39]. We observed here an inverse correlation between miR-199b and SET expression in LARC. We found low miR-199b levels in 10 out of 17 SET-overexpressing cases, which suggest the existence of additional mechanisms to deregulate SET in LARC. Moreover, both SET and miR-199b determined response to neoadjuvant CRT, highlighting the clinical impact of the miR-199b/SET axis in this disease. Although there is no current data about the potential prognostic value of miR-199b in early-stage CRC, our results showing that low miR-199b levels predict shorter OS and EFS in LARC (Figure 5) together with the fact that SET predicts poor outcome in CRC highlights that miR-199b could be of clinical relevance in CRC

without metastatic disease. Moreover, miR-199b downregulation predicted the lack of response to neoadjuvant CRT in our cohort, results that are strengthened by the findings recently reported in 65 LARC tumor samples indicating that high miR-199a/b levels predicted better response to preoperative CRT [25]. Moreover, high exosomal miR-199b expression also correlated with CRT response, which indicates the potential usefulness of this miR for liquid biopsies. This will need to be validated in further randomized, controlled studies before inclusion in clinical protocols.

5. Conclusions

In conclusion, miR-199b downregulation is a frequent alteration in LARC that contributes to 5-FU resistance in a SET-dependent manner. Moreover, both miR-199b overexpression and SET inhibition can overcome the 5-FU-resistant phenotype. Our results indicate that low levels of miR-199b independently predicts shorter OS and EFS, and could be used to anticipate poor pathological response to neoadjuvant CRT in LARC patients. Altogether, our findings highlight the potential impact of the miR-199b/SET axis as a novel therapeutic strategy in LARC, which needs to be fully confirmed in forthcoming studies including ex vivo and in vivo models.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/2072-6694/12/6/1655/s1, Figure S1: Controls for MTS and caspase 3/7 assays, Figure S2: Detailed information about SET analysis by western blot, Table S1: Association between mir-199b and clinical and molecular parameters in 110 LARC patients, Table S2: Association between mir-199b and tumor size/lymph node positivity in 82 LARC patients, Table S3: Association between miR-199b expression levels and downgrading in 60 LARC patients, Table S4: Association between SET and miR-199b expression in LARC patients, Table S5: Association between SET and pathological response to neoadjuvant CRT in LARC patients, Table S6: Association between miR-199b and immunohistochemical SET expression in LARC patients, Table S7: Univariate and multivariate Cox analyses for EFS in the cohort of 82 LARC patients.

Author Contributions: Conceptualization, I.C., J.R. and J.G.-F.; methodology, I.C., A.S., S.Z., L.I. and S.M.; software, J.R., B.T. and C.C.; formal analysis, I.C. and J.R.; investigation, I.C., B.T., A.S., M.L. and M.S.-A.; writing—original draft preparation, I.C. and C.C.; writing—review and editing, J.M.-G. and F.R.; funding acquisition, F.R. and J.G.-F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by PI18/00382 and PI16/01468 grants from “Instituto de Salud Carlos III FEDER”.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Jemal, A.; Bray, F.; Center, M.M.; Ferlay, J.; Ward, E.; Forman, D. Global cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* **2011**, *61*, 69–90.
2. Brenner, H.; Kloor, M.; Pox, C.P. Colorectal cancer. *Lancet* **2014**, *383*, 1490–1502.
3. Sauer, D.M.R.; Becker, H.; Hohenberger, W.; Rödel, C.; Wittekind, C.; Fietkau, R.; Martus, P.; Tschmelitsch, J.; Hager, E.; Hess, C.F.; et al. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *351*, 1731–1740.
4. Petersen, S.H.; Harling, H.; Kirkeby, L.T.; Wille-Jørgensen, P.; Mocellin, S. Postoperative adjuvant chemotherapy in rectal cancer operated for cure. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2012**, *3*, CD004078.
5. Hofheinz, R.-D.; Wenz, F.; Post, S.; Matzdorff, A.; Laechelt, S.; Hartmann, J.T.; Müller, L.; Link, H.; Moehler, M.; Kettner, E.; et al. Chemoradiotherapy with capecitabine versus fluorouracil for locally advanced rectal cancer: A randomised, multicentre, non-inferiority, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **2012**, *13*, 579–588.
6. Van Gijn, W.; Marijnen, C.A.; van de Velde, C.J. Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer: 12 years follow-up of the multicentre, randomised controlled TME trial. *Lancet Oncol.* **2011**, *12*, 575–582.
7. Sauer, R.; Liersch, T.; Rödel, C. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer: Results of the German CAO/ARO/AIO-94 randomized phase III trial after a median follow-up of 11 years. *J. Clin. Oncol.* **2012**, *30*, 1926–1933.

8. Grass, F.; Mathis, K. Novelty in treatment of locally advanced rectal cancer. *F1000Research* **2018**, *7*, 1868.
9. MacGregor, T.P.; Maughan, T.S.; Sharma, R.A. Pathological grading of regression following neoadjuvant chemoradiation therapy: The clinical need is now. *J. Clin. Pathol.* **2012**, *65*, 867–871.
10. Fokas, E.; Liersch, T.; Fietkau, R.; Hohenberger, W.; Beissbarth, T.; Hess, C.; Becker, H.; Ghadimi, M.; Mrak, K.; Merkel, S.; et al. Tumor regression grading after preoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal carcinoma revisited: Updated results of the CAO/ARO/AIO-94 trial. *J. Clin. Oncol.* **2014**, *32*, 1554–1562.
11. Bosset, J.F.; Collette, L.; Calais, G.; Mineur, L.; Maingon, P.; Radošević-Jelić, L.; Daban, A.; Bardet, E.; Beny, A.; Ollier, J.-C. Chemotherapy with preoperative radiotherapy in rectal cancer. *N. Engl. J. Med.* **2006**, *355*, 1114–1123.
12. Kim, N.K.; Baik, S.H.; Seong, J.S.; Kim, H.; Roh, J.K.; Lee, K.Y.; Sohn, S.K.; Cho, C.H. Oncologic outcomes after neoadjuvant chemoradiation followed by curative resection with tumor-specific mesorectal excision for fixed locally advanced rectal cancer. *Ann. Surg.* **2006**, *244*, 1024–1030.
13. Bertolini, F.; Bengala, C.; Losi, L.; Pagano, M.; Iachetta, F.; Dealis, C.; Jovic, G.; Depenni, R.; Zironi, S.; Falchi, A.M.; et al. Prognostic and predictive value of baseline and posttreatment molecular marker expression in locally advanced rectal cancer treated with neoadjuvant chemoradiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2007**, *68*, 1455–1461.
14. Kuremsky, J.G.; Tepper, J.E.; McLeod, H.L. Biomarkers for response to neoadjuvant chemoradiation for rectal cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2009**, *74*, 673–688.
15. Casado, E.; García, V.M.; Sanchez, J.J.; Blanco, M.; Maurel, J.; Feliu, J.; Fernandez-Martos, C.; De Castro-Carpeño, J.; Castelo, B.; Iniesta, C.B.; et al. A combined strategy of SAGE and quantitative PCR provides a 13-gene signature that predicts preoperative chemoradiotherapy response and outcome in rectal cancer. *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17*, 4145–4154.
16. Bottarelli, L.; De Angelis, G.L.; Azzoni, C.; Di Mario, F.; De Angelis, N.; Leandro, G.; Fornaroli, F.; Gaiani, F.; Negri, F. Potential predictive biomarkers in locally advanced rectal cancer treated with preoperative chemo-radiotherapy. *Acta Biomed.* **2018**, *89*, 102–106.
17. Kong, Y.W.; Ferland-McCollough, D.; Jackson, T.; Bushell, M.D. MicroRNAs in cancer management. *Lancet Oncol.* **2012**, *13*, e249–e258.
18. Azizian, A.; Gruber, J.; Ghadimi, B.M.; Gaedcke, J. MicroRNA in rectal cancer. *World J. Gastrointest. Oncol.* **2016**, *8*, 416–426.
19. Machackova, T.; Prochazka, V.; Kala, Z.; Slaby, O. Translational Potential of MicroRNAs for Preoperative Staging and Prediction of Chemoradiotherapy Response in Rectal Cancer. *Cancers* **2019**, *11*, 1545.
20. Shen, Z.-L.; Wang, B.; Jiang, K.-W.; Ye, C.-X.; Cheng, C.; Yan, Y.-C.; Zhang, J.-Z.; Yang, Y.; Gao, Z.-D.; Ye, Y.-J.; et al. Downregulation of miR-199b is associated with distant metastasis in colorectal cancer via activation of SIRT1 and inhibition of CREB/KISS1 signaling. *Oncotarget* **2016**, *7*, 35092–35105.
21. Chen, L.-Y.; Zhi, Z.; Wang, L.; Zhao, Y.-Y.; Deng, M.; Liu, Y.-H.; Qin, Y.; Tian, M.-M.; Liu, Y.; Shen, T.; et al. NSD2 circular RNA promotes metastasis of colorectal cancer by targeting miR-199b-5p-mediated DDR1 and JAG1 signalling. *J. Pathol.* **2019**, *248*, 103–115.
22. Li, M.; Makkinje, A.; Damuni, Z. The myeloid leukemia-associated protein SET is a potent inhibitor of protein phosphatase 2A. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 11059–11062.
23. Hung, M.H.; Chen, K.F. Reprogramming the oncogenic response: SET protein as a potential therapeutic target in cancer. *Expert Opin. Ther. Targets* **2017**, *21*, 685–694.
24. Cristóbal, I.; Caramés, C.; Rincón, R.; Manso, R.; Madoz-Gúrpide, J.; Torrejón, B.; González-Alonso, P.; Rojo, F.; García-Foncillas, J. Downregulation of microRNA-199b predicts unfavorable prognosis and emerges as a novel therapeutic target which contributes to PP2A inhibition in metastatic colorectal cancer. *Oncotarget* **2017**, *8*, 40169–40180.
25. Baek, D.W.; Kim, G.; Kang, B.W.; Kim, H.J.; Park, S.Y.; Park, J.S.; Choi, G.-S.; Kang, M.K.; Hur, K.; Kim, J.G. High expression of microRNA-199a-5p is associated with superior clinical outcomes in patients with locally advanced rectal cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2020**, *146*, 105–115.
26. Greenson, J.K.; Bonner, J.D.; Ben-Yzhak, O.; Cohen, H.I.; Miselevich, I.; Resnick, M.B.; Trougouboff, P.; Tomsho, L.D.; Kim, E.; Low, M.; et al. Phenotype of microsatellite unstable colorectal carcinomas: Well-differentiated and focally mucinous tumors and the absence of dirty necrosis correlate with microsatellite instability. *Am. J. Surg. Pathol.* **2003**, *27*, 563–570.

27. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real—Time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408.
28. McShane, L.M.; Altman, D.G.; Sauerbrei, W.; Taube, S.E.; Gion, M.; Clarck, G.M. Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 9067–9072.
29. Mumby, M. PP2A: Unveiling a reluctant tumor suppressor. *Cell* **2007**, *130*, 21–24.
30. Westermarck, J.; Hahn, W.C. Multiple pathways regulated by the tumor suppressor PP2A in transformation. *Trends Mol. Med.* **2008**, *14*, 152–160.
31. Cristobal, I.; Manso, R.; Rincón, R.; Caramés, C.; Senin, C.; Borrero, A.; Martínez-Useros, J.; Rodríguez, M.; Zazo, S.; Aguilera, O.; et al. PP2A inhibition is a common event in colorectal cancer and its restoration using FTY720 shows promising therapeutic potential. *Mol. Cancer Ther.* **2014**, *13*, 938–947.
32. Carmen Figueroa-Aldariz, M.; Castañeda-Patlán, M.C.; Santoyo-Ramos, P.; Zentella, A.; Robles-Flores, M. Protein phosphatase 2A is essential to maintain active Wnt signaling and its A β tumor suppressor subunit is not expressed in colon cancer cells. *Mol. Carcinog* **2014**, *54*, 1430–1441.
33. Cristobal, I.; Rincón, R.; Manso, R.; Carames, C.; Zazo, S.; Madoz-Gurpide, J.; Rojo, F.; García-Foncillas, J. Deregulation of the PP2A inhibitor SET shows promising therapeutic implications and determines poor clinical outcome in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* **2015**, *21*, 347–356.
34. Tan, Y.J.; Lee, Y.T.; Petersen, S.H.; Kaur, G.; Kono, K.; Tan, S.C.; Majid, A.M.A.; Oon, C.E. BZD9L1 sirtuin inhibitor as a potential adjuvant for sensitization of colorectal cancer cells to 5-fluorouracil. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **2019**, *11*, doi:10.1177/1758835919878977.
35. Zheng, M.; Chen, Y.; Park, J.; Song, H.-C.; Chen, Y.; Park, J.W.; Joe, Y.; Chung, H.T. CO ameliorates endothelial senescence induced by 5-fluorouracil through SIRT1 activation. *Arch. Biochem. Biophys.* **2019**, *677*, 108185.
36. Cristóbal, I.; Garcia-Orti, L.; Cirauqui, C.; Cortes-Lavaud, X.; García-Sánchez, A.; Calasanz, M.J.; Odero, M.D. Overexpression of SET is a recurrent event associated with poor outcome and contributes to protein phosphatase 2A inhibition in acute myeloid leukemia. *Haematologica* **2012**, *97*, 543–550.
37. Agarwal, A.; MacKenzie, R.J.; Pippa, R.; Eide, C.A.; Oddo, J.; Tyner, J.W.; Sears, R.; Vitek, M.P.; Odero, M.D.; Christensen, D.J.; et al. Antagonism of SET using OP449 enhances the efficacy of tyrosine kinase inhibitors and overcomes drug resistance in myeloid leukemia. *Clin. Cancer Res.* **2014**, *20*, 2092–2103.
38. Cristóbal, I.; Madoz-Gurpide, J.; Manso, R.; González-Alonso, P.; Rojo, F.; García-Foncillas, J. Potential anti-tumor effects of FTY720 associated with PP2A activation: A brief review. *Curr. Med. Res. Opin.* **2016**, *32*, 1137–1141.
39. Cristóbal, I.; Torrejón, B.; Rubio, J.; Santos, A.; Pedregal, M.; Caramés, C.; Zazo, S.; Luque, M.; Sanz-Alvarez, M.; Madoz-Gurpide, J.; et al. Deregulation of SET is Associated with Tumor Progression and Predicts Adverse Outcome in Patients with Early-Stage Colorectal Cancer. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 346.



Supplementary Materials

MicroRNA-199b downregulation confers resistance to 5-fluorouracil treatment and predicts poor outcome and response to neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer patients

Ion Cristóbal, Jaime Rubio, Andrea Santos, Blanca Torrejón, Cristina Caramés, Laura Imedio, Sofía Mariblanca, Melani Luque, Marta Sanz-Alvarez, Sandra Zazo, Juan Madoz-Gúrpide, Federico Rojo and Jesús García-Foncillas

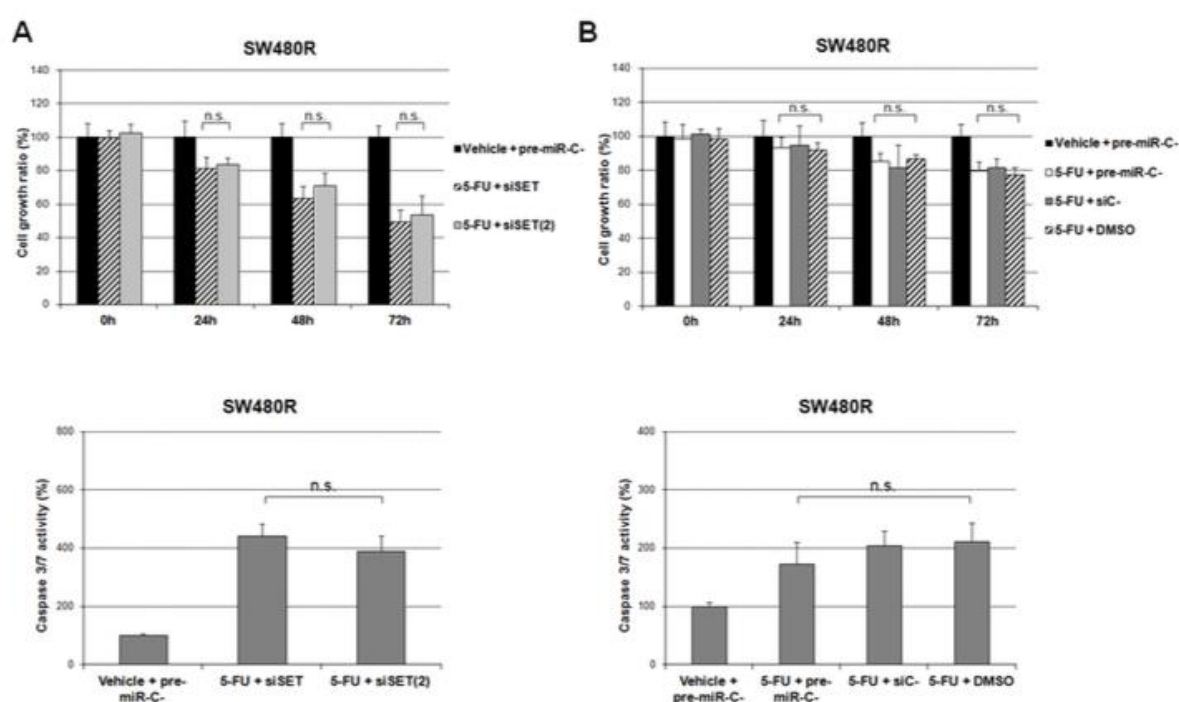


Figure S1. Controls for MTS and caspase 3/7 assays using (A) two specific SET siRNAs and (B) negative controls for miR-199b, siSET and FTY720.

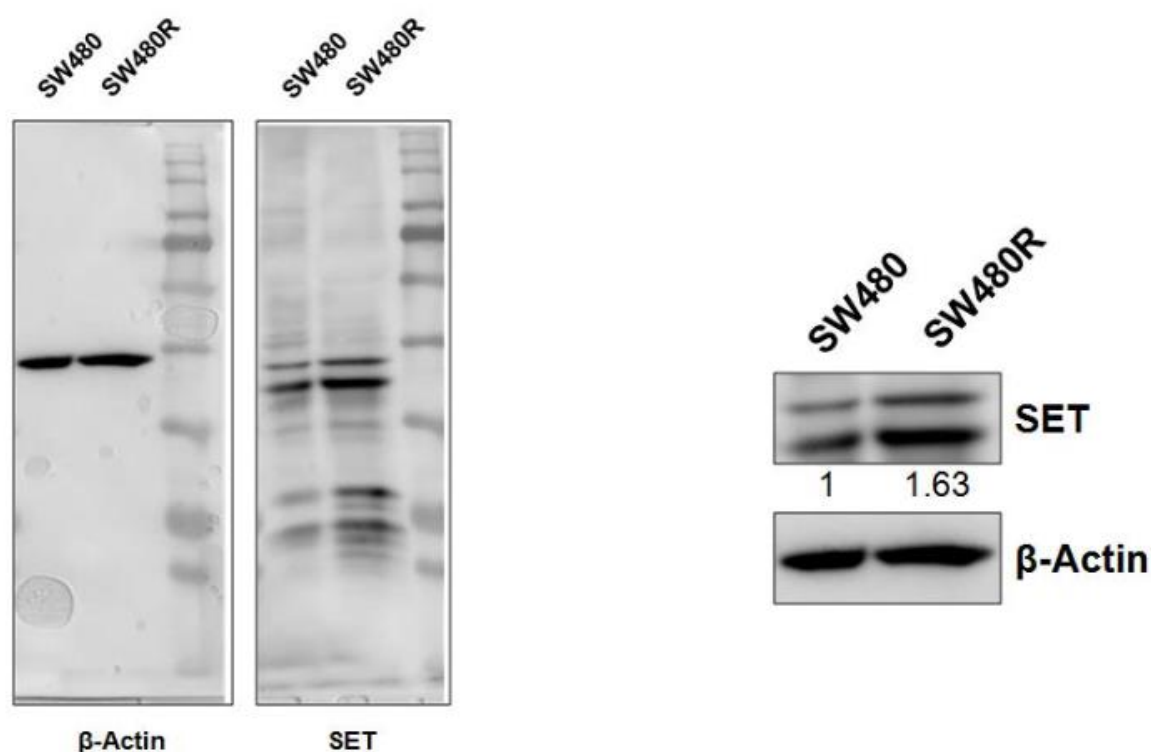


Figure S2. Detailed information about SET analysis by western blot.

Table S1. Association between miR-199b and clinical and molecular parameters in 110 LARC patients.

Parameters	No. Cases	No. miR-199b High (%)	No. miR-199 Low (%)	<i>p</i>
MiR-199b	110	81 (73.6)	29 (26.4)	
Age	110	81	29	0.919
< 70	56	41 (73.2)	15 (26.8)	
≥ 70	54	40 (74.1)	14 (25.9)	
ECOG	110	81	29	0.300
0	67	47 (70.1)	20 (29.9)	
1-2	43	34 (79.1)	9 (20.9)	
Stage	110	81	29	0.547
I-II	15	12 (80)	3 (20)	
III	95	69 (72.6)	26 (27.4)	

Table S2. Association between miR-199b and tumor size/lymph node positivity in 82 LARC patients.

Parameters	No. Cases	No. miR-199b High (%)	No. miR-199 Low (%)	<i>p</i>
ypT	82	58	24	0.015
0-1	22	20 (34.5)	2 (8.3)	
> 1	60	38 (65.5)	22 (91.7)	
ypN	82	58	24	0.006
N0	64	50 (86.2)	14 (58.3)	
N+	18	8 (13.8)	10 (41.7)	

Table S3. Association between miR-199b expression levels and downgrading in 60 LARC patients.

MiR-199b Expression	No. Cases	MiR-199b Low (%)	MiR-199b High (%)	<i>p</i>
Downgrading	60	21	39	0.004
No	40	19 (90.5)	21 (53.8)	
Yes	20	2 (9.5)	18 (46.2)	

Table S4. Association between miR-199b and SET expression levels in LARC patients.

Parameters	No. Cases	MiR-199b Low (%)	MiR-199b High (%)	<i>p</i>
SET	76	23	53	0.004
Low	59	13 (56.5)	46 (86.8)	
High	17	10 (43.5)	7 (13.2)	

Table S5. Association between SET expression levels and pathological response to neoadjuvant CRT in LARC patients.

Responders vs. Non-Responders				
SET Expression	No. Cases	SET Low (%)	SET High (%)	<i>p</i>
Response	76	59	17	0.015
Non-Response ¹	34	22 (37.3)	12 (70.6)	
Response ²	42	37 (62.7)	5 (29.4)	

¹Non-Response: poor or minimal pathological response; ²Response: moderate or complete pathological response.

Table S6. Association between miR-199b and immunohistochemical SET expression in LARC patients.

Parameters	No. Cases	MiR-199b Low (%)	MiR-199b High (%)	<i>p</i>
SET	20	4	16	0.028
Low	17	2 (50)	15 (93.7)	
High	3	2 (50)	1 (6.3)	

Table S7. Univariate and multivariate Cox analyses in the cohort of 82 LARC patients.

Parameters	Univariate EFS ¹ Analysis				Multivariate EFS Cox Analysis			
	HR ³	95% CI ²		<i>p</i>	HR	95% CI		<i>p</i>
		Lower	Upper			Lower	Upper	
Age				0.427				0.384
< 70	1.000				1.000			
≥ 70	1.573	0.514 to 4.817			1.686	0.520 to 5.468		
Gender				0.966				-
Male	1.000							
Female	0.976	0.318 to 2.997			-	-		
Pathological Stage				0.211				-
0-I	1.000							
II-III	2.050	0.666 to 6.313			-	-		
ypT ⁴				0.149				-
0-2	1.000							
3-4	1.318	0.906 to 1.916			-	-		
ypN ⁵				0.040				0.076
N-	1.000				1.000			
N+	3.522	1.057 to 11.738			2.045	0.929 to 4.504		
ECOG ⁶				0.341				-
0	1.000							
1-2	1.702	0.570 to 5.081			-	-		
MiR-199b				0.020				0.042
High	1.000				1.000			
Low	3.744	1.226 to 11.428			3.360	1.042 to 10.831		

¹EFS: event-free survival; ²CI: confidence interval; ³HR: Hazard ratio; ⁴ypT: tumor size after chemoradiotherapy (CRT); ⁵ypN: pathological lymph node after CRT; ⁶ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Artículo 4 - Low MicroRNA-19b Expression Shows a Promising Clinical Impact in Locally Advanced Rectal Cancer

En CRLA el tratamiento de elección es QTRT neoadyuvante y EMT. Sin embargo, la falta de respuesta a este tratamiento preoperatorio compromete en gran medida los resultados del paciente ya que conduce a retrasos quirúrgicos por toxicidades no deseadas y esto es peor en los pacientes no respondedores donde la cirugía es el tratamiento curativo. Por lo tanto, la identificación de biomarcadores eficaces para predecir la respuesta a la QTRT preoperatoria es extremadamente necesaria. Una vez demostrada la relevancia del eje miR-199b/SET/PP2A en este sentido nos planteamos evaluar el potencial impacto de otros miRs que estuvieran implicados en la regulación de PP2A, pero de manera independiente a SET. Teniendo en cuenta que en CCR nuestro grupo describió la baja expresión de la subunidad reguladora de PP2A, PPP2R5E, como un mecanismo molecular de desregulación de esta, y que el miR-19b ha sido descrito como regulador directo de PPP2R5E, e influye además en la sensibilidad a 5-FU, elegimos este miR como candidato para nuestro estudio, ya que su impacto clínico en CRLA no se había investigado previamente.



Aquí, mostramos que la desregulación del miR-19b es un evento común en el cáncer de recto localmente avanzado y que una baja expresión del miR se asocia significativamente con un menor tamaño del tumor después de la QTRT ($p = 0,003$), con estadios patológicos tempranos ($p = 0,003$) y que predice ausencia de recurrencia ($p = 0,001$) en estos pacientes. Curiosamente, la expresión baja de miR-19b muestra un valor predictivo de buena respuesta a la QTRT neoadyuvante ($p < 0,001$), y el subgrupo de pacientes CRLA con niveles bajos de miR-19b tienen una SG mucho mayor ($p = 0,003$), así como una mayor supervivencia libre de recaída ($p = 0,023$). Además, los análisis multivariados determinaron que miR-19b predice de forma independiente tanto la respuesta a la QTRT como el pronóstico del paciente destacando su potencial utilidad clínica en el manejo de pacientes con CRLA. Finalmente, comprobamos la correlación inversa del miR-19b con *PPP2R5E* en un grupo de pacientes de la cohorte de estudio, para apoyar la hipótesis acerca de la relevancia de la ruta miR-19b/PPP2R5E en CRLA.

Aportación del doctorando

En este artículo tomé el rol principal en el planteamiento del estudio con este miR, basándonos en publicaciones previas en CRLA, y en el diseño y contextualización clínica. Completé la base de datos y amplié la misma con casos más recientes. Realicé el análisis por SPSS y colaboré en la escritura del artículo.

Article

Low MicroRNA-19b Expression Shows a Promising Clinical Impact in Locally Advanced Rectal Cancer

Jaime Rubio ^{1,2,3,†} , Ion Cristóbal ^{1,2,*,†}, Andrea Santos ^{1,2}, Cristina Caramés ^{1,2,3} , Melani Luque ⁴, Marta Sanz-Alvarez ⁴, Sandra Zazo ⁴, Juan Madoz-Gúrpide ⁴, Federico Rojo ⁴ and Jesús García-Foncillas ^{2,3,*}

¹ Cancer Unit for Research on Novel Therapeutic Targets, Oncohealth Institute, IIS- Fundación Jiménez Díaz-UAM, E-28040 Madrid, Spain; jaime.rubiop@quironsalud.es (J.R.); andrea.santos@quironsalud.es (A.S.); ccarames@fjd.es (C.C.)

² Translational Oncology Division, Oncohealth Institute, IIS- Fundación Jiménez Díaz-UAM, E-28040 Madrid, Spain

³ Medical Oncology Department, University Hospital "Fundación Jiménez Díaz", UAM, E-28040 Madrid, Spain

⁴ Pathology Department, IIS- Fundación Jiménez Díaz-UAM, E-28040 Madrid, Spain; melani.luque@quironsalud.es (M.L.); marta.sanza@quironsalud.es (M.S.-A.); szazo@fjd.es (S.Z.); jmadoz@fjd.es (J.M.-G.); frojo@fjd.es (F.R.)

* Correspondence: ion.cristobal@idcsalud.es (I.C.); jesus.garciafoncillas@oncohealth.eu (J.G.-F.); Tel.: +34-915504800 (I.C. & J.G.-F.)

† These authors have contributed equally to this work.



Citation: Rubio, J.; Cristóbal, I.; Santos, A.; Caramés, C.; Luque, M.; Sanz-Alvarez, M.; Zazo, S.; Madoz-Gúrpide, J.; Rojo, F.; García-Foncillas, J. Low MicroRNA-19b Expression Shows a Promising Clinical Impact in Locally Advanced Rectal Cancer. *Cancers* **2021**, *13*, 1456. <https://doi.org/10.3390/cancers13061456>

Academic Editors: Torben Frostrup Hansen and Christoph Roerburg

Received: 21 January 2021

Accepted: 19 March 2021

Published: 22 March 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: The establishment of molecular markers to predict response to neoadjuvant chemoradiotherapy (CRT) would help to avoid unnecessary toxicities and surgery delays in the clinical management of locally advanced rectal cancer (LARC) patients. Our aim here was to investigate the clinical impact of miR-19b in this disease. Interestingly, our findings highlight the potential usefulness of miR-19b as a predictor of response to neoadjuvant CRT and outcome, and suggest PPP2R5E as a relevant miR-19b target in LARC.

Abstract: The standard treatment for patients with locally advanced colorectal cancer (LARC) is neoadjuvant 5-fluorouracil (5-FU) based chemoradiotherapy (CRT) followed by surgical mesorectal excision. However, the lack of response to this preoperative treatment strongly compromises patient outcomes and leads to surgical delays and undesired toxicities in those non-responder cases. Thus, the identification of effective and robust biomarkers to predict response to preoperative CRT represents an urgent need in the current clinical management of LARC. The oncomiR microRNA-19b (miR-19b) has been reported to functionally play oncogenic roles in colorectal cancer (CRC) cells as well as regulate 5-FU sensitivity and determine outcome in CRC patients. However, its clinical impact in LARC has not been previously investigated. Here, we show that miR-19b deregulation is a common event in this disease, and its decreased expression significantly associates with lower tumor size after CRT ($p = 0.003$), early pathological stage ($p = 0.003$), and absence of recurrence ($p = 0.001$) in LARC patients. Interestingly, low miR-19b expression shows a predictive value of better response to neoadjuvant CRT ($p < 0.001$), and the subgroup of LARC patients with low miR-19b levels have a markedly longer overall ($p = 0.003$) and event-free survival ($p = 0.023$). Finally, multivariate analyses determined that miR-19b independently predicts both patient outcome and response to preoperative CRT, highlighting its potential clinical usefulness in the management of LARC patients.

Keywords: MiR-19b; locally advanced rectal cancer; prognosis; pathological response

1. Introduction

Colorectal carcinoma (CRC) is a highly prevalent multifactorial disease in the Western world, being the third leading cause of death from cancer. In Spain, more than 44,000 new colorectal cases are diagnosed each year and, unfortunately, around 15,000 deaths are also reported annually [1]. Rectal carcinoma represents almost 30% of all diagnosed

colorectal cancers. The rectum is by definition the continuation of the sigmoid colon, measuring between 12 and 15 cm and continuing up to the dentate line or anal verge [2]. Although new therapeutic approaches are currently under study, the standard treatment recommended by European Society for Medical Oncology (ESMO) guidelines for locally advanced rectal cancer (LARC) is a preoperative chemoradiotherapy (CRT) based on 5-fluorouracil (intravenous or oral formulation, capecitabine) or short-course preoperative radiotherapy (SCPRT) followed by a total mesorectal excision (TME) [3]. Of note, several studies have demonstrated that this therapeutic strategy leads to a better local response and a lower local relapse rate compared to TME alone or followed by adjuvant CRT [4,5]. With this management, around 20% of pathological complete responses (pCR) are reached, and these patients are the ones who benefit most, with better overall survival (OS) and disease-free survival (DFS) [6,7]. Those patients who do not achieve a pCR are those with a higher probability of local and distant relapse, with a 30% of cases developing recurrences within the next 10 years from initial treatment. Despite significant improvements in clinical management in the last decade, distant recurrences remain the major cause of mortality in these patients [8]. In fact, it would be very valuable to identify effective markers with predictive value for disease prognosis or recurrence. Then, clinicians could manage differently those subgroups of patients candidate to be resistant to chemoradiotherapy or those that likely reach a pCR before treatment in order to reduce undesirable observed morbidities and mortalities as well as delays in the resection of the primary tumor [9]. Although researchers have identified several postsurgical prognostic markers as well as few preoperative markers, none of them have been established clinically to date [10–12]. Thus, a major current limitation for clinical management of LARC patients is the absence of effective predictors of pathological tumor response before neoadjuvant CRT.

MicroRNAs (miRs) are small single-stranded RNA molecules (between 19 and 25 nucleotides) that do not code for proteins but regulate the expression of other genes at the post-transcriptional level. They bind to specific sequences of 3' Untranslated Region (UTR) regions of the target messenger RNA (mRNA) and impair their translation [13]. In this way, miRs act as oncogenes or as tumor-suppressor genes, depending on the gene to which the translation is repressed. The clinical value of miRs in human cancer is well known and has been largely reported in many tumor types including rectal cancer, and they can be used to improve tumor diagnosis, as prognostic markers or as predictive markers of response to treatment [14–16]. They can also be used to predict the tumor resistance to therapeutic agents [17]. In rectal cancer, miRs have shown to be potential useful biomarkers based on their detection in both tumor tissue and liquid biopsies [12]. Consequently, the assessment of levels of a single miR or miRNAs-based signatures in tumor specimens or circulating miRs/tumor cells in body fluids could improve the classification of LARC patients according to the CRT response, thus facilitating the clinical decision [18–21]. MiR-19b has been widely associated with carcinogenesis in various tumor subtypes through different signaling pathways. MiR-19b overexpression has been reported to promote tumor growth and metastasis through targeting p53, which led to decreased BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator (BAX) and p21 levels [22]. MiR-19b has also been described as an inhibitor of Phosphatase And Tensin Homolog (PTEN) and activator of the Phosphoinositide-3-kinase (PI3K)/Protein Kinase B (AKT) signaling in Wilms tumor, multiple myeloma, renal cancer, and cholangiocarcinoma [23–25]. Moreover, miR-19b overexpression has been found to inhibit the tumor suppressor PP2A by targeting the PP2A regulatory subunit PPP2R5E, thereby promoting tumor proliferation in non-small cell lung cancer (NSCLC) cells [26]. The role of miR-19b in CRC has been also studied in several works. During early colon cancer evolution, the expression of miR-19b was found confined to the epithelial cells, with an increased expression in the transitional zone from normal to adenomatous tissue [27]. MiR-19b has been identified in several studies to promote CRC cell proliferation [28,29], migration, and invasion [30]. In addition, a recent study has shown that the c-MYC-driven expression of miR-19b represses the proapoptotic protein Bcl2-like 11 (BIM) in CRC cells [31]. At the therapeutic level, miR-19b has been found to

confer resistance to standard induction chemotherapy agents used in CRC treatment such as 5-fluorouracil (5-FU) and oxaliplatin. Jiang and colleagues experimentally confirmed that this miR mediates the resistance of CRC cells to oxaliplatin-based chemotherapy via SMAD Family Member 4 (SMAD4) [29]. Another work confirmed the role of miR-19b regulating sensitivity of CRC to oxaliplatin and demonstrated that the exosomal release of this miR is involved in the acquisition of an oxaliplatin-resistant phenotype [32]. Moreover, miR-19b has been proposed to play a role in the mechanism of 5-FU resistance in CRC cells and has been found to be overexpressed in 5-FU-resistant CRC cell line models [33]. Regarding the data available in the literature for this miR as a biomarker in CRC, circulating serum miR-19b has been proposed as a potential marker with diagnostic value for inflammatory bowel disease and colonic polyps [34]. Another study has shown that a signature of six miRs including miR-19b has diagnostic value for advanced adenoma and CRC detection [35]. Although the work by Cruz-Gil and co-workers has proposed that the expression of miR-19b would serve as a predictor of better prognosis in CRC patients [36], this work is the only discrepancy in the literature, and several other studies have highlighted its role as predictor of poor outcome. In fact, miR-19b overexpression has been proposed as an adverse prognostic marker for tumor recurrence and overall survival in CRC with liver metastases [37], and its clinical impact as a predictor of poor outcome in CRC has been further validated in several other studies [29,30]. In rectal cancer, there is only a study related to miR-19b. The DNA copy number (DCN) of the miR-17-92a-1 cluster host gene (MIR17HG), which includes miR-19b, has been analyzed by Molinari and colleagues in a cohort of 108 LARC patients. Although they did not find a significant association between MIR17HG DCN and response to neoadjuvant CRT, MIR17HG gene amplification was related to a lack of response, further suggesting the potential role of some miR included in this cluster in response to LARC neoadjuvant treatment. In fact, the authors highlighted that the expression levels of the miRs included in this cluster should be evaluated in LARC patient cohorts [38]. Thus, the potential clinical impact of miR-19b in LARC remains to be investigated.

In our work, we evaluate for the first time the clinical significance of miR-19b as a predictor of both patient outcome and response to neoadjuvant CRT in LARC. We quantified the expression levels of this miR in a cohort that includes 121 LARC cases, observing that decreased miR-19b expression is a frequent event in this disease that significantly associates with different molecular and clinical parameters. Notably, we also observed that low miR-19b levels independently predicted better outcome in survival analyses as well as better pathological response to 5-FU-based preoperative CRT.

2. Experimental Section

2.1. Patients Tissue Samples

We selected retrospectively a total of 121 patients with LARC treated between 2007 and 2017 in University Hospital Fundación Jiménez Díaz (Madrid, Spain), and we studied the initial biopsies obtained by colonoscopy and prior to neoadjuvant CRT treatment. All patients were treated with neoadjuvant CRT and TME, and they were treated by the European guidelines recommendations with correct preoperative locoregional staging based on a magnetic resonance (MR), a transrectal ultrasound (TRUS), and a full body CT (computed tomography). The selection criteria were also adenocarcinoma, with operable disease, enough material, clinical follow-up data available, and no metastasis. TNM (tumor, node, metastases) staging was performed based on the 7th American Joint Committee on cancer (AJCC) staging system established for CRC. All patients gave written informed consent for tissue storage and analysis at the biobank of the Hospital Fundación Jiménez Díaz with the approval of the ethical committee with project number (2018/54).

2.2. Evaluation of Pathological Response

The tumor samples that resulted from the initial biopsies derived from colonoscopy were classified according to the CAP (College of American Pathologist) TNM, 7th ed.

Two independent pathologists who were blinded to patient outcome evaluated tumor regression grade according to the modified Ryan classification that categorizes tumors into four levels of response: complete response, moderate response, minimal response, and poor response. A complete response score of 0 indicates no viable cancer cells; a moderate score of 1 indicates single cells or little groups of cancer cells; a minimal score of 2 indicates residual cancer outgrown by fibrosis; and a poor response score of 3 indicates minimal or no tumor kill with extensive residual cancer. According to clinical guidelines, every regression grade was compared with the primary tumor [39].

2.3. RNA Isolation

The RNA isolation from the tumor samples through FFPE (formalin-fixed paraffin-embedded) was performed following the protocol of the Recover All Total Nucleic Acid Isolation Kit Ambion (Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA), and the RNA obtained was quantified with a Nanodrop Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The FFPE samples were obtained from the paraffin block that allows avoiding contamination during storage for years.

2.4. Quantification of miRNA Expression Levels

A Recover all Total Nucleic Acid Isolation kit (Ambion) was used for the total RNA extraction following the manufacturer's instructions. The reverse transcription of the samples was done with the TaqManHMicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), and mature miRNAs were quantified by quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) using TaqMan MicroRNA Assays (Applied Biosystems) specific for the miR-19b (reference number: 000396) and U6B (reference number: 001093) was used as an internal control. Reactions were carried out using an Applied Biosystems 7500 Sequence Detection System. Conditions: 95 °C for 10 min, followed by 45 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. Analysis of relative gene expression data was performed using the Δ CT method [40].

2.5. Statistical Analysis

SPSS Inc for windows was the software tool used for the statistical analyses. We employed the Chi-square test (Fisher exact test) based on bimodal distribution of data to analyze the correlation between miR-19b downregulation and the clinical and pathological variables. A cutoff for miR-19b expression was established using a receiver operating characteristic (ROC) curve as previously reported [18,19]. To assess the potential usefulness of miR-19b as a predictive biomarker, we choose the cutoff point that gave us the best sensitivity and specificity to discriminate rectal cancer pathologic response. Following this criteria, downregulation was considered when miR-19b expression levels [$-\Delta$ CT] were lower than 1.22. Event-free survival (EFS) was defined as the length of time from diagnosis of cancer until complications that the chemotherapy treatment was intended to prevent or delay (distal or local recurrence, last follow up or death). Overall survival (OS) was defined as the length of time from the date of pathological diagnosis to the date of the last follow-up or if the date of death. The K-M or Kaplan–Meier survival analyses were performed by means of log-rank test if the proportional hazard assumption was fulfilled and Breslow otherwise. The Cox proportional hazards model was adjusted, taking into consideration significant parameters in the univariate analysis. The guidelines followed to perform this article were the REMARK Guidelines (Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies) [41].

3. Results

3.1. Low miR-19b Expression Is a Common Alteration in LARC Patients that Associates with Molecular and Clinical PARAMETERS

We quantified the expression of miR-19b in a series of 121 LARC patients with clinical follow-up data available. From the cohort of 121 cases, 73 were males and 48 were females,

with a median of age of 69 years (range: 36–86). Patient characteristics of the global cohort are shown in Table S1. We observed that the prevalence of low miR-19b expression was 38.8% (47 out of 121 cases) in our population. We next evaluated the potential association of low miR-19b downregulation with molecular and clinical parameters in our LARC patient cohort. Of note, low miR-19b levels correlated with lower tumor size after CRT ($p = 0.003$) and early pathological stage ($p = 0.003$). In addition, patients with low miR-19b expression tended to show lower tumor grade pre-CRT as well as lower lymph node positivity rates after CRT; however, statistical significance was not achieved in these cases ($p = 0.103$ and $p = 0.216$, respectively). The associations between molecular and clinical parameters and miR-19b expression are shown in Table 1.

Table 1. Association between clinical and molecular parameters and miR-19b expression levels in a cohort of 121 locally advanced colorectal cancer (LARC) patients.

	No. Cases	No. miR-19b Low (%)		No. miR-19b High (%)		<i>p</i>
MiR-19b	121	47 (38.8)		74 (61.2)		
Gender	121	47		74		0.605
Male	73	27	(37)	46	(63)	
Female	48	20	(41.7)	28	(58.3)	
Age	121	47		74		0.562
<60	40	17	(42.5)	23	(57.5)	
≥60	81	30	(37)	51	(63)	
ECOG ¹	121	47		74		0.831
0	81	32	(39.5)	49	(60.5)	
1–2	40	15	(37.5)	25	(62.5)	
Clinical stage pre-CRT ²	121	47		74		0.285
II	9	5	(55.6)	4	(44.4)	
III	112	42	(37.5)	70	(62.5)	
Grade pre-CRT	112	42		70		0.103
Low	40	19	(47.5)	21	(52.5)	
Moderate-High	72	23	(31.9)	49	(68.1)	
ypT ³	121	47		74		0.003
0	16	13	(81.3)	3	(18.7)	
1	16	7	(43.8)	9	(56.2)	
2	38	12	(31.6)	26	(68.4)	
3	44	13	(29.6)	31	(70.4)	
4	4	0	(0)	4	(100)	
x	3	2	(66.7)	1	(33.3)	
ypN ⁴	121	47		74		0.216
N0	91	38	(41.8)	53	(58.2)	
N1	26	9	(34.6)	17	(65.4)	
N2	4	0	(0)	4	(100)	
Pathological stage	121	47		74		0.003
yp0	16	13	(81.3)	3	(18.7)	
ypI	43	15	(34.9)	28	(65.1)	
ypII	32	10	(31.3)	22	(68.7)	
ypIII	30	9	(30)	21	(70)	

¹ ECOG = Eastern Cooperative Oncology Group; ² CRT = Chemoradiotherapy; ³ ypT = tumor size after CRT; ⁴ ypN = pathological lymph node after CRT.

3.2. MiR-19b Is a Predictor of Pathological Response to Neoadjuvant CRT in Locally Advanced Rectal Cancer

We next generated ROC curves in order to evaluate the potential clinical impact of miR-19b as a predictor of response to preoperative CRT in LARC. MiR-19b expression levels yielded an area under the curve (AUC) value of 0.765 (95% confidence interval (CI) = 0.626 to 0.905; $p = 0.001$) with 81.3% specificity and 66.7% sensitivity in distinguishing LARC patient responders and non-responders to neoadjuvant CRT (Figure 1).

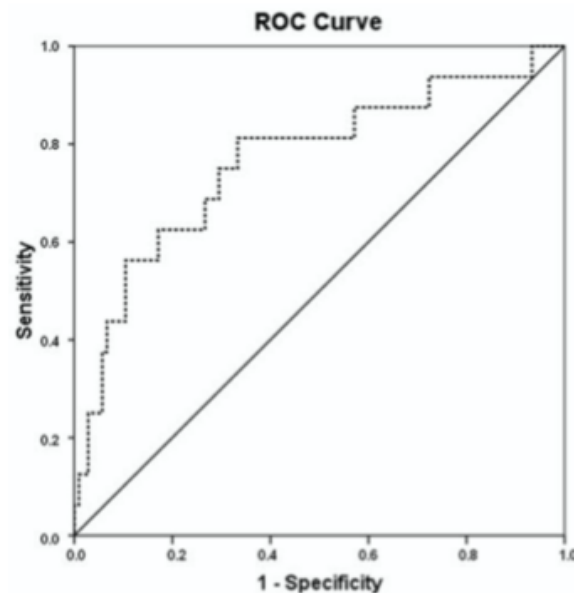


Figure 1. Receiver operating characteristic (ROC) curve to assess the usefulness of miR-19b to discriminate response to neoadjuvant chemoradiotherapy (CRT) in LARC. The dashed line is the coordinated point of the ROC curve. The solid line represents the reference diagonal line.

Thus, we observed that miR-19b expression was associated with response to neoadjuvant CRT ($p < 0.001$), and only 20.6% of those patients who did not show response had low miR-19b expression levels (Table 2).

Table 2. Association between miR-19b expression levels and pathological response to neoadjuvant CRT in LARC patients.

Response to NCRT ¹	No. Cases	Responders ² (%)	Non-Responders ³ (%)	p
MiR-19b Expression	121	58	63	<0.001
Low	47	24 (72.3)	13 (27.7)	
High	74	34 (32.4)	50 (67.6)	

¹ NCRT: neoadjuvant chemoradiotherapy; ² Responders. Moderate or complete pathological response; ³ Non-Responders: poor or minimal pathological response.

In concordance with these data, we also observed a strong association between miR-19b expression and recurrence in our cohort, and miR-19b downregulation was found only in 11.5% of those cases that developed recurrence (Table 3).

Table 3. Association between patient relapse and miR-19b expression levels in LARC patients.

Recurrence	No. Cases	Yes (%)	No (%)	p
MiR-19b Expression	121	26	95	0.001
Low	47	3 (6.4)	44 (93.6)	
High	74	23 (31.1)	51 (68.9)	

Of importance, we performed multivariable logistic regression analyses including all clinical–pathological factors measured before the administration of neoadjuvant CRT. Interestingly, we observed that miR-19b expression levels quantified before neoadjuvant CRT serve as an independent predictor of pathologic response in LARC patients. The odds ratio for non-responders was 0.18 (95% CI = 0.06 to 0.57; $p = 0.003$) (Table 4).

Table 4. Univariate and multivariate logistic analyses for pathological response in the cohort of 121 LARC patients.

	Response ¹ vs. Non-Response ²	
	OR ³ (95% CI ⁴)	<i>p</i>
Gender, Male vs. Female	1.227 (0.558 to 2.98)	0.611
Age, < 60 vs. ≥60	0.778 (0.714 to 1.925)	0.587
Clinical stage pre-CRT ⁵ , II vs. III	1.210 (0.709 to 2.064)	0.485
Grade pre CRT, Low vs. Moderate/High	1.021 (0.492 to 2.119)	0.956
ECOG ⁶ , 0 vs. 1–2	1.174 (0.484 to 2.850)	0.722
miR-19b, High vs. Low	0.166 (0.071 to 0.390)	<0.001

¹ Response: moderate or complete pathological response; ² Non-response: poor or minimal pathological response; ³ OR: odds ratio; ⁴ CI: confidence interval; ⁵ CRT: chemoradiotherapy; ⁶ ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group.

3.3. MiR-19b Expression Determines Outcome in Locally Advanced Rectal Cancer Patients

To evaluate the significance of miR-19b in LARC, we next investigated its potential clinical impact as a predictor of patient outcomes. For survival analyses, we included all the 121 LARC cases from our cohort, since clinical follow-up data were available for all them. Notably, we observed that low miR-19b expression defines a subgroup of patients that shows a markedly longer OS compared to those LARC cases with high miR-19b levels (105 versus 75 months, $p = 0.003$) (Figure 2A). Moreover, we also observed that low miR-19b expression determined significantly longer EFS in our patient cohort (105 versus 73 months, $p = 0.023$) (Figure 2B).

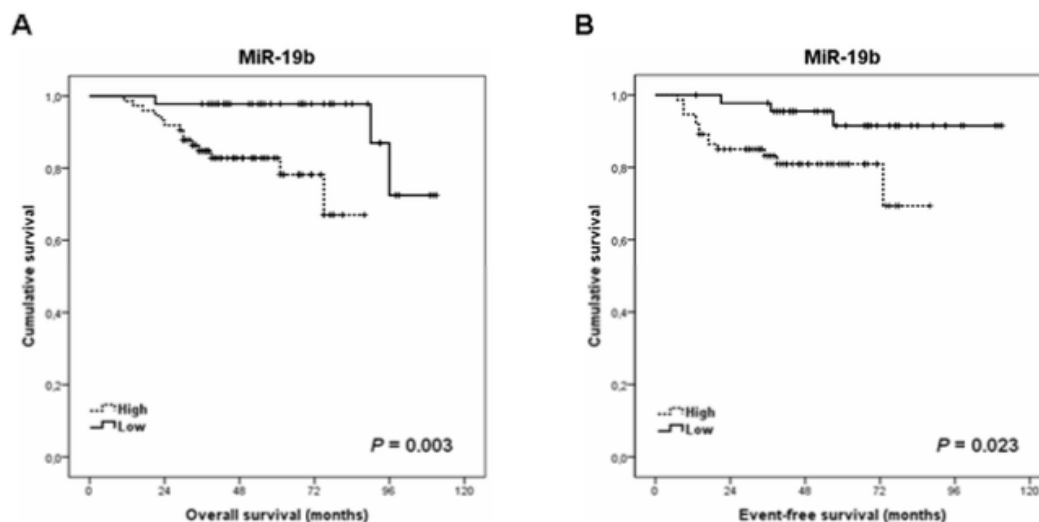


Figure 2. Clinical impact of miR-19b in LARC patient outcomes. Kaplan-Meier analyses for (A) overall and (B) event-free survival.

Furthermore, Cox proportional hazard regression analyses showed that pathological stage (hazard ratio (HR) = 3.484; 95% CI = 1.131 to 10.732; $p = 0.030$), lymph node positivity (HR = 3.747; 95% CI = 1.443 to 9.729; $p = 0.007$), and high miR-19b expression (HR = 0.085; 95% CI = 0.011 to 0.656; $p = 0.018$) were associated with poor outcome in the univariate analysis. Moreover, multivariate analyses revealed that miR-19b downregulation represents

a favorable independent prognostic factor associated with longer OS in LARC patients treated with neoadjuvant CRT (HR = 0.093; 95% CI = 0.012 to 0.727; $p = 0.024$) (Table 5).

Table 5. Univariate and multivariate Cox analyses in the cohort of 121 LARC patients.

	Univariate OS ¹ Analysis				Multivariate OS Cox Analysis			
	HR ³	95% CI ²		p	HR	95% CI		p
		Lower	Upper			Lower	Upper	
Gender				0.816				-
Male	1.000							
Female	0.888	0.326 to 2.418			-	-		
Age				0.225				-
<60	1.000							
≥60	2.167	0.621 to 7.564			-	-		
Pathological stage				0.030				0.490
0-I	1.000				1.000			
II-III	3.484	1.131 to 10.732			1.635	0.405 to 6.607		
ypT ⁴				0.139				-
0-2	1.000							
3-4	2.120	0.783 to 5.741			-	-		
ypN ⁵				0.007				0.105
N-	1.000				1.000			
N+	3.747	1.443 to 9.729			2.658	0.814 to 8.677		
ECOG ⁶				0.454				-
0	1.000							
1-2	1.450	0.548 to 3.836			-	-		
MiR-19b				0.018				0.024
High	1.000				1.000			
Low	0.085	0.011 to 0.656			0.093	0.012 to 0.727		

¹ OS: overall survival; ² CI: confidence interval; ³ HR: hazard ratio; ⁴ ypT: tumor size after chemoradiotherapy (CRT); ⁵ ypN: pathological lymph node after CRT; ⁶ ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group.

Notably, Cox proportional hazard regression analyses were also performed for event-free survival. Similar to OS, we found significance in univariate analyses for pathological stage (HR = 3.519; 95% CI = 1.145 to 10.814; $p = 0.028$), lymph node positivity (HR = 4.045; 95% CI = 1.55 to 10.522; $p = 0.004$), and high miR-19b expression (HR = 0.258; 95% CI = 0.073 to 0.910; $p = 0.035$). However, only miR-19b retained significance in multivariate analyses (HR = 0.268; 95% CI = 0.074 to 0.965; $p = 0.044$), indicating that it represents an independent predictor of EFS in our cohort of LARC patients (Table S2).

Furthermore, we next analyzed the potential relevance of the miR-19b/PPP2R5E axis in LARC. Thus, PPP2R5E expression could be quantified in 63 LARC cases with enough material available from our patient cohort. Interestingly, we observed that the subgroup of patients with low miR-19b expression showed significantly higher PPP2R5E levels ($p < 0.001$) (Figure 3A), and we also found a negative correlation between miR-19b and PPP2R5E expression in our patient cohort (Figure 3B).

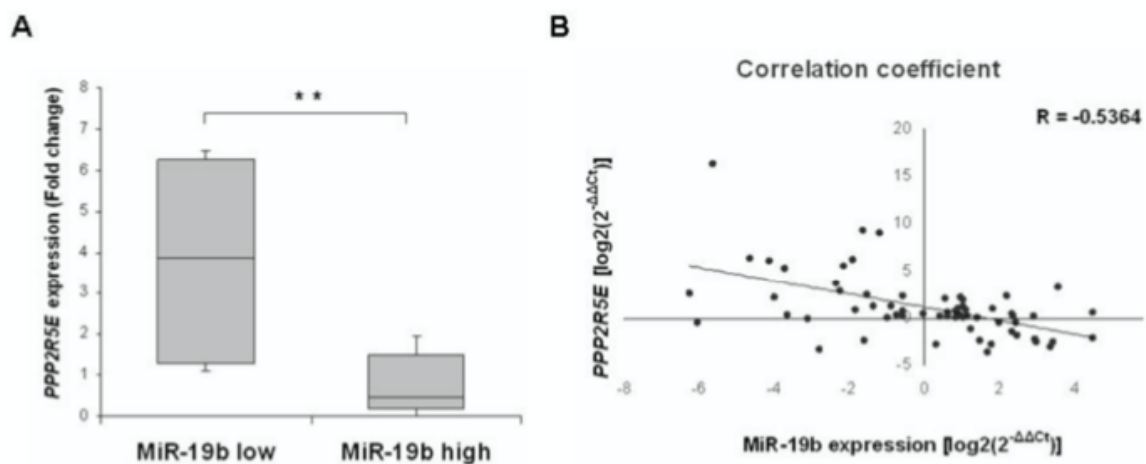


Figure 3. Evaluation of the miR-19b/PPP2R5E axis in LARC; (A) Box-plot showing *PPP2R5E* levels in LARC patients with low and high miR-19b expression; ** $p < 0.001$; (B) Scatter plot showing the negative correlation between miR-19b and *PPP2R5E* expression in 63 LARC patients.

As expected, high *PPP2R5E* and low miR-19b expression were significantly associated in our series of LARC patients ($p < 0.001$) (Table S3), and *PPP2R5E* was also able to predict response to neoadjuvant CRT ($p = 0.022$) (Table S4).

4. Discussion

Nowadays, the clinical decisions in LARC are made based on clinical variables measured prior to neoadjuvant CRT. However, around 30% of cases do not show any response to preoperative CRT, and surgical resection should have been done from the beginning [35]. Although some potential biomarkers have been described in this context, none of them have been established and incorporated in the clinical routine [11,36]. Therefore, the identification of biomarkers predictive of response to neoadjuvant treatment still remains necessary and a challenge to optimize the clinical management of LARC patients. Here, we evaluate the potential clinical impact of miR-19b in this disease, and we hypothesized that miR-19b could serve as a good candidate to predict both outcome and response to neoadjuvant CRT in LARC patients based on several considerations. First, although its role in rectal cancer has not been investigated yet, this miR has been reported in several prior studies to predict outcome in CRC patient cohorts [29,30,36,37], suggesting that it could be a useful biomarker to predict outcome also in LARC. Second, miR-19b has been described to regulate the sensitivity of CRC cells to 5-FU [32], which could be directly related with the response to a neoadjuvant treatment based on this chemotherapy agent. Moreover, our group reported that PP2A inhibition is an alteration that confers 5-FU resistance in CRC and described the downregulation of *PPP2R5E* as a contributing mechanism to inactivate this phosphatase [42,43]. *PPP2R5E* is a PP2A regulatory subunit [44], and its deregulation has been reported to have important implications in both human cancer and cognitive disorders such as Alzheimer disease [26,45,46]. Interestingly, *PPP2R5E* has been identified as a direct target of miR-19b [26], further suggesting that this miR could be involved as a regulator of 5-FU sensitivity in LARC through PP2A regulation. Third, the work by Molinari and colleagues analyzed the DCN of *MIR17HG*, observing that *MIR17HG* gene amplification, which includes miR-19b, was related with a lack of response in LARC [38].

Our results showed that low miR-19b levels correlated with lower tumor size and early pathological stage, and that those cases with decreased miR-19b expression tended to show a lower lymph node positivity rate after-CRT (Table 1). In concordance with these findings, Zhang and colleagues described in their work increased miR-19b expression levels in the subgroup of CRC patients with lymph node metastasis compared with those patients with no lymph node metastasis. Moreover, these authors also found a higher miR-19b expression in the subgroup of patients with distal metastasis [30], and we observed here that high

miR-19b levels are markedly associated with recurrence (Table 3). Furthermore, we found that those patients with low miR-19b expression had longer OS and EFS (Figure 2) and that this miR serves an independent predictor of prognosis in LARC (Table 5 and Table S2), and these findings would further supported by the fact that in previous works in the literature, high miR-19b has been associated with shorter survival in CRC patients [29,30,37]. The retrospective nature of the study and the lack of validation in larger independent cohorts are relevant limitations of our work that suggest taking the conclusions with caution. However, the present study is the first one to evaluate the clinical relevance of miR-19b in LARC. Finally, we show here that miR-19b levels have a marked predictive value of response to neoadjuvant CRT in our cohort of LARC patients, which suggests that this miR is probably regulating the sensitivity of the tumor cells to 5-FU. It would be very interesting to evaluate this issue in forthcoming studies as well as determine the molecular mechanism of action. In this way, it could be of interest to analyze the involvement and relevance of a potential miR-19b-mediated PP2A inhibition through the negative regulation of PPP2R5E. We found here a negative correlation between miR-19b and PPP2R5E expression (Figure 3), which would be suggesting the role of miR-19b as a negative regulator of PPP2R5E in LARC patients. The fact that PPP2R5E was also able to predict response to neoadjuvant CRT in our patient cohort (Table S4) highlights the potential significance of the miR-19b/PPP2R5E axis in regulating sensitivity to CRT, but this hypothesis needs to be confirmed in future functional studies. Of interest, PPP2R5E has been recently reported as a novel molecular target of allosteric PP2A activators with promising therapeutic implications in human cancer [46]. Moreover, the validation of our findings in an independent series of LARC patients is warranted to confirm the clinical impact of miR-19b and its usefulness as a robust biomarker in this disease. The lack of knowledge about a potential dependence of miR-19b of ethnic characteristics as well as the use of a unique cohort of 121 patients are relevant limitations that could lead to taking the conclusions of this study with caution before validation in an independent cohort. It would be also of relevance to evaluate its role as a biomarker in liquid biopsies and compare miR-19b expression between preoperative and postoperative samples from the same patient to strengthen its role in the progression of the disease.

5. Conclusions

In conclusion, our work shows evidence that miR-19b downregulation is a common event in LARC. Our results indicate that the subgroup of LARC patients with low levels of miR-19b independently predicts larger OS and EFS, and it could be used to anticipate good pathological response in this disease. However, it remains necessary to clarify the underlying mechanism of action of this miR to investigate its functional role and therapeutic value. Altogether, our findings highlight the potential usefulness of miR-19b as a predictive biomarker for pathological response and outcome in LARC patients treated with neoadjuvant chemoradiotherapy, which has to be fully validated in forthcoming studies including independent cohorts and liquid biopsies.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/2072-6694/13/6/1456/s1>, Table S1: Association between mir-19b and clinical and molecular parameters in 121 LARC patients, Table S2: Univariate and multivariate Cox analyses for EFS in the cohort of 121 LARC patients, Table S3: Association between *PPP2R5E* and miR-19b expression levels in LARC patients, Table S4: Association between *PPP2R5E* expression and pathological response to neoadjuvant CRT in LARC patients.

Author Contributions: Conceptualization, I.C., J.R. and J.G.-F.; methodology, I.C., A.S. and S.Z.; software, J.R., A.S. and C.C.; formal analysis, I.C. and J.R.; investigation, I.C., J.R., A.S., M.L., M.S.-A.; writing—original draft preparation, I.C. and J.R.; writing—review and editing, J.M.-G. and F.R.; funding acquisition, F.R. and J.G.-F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by PI18/00382 and PI16/01468 grants from “Instituto de Salud Carlos III FEDER”. M.S.-A. is supported by “Fundación Cristina Rábago de Jiménez Díaz”.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Review Board of Fundación Jiménez Díaz University Hospital (2018/54).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Data sharing is not applicable for this article.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Spanish Society of Medical Oncology. Cancer Data in Spain. Available online: <https://seom.org/dmccancer/wp-content/uploads/2019/Informe-SEOM-cifras-cancer-2019.pdf> (accessed on 8 January 2021).
- Feeney, G.; Sehgal, R.; Sheehan, M.; Hogan, A.; Regan, M.; Joyce, M.; Kerin, M. Neoadjuvant radiotherapy for rectal cancer management. *World J. Gastroenterol.* **2019**, *25*, 4850–4869. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Glynn-Jones, R.; Wyrwicz, L.; Tiret, E.; Brown, G.; Rödel, C.; Cervantes, A.; Arnold, D. Rectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* **2017**, *28*, iv22–iv40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- National Comprehensive Cancer Network (NCCN). NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Available online: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls (accessed on 8 January 2021).
- van Gijn, W.; Marijnen, C.A.; Nagtegaal, I.D.; Kranenbarg, E.M.-K.; Putter, H.; Wiggers, T.; Rutten, H.J.; Pählman, L.; Glimelius, B.; van de Velde, C.J. Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer: 12-year follow-up of the multicentre, randomised controlled TME trial. *Lancet Oncol.* **2011**, *12*, 575–582. [[CrossRef](#)]
- Yeo, S.-G.; Kim, D.Y.; Kim, T.H.; Chang, H.J.; Oh, J.H.; Park, W.; Choi, D.H.; Nam, H.; Kim, J.; Cho, M.; et al. Pathologic Complete Response of Primary Tumor Following Preoperative Chemoradiotherapy for Locally Advanced Rectal Cancer: Long-term Outcomes and Prognostic Significance of Pathologic Nodal Status (KROG 09-01). *Ann. Surg.* **2010**, *252*, 998–1004. [[CrossRef](#)]
- Fokas, E.; Fietkau, R.; Hartmann, A.; Hohenberger, W.; Grützmann, R.; Ghadimi, M.; Liersch, T.; Ströbel, P.; Grabenbauer, G.; Graeven, U.; et al. Neoadjuvant rectal score as individual-level surrogate for disease-free survival in rectal cancer in the CAO/ARO/AIO-04 randomized phase III trial. *Ann. Oncol.* **2018**, *29*, 1521–1527. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Guillem, J.G.; Chessin, D.B.; Cohen, A.M.; Shia, J.; Mazumdar, M.; Enker, W.; Paty, P.B.; Weiser, M.R.; Klimstra, D.; Saltz, L.; et al. Long-term Oncologic Outcome Following Preoperative Combined Modality Therapy and Total Mesorectal Excision of Locally Advanced Rectal Cancer. *Ann. Surg.* **2005**, *241*, 829–838. [[CrossRef](#)]
- Benzoni, E.; Intersimone, D.; Terrosu, G.; Bresadola, V.; Cojutti, A.; Cerato, F.; Avellini, C. Prognostic value of tumour regression grading and depth of neoplastic infiltration within the perirectal fat after combined neoadjuvant chemo-radiotherapy and surgery for rectal cancer. *J. Clin. Pathol.* **2006**, *59*, 505–512. [[CrossRef](#)]
- Bottarelli, L.; de Angelis, G.L.; Azzoni, C.; Di Mario, F.; de Angelis, N.; Leandro, G.; Fornaroli, F.; Gaiani, F.; Negri, F. Potential predictive biomarkers in locally advanced rectal cancer treated with preoperative chemo-radiotherapy. *Acta Biomed.* **2018**, *89*, 102–106.
- Imedio, L.; Cristóbal, I.; Rubio, J.; Santos, A.; Rojo, F.; García-Foncillas, J. MicroRNAs in Rectal Cancer: Functional Significance and Promising Therapeutic Value. *Cancers* **2020**, *12*, 2040. [[CrossRef](#)]
- De Palma, F.D.E.; Luglio, G.; Tropeano, F.P.; Pagano, G.; D’Armiendo, M.; Kroemer, G.; Maiuri, M.C.; De Palma, G.D. The Role of Micro-RNAs and Circulating Tumor Markers as Predictors of Response to Neoadjuvant Therapy in Locally Advanced Rectal Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 7040. [[CrossRef](#)]
- Zhang, B.; Pan, X.; Cobb, G.P.; Anderson, T.A. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev. Biol.* **2007**, *302*, 1–12. [[CrossRef](#)]
- Xi, Y.; Formentini, A.; Chien, M.; Weir, D.B.; Russo, J.J.; Ju, J.; Kornmann, M.; Ju, J. Prognostic Values of microRNAs in Colorectal Cancer. *Biomark. Insights* **2006**, *1*, 113–121. [[CrossRef](#)]
- Mosakhani, N.; Sarhadi, V.K.; Borze, I.; Karjalainen-Lindsberg, M.-L.; Sundström, J.; Ristamäki, R.; Osterlund, P.; Knuutila, S. MicroRNA profiling differentiates colorectal cancer according to KRAS status. *Genes Chromosom Cancer* **2012**, *51*, 1–9. [[CrossRef](#)]
- Wang, H.; Peng, R.; Wang, J.; Qin, Z.; Xue, L. Circulating microRNAs as potential cancer biomarkers: The advantage and disadvantage. *Clin. Epigenetics* **2018**, *10*, 1–10. [[CrossRef](#)]
- Machackova, T.; Prochazka, V.; Kala, Z.; Slaby, O. Translational Potential of MicroRNAs for Preoperative Staging and Prediction of Chemoradiotherapy Response in Rectal Cancer. *Cancers* **2019**, *11*, 1545. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Caramés, C.; Cristóbal, I.; Moreno, V.; Del Puerto, L.; Moreno, I.; Rodríguez, M.; Marín, J.P.; Correa, A.V.; Hernández, R.; Zenzola, V.; et al. MicroRNA-21 predicts response to preoperative chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer. *Int. J. Color. Dis.* **2015**, *30*, 899–906. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Caramés, C.; Cristóbal, I.; Moreno, V.; Marín, J.P.; González-Alonso, P.; Torrejón, B.; Minguez, P.; Leon, A.; Martín, J.I.; Hernández, R.; et al. MicroRNA-31 Emerges as a Predictive Biomarker of Pathological Response and Outcome in Locally Advanced Rectal Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 878. [[CrossRef](#)]

20. Zhu, Y.; Peng, Q.; Lin, Y.; Zou, L.; Shen, P.; Chen, F.; Min, M.; Shen, L.; Chen, J.; Shen, B. Identification of biomarker microRNAs for predicting the response of colorectal cancer to neoadjuvant chemoradiotherapy based on microRNA regulatory network. *Oncotarget* **2016**, *8*, 2233–2248. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Cristóbal, I.; Rubio, J.; Santos, A.; Torrejón, B.; Caramés, C.; Imedio, L.; Mariblanca, S.; Luque, M.; Sanz-Alvarez, M.; Zazo, S.; et al. MicroRNA-199b Downregulation Confers Resistance to 5-Fluorouracil Treatment and Predicts Poor Outcome and Response to Neoadjuvant Chemoradiotherapy in Locally Advanced Rectal Cancer Patients. *Cancers* **2020**, *12*, 1655. [[CrossRef](#)]
22. Fan, Y.; Yin, S.; Hao, Y.; Yang, J.; Zhang, H.; Sun, C.; Ma, M.; Chang, Q.; Xi, J.J. miR-19b promotes tumor growth and metastasis via targeting TP53. *Struct. 30s Ribosomal Decod. Complex. At. Ambient Temp.* **2014**, *20*, 765–772. [[CrossRef](#)]
23. Liu, G.-L.; Yang, H.-J.; Liu, B.; Liu, T. Effects of MicroRNA-19b on the Proliferation, Apoptosis, and Migration of Wilms' Tumor Cells Via the PTEN/PI3K/AKT Signaling Pathway. *J. Cell. Biochem.* **2017**, *118*, 3424–3434. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Yuan, J.; Su, Z.; Gu, W.; Shen, X.; Zhao, Q.; Shi, L.; Jin, C.; Wang, X.; Cong, H.; Ju, S. MiR-19b and miR-20a suppress apoptosis, promote proliferation and induce tumorigenicity of multiple myeloma cells by targeting PTEN. *Cancer Biomark.* **2019**, *24*, 279–289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Wang, N.; Liang, X.; Yu, W.; Zhou, S.; Fang, M. Differential Expression of MicroRNA-19b Promotes Proliferation of Cancer Stem Cells by Regulating the TSC1/mTOR Signaling Pathway in Multiple Myeloma. *Cell. Physiol. Biochem.* **2018**, *50*, 1804–1814. [[CrossRef](#)]
26. Baumgärtner, U.; Berger, F.; Gheinani, A.H.; Burgener, S.S.; Monastyrskaya, K.; Vassella, E. miR-19b enhances proliferation and apoptosis resistance via the EGFR signaling pathway by targeting PP2A and BIM in non-small cell lung cancer. *Mol. Cancer* **2018**, *17*, 1–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Knudsen, K.N.; Nielsen, B.S.; Lindebjerg, J.; Hansen, T.F.; Holst, R.; Sørensen, F.B. microRNA-17 Is the Most Up-Regulated Member of the miR-17-92 Cluster during Early Colon Cancer Evolution. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0140503. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Humphreys, K.J.; Cobiac, L.; Le Leu, R.K.; Van Der Hoek, M.B.; Michael, M.Z. Histone deacetylase inhibition in colorectal cancer cells reveals competing roles for members of the oncogenic miR-17-92 cluster. *Mol. Carcinog.* **2012**, *52*, 459–474. [[CrossRef](#)]
29. Jiang, T.; Ye, L.; Han, Z.; Liu, Y.; Yang, Y.; Peng, Z.; Fan, J. miR-19b-3p promotes colon cancer proliferation and oxaliplatin-based chemoresistance by targeting SMAD4: Validation by bioinformatics and experimental analyses. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2017**, *36*, 1–14. [[CrossRef](#)]
30. Zhang, J.; Wang, Z.; Han, X.; Jiang, L.; Ge, R.; Wang, X.; Li, J. Up-regulation of microRNA-19b is associated with metastasis and predicts poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2018**, *11*, 3952–3960.
31. Guo, Y.; Ye, Q.; Deng, P.; Cao, Y.; He, D.; Zhou, Z.; Wang, C.; Zaytseva, Y.Y.; Schwartz, C.E.; Lee, E.Y.; et al. Spermine synthase and MYC cooperate to maintain colorectal cancer cell survival by repressing Bim expression. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1–16. [[CrossRef](#)]
32. Gu, Y.Y.; Yu, J.; Zhang, J.F.; Wang, C. Suppressing the secretion of exosomal miR-19b by gw4869 could regulate oxaliplatin sensitivity in colorectal cancer. *Neoplasma* **2019**, *66*, 39–45. [[CrossRef](#)]
33. Kurokawa, K.; Tanahashi, T.; Iima, T.; Yamamoto, Y.; Akaike, Y.; Nishida, K.; Masuda, K.; Kuwano, Y.; Murakami, Y.; Fukushima, M.; et al. Role of miR-19b and its target mRNAs in 5-fluorouracil resistance in colon cancer cells. *J. Gastroenterol.* **2012**, *47*, 883–895. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Zekri, A.-R.N.; Youssef, A.S.E.-D.; Lotfy, M.M.; Gabr, R.; Ahmed, O.S.; Nassar, A.; Hussein, N.; Omran, D.; Medhat, E.; Eid, S.; et al. Circulating Serum miRNAs as Diagnostic Markers for Colorectal Cancer. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0154130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Marcuello, M.; Duran-Sanchon, S.; Moreno, L.; Lozano, J.J.; Bujanda, L.; Castells, A.; Gironella, M. Analysis of A 6-Mirna Signature in Serum from Colorectal Cancer Screening Participants as Non-Invasive Biomarkers for Advanced Adenoma and Colorectal Cancer Detection. *Cancers* **2019**, *11*, 1542. [[CrossRef](#)]
36. Cruz-Gil, S.; Sanchez-Martinez, R.; de Cedron, M.G.; Martin-Hernandez, R.; Vargas, T.; Molina, S.; Herranz, J.; Davalos, A.; Reglero, G.; de Molina, A.R. Targeting the lipid metabolic axis ACSL/SCD in colorectal cancer progression by therapeutic miRNAs: miR-19b-1 role. *J. Lipid Res.* **2018**, *59*, 14–24. [[CrossRef](#)]
37. Kahlert, C.; Klupp, F.; Brand, K.; Lasitschka, F.; Diederichs, S.; Kirchberg, J.; Rahbari, N.; Dutta, S.; Bork, U.; Fritzmann, J.; et al. Invasion front-specific expression and prognostic significance of microRNA in colorectal liver metastases. *Cancer Sci.* **2011**, *102*, 1799–1807. [[CrossRef](#)]
38. Salvi, S.; Molinari, C.; Foca, F.; Teodorani, N.; Saragoni, L.; Puccetti, M.; Passardi, A.; Tamberi, S.; Avanzolini, A.; Lucci, E.; et al. miR-17-92a-1 cluster host gene (MIR17HG) evaluation and response to neoadjuvant chemoradiotherapy in rectal cancer. *Oncotargets* **2016**, *9*, 2735–2742. [[CrossRef](#)]
39. Greenson, J.K.; Huang, S.-C.; Herron, C.; Moreno, V.; Bonner, J.D.; Tomsho, L.P.; Ben-Izhak, O.; Cohen, H.I.; Trougouboff, P.; Bejhar, J.; et al. Pathologic Predictors of Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Am. J. Surg. Pathol.* **2009**, *33*, 126–133. [[CrossRef](#)]
40. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)). *Method* **2001**, *25*, 402–408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Sauerbrei, W.; Taube, S.E.; McShane, L.M.; Cavenagh, M.M.; Altman, D.G. Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies (REMARK): An Abridged Explanation and Elaboration. *J. Natl. Cancer Inst.* **2018**, *110*, 803–811. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

42. Cristóbal, I.; Manso, R.; Rincón, R.; Caramés, C.; Senin, C.; Borrero, A.; Martínez-Useros, J.; Rodríguez, M.; Zazo, S.; Aguilera, O.; et al. PP2A Inhibition Is a Common Event in Colorectal Cancer and Its Restoration Using FTY720 Shows Promising Therapeutic Potential. *Mol. Cancer* **2014**, *13*, 938–947. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Cristóbal, I.; Rincón, R.; Manso, R.; Madoz-Gúrpide, J.; Caramés, C.; del Puerto-Nevado, L.; Rojo, F.; García-Foncillas, J. Hyperphosphorylation of PP2A in colorectal cancer and the potential therapeutic value showed by its forskolin-induced dephosphorylation and activation. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1842*, 1823–1829. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. McCright, B.; Brothman, A.R.; Virshup, D.M. Assignment of human protein phosphatase 2A regulatory subunit genes b56alpha, b56beta, b56gamma, b56delta, and b56epsilon (PPP2R5A-PPP2R5E), highly expressed in muscle and brain, to chromosome regions 1q41, 11q12, 3p21, 6p21.1, and 7p11.2 → p12. *Genomics* **1996**, *36*, 168–170. [[CrossRef](#)]
45. Theendakara, V.; Bredesen, D.E.; Rao, R.V. Downregulation of protein phosphatase 2A by apolipoprotein E: Implications for Alzheimer's disease. *Mol. Cell Neurosci.* **2017**, *83*, 83–91. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Morita, K.; He, S.; Nowak, R.P.; Wang, J.; Zimmerman, M.W.; Fu, C.; Durbin, A.D.; Martel, M.W.; Prutsch, N.; Gray, N.S.; et al. Allosteric Activators of Protein Phosphatase 2A Display Broad Antitumor Activity Mediated by Dephosphorylation of MYBL2. *Cell* **2020**, *181*, 702–715.e20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Low MicroRNA-19b Expression Shows a Promising Clinical Impact in Locally Advanced Rectal Cancer

Jaime Rubio, Ion Cristóbal, Andrea Santos, Cristina Caramés, Melani Luque, Marta Sanz-Alvarez, Sandra Zazo, Juan Madoz-Gúrpide, Federico Rojo and Jesús García-Foncillas

Table S1. Clinical and molecular characteristics of a series of 121 LARC patients.

		No.	(%)
Sex	Male	73	(60.3)
	Female	48	(39.7)
Age	<60	40	(33.1)
	≥60	81	(66.9)
ECOG ¹	0	81	(66.9)
	1-2	40	(33.1)
Site of primary tumor	Rectum	121	(100)
Clinical stage pre-CRT ²	II	9	(7.4)
	III	112	(92.6)
Grade pre-CRT	Low	40	(35.7)
	Moderate-High	72	(64.3)
ypT ³	0	16	(13.2)
	1	16	(13.2)
	2	38	(31.4)
	3	44	(36.4)
	4	4	(3.3)
	x	3	(2.5)
ypN ⁴	0	91	(75.2)
	1	26	(21.5)
	2	4	(3.3)
Pathological stage	yp0	16	(13.2)
	ypI	43	(35.5)
	ypII	32	(26.5)
	ypIII	30	(24.8)
Neoadjuvant CRT	RT + 5-FU based	121	(100)
Recurrence	No	95	(78.5)
	Yes	26	(21.5)

¹ECOG= Eastern Cooperative Oncology Group; ²CRT= Chemoradiotherapy; ³ypT= tumor size after CRT; ⁴ypN= pathological lymph node after CRT.

Table S2. Univariate and multivariate analyses of factors predictive of event-free survival in the cohort of 121 LARC patients.

	Univariate EFS ¹ analysis				Multivariate EFS Cox analysis			
	HR ³	95% CI ²		<i>p</i>	HR	95% CI		<i>p</i>
		Lower	Upper			Lower	Upper	
Gender				0.696				-
Male	1.000							
Female	0.820	0.303 to 2.219			-	-		
Age				0.201				-
<60	1.000							
≥60	2.255	0.648 to 7.851			-	-		
Pathological stage				0.028				0.492
0-I	1.000				1.000			
II-III	3.519	1.145 to 10.814			1.631	0.404 to 6.579		
ypT ⁴				0.100				-
0-2	1.000							
3-4	2.306	0.852 to 6.243			-	-		
ypN ⁵				0.004				0.066
N-	1.000				1.000			
N+	4.045	1.550 to 10.522			3.075	0.930 to 10.171		
ECOG ⁶				0.349				-
0	1.000							
1-2	1.586	0.603 to 4.171			-	-		
MiR-19b				0.035				0.044
High	1.000				1.000			
Low	0.258	0.073 to 0.910			0.268	0.074 to 0.965		

¹EFS: event-free survival; ²CI: confidence interval; ³HR: Hazard ratio; ⁴ypT: tumor size after chemoradiotherapy (CRT); ⁵ypN: pathological lymph node after CRT; ⁶ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group.

Table S3. Association between miR-19b and *PPP2R5E* expression levels in LARC patients.

	No. Cases	MiR-19b low (%)		MiR-19b high (%)		<i>p</i>
<i>PPP2R5E</i>	63	24		39		<0.001
Low	48	12	(50)	36	(92.3)	
High	15	12	(50)	3	(7.7)	

Table S4. Association between pathological response to neoadjuvant CRT and *PPP2R5E* expression in LARC patients.

Response	Response to neoadjuvant CRT ¹				<i>p</i>
	No. Cases	Responders ² (%)		Non-Responders ³ (%)	
<i>PPP2R5E</i> expression	63	26		37	0.022
Low	48	16	(33.3)	32	(66.7)
High	15	10	(66.7)	5	(33.3)

¹CRT: chemoradiotherapy; ²Responders: moderate or complete pathological response; ³Non-Responders: poor or minimal pathological response.

DISCUSIÓN

La desregulación de SET es un evento asociado a progresión tumoral que predice pronóstico adverso en pacientes con cáncer colorrectal localizado

La proteína SET (I2PP2A/PHAP-II/TAF-I β) es una oncoproteína nuclear con un tamaño molecular de 39 kDa con múltiples funciones celulares, destacando principalmente la inhibición endógena de PP2A y favoreciendo propiedades oncogénicas en diversos subtipos tumorales, entre los que se incluyen tumores de alta incidencia como CCRm o CPNCP (136,170,171,174). Además, nuestro grupo de trabajo ya demostró la importancia de SET en CCRm donde se aprecia una correlación con peor estado general del paciente, peor SG y SLP, y con peor respuesta a tratamientos quimioterápicos basados en oxaliplatino (252).

El mecanismo de acción es a través de la inhibición que ejerce SET sobre PP2A, un supresor tumoral que regula un gran número de rutas de señalización y que se encuentra inactivado en una gran variedad de tipos tumorales (111,116). Cabe destacar que en la célula tumoral se han descrito múltiples estrategias para inactivar a PP2A, tanto a través de mutaciones u otras alteraciones que afectan a los niveles de expresión de las diferentes subunidades de PP2A, como por modificaciones postranscripcionales o por la sobreexpresión de sus inhibidores endógenos, CIP2A o SET (131–134).

Concretamente, hemos observado en CCRm que SET promueve la proliferación celular y la formación de colonosferas, inhibiendo a PP2A y determinando resistencia a QT (252) tanto in vitro como a nivel clínico. Actualmente, el papel en la enfermedad localizada es desconocido y el potencial terapéutico en ese escenario tiene un alto valor clínico por el potencial curativo de los tratamientos. En efecto, se ha comprobado que revertir la inhibición de PP2A con drogas como FTY720, por medio de la disolución de la unión de PP2A y de SET, muestra un claro efecto antitumoral (130).

Con la intención de estudiar la relevancia funcional de SET en la progresión del CCR se llevó a cabo la modulación ectópica de SET en las líneas celulares SW480 y HT29, observando cambios muy significativos en la capacidad de migración celular. Esto estaría apoyado por observaciones previas de nuestro grupo en las que se observó que

el tratamiento con FTY720, para reactivar a PP2A mediante el bloqueo la unión SET-PP2A que ejerce esta droga, reducía drásticamente la migración de las líneas celulares de CCR (130). Así, en el primero de los trabajos publicados en esta tesis doctoral vimos que el silenciamiento de SET induce un descenso en la capacidad de migración y, por el contrario, que la sobreexpresión de SET llevaba a un incremento de la misma. Se observaron también efectos similares en la TEM y en la capacidad de migración tras la modulación de SET, así como en la capacidad de crecimiento con independencia de anclaje. Todos estos resultados van en la línea de apoyar la hipótesis de que la sobreexpresión de SET promueve características funcionales estrechamente relacionadas con el incremento de agresividad de la célula tumoral, incrementando de este modo la capacidad de progresión del tumor. Por tanto nuestros hallazgos suponen una prueba del papel clave de SET en CCR, como otros trabajos lo han demostrado en diferentes modelos celulares como en CPNCP (253) Así, ten Klooster y colaboradores (154), demostraron que SET se trasloca hasta la membrana plasmática en donde interacciona con Rac-1 favoreciendo la migración celular, lo cual estaría apoyado por los resultados obtenidos en nuestros experimentos. Sin embargo, las observaciones de ten Klooster y colaboradores están determinadas por un procesamiento post-traducciona l en el cual SET sufre un corte por proteasas previo a su migración a la membrana donde se une con Rac-1. Falta por determinar en que medida nuestros resultados suponen un mecanismo adicional de control de SET sobre la migración celular puesto que nuestras observaciones no indican un incremento de ninguna forma truncada o cortada de SET, sino de su forma total. En el futuro sería interesante llevar a cabo más experimentos para dilucidar si, efectivamente, estos resultados son objeto de la cooperación de SET con Rac-1 y aclarar la relevancia de la regulación de SET sobre c-MYC, proteína afectada tras la modulación de SET en nuestros experimentos y que se ha descrito implicada en agresividad y progresión a enfermedad metastásica (251).

Para profundizar en la importancia de la desregulación de SET en CCR, hemos evaluado la expresión de esta proteína en una cohorte de 231 casos de CCR localizado al diagnóstico, observando una prevalencia del 15.4%, la cual es menor que la descrita para en CCRm que era del 24.8%, aunque similar al 13,8% de casos positivos sin enfermedad metastásica detectados en ese mismo trabajo (252). Las diferencias de

prevalencia que se encuentran entre la enfermedad localizada y metastásica pueden deberse a esa capacidad de SET de conferir una mayor agresividad al tumor y al hecho de que se trate de una alteración que en muchos casos surge como secundaria a otras en el proceso de evolución del CCR. Igualmente, se observó una correlación entre el aumento de expresión de SET y un peor ECOG. Sin embargo, esta alteración se asoció de manera significativa con aquellos casos con CCRm que presentaban tumores de colon (31.8% vs 11.8%), pero la situación se revertía al analizar los casos sin enfermedad metastásica al diagnóstico, en los que se vio una prevalencia mayor en los que tenían cáncer de recto (11% vs 24,2%). En el trabajo actual hemos observado una prevalencia parecida e independiente de la localización del tumor (15.2% vs 17.1%). Por lo tanto, estos resultados necesitan ser confirmados en futuros estudios con series independientes. Otro resultado muy interesante de nuestro estudio fue el hecho de que la sobreexpresión de SET se encontró asociada a recaída sólo en aquellos casos con estadio II frente a los pacientes con estadio III. Este hecho, podría ser debido a que el estadio III de la enfermedad es un estadio más avanzado y con afectación ganglionar por lo que esta alteración podría ser menos relevante para la determinación de recaídas debido a alteraciones adicionales adaptativas no presentes en casos sin afectación ganglionar y más precoces, como es el estadio II.

También demostramos que la sobreexpresión de SET se asocia con un menor tiempo a metástasis y menor tiempo a la progresión desde el diagnóstico de enfermedad metastásica. Esto es determinante en la enfermedad localmente avanzada, y más en el subgrupo de pacientes que desarrollan recidiva a distancia, porque asocia el aumento de SET como una característica de mayor agresividad. Nuestros resultados además muestran que predice una menor supervivencia en el subgrupo de mayores de 70 años, siendo esta población la que podría beneficiarse más de un tratamiento dirigido contra SET como sería el activador de PP2A, FTY720, un fármaco ya aprobado por la FDA para el tratamiento de la esclerosis múltiple y con resultados preclínicos oncológicos (254), u otros inhibidores más específicos de SET .

Por último, demostramos en una pequeña serie de 29 casos que al igual que se da en el CCRm, donde el miR-199b presentaba una baja expresión en aproximadamente

el 50% de los casos que sobreexpresaban SET, sucede lo mismo en CCR localizado. En este trabajo hemos querido confirmar de manera indirecta la vigencia funcional del eje miR-199b/SET en estos casos y para ello hemos analizado los niveles de expresión del miR-199b, observando que 7 de los 29 casos estudiados presentaban sobreexpresión de SET y, 4 de esos 7 mostraban una baja regulación del miR-199b. Por tanto, hemos demostrado que la baja expresión del miR-199b se asocia de manera significativa con la sobreexpresión de SET, ya que se observó que los niveles totales del miR se correlacionaban inversamente con los de SET en nuestra cohorte. Sin embargo, el hecho de que haya casos con sobreexpresión de SET que no presenten una baja regulación del miR-199b nos ha llevado a pensar que deben existir mecanismos moleculares alternativos que contribuyan a la desregulación de SET más allá del miR-199b, y que pretendemos investigar en futuros estudios.

La desregulación del microARN-199b muestra un valor pronóstico independiente de los niveles de SET en pacientes con estadios tempranos de cáncer colorrectal.

Los miRs son moléculas de ARN monocatenario de pequeño tamaño (entre 19 y 25 nucleótidos) que, aunque no codifican para proteínas, son capaces de regular la expresión de otros genes siendo capaces de unirse al ARN mensajero diana y reprimiendo su traducción, actuando como oncogenes o como genes supresores de tumores dependiendo del gen al que reprima la traducción (229).

Sus roles en el desarrollo de tumores han sido largamente reportados ya que participan en la proliferación, apoptosis y diferenciación celular entre otras (198).

Su función en el cáncer está en constante investigación y se conoce que participan en la biología de las células madre, en la angiogénesis, en la TEM, en el desarrollo de metástasis o incluso en la resistencia a los fármacos.

La baja expresión del miR-199b ha sido reportado en muchos tumores, al ser un supresor de tumores favorece el desarrollo de estos, desde en LMA, en cáncer de mama, de vejiga, CPNCP y en tumores de cabeza y cuello (230-233). También, nuestro grupo de investigación lo corroboró en CCR metastásico (138). De hecho, ha sido incluso propuesto como una nueva diana con valor terapéutico en CPNCP (255). Ya en artículos previos hemos demostrado el valor pronóstico del miR-199b en CCRm y su posible aportación terapéutica al inhibir SET, suponiendo por tanto un incremento de la

actividad PP2A (138), y también hemos descrito en una pequeña serie su asociación inversa con SET en CRLA (256). Para explorar el impacto clínico de la desregulación del miR-199b en CCR precoz cuantificamos este miR en una cohorte de 171 pacientes con CCR no metastásico al diagnóstico. Nuestro grupo informó anteriormente que la regulación negativa del miR-199b tenía una prevalencia del 25% en el CCR metastásico, que es ligeramente superior al 21,8% observado en los pacientes con CCR con enfermedad localizada. Estas diferencias podrían explicarse por el hecho de que la regulación a la baja de miR-199b contribuye a la agresividad de la enfermedad y representa una alteración secundaria adquirida en la progresión de la enfermedad como capacidad adaptativa de agresividad, en paralelo a lo propuesto la sobreexpresión de SET (138). Curiosamente, en ambos estudios, la prevalencia de los bajos niveles del miR-199b fue menor en el cáncer de recto que en los casos de cáncer de colon (22% frente al 18,6% en el CCR localizado y 26,4% frente al 20% en el CCRm), pero las diferencias no fueron significativas. Además, la asociación entre miR-199b y ECOG observada en el presente trabajo no se encontró en pacientes con CCRm.

Había que dilucidar si su valor pronóstico se debía meramente al peor pronóstico que confiere SET o si se trata de un valor independiente, ya que la sobreexpresión de SET también se ha descrito como capaz de predecir peores pronósticos en el CCR en estadio temprano (256). El miR-199b contribuye a la progresión del CCR hacia la regulación de SET, pero se apreció que el miR-199b estaba regulado a la baja en alrededor del 50% de los casos con CCR metastásico y con expresión alta de SET (138), y en CCR localizado hemos obtenido resultados muy similares con una regulación negativa de miR-199b en 10 de los 22 pacientes que sobreexpresaban SET (45%). Por tanto, estos resultados refuerzan nuestra hipótesis de la existencia de mecanismos moleculares adicionales al miR-199b para regular a SET, que son de relevancia en CCR, y que aún no han sido descritos.

Aunque se encontró que ambas alteraciones se correlacionaron con un peor ECOG, la sobreexpresión de SET fue mayor en aquellos casos con estadio III y la prevalencia de regulación a la baja de miR-199b fue similar en pacientes con estadio III que en aquellos casos con estadios I-II. Además, en el miR-199b no hay una asociación

con la recaída (local o distante) en contraste con la fuerte asociación de SET con este parámetro, que con altas expresiones presentaban un tiempo más corto hasta las metástasis, sobretodo en mayores de 70 años. Esto puede deberse a que el miR-199b no tiene tanta relevancia en el proceso de recaída como lo tiene SET. Sin embargo, encontramos aquí que la regulación a la baja de miR-199b muestra valor pronóstico en mayores y menores de 70 años. Por lo tanto, hubo diferencias significativas entre la regulación a la baja de miR-199b y la sobreexpresión de SET, y el hecho de que el primero fue más prevalente (21,6% frente a 15,3%) destaca aún más que miR-199b incluiría casos con niveles de SET normales. Es decir, ambas alteraciones sólo se solapan parcialmente en el espectro de pacientes con CCR que cubren.

De hecho, evaluamos si el valor predictivo del miR-199b era dependiente de SET y vimos que es un marcador independiente con mayor significación incluso que SET. Esto podría deberse a que el miR-199b estaría regulando la expresión de dianas alternativas a SET. Se ha descrito el papel que tiene sobre la supresión del oncogén SIRT1 y la modulación posterior de la vía de CREB/KISS1, de esta manera cuando hay una regulación a la baja del miR-199b se produce una activación de SIRT1 lo que favorece la capacidad de metástasis tumoral (257). Además, se ha informado que miR-199b está regulado negativamente a través del silenciamiento epigenético en el cáncer de ovario (258) y ARN largos no codificantes en los cánceres de pulmón de células no pequeñas y de cuello uterino (259,260). El miR-199b también funciona como supresor tumoral en meduloblastoma, a través de la regulación negativa de HES1 (237), en carcinoma hepatocelular y cáncer de próstata a través de HIF1 α (238) y en cáncer de mama afectando a HER2 (239). Por otra parte, un estudio reciente ha investigado el papel del ARN circular NSD2 en la inhibición de miR-199b en el CCR (261) Sin embargo, la identificación y aclaración de la relevancia de estos mecanismos que gobiernan la regulación del miR-199b en el CCR, queda pendiente para futuros estudios.

Finalmente, hay una publicación a destacar que sugiere que los niveles del microARN-199a en biopsias líquidas puede ser un buen marcador predictivo pronóstico de respuesta al tratamiento con QTRT neoadyuvante en CRLA. Lo analizaron en 69 pacientes (262) y sería muy interesante confirmar su potencial utilidad tanto en

estadios iniciales como en CCR metastásico en próximos estudios, ya que la capacidad predictiva de la biopsia líquida en CCR podrá determinar cambios terapéuticos (263,264).

La desregulación del microARN-199b confiere resistencia a tratamientos con 5-fluorouracilo y predice peor respuesta a quimiorradioterapia neoadyuvante y supervivencia más corta en pacientes con cáncer de recto localmente avanzado.

En los últimos años el abordaje contra el CRLA ha ido sufriendo modificaciones en el manejo según las características del paciente (frágil o robusto), según el estadio del cáncer y según la región del recto afecto. Esto ha supuesto que surjan nuevas estrategias a implementar en la práctica clínica habitual individualizando cada caso y con un manejo multidisciplinar en un comité de tumores con todos los especialistas médicos y cirujanos implicados. Entre ellas caben destacar el uso del ciclo corto de radioterapia (25 Grays en 5 sesiones) en aquellos que no puedan tolerar el ciclo convencional, con tumores pequeños o poca afectación ganglionar (114). Otra estrategia que ha demostrado una mejor tasa de respuestas es la neoadyuvancia total basada en QT de inducción con FOLFOX seguido de la QTRT y la cirugía para tumores de gran volumen con intención de aumentar las tasas de respuesta con resultados muy prometedores (118, 119). Incluso se están planteando las estrategias conocidas como “*Watch and Wait*” (W-W) que tratan de estudiar si se puede evitar la cirugía con esquemas más intensivos en tumores con respuesta patológica completa (102). Todo ello recalca la necesidad que tenemos de nuevos biomarcadores predictivos de respuesta al tratamiento neoadyuvante para seleccionar que pacientes se benefician más de cada estrategia. En nuestro caso y dados los resultados publicados por nuestro grupo de trabajo en relación a la importancia del eje SET/PP2A en la determinación de la respuesta a 5-FU, nos planteamos que el miR-199b podría tener un importante impacto funcional y clínico en CRLA. Si bien ya hay algunos estudios que han establecido potenciales miRs pronósticos en CRLA, ninguno ha sido correctamente validado e incorporado a la práctica clínica habitual (265,210).

Hemos demostrado que en CCRm la expresión baja del miR-199b es un evento frecuente y que actúa como inhibidor de SET, considerándose por tanto un miR con

función supresor de tumores (138). Nuestro grupo también informó que la sobreexpresión de SET induce el crecimiento celular y disminuye la sensibilidad de las células CRC a los agentes quimioterapéuticos estándar como el oxaliplatino y el 5-FU (252) y se encontró que miR-199b también aumenta los efectos de ambos tratamientos. Por tanto, y teniendo en cuenta que el eje terapéutico neoadyuvante en CRLA es el 5-FU, nos planteamos como se indicó anteriormente la hipótesis de que este miR podría tener un potencial impacto clínico y terapéutico en esta enfermedad. Así, nuestros resultados muestran en líneas celulares una relación clara entre la sobreexpresión de miR-199b y la sensibilización de las células de CRC al tratamiento con 5-FU. Además, también utilizamos un anti-miR-199b específico, observando una reducción esperada en los efectos antitumorales del 5-FU, lo que valida los resultados observados con la sobreexpresión de dicho miR. Aunque los efectos del uso del anti-miR-199b fueran menores de lo esperado, probablemente sea porque las líneas celulares empleadas (SW480 y HT-29) tienen una expresión basal baja del miR-199b.

En este artículo observamos que un incremento del miR-199b sensibiliza al 5-FU de una manera dependiente de SET y para demostrar la participación de SET lo sobreexpresamos ectópicamente y vimos que SET revirtió la quimiosensibilidad conseguida por los altos niveles del miR-199b, demostrando que este miR modula la sensibilidad al 5-FU al menos parcialmente a través de SET. Este experimento permite evitar el efecto del miR-199b sobre el SET expresado ectópicamente gracias a la ausencia de la región no codificante de unión del miR-199b a SET. Sin embargo, dado que el miR-199b tiene otras dianas no podemos excluir otras vías de acción independientes de SET, como por ejemplo la inhibición del oncogén SIRT1, que ya hemos comentado previamente que se ha probado como otra diana del miR-199b en CCR (257). Además, en los experimentos con el tratamiento con FTY720 vimos excelentes respuestas que podrían explicarse por efectos antitumorales adicionales a la inhibición de SET como la regulación a la baja de CIP2A, otro inhibidor de PP2A (254). También en los experimentos con un modelo de resistencia adquirida a 5-FU pudimos ver el valor terapéutico que podría suponer el eje miR-199b/SET para revertir la resistencia a dicho agente.

Como vimos en el artículo previo de esta tesis, una baja expresión del miR-199b se asoció con la sobreexpresión de SET en una pequeña cohorte de pacientes con CCR localizado, considerándose uno de los mecanismo de regulación de SET (256). Aquí, demostramos una correlación inversa entre la expresión del miR-199 y SET en pacientes con CRLA, viendo niveles bajos de miR-199b en 10 de los 17 casos con sobreexpresión de SET, lo que también sugiere, como se indicó previamente, la existencia de mecanismos adicionales para desregular SET. Igualmente nuestros resultados indican que tanto SET como miR-199b son buenos predictores de respuesta a la QTRT. Probamos que los niveles bajos de miR-199b predicen una SG y SLE más cortas, esto junto con el hecho de que SET predice peor pronóstico en CCR (256) remarca la relevancia clínica que podría tener miR-199b en CCR localmente avanzado. Los resultados obtenidos con el miR-199b como marcador en pacientes con CRLA deberán validarse en más estudios con series independientes de mayor tamaño antes de su inclusión en los protocolos clínicos, y será nuestro siguiente paso a seguir.

Los bajos niveles de expresión del microARN-19b muestran un prometedor impacto clínico en cáncer de recto localmente avanzado.

Como ya hemos comentado previamente los investigadores han identificado numerosos biomarcadores postquirúrgicos pronósticos y unos pocos prequirúrgicos, pero ninguno tiene aplicación clínica (214, 266). Dentro del estudio de la vía de PP2A, dado que la regulación postranscripcional del miR-199b sobre SET no predicen completamente la respuesta al tratamiento nos planteamos estudiar otros microARNs implicados en esta vía molecular. Decidimos estudiar el miR-19b porque se ha probado su potencial carcinogénico en diferentes tumores (243,244,246) y porque el mecanismo de acción en CPNCP, donde inhibe la subunidad coestimuladora de PP2A, PPP2R5E, podría ser el mismo que promueve la proliferación celular en CRLA (247). Además, en CCRm ya ha sido demostrado su potencial oncogénico favoreciendo la proliferación, migración e invasión tumoral (268). De hecho, a nivel terapéutico, se han relacionado altos niveles de miR-19b con una mayor resistencia a QT en modelos de CCR (oxaliplatino y 5-FU) (250). Además, nuestro grupo informó que la inhibición de PP2A es una alteración que confiere resistencia al 5-FU en el CCR y describió la regulación a la

baja de PPP2R5E como un mecanismo que contribuye a inactivar esta fosfatasa (136,254). Por todo ello nos pareció interesante estudiar este microARN en nuestra serie de pacientes.

En esta publicación, evaluamos el impacto clínico potencial del miR-19b en esta enfermedad, y planteamos la hipótesis de que miR-19b podría servir como un buen candidato para predecir tanto la respuesta al tratamiento con QTRT como el resultado pronóstico global. Nuestros resultados muestran que los niveles bajos de expresión del miR-19b se correlacionan con un tamaño tumoral más bajo y un estadio menos avanzado, y que aquellos pacientes con esta alteración tendían a mostrar menor afectación ganglionar tras la QTRT. Esto se correlaciona con datos similares de otros grupos de trabajo (268), que a su vez vieron que la sobreexpresión del miR suponía un mayor riesgo de metástasis a distancia, y en nuestra serie encontramos una mayor tasa de recurrencias. Al mismo tiempo, encontramos que los pacientes con bajos niveles del miR-19b tenían una SG y una SLE más prolongadas y los análisis multivariantes mostraron que este miR tiene valor predictivo y pronóstico independiente en CRLA. Tenemos que recalcar que la naturaleza retrospectiva del estudio y la falta de validación en cohortes independientes más grandes son limitaciones relevantes de nuestro trabajo, sin embargo, este estudio es el primero en evaluar la relevancia clínica de miR-19b en CRLA y de ahí su interés.

Finalmente, mostramos aquí que los niveles de miR-19b tienen un marcado valor predictivo de respuesta a la QTRT neoadyuvante en pacientes con CRLA, lo que sugiere que este miR probablemente regula la sensibilidad de las células tumorales al 5-FU y la hipótesis más plausible es que lo haga a través de la regulación de los niveles de actividad de PP2A, la cual ya ha sido previamente implicada en este sentido por nuestro propio grupo de trabajo (252). Podría ser de interés analizar la implicación y relevancia de una posible inhibición de PP2A mediada por miR-19b a través de la regulación negativa de PPP2R5E. Por esa razón medimos la expresión de PPP2R5E en nuestras muestras (63 casos con muestra disponible) y encontramos una correlación negativa entre el miR-19b y PPP2R5E, lo que estaría apoyando el papel de miR-19b como regulador negativo de PPP2R5E. Además, PPP2R5E también fue capaz de predecir la

respuesta a la QTRT neoadyuvante en nuestra cohorte de pacientes recalcando la importancia del eje miR-19b/PPP2R5E en la regulación de la sensibilidad a la QTRT. Esta hipótesis debe confirmarse en futuros estudios. Además, la validación de nuestros hallazgos en una serie independiente de pacientes con CRLA está justificada para confirmar el impacto del miR-19b y su utilidad como biomarcador. También sería relevante evaluar su papel como biomarcador en biopsias líquidas, para tratar de establecer sus niveles como un biomarcador para monitorizar las respuestas durante el tratamiento y seleccionar aquellos pacientes en los que debemos intensificar el tratamiento o desescalarlo. Ese campo será abordado en futuros experimentos de nuestro grupo.

Valoración global de los resultados obtenidos

La investigación realizada durante el desarrollo de esta tesis doctoral ha permitido completar el estudio sobre el impacto clínico y funcional de SET en CCR, abordando el estudio del mismo en pacientes con enfermedad localizada y evaluar la relevancia de SET como regulador de características tumorales relacionadas con la progresión del cáncer. Además, la identificación de mecanismos moleculares que contribuyen a la sobreexpresión de SET como supone la expresión disminuida de su regulador miR-199b nos permite aumentar nuestra comprensión sobre las vías de señalización que afectan en última instancia a la actividad de PP2A de cara a su empleo como diana molecular para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. Además, durante esta tesis hemos podido identificar nuevos marcadores pronósticos, definiendo un subgrupo de pacientes con cáncer de recto localmente avanzado con un peor pronóstico de respuesta a terapia neoadyuvante, con mayor probabilidad de recaída y con peor supervivencia, destacando este subgrupo como los que más se beneficiarían de nuevos abordajes terapéuticos.

Esta tesis doctoral es la continuidad de un trabajo realizado por un grupo científico durante los últimos años. Surge a raíz de los resultados de Cristóbal y colaboradores que demostraron que en el CCRm el supresor tumoral PP2A mostraba bajos niveles de actividad (254). En ese trabajo ya se caracterizó que esto se debía

principalmente a la sobreexpresión de sus inhibidores endógenos SET y CIP2A, siendo reversible con inhibidores específicos, así como con drogas como FTY720. A raíz de esto se describió que SET estaba sobreexpresado en un subgrupo de pacientes con CCRm (252) pero no estaban descritos cuales eran los mecanismos moleculares que producían dicha alteración. Profundizado en esto completaron el estudio en CCRm abordando la regulación de SET vía post-traducciona l a través de SETBP1 (168) o post-transcripcional vía miR-199b, cuya sobreexpresión inhibía SET y suponía una futura diana terapéutica como resensibilizador a la QT basada en 5-FU y oxaliplatino (138).

En esta tesis doctoral, hemos dilucidado el papel que la sobreexpresión de SET juega en CCR localizado, viendo que a nivel funcional promueve las propiedades de migración celular, crecimiento con independencia de anclaje y TEM, todas ellas propiedades relacionadas con progresión tumoral y mayor agresividad. Además, hemos definido el valor de la sobreexpresión de SET como marcador de mal pronóstico también en pacientes con CCR localizado, al igual que lo describimos para aquéllos con enfermedad metastásica en anteriores trabajos. A continuación, hemos identificado la relevancia de la baja expresión del miR-199b como un mecanismo molecular responsable de la sobreexpresión de SET en aproximadamente la mitad de los casos con CCR localizado, del mismo modo que se describió también para el CCRm. Sumado a esto, hemos visto que la disminución de los niveles de expresión de este miR es una alteración más prevalente que la sobreexpresión de SET y que muestra un valor pronóstico independiente de SET en esta enfermedad. Tras observar la importancia del eje miR-199b/SET en la regulación de la sensibilidad a 5-FU, nos planteamos evaluar el impacto funcional y clínico de este miR en pacientes con CRLA, ya que es un grupo de casos que se caracteriza por recibir un tratamiento con QTRT neoadyuvante basada en 5-FU. Así, vimos que el miR-199b juega un papel esencial en la respuesta a 5-FU e incluso el eje miR-199b/SET surge como una nueva diana terapéutica para revertir la resistencia a 5-FU adquirida en la progresión del CCR. El miR-199b mostró un valor muy significativo en nuestra cohorte de pacientes con CRLA, y aquellos con una baja expresión del mismo se asociaron con mala respuesta patológica a la QTRT neoadyuvante, así como con una supervivencia más corta. Finalmente, estudiamos el significado clínico del miR-19b, ya que es un regulador de PPP2R5E, cuya alteración fue

descrita en un trabajo previo de nuestro grupo como uno de los mecanismos de inhibición de PP2A en CCR, supresor tumoral relacionado con la respuesta a 5-FU. De hecho, la función de SET como regulador de la sensibilidad a 5-FU está determinada por su condición de potente inhibidor endógeno de PP2A. Nuestros resultados demostraron que la alta expresión del miR-19b predice una buena respuesta de los pacientes con CRLA a QTRT neoadyuvante, así como una mejor supervivencia de los mismos. Además, se correlacionan inversamente las expresiones de este miR con la de PPP2R5E, lo que indirectamente apoya el papel del eje miR-19b/PPP2R5E en este sentido, a través de la regulación de los niveles de PP2A en pacientes con CRLA. De todos modos, demostrar experimentalmente esta hipótesis es uno de los objetivos de nuestra línea de investigación por realizar.

CONCLUSIONES

1. La sobreexpresión de SET es un evento frecuente que contribuye a la progresión del cáncer colorrectal, a través del potenciamiento de las capacidades de migración, crecimiento con independencia de anclaje y la transición epitelio-mesénquima de las células tumorales.
2. La sobreexpresión de SET es un marcador predictivo de menor supervivencia global en pacientes mayores de 70 años con cáncer colorrectal localizado al diagnóstico. Además, dicha alteración determina un menor tiempo de evolución a metástasis, así como un menor tiempo de progresión desde el diagnóstico de enfermedad metastásica.
3. La baja expresión del miR-199b es una alteración común en cáncer colorrectal localizado al diagnóstico que define un subgrupo de pacientes con peor supervivencia global y supervivencia libre de progresión de manera independiente y estadísticamente más significativa que la sobreexpresión de SET, lo cual sugiere que también regula otras dianas relevantes para la progresión del cáncer colorrectal.
4. El miR-199b regula la sensibilidad de las células tumorales de cáncer colorrectal al tratamiento con 5-fluorouracilo de una manera dependiente de la capacidad de este microARN de funcionar como regulador negativo de SET. Además, la sobreexpresión del miR-199b, así como el silenciamiento de SET o el tratamiento con el fármaco Fingolimod fueron capaces de revertir el fenotipo de resistencia adquirida a 5-fluorouracilo en la línea celular SW480.
5. Los niveles bajos de expresión del miR-199b en pacientes con cáncer de recto localmente avanzado sirven como marcador independiente de mala respuesta a quimiorradioterapia neoadyuvante, así como de supervivencia global y libre de evento más corta, y se asocian significativa e inversamente a los de SET en la cohorte de pacientes analizados.

6. La baja expresión del miR-19b se observa de manera muy frecuente en pacientes con cáncer de recto localmente avanzado y se asocia con buena respuesta patológica a quimiorradioterapia neoadyuvante y con un riesgo muy bajo de recaída en pacientes con esta alteración. Además, la expresión disminuida del miR-19b muestra valor como marcador de buen pronóstico en pacientes con cáncer de recto localmente avanzado tanto en términos de supervivencia global como supervivencia libre de evento.

7. Los niveles de expresión del miR-19b se encuentran inversamente correlacionados con la expresión de PPP2R5E, subunidad reguladora de PP2A que también determina buena respuesta a quimiorradioterapia neoadyuvante en pacientes con cáncer de recto localmente avanzado, lo que sugiere la potencial relevancia del eje miR-19b/PPP2R5E en esta enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Spanish Society of Medical Oncology. Cancer data in Spain. [Internet]. Disponible en: <https://seom.org/dmccancer/wp-content/uploads/2019/Informe-SEOM-cifras-cancer-2019.pdf>
2. Global Burden of Disease Cancer Collaboration, Fitzmaurice C, Akinyemiju TF, Al Lami FH, Alam T, Alizadeh-Navaei R, et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2016: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol.* 2018;4(11):1553-68.
3. Aran V, Victorino AP, Thuler LC, Ferreira CG. Colorectal Cancer: Epidemiology, Disease Mechanisms and Interventions to Reduce Onset and Mortality. *Clinical Colorectal Cancer.* 2016;15(3):195-203.
4. Chen E, Xu X, Liu T. Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer and Cancer Syndromes: Recent Basic and Clinical Discoveries. *Journal of Oncology.* 2018 1-11.
5. Freedman AN, Slattery ML, Ballard-Barbash R, Willis G, Cann BJ, Pee D, et al. Colorectal cancer risk prediction tool for white men and women without known susceptibility. *J Clin Oncol.* 2009;27(5):686-93.
6. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin.* 2010;60(5):277-300.
7. Castro-Mujica MC, Sullcahuamán-Allende Y, Barreda-Bolaños F, Taxa-Rojas L. Síndromes hereditarios de predisposición al cáncer colorrectal identificados en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN). *Rev Gastroenterol Peru;* 2014.
8. Rutter MD. Surveillance programmes for neoplasia in colitis. *J Gastroenterol.* 2011;46 Suppl 1:1-5.
9. Rombouts AJM, Hugen N, Elferink MAG, Poortmans PMP, Nagtegaal ID, de Wilt JHW. Increased risk for second primary rectal cancer after pelvic radiation therapy. *Eur J Cancer.* 2020;124:142-51.
10. Webster AC, Craig JC, Simpson JM, Jones MP, Chapman JR. Identifying high risk groups and quantifying absolute risk of cancer after kidney transplantation: a cohort study of 15,183 recipients. *Am J Transplant.* 2007;7(9):2140-51.
11. Yang Y-X, Hennessy S, Lewis JD. Type 2 diabetes mellitus and the risk of colorectal cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2005;3(6):587-94.
12. He J, Stram DO, Kolonel LN, Henderson BE, Le Marchand L, Haiman CA. The association of diabetes with colorectal cancer risk: the Multiethnic Cohort. *Br J Cancer.* 2010;103(1):120-6.
13. Gillissen S, Templeton A, Marra G, Kuo Y-F, Valtorta E, Shahinian VB. Risk of colorectal cancer in men on long-term androgen deprivation therapy for prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2010;102(23):1760-70.
14. Derry MM, Raina K, Agarwal C, Agarwal R. Identifying molecular targets of lifestyle modifications in colon cancer prevention. *Front Oncol.* 2013;3:119.
15. Huxley RR, Ansary-Moghaddam A, Clifton P, Czernichow S, Parr CL, Woodward M. The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal cancer: a quantitative overview of the epidemiological evidence. *Int J Cancer.* 2009;125(1):171-80.
16. Gonzalez CA, Riboli E. Diet and cancer prevention: Contributions from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Eur J Cancer.* 2010;46(14):2555-62.
17. Cross AJ, Ferrucci LM, Risch A, Graubard BI, Ward MH, Park Y, et al. A large

- prospective study of meat consumption and colorectal cancer risk: an investigation of potential mechanisms underlying this association. *Cancer Res.* 2010;70(6):2406-14.
18. Fiolet T, Srour B, Sellem L, Kesse-Guyot E, Allès B, Méjean C, et al. Consumption of ultra-processed foods and cancer risk: results from NutriNet-Santé prospective cohort. *BMJ.* 2018;k322.
 19. Danaei G, Vander Hoorn S, Lopez AD, Murray CJ, Ezzati M. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *The Lancet.* 2005;366(9499):1784-93.
 20. Steffen A, MacInnis RJ, Joshy G, Giles GG, Banks E, Roder D. Development and validation of a risk score predicting risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014;23(11):2543-52.
 21. Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer. *Lancet.* 2014;383(9927):1490-502.
 22. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990;61(5):759-67.
 23. Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature.* 2002;418(6901):934.
 24. Catalán V, Honorato B, García F, Bandrés E, Zabalegui N, Zárata R, et al. Carcinogénesis colónica: proceso de transformación neoplásica. *Rev Med Univ Navarra.* 2003;47(1)15-19.
 25. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med.* 2015;21(11):1350-1356.
 26. Adams BD, Kasinski AL, Slack FJ. Aberrant regulation and function of microRNAs in cancer. *Curr Biol.* 2014;24(16):R762-776.
 27. Zhang B, Wang J, Wang X, Zhu J, Liu Q, Shi Z, et al. Proteogenomic characterization of human colon and rectal cancer. *Nature.* 2014;513(7518):382-7.
 28. Mehnert JM, Kluger HM. Driver mutations in melanoma: lessons learned from bench-to bedside studies. *Curr Oncol Rep.* 2012;14(5):449-57.
 29. Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science.* 1996;274(5293):1672-7.
 30. Shibata D, Schaeffer J, Li ZH, Capella G, Perucho M. Genetic heterogeneity of the c-K-ras locus in colorectal adenomas but not in adenocarcinomas. *J Natl Cancer Inst.* 1993;85(13):1058-63.
 31. Vigil D, Cherfils J, Rossman KL, Der CJ. Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? *Nat Rev Cancer.* 2010;10(12):842-57.
 32. Jančík S, Drábek J, Radzioch D, Hajdúch M. Clinical Relevance of KRAS in Human Cancers. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 2010; 1-13.
 33. Canon J, Rex K, Saiki AY, Mohr C, Cooke K, Bagal D, et al. The clinical KRAS(G12C) inhibitor AMG 510 drives anti-tumour immunity. *Nature.* 2019;575(7781):217-23.
 34. Govindan R, Fakih MG, Price TJ, Falchook GS, Desai J, Kuo JC, et al. Phase I study of AMG 510, a novel molecule targeting KRAS G12C mutant solid tumours. *Annals of Oncology.* 2019;30:v163-4.
 35. Hong DS, Kuo J, Sacher AG, Barlesi F, Besse B, Kuboki Y, et al. CodeBreak 100: Phase I study of AMG 510, a novel KRAS^{G12C} inhibitor, in patients (pts) with advanced solid tumors other than non-small cell lung cancer (NSCLC) and colorectal cancer (CRC). *JCO.* 2020;38(15_suppl):3511-3511.
 36. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al.

- Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*. 1988;319(9):525-32.
37. Van Cutsem E, Köhne C-H, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien C-R, Makhson A, et al. Cetuximab and Chemotherapy as Initial Treatment for Metastatic Colorectal Cancer. *N Engl J Med*. 2009;360(14):1408-17.
 38. 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. *JCO*. 2011;29(15):2011-9.
 39. Tejpar S, Lenz H-J, Köhne C-H, Heinemann V, Ciardiello F, Esser R, et al. Effect of *KRAS* and *NRAS* mutations on treatment outcomes in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated first-line with cetuximab plus FOLFOX4: New results from the OPUS study. *JCO*. 2014;32(3_suppl):LBA444-LBA444.
 40. Arrington AK, Heinrich EL, Lee W, Duldulao M, Patel S, Sanchez J, Garcia-Aguilar J, Kim J. Prognostic and predictive roles of *KRAS* mutation in colorectal cancer. *Int J Mol Sci*. 2012 Sep 25;13(10):12153-68.
 41. Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, Hamilton SR, Hammond EH, Hayes DF, et al. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for *KRAS* gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *J Clin Oncol*. 2009;27(12):2091-6.
 42. Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH, Turnbull BA, Ross ME, Colorectal Cancer Study Group. Fecal DNA versus fecal occult blood for colorectal-cancer screening in an average-risk population. *N Engl J Med*. 2004;351(26):2704-14.
 43. De Roock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilias 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. *The Lancet Oncology*. 2010;11(8):753-62.
 44. Tran B, Kopetz S, Tie J, Gibbs P, Jiang Z-Q, Lieu CH, et al. Impact of *BRAF* mutation and microsatellite instability on the pattern of metastatic spread and prognosis in metastatic colorectal cancer: Metastatic Pattern in *BRAF* Mutant CRC. *Cancer*. 2011;117(20):4623-32.
 45. Seymour MT, Brown SR, Middleton G, Maughan T, Richman S, Gwyther S, et al. Panitumumab and irinotecan versus irinotecan alone for patients with *KRAS* wild-type, fluorouracil-resistant advanced colorectal cancer (PICCOLO): a prospectively stratified randomised trial. *The Lancet Oncology*. 2013;14(8):749-59.
 46. Peeters M, Oliner KS, Parker A, Siena S, Van Cutsem E, Huang J, et al. Massively parallel tumor multigene sequencing to evaluate response to panitumumab in a randomized phase III study of metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2013;19(7):1902-12.
 47. Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, Sobrero A, Van Krieken JH, Aderka D, et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2016;27(8):1386-422.
 48. Prahallad A, Sun C, Huang S, Di Nicolantonio F, Salazar R, Zecchin D, et al. Unresponsiveness of colon cancer to *BRAF*(V600E) inhibition through feedback activation of *EGFR*. *Nature*. 26 de enero de 2012;483(7387):100-3.
 49. Knudson AG. Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Res*.

1985;45(4):1437-43.

50. Knudson AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1971;68(4):820-3.

51. Spirio LN, Samowitz W, Robertson J, Robertson M, Burt RW, Leppert M, et al. Alleles of APC modulate the frequency and classes of mutations that lead to colon polyps. *Nat Genet*. 1998;20(4):385-8.

52. Robson ME, Bradbury AR, Arun B, Domchek SM, Ford JM, Hampel HL, et al. American Society of Clinical Oncology Policy Statement Update: Genetic and Genomic Testing for Cancer Susceptibility. *J Clin Oncol*. 2015;33(31):3660-7.

53. Russo A, Bazan V, Iacopetta B, Kerr D, Soussi T, Gebbia N, et al. The TP53 colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of p53 mutation: influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment. *J Clin Oncol*. 2005;23(30):7518-28.

54. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*. 1992;358(6381):15-6.

55. Moynahan ME, Chiu JW, Koller BH, Jasin M. Brca1 controls homology-directed DNA repair. *Mol Cell*. 1999;4(4):511-8.

56. Moynahan ME, Pierce AJ, Jasin M. BRCA2 is required for homology-directed repair of chromosomal breaks. *Mol Cell*. 2001;7(2):263-72.

57. Wheeler JMD. DNA mismatch repair genes and colorectal cancer. *Gut*. 2000;47(1):148-53.

58. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature*. 1993;363(6429):558-61.

59. Valeri N, Vannini I, Fanini F, Calore F, Adair B, Fabbri M. Epigenetics, miRNAs, and human cancer: a new chapter in human gene regulation. *Mamm Genome*. 2009;20(9-10):573-80.

60. Okugawa Y, Grady WM, Goel A. Epigenetic Alterations in Colorectal Cancer: Emerging Biomarkers. *Gastroenterology*. 2015;149(5):1204-1225.e12.

61. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet*. 2003;33 Suppl:245-54.

62. Zamani M, Hosseini SV, Mokarram P. Epigenetic biomarkers in colorectal cancer: premises and prospects. *Biomarkers*. 2018;23(2):105-14.

63. 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*. 2016;15(1):67-73.

64. Mulder SA, Kranse R, Damhuis RA, de Wilt JHW, Ouwendijk RJT, Kuipers EJ, et al. Prevalence and prognosis of synchronous colorectal cancer: a Dutch population-based study. *Cancer Epidemiol*. 2011;35(5):442-7.

65. Al-Sukhni E, Milot L, Fruitman M, Beyene J, Victor JC, Schmocker S, et al. Diagnostic accuracy of MRI for assessment of T category, lymph node metastases, and circumferential resection margin involvement in patients with rectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ann Surg Oncol*. 2012;19(7):2212-23.

66. Sahani DV, Bajwa MA, Andrabi Y, Bajpai S, Cusack JC. Current status of imaging and emerging techniques to evaluate liver metastases from colorectal carcinoma. *Ann Surg*. 2014;259(5):861-72.

67. Brierley J, Gospodarowicz MK, Wittekind C, editores. TNM classification of

- malignant tumours. Eighth edition. Chichester, West Sussex, UK ; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc; 2017.
68. Monson JRT, Weiser MR, Buie WD, Chang GJ, Rafferty JF, Buie WD, et al. Practice parameters for the management of rectal cancer (revised). *Dis Colon Rectum*. 2013;56(5):535-50.
 69. Vogel JD, Eskicioglu C, Weiser MR, Feingold DL, Steele SR. The American Society of Colon and Rectal Surgeons Clinical Practice Guidelines for the Treatment of Colon Cancer. *Dis Colon Rectum*. 2017;60(10):999-1017.
 70. Butte JM, Tang P, Gonen M, Shia J, Schattner M, Nash GM, et al. Rate of residual disease after complete endoscopic resection of malignant colonic polyp. *Dis Colon Rectum*. 2012;55(2):122-7.
 71. Bos ACRK, van Erning FN, van Gestel YRBM, Creemers GJM, Punt CJA, van Oijen MGH, et al. Timing of adjuvant chemotherapy and its relation to survival among patients with stage III colon cancer. *Eur J Cancer*. noviembre de 2015;51(17):2553-61.
 72. Wolmark N, Fisher B, Rockette H, Redmond C, Wickerham DL, Fisher ER, et al. Postoperative adjuvant chemotherapy or BCG for colon cancer: results from NSABP protocol C-01. *J Natl Cancer Inst*. 1988;80(1):30-6.
 73. Twelves C, Wong A, Nowacki MP, Abt M, Burris H, Carrato A, et al. Capecitabine as adjuvant treatment for stage III colon cancer. *N Engl J Med*. 2005;352(26):2696-704.
 74. André T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, et al. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med*. 2004;350(23):2343-51.
 75. Wolmark N, Wieand S, Kuebler JP, Colangelo L, Smith RE. A phase III trial comparing FULV to FULV + oxaliplatin in stage II or III carcinoma of the colon: Results of NSABP Protocol C-07. *JCO*. 2005;23(16_suppl):LBA3500-LBA3500.
 76. Haller DG, Tabernero J, Maroun J, de Braud F, Price T, Van Cutsem E, et al. Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29(11):1465-71.
 77. van Cutsem E, Labianca R, Hossfeld D, Bodoky G, Roth A, Aranda E, et al. Randomized phase III trial comparing infused irinotecan/5-fluorouracil (5-FU)/folinic acid (IF) versus 5-FU/FA (F) in stage III colon cancer patients (pts). (PETACC 3). *JCO*. 2005;23(16_suppl):LBA8-LBA8.
 78. Ychou M, Raoul J-L, Douillard J-Y, Bugat R, Mineur L, Viret F, et al. A phase III randomized trial of LV5FU2+CPT-11 vs. LV5FU2 alone in adjuvant high risk colon cancer (FNCLCC Accord02/FFCD9802). *JCO*. 2005;23(16_suppl):3502-3502.
 79. Saltz LB, Niedzwiecki D, Hollis D, Goldberg RM, Hantel A, Thomas JP, et al. Irinotecan plus fluorouracil/leucovorin (IFL) versus fluorouracil/leucovorin alone (FL) in stage III colon cancer (intergroup trial CALGB C89803). *JCO*. 2004;22(14_suppl):3500-3500.
 80. Alberts SR, Sargent DJ, Nair S, Mahoney MR, Mooney M, Thibodeau SN, et al. Effect of oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin with or without cetuximab on survival among patients with resected stage III colon cancer: a randomized trial. *JAMA*. 2012;307(13):1383-93.
 81. Allegra CJ, Yothers G, O'Connell MJ, Sharif S, Petrelli NJ, Lopa SH, et al. Bevacizumab in stage II-III colon cancer: 5-year update of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project C-08 trial. *J Clin Oncol*. 2013;31(3):359-64.
 82. André T, Vernerey D, Im SA, Bodoky G, Buzzoni R, Reingold S, et al. Bevacizumab

- as adjuvant treatment of colon cancer: updated results from the S-AVANT phase III study by the GERCOR Group. *Ann Oncol*. 2020;31(2):246-56.
83. Grothey A, Sobrero AF, Shields AF, Yoshino T, Paul J, Taieb J, et al. Duration of Adjuvant Chemotherapy for Stage III Colon Cancer. *N Engl J Med*. 2018;378(13):1177-88.
 84. Lieu C, Kennedy EB, Bergsland E, Berlin J, George TJ, Gill S, et al. Duration of Oxaliplatin-Containing Adjuvant Therapy for Stage III Colon Cancer: ASCO Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol*. 2019;37(16):1436-47.
 85. Quah H-M, Chou JF, Gonen M, Shia J, Schrag D, Landmann RG, et al. Identification of patients with high-risk stage II colon cancer for adjuvant therapy. *Dis Colon Rectum*. 2008;51(5):503-7.
 86. Chen HS, Sheen-Chen SM. Obstruction and perforation in colorectal adenocarcinoma: an analysis of prognosis and current trends. *Surgery*. 2000;127(4):370-6.
 87. Petersen VC, Baxter KJ, Love SB, Shepherd NA. Identification of objective pathological prognostic determinants and models of prognosis in Dukes' B colon cancer. *Gut*. 2002;51(1):65-9.
 88. Nelson H, Petrelli N, Carlin A, Couture J, Fleshman J, Guillem J, et al. Guidelines 2000 for Colon and Rectal Cancer Surgery. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 2001;93(8):583-96.
 89. Scott N, Jackson P, Al-Jaberi T, Dixon MF, Quirke P, Finan PJ. Total mesorectal excision and local recurrence: A study of tumour spread in the mesorectum distal to rectal cancer. *Br J Surg*. 1995;82(8):1031-3.
 90. Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rödel C, Wittekind C, Fietkau R, et al. Preoperative versus Postoperative Chemoradiotherapy for Rectal Cancer. *N Engl J Med*. 2004;351(17):1731-40.
 91. Willett CG, Badizadegan K, Ancukiewicz M, Shellito PC. Prognostic factors in Stage T3NO rectal cancer: Do all patients require postoperative pelvic irradiation and chemotherapy? *Diseases of the Colon & Rectum*. 1999;42(2):167-73.
 92. Lee M, Gibbs P, Wong R. Multidisciplinary Management of Locally Advanced Rectal Cancer—An Evolving Landscape? *Clinical Colorectal Cancer*. 2015;14(4):251-61.
 93. Yeo S-G, Kim DY, Kim TH, Chang HJ, Oh JH, Park W, et al. Pathologic Complete Response of Primary Tumor Following Preoperative Chemoradiotherapy for Locally Advanced Rectal Cancer: Long-term Outcomes and Prognostic Significance of Pathologic Nodal Status (KROG 09-01). *Annals of Surgery*. 2010;252(6):998-1004.
 94. Glynne-Jones R, Wyrwicz L, Tiret E, Brown G, Rödel C, Cervantes A, et al. Rectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2017;28:iv22-40.
 95. Bujko K, Nowacki MP, Nasierowska-Guttmejer A, Michalski W, Bebenek M, Kryj M, et al. Long-term results of a randomized trial comparing preoperative short-course radiotherapy with preoperative conventionally fractionated chemoradiation for rectal cancer. *Br J Surg*. 2006;93(10):1215-23.
 96. Ngan SY, Burmeister B, Fisher RJ, Solomon M, Goldstein D, Joseph D, et al. Randomized Trial of Short-Course Radiotherapy Versus Long-Course Chemoradiation Comparing Rates of Local Recurrence in Patients With T3 Rectal Cancer: Trans-Tasman Radiation Oncology Group Trial 01.04. *JCO*. 2012;30(31):3827-33.
 97. Cercek A, Dos Santos Fernandes G, Roxburgh CS, Ganesh K, Ng S, Sanchez-Vega

- F, et al. Mismatch Repair–Deficient Rectal Cancer and Resistance to Neoadjuvant Chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2020;26(13):3271-9.
98. Cercek A, Roxburgh CSD, Strombom P, Smith JJ, Temple LKF, Nash GM, et al. Adoption of Total Neoadjuvant Therapy for Locally Advanced Rectal Cancer. *JAMA Oncol.* 2018;4(6):e180071.
99. Petrelli F, Trevisan F, Cabiddu M, Sgroi G, Bruschi L, Rausa E, et al. Total Neoadjuvant Therapy in Rectal Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis of Treatment Outcomes. *Annals of Surgery.* 2020;271(3):440-8.
100. Bahadoer RR, Dijkstra EA, van Etten B, Marijnen CAM, Putter H, Kranenbarg EM-K, et al. Short-course radiotherapy followed by chemotherapy before total mesorectal excision (TME) versus preoperative chemoradiotherapy, TME, and optional adjuvant chemotherapy in locally advanced rectal cancer (RAPIDO): a randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology.* 2021;22(1):29-42.
101. Conroy T, Bosset J-F, Etienne P-L, Rio E, François É, Mesgouez-Nebout N, et al. Neoadjuvant chemotherapy with FOLFIRINOX and preoperative chemoradiotherapy for patients with locally advanced rectal cancer (UNICANCER-PRODIGE 23): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology.* 2021;22(5):702-15.
102. Renehan AG, Malcomson L, Emsley R, Gollins S, Maw A, Myint AS, et al. Watch-and-wait approach versus surgical resection after chemoradiotherapy for patients with rectal cancer (the OnCoRe project): a propensity-score matched cohort analysis. *Lancet Oncol.* 2016;17(2):174-83.
103. National Comprehensive Cancer Network (NCCN). NCCN clinical practice guidelines in oncology. https://www.nccn.org/professionals/physician_gls (Accessed on July 16, 2020).
104. Maas M, Nelemans PJ, Valentini V, Das P, Rödel C, Kuo L-J, et al. Long-term outcome in patients with a pathological complete response after chemoradiation for rectal cancer: a pooled analysis of individual patient data. *The Lancet Oncology.* 2010;11(9):835-44.
105. Kirstein MM, Lange A, Prenzler A, Manns MP, Kubicka S, Vogel A. Targeted Therapies in Metastatic Colorectal Cancer: A Systematic Review and Assessment of Currently Available Data. *The Oncologist.* 2014;19(11):1156-68.
106. Soukup T, Lamb B, Arora S, Darzi A, Sevdalis N, Green J. Successful strategies in implementing a multidisciplinary team working in the care of patients with cancer: an overview and synthesis of the available literature. *JMDH.* 2018;11:49-61.
107. Xie Y-H, Chen Y-X, Fang J-Y. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Sig Transduct Target Ther.* 2020;5(1):22.
108. Geng F, Wang Z, Yin H, Yu J, Cao B. Molecular Targeted Drugs and Treatment of Colorectal Cancer: Recent Progress and Future Perspectives. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals.* 2017;32(5):149-60.
109. Advani S, Kopetz S. Ongoing and future directions in the management of metastatic colorectal cancer: Update on clinical trials. *J Surg Oncol.* 2019;119(5):642-52.
110. Dienstmann R, Vermeulen L, Guinney J, Kopetz S, Tejpar S, Tabernero J. Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer.* 2017;17(2):79-92.
111. Eichhorn PJA, Creighton MP, Bernards R. Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1795(1):1-15.
112. Bialojan C, Takai A. Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on

- protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochemical Journal*. 1988;256(1):283-90.
113. Fujiki H, Suganuma M. Tumor promotion by inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A: the okadaic acid class of compounds. *Adv Cancer Res*. 1993;61:143-94.
114. Schönthal AH. Role of PP2A in intracellular signal transduction pathways. *Front Biosci*. 1998;3:D1262-1273.
115. Janssens V, Goris J. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J*. 2001;353(Pt 3):417-39.
116. Westermarck J, Hahn WC. Multiple pathways regulated by the tumor suppressor PP2A in transformation. *Trends in Molecular Medicine*. 2008;14(4):152-60.
117. Westermarck J, Hahn WC. Multiple pathways regulated by the tumor suppressor PP2A in transformation. *Trends in Molecular Medicine*. 2008;14(4):152-60.
118. Reynhout S, Janssens V. Physiologic functions of PP2A: Lessons from genetically modified mice. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2019;1866(1):31-50.
119. Kurimchak A, Graña X. PP2A holoenzymes negatively and positively regulate cell cycle progression by dephosphorylating pocket proteins and multiple CDK substrates. *Gene*. 2012;499(1):1-7.
120. Ory S, Zhou M, Conrads TP, Veenstra TD, Morrison DK. Protein Phosphatase 2A Positively Regulates Ras Signaling by Dephosphorylating KSR1 and Raf-1 on Critical 14-3-3 Binding Sites. *Current Biology*. 2003;13(16):1356-64.
121. Eichhorn PJA, Creighton MP, Wilhelmsen K, van Dam H, Bernards R. A RNA Interference Screen Identifies the Protein Phosphatase 2A Subunit PR55 γ as a Stress-Sensitive Inhibitor of c-SRC. Clurman B, editor. *PLoS Genet*. 2007;3(12):e218.
122. Li Y, Yue P, Deng X, Ueda T, Fukunaga R, Khuri FR, et al. Protein Phosphatase 2A Negatively Regulates Eukaryotic Initiation Factor 4E Phosphorylation and eIF4F Assembly through Direct Dephosphorylation of Mnk and eIF4E. *Neoplasia*. 2010;12(10):848-55.
123. Chen W, Arroyo JD, Timmons JC, Possemato R, Hahn WC. Cancer-Associated PP2A A α Subunits Induce Functional Haploinsufficiency and Tumorigenicity. *Cancer Res*. 2005;65(18):8183-92.
124. Perrotti D, Neviani P. Protein phosphatase 2A: a target for anticancer therapy. *The Lancet Oncology*. 2013;14(6):e229-38.
125. Cristobal I, Garcia-Orti L, Cirauqui C, Cortes-Lavaud X, Garcia-Sanchez MA, Calasanz MJ, et al. Overexpression of SET is a recurrent event associated with poor outcome and contributes to protein phosphatase 2A inhibition in acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2012;97(4):543-50.
126. METABRIC Group, Curtis C, Shah SP, Chin S-F, Turashvili G, Rueda OM, et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*. 2012;486(7403):346-52.
127. Shih I-M, Panuganti PK, Kuo K-T, Mao T-L, Kuhn E, Jones S, et al. Somatic Mutations of PPP2R1A in Ovarian and Uterine Carcinomas. *The American Journal of Pathology*. 2011;178(4):1442-7.
128. Ruvolo PP, Qui YH, Coombes KR, Zhang N, Ruvolo VR, Borthakur G, et al. Low expression of PP2A regulatory subunit B55 α is associated with T308 phosphorylation of AKT and shorter complete remission duration in acute myeloid leukemia patients.

Leukemia. 2011;25(11):1711-7.

129. Mannava S, Omilian AR, Wawrzyniak JA, Fink EE, Zhuang D, Miecznikowski JC, et al. PP2A-B56 α controls oncogene-induced senescence in normal and tumor human melanocytic cells. *Oncogene*. 2012;31(12):1484-92.
130. Cristóbal I, Manso R, Rincón R, Caramés C, Senin C, Borrero A, et al. PP2A Inhibition Is a Common Event in Colorectal Cancer and Its Restoration Using FTY720 Shows Promising Therapeutic Potential. *Mol Cancer Ther*. 2014;13(4):938-47.
131. Qiu M, Liu L, Chen L, Tan G, Liang Z, Wang K, et al. microRNA-183 plays as oncogenes by increasing cell proliferation, migration and invasion via targeting protein phosphatase 2A in renal cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2014;452(1):163-9.
132. Neviani P, Santhanam R, Trotta R, Notari M, Blaser BW, Liu S, et al. The tumor suppressor PP2A is functionally inactivated in blast crisis CML through the inhibitory activity of the BCR/ABL-regulated SET protein. *Cancer Cell*. 2005;8(5):355-68.
133. Böckelman C, Koskensalo S, Hagström J, Lundin M, Ristimäki A, Haglund C. CIP2A overexpression is associated with c-Myc expression in colorectal cancer. *Cancer Biology & Therapy*. 2012;13(5):289-95.
134. Junttila MR, Puustinen P, Niemelä M, Ahola R, Arnold H, Böttzauw T, et al. CIP2A Inhibits PP2A in Human Malignancies. *Cell*. 2007;130(1):51-62.
135. Cristóbal I, Manso R, Rincón R, Caramés C, Zazo S, del Pulgar TG, et al. Phosphorylated protein phosphatase 2A determines poor outcome in patients with metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2014;111(4):756-62.
136. Cristóbal I, Rincón R, Manso R, Madoz-Gúrpide J, Caramés C, del Puerto-Nevado L, et al. Hyperphosphorylation of PP2A in colorectal cancer and the potential therapeutic value showed by its forskolin-induced dephosphorylation and activation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2014;1842(9):1823-9.
137. Cristóbal I, Rincón R, Manso R, Caramés C, Zazo S, Madoz-Gúrpide J, et al. Deregulation of the PP2A Inhibitor SET Shows Promising Therapeutic Implications and Determines Poor Clinical Outcome in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2015;21(2):347-56.
138. Cristóbal I, Caramés C, Rincón R, Manso R, Madoz-Gúrpide J, Torrejón B, et al. Downregulation of microRNA-199b predicts unfavorable prognosis and emerges as a novel therapeutic target which contributes to PP2A inhibition in metastatic colorectal cancer. *Oncotarget*. 2017;8(25):40169-80.
139. Li M, Makkinje A, Damuni Z. The Myeloid Leukemia-associated Protein SET Is a Potent Inhibitor of Protein Phosphatase 2A. *J Biol Chem*. 1996;271(19):11059-62.
140. von Lindern M, van Baal S, Wiegant J, Raap A, Hagemeijer A, Grosveld G. Can, a putative oncogene associated with myeloid leukemogenesis, may be activated by fusion of its 3' half to different genes: characterization of the set gene. *Mol Cell Biol*. 1992;12(8):3346-55.
141. Hung M-H, Chen K-F. Reprogramming the oncogenic response: SET protein as a potential therapeutic target in cancer. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2017;21(7):685-94.
142. Stevens SJC, van der Schoot V, Leduc MS, Rinne T, Lalani SR, Weiss MM, et al. De novo mutations in the SET nuclear proto-oncogene, encoding a component of the inhibitor of histone acetyltransferases (INHAT) complex in patients with nonsyndromic intellectual disability. *Human Mutation*. 2018;39(7):1014-23.

143. Seo S, McNamara P, Heo S, Turner A, Lane WS, Chakravarti D. Regulation of Histone Acetylation and Transcription by INHAT, a Human Cellular Complex Containing the Set Oncoprotein. *Cell*. 2001;104(1):119-30.
144. Estanyol JM, Jaumot M, Casanovas O, Rodriguez-Vilarrupla A, Agell N, Bachs O. The Protein SET Regulates the Inhibitory Effect of p21 (Cip1) on Cyclin E-Cyclin-dependent Kinase 2 Activity. *J Biol Chem*. 1999;274(46):33161-5.
145. Canela N, Rodriguez-Vilarrupla A, Estanyol JM, Díaz C, Pujol MJ, Agell N, et al. The SET Protein Regulates G2/M Transition by Modulating Cyclin B-Cyclin-dependent Kinase 1 Activity. *J Biol Chem*. 2003;278(2):1158-64.
146. Li Y, Jenkins CW, Nichols MA, Xiong Y. Cell cycle expression and p53 regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Oncogene*. 1994;9(8):2261-8.
147. Bayarkhangai B, Noureldin S, Yu L, Zhao N, Gu Y, Xu H, et al. A comprehensive and perspective view of oncoprotein SET in cancer. *Cancer Med*. 2018;7(7):3084-94.
148. Wei Y, Maximov V, Morrissy SA, Taylor MD, Pallas DC, Kenney AM. p53 Function Is Compromised by Inhibitor 2 of Phosphatase 2A in Sonic Hedgehog Medulloblastoma. *Mol Cancer Res*. 2019;17(1):186-98.
149. Chae Y-C, Kim K-B, Kang J-Y, Kim S-R, Jung H-S, Seo S-B. Inhibition of FoxO1 acetylation by INHAT subunit SET/TAF-I β induces p21 transcription. *FEBS Letters*. 2014;588(17):2867-73.
150. Kato K, Miyaji-Yamaguchi M, Okuwaki M, Nagata K. Histone acetylation-independent transcription stimulation by a histone chaperone. *Nucleic Acids Research*. 2007;35(3):705-15.
151. Kang D-H. Oxidative Stress, DNA Damage, and Breast Cancer: AACN Clinical Issues: Advanced Practice in Acute and Critical Care. 2002;13(4):540-9.
152. Kim K-B, Kim D-W, Park JW, Jeon Y-J, Kim D, Rhee S, et al. Inhibition of Ku70 acetylation by INHAT subunit SET/TAF-I β regulates Ku70-mediated DNA damage response. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(14):2731-45.
153. Faroudi M, Hons M, Zachacz A, Dumont C, Lyck R, Stein JV, et al. Critical roles for Rac GTPases in T-cell migration to and within lymph nodes. *Blood*. 16 de 2010;116(25):5536-47.
154. ten Klooster JP, Leeuwen I v, Scheres N, Anthony EC, Hordijk PL. Rac1-induced cell migration requires membrane recruitment of the nuclear oncogene SET. *EMBO J*. 2007;26(2):336-45.
155. Li M, Damuni Z. I1 PP2A and I2 PP2A. En: Ludlow JW, editor. *Protein Phosphatase Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 1998 p. 59-66.
<http://link.springer.com/10.1385/0-89603-468-2:59>
156. Sablina AA, Hahn WC. The Role of PP2A A Subunits in Tumor Suppression. *Cell Adhesion & Migration*. 2007;1(3):140-1.
157. Feng Y, Li X, Zhou W, Lou D, Huang D, Li Y, et al. Regulation of SET Gene Expression by NF κ B. *Mol Neurobiol*. 2017;54(6):4477-85.
158. Pippa R, Dominguez A, Malumbres R, Endo A, Arriazu E, Marcotegui N, et al. MYC-dependent recruitment of RUNX1 and GATA2 on the SET oncogene promoter enhances PP2A inactivation in acute myeloid leukemia. *Oncotarget*. 2017;8(33):53989-4003.
159. Lugthart S, Figueroa ME, Bindels E, Skrabanek L, Valk PJM, Li Y, et al. Aberrant DNA hypermethylation signature in acute myeloid leukemia directed by EVI1. *Blood*. 2011;117(1):234-41.

160. Deng X, Cao Y, Liu Y, Li F, Sambandam K, Rajaraman S, et al. Overexpression of Evi-1 oncoprotein represses TGF- β signaling in colorectal cancer. *Mol Carcinog*. 2013;52(4):255-64.
161. Lugthart S, van Drunen E, van Norden Y, van Hoven A, Erpelinck CAJ, Valk PJM, et al. High EVI1 levels predict adverse outcome in acute myeloid leukemia: prevalence of EVI1 overexpression and chromosome 3q26 abnormalities underestimated. *Blood*. 2008;111(8):4329-37.
162. Patel JB, Appaiah HN, Burnett RM, Bhat-Nakshatri P, Wang G, Mehta R, et al. Control of EVI-1 oncogene expression in metastatic breast cancer cells through microRNA miR-22. *Oncogene*. 2011;30(11):1290-301.
163. Chao A, Tsai C-L, Wei P-C, Hsueh S, Chao A-S, Wang C-J, et al. Decreased expression of microRNA-199b increases protein levels of SET (protein phosphatase 2A inhibitor) in human choriocarcinoma. *Cancer Letters*. 2010;291(1):99-107.
164. Ying X, Wei K, Lin Z, Cui Y, Ding J, Chen Y, et al. MicroRNA-125b Suppresses Ovarian Cancer Progression via Suppression of the Epithelial-Mesenchymal Transition Pathway by Targeting the SET Protein. *Cell Physiol Biochem*. 2016;39(2):501-10.
165. Zhong J, Ren X, Chen Z, Zhang H, Zhou L, Yuan J, et al. miR-21-5p promotes lung adenocarcinoma progression partially through targeting SET/TAF-1 α . *Life Sciences*. 2019;231:116539.
166. Cristóbal I, Blanco FJ, Garcia-Orti L, Marcotegui N, Vicente C, Rifon J, et al. SETBP1 overexpression is a novel leukemogenic mechanism that predicts adverse outcome in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2010;115(3):615-25.
167. Caramés C, Cristobal I, Moreno V, Marín J, González-Alonso P, Torrejón B, et al. MicroRNA-31 Emerges as a Predictive Biomarker of Pathological Response and Outcome in Locally Advanced Rectal Cancer. *IJMS*. 2016;17(6):878.
168. Torrejón B, Cristóbal I, Caramés C, Prieto-Potín I, Chamizo C, Santos A, et al. Analysis of Potential Alterations Affecting SETBP1 as a Novel Contributing Mechanism to Inhibit PP2A in Colorectal Cancer Patients. *World J Surg*. 2018;42(11):3771-8.
169. Fukukawa C, Shima H, Tanuma N, Ogawa K, Kikuchi K. Up-regulation of I-2 PP2A /SET gene expression in rat primary hepatomas and regenerating livers. *Cancer Letters*. 2000;161(1):89-95.
170. Hung M-H, Wang C-Y, Chen Y-L, Chu P-Y, Hsiao Y-J, Tai W-T, et al. SET antagonist enhances the chemosensitivity of non-small cell lung cancer cells by reactivating protein phosphatase 2A. *Oncotarget*. 2016;7(1):638-55.
171. Neviani P, Harb JG, Oaks JJ, Santhanam R, Walker CJ, Ellis JJ, et al. PP2A-activating drugs selectively eradicate TKI-resistant chronic myeloid leukemic stem cells. *J Clin Invest*. 2013;123(10):4144-57.
172. Christensen DJ, Chen Y, Oddo J, Matta KM, Neil J, Davis ED, et al. SET oncoprotein overexpression in B-cell chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphoma: a predictor of aggressive disease and a new treatment target. *Blood*. 2011;118(15):4150-8.
173. Leopoldino AM, Squarize CH, Garcia CB, Almeida LO, Pestana CR, Sobral LM, et al. SET protein accumulates in HNSCC and contributes to cell survival: Antioxidant defense, Akt phosphorylation and AVOs acidification. *Oral Oncology*. 2012;48(11):1106-13.
174. Ouchida AT, Uyemura VT, Queiroz AL, Brauer VS, Cavalcanti-Neto MP, Sousa LO, et al. SET protein accumulation prevents cell death in head and neck squamous cell

- carcinoma through regulation of redox state and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2019;1866(4):623-37.
175. Routila J, Mäkelä J-A, Luukkaa H, Leivo I, Ijrjala H, Westermarck J, et al. Potential role for inhibition of protein phosphatase 2A tumor suppressor in salivary gland malignancies: INHIBITION OF PP2A IN SALIVARY GLAND MALIGNANCIES. *Genes Chromosomes Cancer*. 2016;55(1):69-81.
176. Janghorban M, Farrell AS, Allen-Petersen BL, Pelz C, Daniel CJ, Oddo J, et al. Targeting c-MYC by antagonizing PP2A inhibitors in breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(25):9157-62.
177. Liu C-Y, Huang T-T, Chen Y-T, Chen J-L, Chu P-Y, Huang C-T, et al. Targeting SET to restore PP2A activity disrupts an oncogenic CIP2A-feedforward loop and impairs triple negative breast cancer progression. *EBioMedicine*. 2019;40:263-75.
178. Hung M-H, Chen Y-L, Chu P-Y, Shih C-T, Yu H-C, Tai W-T, et al. Upregulation of the oncoprotein SET determines poor clinical outcomes in hepatocellular carcinoma and shows therapeutic potential. *Oncogene*. 2016;35(37):4891-902.
179. Leopoldino AM, Squarize CH, Garcia CB, Almeida LO, Pestana CR, Polizello ACM, et al. Accumulation of the SET protein in HEK293T cells and mild oxidative stress: cell survival or death signaling. *Mol Cell Biochem*. 2012;363(1-2):65-74.
180. Yuan X, Zhang T, Zheng X, Zhang Y, Feng T, Liu P, et al. Overexpression of SET oncoprotein is associated with tumor progression and poor prognosis in human gastric cancer. *Oncology Reports*. 2017;38(3):1733-41.
181. Bhutia YD, Hung SW, Krentz M, Patel D, Lovin D, Manoharan R, et al. Differential Processing of let-7a Precursors Influences RRM2 Expression and Chemosensitivity in Pancreatic Cancer: Role of LIN-28 and SET Oncoprotein. Velasco G, editor. *PLoS ONE*. 2013;8(1):e53436.
182. Farrell AS, Allen-Petersen B, Daniel CJ, Wang X, Wang Z, Rodriguez S, et al. Targeting Inhibitors of the Tumor Suppressor PP2A for the Treatment of Pancreatic Cancer. *Mol Cancer Res*. 2014;12(6):924-39.
183. Hu Y, Jin Y, Wu X, Yang Y, Li Y, Li H, et al. LncRNA-HGBC stabilized by HuR promotes gallbladder cancer progression by regulating miR-502-3p/SET/AKT axis. *Mol Cancer*. 2019;18(1):167.
184. Ouellet V, Page CL, Guyot M-C, Lussier C, Tonin PN, Provencher DM, et al. SET complex in serous epithelial ovarian cancer: Set Complex in Serous Ovarian Tumors. *Int J Cancer*. 2006;119(9):2119-26.
185. Carlson SG, Eng E, Kim EG, Perlman EJ, Copeland TD, Ballermann BJ. Expression of SET, an inhibitor of protein phosphatase 2A, in renal development and Wilms' tumor. *J Am Soc Nephrol*. 1998;9(10):1873-80.
186. Kubota D, Yoshida A, Kawai A, Kondo T. Proteomics Identified Overexpression of SET Oncogene Product and Possible Therapeutic Utility of Protein Phosphatase 2A in Alveolar Soft Part Sarcoma. *J Proteome Res*. 2014;13(5):2250-61.
187. Hu X, Garcia C, Fazli L, Gleave M, Vitek MP, Jansen M, et al. Inhibition of Pten deficient Castration Resistant Prostate Cancer by Targeting of the SET - PP2A Signaling axis. *Sci Rep*. 2015;5(1):15182.
188. Tsukamoto S, Huang Y, Umeda D, Yamada S, Yamashita S, Kumazoe M, et al. 67-kDa laminin receptor-dependent protein phosphatase 2A (PP2A) activation elicits melanoma-specific antitumor activity overcoming drug resistance. *J Biol Chem*. 2014;289(47):32671-81.

189. Pelletier D, Hafler DA. Fingolimod for Multiple Sclerosis. *N Engl J Med*. 2012;366(4):339-47.
190. Cristóbal I, Madoz-Gúrpide J, Manso R, González-Alonso P, Rojo F, García-Foncillas J. Potential anti-tumor effects of FTY720 associated with PP2A activation: a brief review. *Current Medical Research and Opinion*. 2016;32(6):1137-41.
191. Pippa R, Dominguez A, Christensen DJ, Moreno-Miralles I, Blanco-Prieto MJ, Vitek MP, et al. Effect of FTY720 on the SET–PP2A complex in acute myeloid leukemia; SET binding drugs have antagonistic activity. *Leukemia*. 2014;28(9):1915-8.
192. Rincón R, Cristóbal I, Zazo S, Arpí O, Menéndez S, Manso R, et al. PP2A inhibition determines poor outcome and doxorubicin resistance in early breast cancer and its activation shows promising therapeutic effects. *Oncotarget*. 2015;6(6):4299-314.
193. Cristóbal I, González-Alonso P, Daoud L, Solano E, Torrejón B, Manso R, et al. Activation of the Tumor Suppressor PP2A Emerges as a Potential Therapeutic Strategy for Treating Prostate Cancer. *Marine Drugs*. 2015;13(6):3276-86.
194. Liu H, Gu Y, Yin J, Zheng G, Wang C, Zhang Z, et al. SET-mediated NDRG1 inhibition is involved in acquisition of epithelial-to-mesenchymal transition phenotype and cisplatin resistance in human lung cancer cell. *Cellular Signalling*. 2014;26(12):2710-20.
195. Omar HA, Chou C-C, Berman-Booty LD, Ma Y, Hung J-H, Wang D, et al. Antitumor effects of OSU-2S, a nonimmunosuppressive analogue of FTY720, in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2011;53(6):1943-58.
196. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843-54.
197. Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental Biology*. 2007;302(1):1-12.
198. Kong YW, Ferland-McCollough D, Jackson TJ, Bushell M. microRNAs in cancer management. *The Lancet Oncology*. 2012;13(6):e249-58.
199. Kim C, Paik S. Gene-expression-based prognostic assays for breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010;7(6):340-7.
200. Karim BO, Ali SZ, Landolfi JA, Mann JF, Liu G, Christian A, et al. Cytomorphologic differentiation of benign and malignant mammary tumors in fine needle aspirate specimens from irradiated female Sprague–Dawley rats. *Veterinary Clinical Pathology*. 2008;37(2):229-36.
201. Mosakhani N, Sarhadi VK, Borze I, Karjalainen-Lindsberg M-L, Sundström J, Ristamäki R, et al. MicroRNA profiling differentiates colorectal cancer according to KRAS status. *Genes Chromosom Cancer*. 2012;51(1):1-9.
202. Oberg AL, French AJ, Sarver AL, Subramanian S, Morlan BW, Riska SM, et al. miRNA Expression in Colon Polyps Provides Evidence for a Multihit Model of Colon Cancer. Srivastava RK, editor. *PLoS ONE*. 2011;6(6):e20465.
203. Xiong B, Cheng Y, Ma L, Zhang C. MiR-21 regulates biological behavior through the PTEN/PI-3 K/Akt signaling pathway in human colorectal cancer cells. *International Journal of Oncology*. 2013;42(1):219-28.
204. Xu L, Zhang Y, Wang H, Zhang G, Ding Y, Zhao L. Tumor suppressor miR-1 restrains epithelial-mesenchymal transition and metastasis of colorectal carcinoma via the MAPK and PI3K/AKT pathway. *J Transl Med*. 2014;12(1):244.
205. Schetter AJ, Okayama H, Harris CC. The Role of MicroRNAs in Colorectal Cancer: The Cancer Journal. 2012;18(3):244-52.

206. Caramés C, Cristóbal I, Moreno V, del Puerto L, Moreno I, Rodríguez M, et al. MicroRNA-21 predicts response to preoperative chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer. *Int J Colorectal Dis.* 2015;30(7):899-906.
207. Caramés C, Cristobal I, Moreno V, Marín J, González-Alonso P, Torrejón B, et al. MicroRNA-31 Emerges as a Predictive Biomarker of Pathological Response and Outcome in Locally Advanced Rectal Cancer. *IJMS.* 2016;17(6):878.
208. Ding Y, Li W, Wang K, Xu C, Hao M, Ding L. Perspectives of the Application of Liquid Biopsy in Colorectal Cancer. *BioMed Research International.* 2020;2020:1-13.
209. Vychytilova-Faltejskova P, Radova L, Sachlova M, Kosarova Z, Slaba K, Fabian P, et al. Serum-based microRNA signatures in early diagnosis and prognosis prediction of colon cancer. *CARCIN.* 2016;37(10):941-50.
210. Machackova, Prochazka, Kala, Slaby. Translational Potential of MicroRNAs for Preoperative Staging and Prediction of Chemoradiotherapy Response in Rectal Cancer. *Cancers.* 2019;11(10):1545.
211. Strubberg AM, Madison BB. MicroRNAs in the etiology of colorectal cancer: pathways and clinical implications. *Dis Model Mech.* 2017;10(3):197-214.
212. Gaedcke J, Grade M, Camps J, Sokilde R, Kaczowski B, Schetter AJ, et al. The Rectal Cancer microRNAome - microRNA Expression in Rectal Cancer and Matched Normal Mucosa. *Clinical Cancer Research.* 2012;18(18):4919-30.
213. Wu W. Identification of aberrantly expressed miRNAs in rectal cancer. *Oncol Rep.* 2012 <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2012.1769>
214. Imedio L, Cristóbal I, Rubio J, Santos A, García-Foncillas J. MicroRNAs in Rectal Cancer: Functional Significance and Promising Therapeutic Value. *Cancers.* 2020;12:2040.
215. McDermott AM, Heneghan HM, Miller N, Kerin MJ. The Therapeutic Potential of MicroRNAs: Disease Modulators and Drug Targets. *Pharm Res.* 2011;28(12):3016-29.
216. Rossi S, Kopetz S, Davuluri R, Hamilton SR, Calin GA. MicroRNAs, ultraconserved genes and colorectal cancers. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2010;42(8):1291-7.
217. Pettit C, Webb A, Walston S, Chatterjee M, Chen W, Frankel W, et al. MicroRNA molecular profiling identifies potential signaling pathways conferring resistance to chemoradiation in locally-advanced rectal adenocarcinoma. *Oncotarget.* 2018;9(48):28951-64.
218. Jin Y, Jiang Z, Guan X, Chen Y, Tang Q, Wang G, et al. miR-450b-5p Suppresses Stemness and the Development of Chemoresistance by Targeting SOX2 in Colorectal Cancer. *DNA and Cell Biology.* 2016;35(5):249-56.
219. Jiang H, Ju H, Zhang L, Lu H, Jie K. microRNA-577 suppresses tumor growth and enhances chemosensitivity in colorectal cancer: Jiang et al. *J Biochem Mol Toxicol.* 2017;31(6):e21888.
220. Xu F, Ye M-L, Zhang Y-P, Li W-J, Li M-T, Wang H-Z, et al. MicroRNA-375-3p enhances chemosensitivity to 5-fluorouracil by targeting thymidylate synthase in colorectal cancer. *Cancer Sci.* 2020;111(5):1528-41.
221. Liu H, Yin Y, Hu Y, Feng Y, Bian Z, Yao S, et al. miR-139-5p sensitizes colorectal cancer cells to 5-fluorouracil by targeting NOTCH-1. *Pathology - Research and Practice.* 2016;212(7):643-9.
222. Ha Thi HT, Kim H-Y, Kim Y-M, Hong S. MicroRNA-130a modulates a radiosensitivity of rectal cancer by targeting SOX4. *Neoplasia.* 2019;21(9):882-92.

223. Zhu Y, Wang C, Becker SA, Hurst K, Nogueira LM, Findlay VJ, et al. miR-145 Antagonizes SNAI1-Mediated Stemness and Radiation Resistance in Colorectal Cancer. *Mol Ther*. 2018;26(3):744-54.
224. Zhu Y, Peng Q, Lin Y, Zou L, Shen P, Chen F, et al. Identification of biomarker microRNAs for predicting the response of colorectal cancer to neoadjuvant chemoradiotherapy based on microRNA regulatory network. *Oncotarget*. 2017;8(2):2233-48.
225. Wang Y, Mu L, Huang M. MicroRNA-195 suppresses rectal cancer growth and metastasis via regulation of the PI3K/AKT signaling pathway. *Mol Med Report*. 2019 <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2019.10717>
226. Wan P, Bai X, Yang C, He T, Luo L, Wang Y, et al. miR-129-5p inhibits proliferation, migration, and invasion in rectal adenocarcinoma cells through targeting E2F7. *J Cell Physiol*. 2020;235(7-8):5689-701.
227. Cai S-D, Chen J-S, Xi Z-W, Zhang L-J, Niu M-L, Gao Z-Y. MicroRNA-144 inhibits migration and proliferation in rectal cancer by downregulating ROCK-1. *Molecular Medicine Reports*. 2015;12(5):7396-402.
228. Zhang Y, Tian S, Li X, Ji Y, Wang Z, Liu C. UBE2C promotes rectal carcinoma via miR-381. *Cancer Biology & Therapy*. 2018;19(3):230-8.
229. Su Y-F, Zang Y-F, Wang Y-H, Ding Y-L. MiR-19-3p Induces Tumor Cell Apoptosis via Targeting FAS in Rectal Cancer Cells. *Technol Cancer Res Treat*. 2020;19:153303382091797.
230. Favreau AJ, McGlaflin RE, Duarte CW, Sathyanarayana P. miR-199b, a novel tumor suppressor miRNA in acute myeloid leukemia with prognostic implications. *Exp Hematol Oncol*. 2015;5(1):4.
231. Fang C, Wang F-B, Li Y, Zeng X-T. Down-regulation of miR-199b-5p is correlated with poor prognosis for breast cancer patients. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2016;84:1189-93.
232. Sakaguchi T, Yoshino H, Yonemori M, Miyamoto K, Sugita S, Matsushita R, et al. Regulation of ITGA3 by the dual-stranded microRNA-199 family as a potential prognostic marker in bladder cancer. *Br J Cancer*. 2017;116(8):1077-87.
233. Wang J, Zhou F, Yin L, Zhao L, Zhang Y, Wang J. MicroRNA-199b targets the regulation of ZEB1 expression to inhibit cell proliferation, migration and invasion in non-small cell lung cancer. *Molecular Medicine Reports*. 2017;16(4):5007-14.
234. Chao A, Tsai C-L, Wei P-C, Hsueh S, Chao A-S, Wang C-J, et al. Decreased expression of microRNA-199b increases protein levels of SET (protein phosphatase 2A inhibitor) in human choriocarcinoma. *Cancer Letters*. 2010;291(1):99-107.
235. Liu MX, Siu MKY, Liu SS, Yam JWP, Ngan HYS, Chan DW. Epigenetic silencing of microRNA-199b-5p is associated with acquired chemoresistance via activation of JAG1-Notch1 signaling in ovarian cancer. *Oncotarget*. 2014;5(4):944-58.
236. Joshi D, Chandrakala S, Korgaonkar S, Ghosh K, Vundinti BR. Down-regulation of miR-199b associated with imatinib drug resistance in 9q34.1 deleted BCR/ABL positive CML patients. *Gene*. 2014;542(2):109-12.
237. Garzia L, Andolfo I, Cusanelli E, Marino N, Petrosino G, De Martino D, et al. MicroRNA-199b-5p Impairs Cancer Stem Cells through Negative Regulation of HES1 in Medulloblastoma. *Blagosklonny MV, editor. PLoS ONE*. 2009;4(3):e4998.
238. Wang C, Song B, Song W, Liu J, Sun A, Wu D, et al. Underexpressed microRNA-199b-5p targets Hypoxia-Inducible Factor-1 α in hepatocellular carcinoma and predicts

- prognosis of hepatocellular carcinoma patients: MicroRNA-199b-5p targets HIF-1 α in HCC. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2011;26(11):1630-7.
239. Fang C, Zhao Y, Guo B. MiR-199b-5p targets HER2 in breast cancer cells. *J Cell Biochem*. 2013;114(7):1457-63.
240. Fan Y, Yin S, Hao Y, Yang J, Zhang H, Sun C, et al. miR-19b promotes tumor growth and metastasis via targeting TP53. *RNA*. 2014;20(6):765-72.
241. Liu G-L, Yang H-J, Liu B, Liu T. Effects of MicroRNA-19b on the Proliferation, Apoptosis, and Migration of Wilms' Tumor Cells Via the PTEN/PI3K/AKT Signaling Pathway. *J Cell Biochem*. 2017;118(10):3424-34.
242. Yuan J, Su Z, Gu W, Shen X, Zhao Q, Shi L, et al. MiR-19b and miR-20a suppress apoptosis, promote proliferation and induce tumorigenicity of multiple myeloma cells by targeting PTEN. *Cancer Biomark*. 2019;24(3):279-89.
243. Wang N, Liang X, Yu W, Zhou S, Fang M. Differential Expression of MicroRNA-19b Promotes Proliferation of Cancer Stem Cells by Regulating the TSC1/mTOR Signaling Pathway in Multiple Myeloma. *Cell Physiol Biochem*. 2018;50(5):1804-14.
244. Ecevit ÇÖ, Aktaş S, Tosun Yildirim H, Demirağ B, Erbay A, Karaca İ, et al. MicroRNA-17, MicroRNA-19b, MicroRNA-146a, MicroRNA-302d Expressions in Hepatoblastoma and Clinical Importance. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2019;41(1):7-12.
245. Wang L, Yang G, Zhao D, Wang J, Bai Y, Peng Q, et al. CD103-positive CSC exosome promotes EMT of clear cell renal cell carcinoma: role of remote MiR-19b-3p. *Mol Cancer*. 2019;18(1):86.
246. Tang Y, Yang J, Wang Y, Tang Z, Liu S, Tang Y. MiR-19b-3p facilitates the proliferation and epithelial-mesenchymal transition, and inhibits the apoptosis of intrahepatic cholangiocarcinoma by suppressing coiled-coil domain containing 6. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2020;686:108367.
247. Baumgartner U, Berger F, Hashemi Gheinani A, Burgener SS, Monastyrskaya K, Vassella E. miR-19b enhances proliferation and apoptosis resistance via the EGFR signaling pathway by targeting PP2A and BIM in non-small cell lung cancer. *Mol Cancer*. 2018;17(1):44.
248. Borzi C, Calzolari L, Ferretti AM, Caleca L, Pastorino U, Sozzi G, et al. c-Myc shuttled by tumour-derived extracellular vesicles promotes lung bronchial cell proliferation through miR-19b and miR-92a. *Cell Death Dis*. 2019;10(10):759.
249. Kurokawa K, Tanahashi T, Ima T, Yamamoto Y, Akaike Y, Nishida K, et al. Role of miR-19b and its target mRNAs in 5-fluorouracil resistance in colon cancer cells. *J Gastroenterol*. 2012;47(8):883-95.
250. Jiang T, Ye L, Han Z, Liu Y, Yang Y, Peng Z, et al. miR-19b-3p promotes colon cancer proliferation and oxaliplatin-based chemoresistance by targeting SMAD4: validation by bioinformatics and experimental analyses. *J Exp Clin Cancer Res*. 2017;36(1):131.
251. Guo Y, Ye Q, Deng P, Cao Y, He D, Zhou Z, et al. Spermine synthase and MYC cooperate to maintain colorectal cancer cell survival by repressing Bim expression. *Nat Commun*. 2020;11(1):3243.
252. Cristobal I, Rincon R, Manso R, Carames C, Zazo S, Madoz-Gurpide J, et al. Deregulation of the PP2A Inhibitor SET Shows Promising Therapeutic Implications and Determines Poor Clinical Outcome in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2015;21(2):347-56.
253. Liu H, Gu Y, Wang H, Yin J, Zheng G, Zhang Z, et al. Overexpression of PP2A

inhibitor SET oncoprotein is associated with tumor progression and poor prognosis in human non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. 2015;6(17):14913-25.

254. Cristóbal I, Manso R, Rincón R, Caramés C, Senin C, Borrero A, et al. PP2A Inhibition Is a Common Event in Colorectal Cancer and Its Restoration Using FTY720 Shows Promising Therapeutic Potential. *Mol Cancer Ther*. 2014;13(4):938-47.

255. Jin H, Jang Y, Cheng N, Li Q, Cui P-F, Zhou Z-W, et al. Restoration of mutant K-Ras repressed miR-199b inhibits K-Ras mutant non-small cell lung cancer progression. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019;38(1):165.

256. Cristóbal I, Torrejón B, Rubio J, Santos A, Pedregal M, Caramés C, et al. Deregulation of SET is Associated with Tumor Progression and Predicts Adverse Outcome in Patients with Early-Stage Colorectal Cancer. *JCM*. 2019;8(3):346.

257. Shen Z-L, Wang B, Jiang K-W, Ye C-X, Cheng C, Yan Y-C, et al. Downregulation of miR-199b is associated with distant metastasis in colorectal cancer via activation of SIRT1 and inhibition of CREB/KISS1 signaling. *Oncotarget*. 2016;7(23):35092-105.

258. Liu MX, Siu MKY, Liu SS, Yam JWP, Ngan HYS, Chan DW. Epigenetic silencing of microRNA-199b-5p is associated with acquired chemoresistance via activation of JAG1-Notch1 signaling in ovarian cancer. *Oncotarget*. 2014;5(4):944-58.

259. Chen W, Xiong L, Yang L, Yang L, Li L, Huang L, et al. Long Non-Coding RNA LINC01783 Promotes the Progression of Cervical Cancer by Sponging miR-199b-5p to Mediate GBP1 Expression. *CMAR*. 2020;Volume 12:363-73.

260. Peng W, He D, Shan B, Wang J, Shi W, Zhao W, et al. LINC81507 act as a competing endogenous RNA of miR-199b-5p to facilitate NSCLC proliferation and metastasis via regulating the CAV1/STAT3 pathway. *Cell Death Dis*. 2019;10(7):533.

261. Chen L, Zhi Z, Wang L, Zhao Y, Deng M, Liu Y, et al. NSD2 circular RNA promotes metastasis of colorectal cancer by targeting miR-199b-5p-mediated DDR1 and JAG1 signalling. *J Pathol*. 2019;248(1):103-15.

262. Baek DW, Kim G, Kang BW, Kim HJ, Park SY, Park JS, et al. High expression of microRNA-199a-5p is associated with superior clinical outcomes in patients with locally advanced rectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2020;146(1):105-15.

263. Vidal J, Muínelo L, Dalmases A, Jones F, Edelstein D, Iglesias M, et al. Plasma ctDNA RAS mutation analysis for the diagnosis and treatment monitoring of metastatic colorectal cancer patients. *Annals of Oncology*. 2017;28(6):1325-32.

264. Tie J, Cohen JD, Wang Y, Li L, Christie M, Simons K, et al. Serial circulating tumour DNA analysis during multimodality treatment of locally advanced rectal cancer: a prospective biomarker study. *Gut*. 2019;68(4):663-71.

265. Casado E, García VM, Sánchez JJ, Blanco M, Maurel J, Feliu J, et al. A Combined Strategy of SAGE and Quantitative PCR Provides a 13-Gene Signature that Predicts Preoperative Chemoradiotherapy Response and Outcome in Rectal Cancer. *Clin Cancer Res*. 2011;17(12):4145-54.

266. Bottarelli L, de' Angelis GL, Azzoni C, Di Mario F, de' Angelis N, Leandro G, et al. Potential predictive biomarkers in locally advanced rectal cancer treated with preoperative chemo-radiotherapy. *Acta Bio Medica Atenei Parmensis*. 2018;89(9-S):102-6.

267. Fan Y, Yin S, Hao Y, Yang J, Zhang H, Sun C, et al. miR-19b promotes tumor growth and metastasis via targeting TP53. *RNA*. 2014;20(6):765-72.

268. Zhang J, Wang Z, Han X, Jiang L, Ge R, Wang X, et al. Up-regulation of microRNA-19b is associated with metastasis and predicts poor prognosis in patients with

colorectal cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2018;11(8):3952-60.