

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



Doctorado en Genética y Biología Celular

**KLF6 como marcador tumoral y Endogлина como
factor pronóstico en el cáncer colorrectal.**

Tesis doctoral

Delia Isabel Laime Condori

Madrid 2007

Directores:

Francisco Sanz Rodríguez
José Ramón García Rodríguez
Ángeles Juarranz de la Fuente

RESUMEN

Durante años, los factores pronósticos utilizados en la iniciación y progresión de la transformación oncogénica se han basado en hallazgos histopatológicos. Las observaciones de mayor significación pronóstica son: el tamaño tumoral, la profundidad de invasión, los ganglios linfáticos afectados y las metástasis a distancia. No obstante, actualmente el pronóstico en tumores se realiza mediante el estudio de factores relacionados con marcadores moleculares y su relación con el comportamiento evolutivo de la enfermedad. El cáncer colorrectal (CCR) constituye el segundo tipo de cáncer más frecuente en la población (Europa). Sin embargo, hasta el momento no existen referencias claras de marcadores para su diagnóstico. Por esta razón, nos propusimos realizar un estudio inmunohistoquímico/molecular de tres tipos de estadios benignos y tres malignos basado en una combinación de expresión de 4 genes. Entre ellos incluimos a Ki67 y p53, utilizados como marcadores positivos debido a su amplio estudio en todo tipo de cánceres y dos marcadores nuevos: **endoglina y KLF6**.

Endoglina es una proteína transmembrana que se expresa abundantemente en la superficie del endotelio así como en otros tipos celulares formando parte del complejo de receptores del TGF- β . La función de esta proteína está relacionada con la angiogénesis tumoral, sobreexpresándose durante la neovascularización tumoral. Por su parte, KLF6 es un supresor tumoral que está relacionado con ciertos tipos de cánceres.

Nuestra hipótesis de trabajo plantea que endoglina podría ser empleada como factor pronóstico y KLF6 como marcador diagnóstico en el CCR. El estudio se ha realizado sobre biopsias de pacientes diagnosticados de adenomas o adenocarcinomas de colon. Se ha realizado una histología e inmunohistoquímica convencional, así como análisis mediante RT-PCR del ARN extraído de las diferentes muestras. El estudio se ha completado en cultivos celulares *in vitro* con dos líneas tumorales humanas de CCR (Caco-2 y SW-480) en las que se estudió la expresión mediante inmunofluorescencia y Western-blot de endoglina y KLF6 y otros marcadores. Los resultados muestran que la expresión de endoglina se incrementaba con el grado de malignización, alcanzando su máximo de expresión en el estadio T2 de adenocarcinoma, para desaparecer en el estadio T3, previo al proceso de metástasis. Por su parte, la expresión de KLF6 está directamente relacionada con el aumento de la malignidad celular en adenomas y en adenocarcinomas. KLF6 se expresa tanto a nivel citoplasmático como nuclear en las primeras fases de desarrollo de los adenomas y de los primeros estadios de adenocarcinoma, para desaparecer a nivel nuclear en el estadio más avanzado (T3). Paralelamente a las variaciones en la expresión y distribución subcelular de KLF6, los resultados a nivel de RT-PCR, mostraron un incremento en sus formas de procesamiento alternativo.

En resumen, de los resultados obtenidos podemos concluir que endoglina podría ser un factor de pronóstico que permitiría diferenciar entre estadios de mayor o menor malignización en CCR. Sin embargo, sería necesario ampliar el estudio analizando los niveles de endoglina soluble en sangre de pacientes, así como aumentar el número de casos analizados que apoyen lo anterior. Por su parte, KLF6 es un buen marcador diagnóstico del CCR, debido a que muestra patrones crecientes de expresión a nivel citoplasmático y decrecientes a nivel nuclear. La utilización combinada de ambas proteínas podría ayudar a identificar el grado de malignización tanto en adenomas como en adenocarcinomas de colon.

SUMMARY

For years, histopathological features have been considered as prognosis factors for the initiation and progression of cancer. Prognosis factors more used are the following: tumor size, tumor invasiveness, affected lymph nodes and metastasis. Nowadays, the best prognosis in tumors is the study of factors related with tumoral molecular biology and the progression of cancer. Colorectal cancer (CRC) is the second type of cancer more frequent in male and female (Europe); however, there are no clear tumor markers for its diagnosis so far. In this context, our work was focused to the immunohistochemical/molecular study of benign and malignant stages, and the expression of 4 different genes: Ki67 and p53, which were used as positive markers, and two novel markers: **endoglin and KLF6**.

Endoglin is a transmembrane protein included among the receptors of TGF-B, which is highly expressed in endothelial cells as well as other cell types. The role of endoglin in cancer progression is related to angiogenesis of tumors; this protein is overexpressed in tumoral neovasculature. KLF6 is a tumor supressor related with several types of cancers. We propose the use of endoglin as a prognosis factor and KLF6 as a diagnosis marker in CRC.

Our study has been performed in biopsies of colon adenoma or adenocarcinoma by using histology, immunohistochemistry and RT-PCR of RNA samples. Our study has been completed by cell culture of two human tumor CRC lines: Caco-2 and SW-480, in which we studied endoglin and KLF6 by immunocytochemistry and Western-blot. Our results showed that endoglin expression was increased in malignant tumors, with highest expression levels in T2 stage, but then almost disappeared in the previous T3 metastatic stage. In addition, the expression of KLF6 correlates with the increase of cell malignancy in adenomas and adenocarcinomas. KLF6 was expressed both in cytoplasm and nucleus in the first stages of malignancy, and then disappeared in the nuclei at higher malignant stages (T3). RT-PCR results showed an increase of alternative splice forms of KLF6.

The conclusion of this work is that KLF6 is a good diagnosis marker for CRC due to is high expression pattern in cytoplasm and low expression in nucleus of CRC samples. Moreover, endoglin could be a prognosis factor to distinguish between higher and lower malignant stages in CRC. However, it would be necessary to study soluble endoglin in blood samples of patients, and to increase the number of events to confirm our study. The analysis of these two proteins could help to identify the degree of malignancy both in adenomas and colon adenocarcinomas.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1.- CÁNCER COLORRECTAL	1
1.1.- EPIDEMIOLOGÍA	2
1.2.- ETIOPATOGENÍA	2
1.2.1.- Factores endógenos	2
1.2.1.1.- Factores hereditarios	2
1.2.1.2.- Patologías intestinales	4
1.2.2.- Factores exógenos	4
1.3.- BIOLOGÍA DEL EPITELIO COLÓNICO	5
1.4.- HISTOPATOLOGÍA Y ESTADIAJE	7
1.5.- DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO	9
2.- MODELO DE CARCINOGENÉISIS COLORECTAL	10
2.1.- β-CATENINA EN LA HOMEOSTASIS DEL EPITELIO COLÓNICO	13
3.- POSIBLES NUEVOS MARCADORES MOLECULARES EN CCR	17
3.1.- ASPECTOS GENERALES DE ENDOGLINA	19
3.1.1.- Estructura y función	20
3.1.2.- Patología asociada a mutaciones en el gen de Endoglina	22
3.1.3.- Funciones independientes de TGF-β	23
3.1.4.- Endoglina en cáncer	24
3.2.- KLF6 Y LA FAMILIA KRÜPPEL DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN	25
3.2.1.- KLF6 y su papel como activador de transcripción y supresor tumoral	27
3.2.2.- Inactivación de KLF6 como supresor tumoral en cáncer	30
II.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	33
III.- MATERIAL Y MÉTODOS	34
1.- REACTIVOS Y ANTICUERPOS	34
2.- MUESTRAS PATOLÓGICAS	36
2.1.- OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS TISULARES	36
2.2.- TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS	37
2.3.- ESTUDIO EVALUATIVO	38
3.- LÍNEAS CELULARES	37

4.- RT-PCR	39
4.1.- EXTRACCIÓN DE ARN A PARTIR DE TEJIDO INCLUIDO EN PARAFINA	39
4.2.- EXTRACCIÓN DE ARN A PARTIR DE TEJIDO FIJADO EN FORMALINA	40
4.3.- EXPRESIÓN DEL ARN DE ENDOGLINA Y KLF6	40
5.- CULTIVOS CELULARES	42
5.1.- CONDICIONES DE CULTIVOS	42
5.2.- DENSIDAD DE SIEMBRA, ESTIMACIÓN Y VIABILIDAD CELULAR	42
5.3.- MORFOLOGÍA CELULAR	43
5.4.- INMUNOFLUORESCENCIA	43
5.5.- DETERMINACIÓN DE ACTINA FILAMENTOSA	43
5.6.- ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA Y WESTERN BLOT	44
5.6.1.- Obtención de extractos celulares	44
5.6.2.- Detección de proteínas por Western Blot	44
6.- OBSERVACIONES MICROSCOPICAS	45
7.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO	45
IV.- RESULTADOS	47
1.- ANATOMÍA PATOLÓGICA	47
1.1.- HISTOLOGÍA	47
1.2.- INMUNOHISTOQUÍMICA	48
1.2.1.- Factor de proliferación Ki67	48
1.2.2.- Proteína p53	49
1.2.3.- Endogлина	49
1.2.4.- KLF6	49
1.3.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO	50
1.3.1. Caracterización de Ki67	50
1.3.2. Caracterización de p53	53
1.3.3. Caracterización de endogлина	55
1.3.4. Caracterización de KLF6	57
2.- ANÁLISIS POR RT-PCR DE CARCINOMA DE COLON HUMANO	58
2.1. EXPRESION DE ENDOGLINA	58
2.2. EXPRESION DE KLF-6	60

3.- ESTUDIOS EN CULTIVOS CELULARES	61
3.1.- MORFOLOGÍA DE LAS LÍNEAS CELULARES	61
3.2.- EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN	62
3.3.- EXPRESIÓN DE ENDOGLINA	63
3.4.- EXPRESIÓN DE KLF6	64
V.- DISCUSIÓN	65
5.1. ENDOGLINA COMO FACTOR PRONÓSTICO DEL CCR	65
5.2. KLF6 COMO FACTOR DIAGNOSTICO EN EL CCR	71
VI.- CONCLUSIONES	76
VII.- BIBLIOGRAFÍA	77

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1.- Estructura del colon	5
Figura 2.- Esquema del epitelio colónico	6
Figura 3.- Modelo de progresión del CCR	12
Figura 4.- Vía canónica y no canónica de Wnt	15
Figura 5.- Acción de la vía de Wnt durante la diferenciación terminal del epitelio intestinal	16
Figura 6.- Representación esquemática del dímero de endoglina	21
Figura 7.- Procesamiento alternativo del ARNm de endoglina	22
Figura 8.- Representación de la estructura de un miembro de la familia KLF	26
Figura 9.- Estructura de KLF-6 con sus 4 exones	27
Figura 10.- Capacidad antiproliferativa de KLF6 en hepatocitos	28
Figura 11.- Acción supresora de KLF-6 sobre el crecimiento celular	29
Figura 12.- Estructura y organización genómica de KLF-6	31
Figura 13.- Localización de KLF-6 salvaje y sus variantes de "Splicing"	32

RESULTADOS

Figura 14.- Biopsia de intestino grueso normal	47
Figura 15.- Biopsia de intestino grueso con displasia epitelial	47
Figura 16.- Adenomas de intestino grueso en diferentes grados de displasia	47
Figura 17.- Adenocarcinoma de intestino grueso (Estadio T1 y T2)	48
Figura 18.- Adenocarcinoma de intestino grueso (Estadio T3)	48
Figura 19.- Expresión de Ki67 y de p53 en epitelio de colon control	48
Figura 20.- Expresión de Ki-67 en adenomas de colon con diferentes grados de displasia	49
Figura 21.- Expresión de Ki67 en carcinoma de colon (Estadios T1, T2 y T3)	49
Figura 22.- Expresión de p53 en adenomas colorectales con displasia celular	49
Figura 23.- Expresión de p53 en carcinoma colorrectal p53 (Estadio T1,T2 y T3)	49
Figura 24.- Expresión de Endoglina en el intestino grueso normal	49
Figura 25.- Expresión de Endoglina en adenoma de colon con diferentes	49

grados de displasia	
Figura 26.- Expresión de Endoglin en el cáncer colorrectal (Estadios T1,T2,T3)	49
Figura 27.- Expresión de KLF6 en adenomas de colon con displasia intestinal	49
Figura 28.- Expresión de KLF6 en el adenocarcinoma de colon	50
Figura 29.- Grafico de Box Whiskers, para Ki67	51
Figura 30.- Grafico de Box Whiskers, para p53	53
Figura 31.- Grafico de Box Whiskers, para endoglin	56
Figura 32.- Grafico de Box Whiskers, para KLF6	57

RT-PCR

Figura 33.- RT-PCR de endoglin en control y adenomas	59
Figura 34.- RT-PCR de endoglin en los Estadios T1,T2 y T3 en adenocarcinoma de colon	59
Figura 35.- RT-PCR de la evolución de los transcritos Largos y Cortos de endoglin, en adenocarcinoma Estadio T2	59
Figura 36.- RT-PCR de KLF6 en controles y adenomas de colon	60
Figura 37.- RT-PCR de KLF6 de los Estadios T1, T2 y T3 en adenocarcinoma de colon	60
Figura 38.- RT-PCR del ARNm de KLF6 y su relación entre la forma salvaje y el procesado alternativo en adenocarcinoma de colon	60

CULTIVOS CELULARES

Figura 39.- Morfología de las líneas celulares de adenocarcinomas Caco-2 y SW-480	61
Figura 40.- Morfología de las Sub- líneas celulares SW-480ADH y SW-480R	61
Figura 41.- Expresión y distribución de E-Cadherina en células Caco-2	62
Figura 42.- Microfotografía de E-Cadherina en líneas celulares SW-480-R y SW-480-ADH	62
Figura 43.- Expresión de β -Catenina en línea celular Caco-2	62
Figura 44.- Microfotografía de la expresión de β -Catenina en líneas celulares SW-480R y SW-480ADH	62
Figura 45.- Distribución de Actina filamentosa en línea celular Caco-2	63

Figura 46.- Distribución de Actina filamentosa en las líneas celulares SW-480R y SW-480ADH	63
Figura 47.- Expresión de endogлина en las líneas celulares HMEC-1 y Caco-2	63
Figura 48.- Expresión de endogлина en líneas celulares SW-480 (ADH y R)	63
Figura 49.- Expresión de KLF6 en línea celular Caco-2	64
Figura 50.- Expresión de KLF6 en líneas celulares SW-480 (ADH y R)	64

WESTERN BLOT

Figura 51.- Análisis por <i>Western blot</i> de la expresión de endogлина y KLF6 en Caco-2 y SW-480	64
Figura 52.- Densitometría de KLF6, de las bandas correspondientes a las formas salvajes y procesado alternativo, en líneas celulares Caco-2 y SW-480	64

I. INTRODUCCIÓN

1.- CANCER COLORRECTAL

1.1.- EPIDEMIOLOGÍA

El cáncer de intestino grueso o cáncer colorrectal (CCR) es en la actualidad un importante problema de salud pública por su alta incidencia y su alta mortalidad. En el año 2000 la incidencia mundial de cáncer fue de 10,1 millones, de los cuales el 12,3% correspondieron a pulmón, el 10,4% a mama y el 9,4% a cáncer de intestino grueso. De hecho, la mitad de la población de los países occidentales desarrolla antes de los setenta años de edad un adenoma en el colon, y uno de cada diez casos progresa a carcinoma. Así el CCR constituye el segundo en incidencia y mortalidad en Europa y uno de los más importantes del mundo con medio millón de muertes y un millón de nuevos casos diagnosticados cada año (Boyle & Ferlay *et al.*, 2005; Jemal *et al.*, 2002; Gloeckler Ries *et al.*, 2003; Meyerhardt & Mayer, 2005; Parkin, 2001, 2004). Según un informe del Ministerio de Sanidad y Consumo de Agosto de 2005, en España, en concreto, el cáncer es la primera causa de muerte siendo el CCR el más frecuente (López-Abente, 2004) (Tabla 1).

Localización Tumoral	HOMBRES			MUJERES			AMBOS SEXOS
	Casos	IC al 95%	TA	Casos	IC al 95%	TA	Total casos
Colon y Recto	14.204	9.977-19.173	63,58	11.461	8.152-15.679	30,01	25.665
Pulmón	16.690	12.271-22.084	77,40	2.131	1.455-3.036	8,07	18.821
Mama	--	--	--	15.979	10.508-23.586	7,06	15.979
Vejiga	12.727	6.441-23.121	58,05	1.750	1.371-2.201	5,56	14.477
Próstata	13.212	6.245-24524	56,29	--	--	--	13.212
Útero y Cérvix	--	--	--	7.164	4.120-11.657	31,92	7.164
Estómago	2.896	1.964-4.118	12,76	3.454	1.752-6.225	11,42	6.350
LNH	3.253	1.868-5.280	15,25	2.209	1.696-2.846	8,19	5.462
Laringe	3.705	2.034-6.248	18,31	852	54-3.897	3,66	4.557
Hígado	3.081	2.233-4.158	13,85	1.309	807-2.361	4,02	4.390
Leucemias	2.436	1.873-3.104	11,15	1.852	1.429-2.361	6,75	4.288
Páncreas	1.919	1.449-2.516	8,87	1.675	1.247-2.238	5,30	3.594
Esófago	1.512	1.319-1.730	7,46	257	160-406	0,89	1.769

Tabla 1.- Estimación de la incidencia anual de cáncer en España en el período 1997 – 2000. IC: Intervalo de credibilidad; TA: Tasa ajustada con la población europea (Tomado de López-Abente, 2004)

El CCR tiene un importante componente geográfico. Así, las tasas de incidencia mas elevadas (65%) corresponden a los países mas desarrollados,

principalmente Estados Unidos y Europa Occidental, siendo las más bajas las de la India y los países africanos (Parkin, 2001, 2004). Además, las tasas de incidencia de CCR han aumentado en los últimos 20 años en los países con tasas previamente bajas, mientras que en los países que ya eran de alto riesgo se ha producido una estabilización o incluso disminución de la incidencia, particularmente en los grupos de edad joven (Parkin, 2001).

1.2.- ETIOPATOGENIA

Los datos sobre incidencia apuntados anteriormente indican que en la susceptibilidad al CCR influyen tanto factores ambientales (dieta rica en grasas y proteínas y pobre en fibra y vegetales, fundamentalmente), como el progresivo envejecimiento de la población. Sin embargo, el factor hereditario es relativamente bajo. Así, los factores asociados al CCR se pueden resumir en dos grupos:

- **Factores endógenos:** hereditarios y patologías intestinales.
- **Factores exógenos:** la dieta (incluido el alcohol y el tabaco) y la exposición a radiaciones ionizantes o a agentes teratógenos.

1.2.1.- Factores endógenos

1.2.1.1.- Factores hereditarios

Como se ha comentado anteriormente, la herencia tiene escaso impacto en la incidencia poblacional (menos de un 5% de los casos de CCR). No obstante, se han descrito ciertos síndromes hereditarios como son: la Poliposis Adenomatosa Familiar (PAF), relacionado con mutaciones en el gen supresor de tumores *APC* y el Cáncer de Colon Hereditario No Polipósico (CCHNP) o Síndrome de Lynch, relacionado con mutaciones en genes de reparación (Lynch & De la Chapelle, 2003; De la Chapelle, 2004; Benito y Diaz-Rubio, 2006). Estos, se presentan antes de los 50 años y en el 100% ó 70% de los portadores genéticos respectivamente, degeneran en CCR.

Asimismo, se ha observado que incluso en familias que no muestran un síndrome familiar caracterizado, como los definidos anteriormente, existe un riesgo mayor de desarrollar CCR en aquellos pacientes que tienen un familiar de primer grado con CCR o que presenten adenomas (Winawer *et al.*, 1996), habiéndose

sugerido una herencia autosómica dominante y hábitos compartidos (De la Chapelle, 2004; Benito y Diaz-Rubio, 2006). Dependiendo de la edad de diagnóstico y el número de familiares afectados, el riesgo a lo largo de la vida de desarrollar un CCR puede aumentar de 1,8 a 8,0 veces.

Por otro lado, la **Poliposis Adenomatosa Familiar (PAF)** es un síndrome que se caracteriza por la aparición temprana de pólipos, los cuales presentan un riesgo virtual del 100% de desarrollar CCR. Representan un bajo porcentaje de los casos de CCR (1-2%). La PAF, está causada por la herencia de una copia mutada del gen supresor de tumores *adenomatous polyposis coli (APC)* (Grodén *et al.*, 1991, Kinzler *et al.*, 1991). Es de herencia autosómica dominante con alta penetrancia y es importante destacar que del 20% al 30% de los casos son mutaciones “de novo” sin historia familiar aparente. En su forma típica, se desarrollan cientos de adenomas en el intestino grueso durante la segunda y tercera décadas de la vida. Sin embargo, sólo unos pocos evolucionan a CCR si no se practica una colectomía profiláctica antes de los 40 años, lo que indica que se necesitan mutaciones adicionales en la generación del CCR. Además de la presencia de numerosos adenomas, los pacientes muestran hipertrofia del epitelio pigmentario de la retina y algunas variantes (Síndrome de Gardner) se caracterizan por la presencia de osteomas y alteraciones en la piel (Benito & Díaz-Rubio, 2006),

En cuanto al **Cáncer de Colon Hereditario No Polipósico (CCHNP)** o Síndrome de Lynch es un trastorno de herencia autosómica dominante y con alta penetrancia, marcado por una alta susceptibilidad a CCR (80%). Su fenotipo es el de aparición temprana del cáncer (edad media alrededor de los 44 años) y frecuentemente localizado en colon proximal (70%). Los tumores tienden a ser poco diferenciados y con un extenso componente inflamatorio. En general, comparados con los casos de CCR esporádico, parecen tener mejor supervivencia (Watson *et al.*, 1998).

La enfermedad fue descrita por primera vez por Aldred Warthin en 1913 al estudiar una familia con múltiples casos de cáncer de colon, de estómago y de útero. Posteriormente, Lynch & De la Chapelle (2003) describieron algunas familias bajo el término de síndrome de cáncer familiar, las cuales presentaban un gran número de individuos con múltiples cánceres primarios: cáncer endometrial, de estómago, de ovario, hepatobiliares, uroepiteliales y de cerebro. La transmisión multigeneracional del cáncer presentaba un patrón dominante.

El CCHNP es un síndrome genéticamente heterogéneo, causado por mutaciones germinales en uno de los genes implicados en el sistema de reparación de errores de la replicación (MMR). Hasta el momento se han identificados varios genes asociados a CCHNP: MLH1, MSH2, MSH3, MSH6, PMS1 y PMS2 (Marra & Boland, 1995; Miyaki *et al.*, 1997; De La Chapelle, 2004; Benito & Díaz-Rubio, 2006).

1.2.1.2.- Patologías intestinales

Existe un riesgo aumentado de CCR en pacientes afectados de enfermedades inflamatorias intestinales (Karlen *et al.*, 1999). Específicamente, los pacientes con colitis ulcerosa presentan un riesgo elevado de desarrollar CCR, el cual está relacionado con la duración y extensión de la enfermedad. Se estima un riesgo de un 5% a un 10% a los 20 años del diagnóstico y de un 12% a un 20% a los 30 años (Solomon & Schnitzel, 1998). La enfermedad de Crohn puede afectar al área ileo-cólica o limitarse a porciones del colon. En ausencia de afectación colónica, no existe un riesgo elevado de CCR.

1.2.2.- Factores exógenos

La **dieta** está considerada como uno de los mayores factores etiológicos en el desarrollo del CCR. Sin embargo, determinar la relación entre la dieta y el cáncer es difícil debido al largo intervalo requerido para el proceso de la carcinogénesis y a los múltiples factores de confusión creados por las interacciones entre los diferentes constituyentes de la dieta. Los componentes de la dieta que han sido más investigados en relación al CCR son: las fibras, frutas y verduras, el ácido fólico, las grasas, proteínas de origen animal y el calcio (Hill *et al.*, 2006; Van den Brandt, 2006).

Los ácidos biliares normales, que se relacionan con la digestión de la grasa, pueden inducir hiperproliferación de la mucosa intestinal, mediante la activación de AP-1, un factor de transcripción asociado con la transformación neoplásica de las células colónicas (Glinghammar *et al.*, 1999). Una alta ingesta de grasas, en particular de grasas saturadas, ocasiona una proliferación anormal de la mucosa colónica, a través de la secreción de ácidos biliares, pudiendo incluso producir focos de criptas aberrantes, uno de los cambios estructurales más tempranos asociados con el CCR (Lambert *et al.*, 2001).

El **tabaco** se ha asociado consistentemente con el desarrollo de adenomas colorectales. En EEUU se ha demostrado que el fumar estaba asociado con la aparición de adenomas pequeños durante los primeros 20 años de consumo de tabaco. A la luz de los resultados actuales, el tabaco puede ser considerado como un factor de riesgo de CCR pero, con un intervalo de latencia muy largo, mayor de 30 años.

En relación con el efecto del consumo de **alcohol**, el consumo elevado del mismo podría tener un efecto de carcinogénesis en el CCR. Se hipotetiza que, al igual que para el tabaco, el tiempo de latencia de este factor carcinógeno para el CCR sería largo (mayor de 20 años) (Seitz *et al.*, 2005; Hill *et al.*, 2006).

1.3.- BIOLOGÍA DEL EPITELIO COLÓNICO

Los CCRs comprenden todos aquellos cánceres situados en el intestino grueso, el cual, anatómicamente, se divide en colon y recto. El colon comprende desde la válvula ileocecal hasta el recto; es un órgano intraperitoneal y está suspendido de la pared dorsal del cuerpo por el mesocolon. Tiene una longitud aproximada de 1,5 metros y un calibre de 4-6 cm. Al dejar la cavidad abdominal, y penetrar en la cavidad pélvica, el colon se convierte en el recto y abarca los últimos 12-15 cm del tracto intestinal. Los últimos 2 cm del recto, aproximadamente, constituyen el canal anal (Latarjet *et al.*, 2004) (Fig.1).

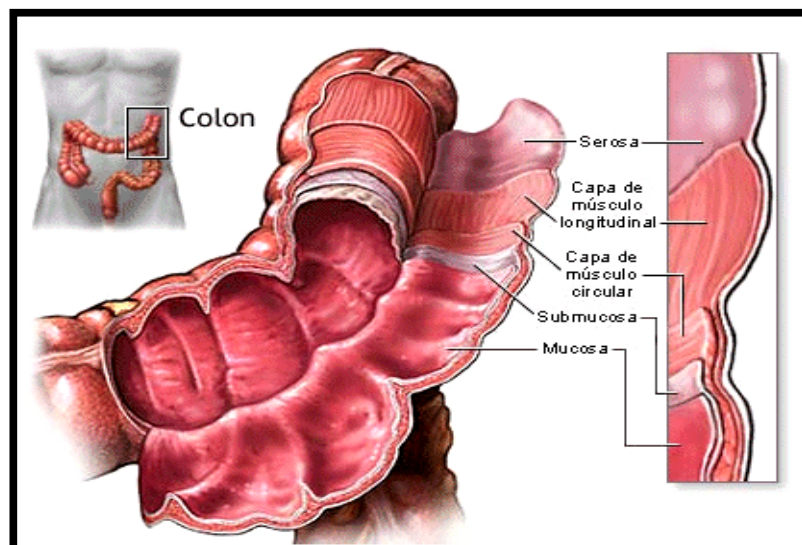


Figura 1.- Estructura del colon: órgano hueco y largo cubierto por la mucosa y por capas musculares (Tomado de National Cancer Institute).

El tracto intestinal es un tubo formado por cuatro capas. La más externa es la serosa o peritoneo, una capa de tejido conjuntivo que recubre toda la cavidad abdominal. A continuación hay una capa de músculo liso que se encarga de los movimientos peristálticos. La siguiente es la submucosa, compuesta por tejido conjuntivo laxo, fibras nerviosas, vasos sanguíneos y vasos linfáticos. La más cercana a la luz del tubo es la mucosa, formada por tejido conjuntivo, músculo liso y por el epitelio. En el caso del colon, el epitelio de la mucosa está formado por células caliciformes que secretan moco para lubricar y compactar las heces, por enterocitos que absorben agua, sodio y otras sustancias y por un escaso número de células enteroendocrinas argirófilas (Lamprecht *et al.*, 2002; Sancho *et al.*, 2004) (Fig. 2).

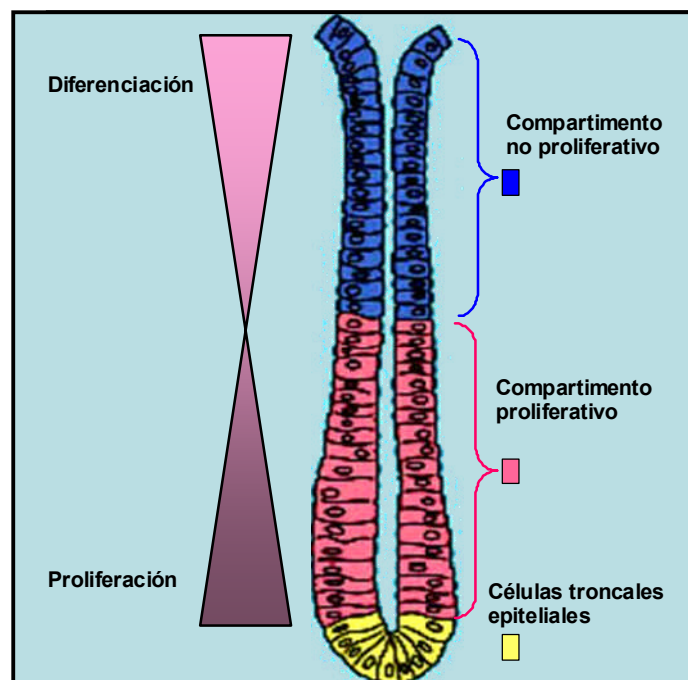


Figura 2.- Esquema del epitelio colónico. La superficie epitelial se invagina hacia la submucosa formando las criptas. En la base de éstas residen las células madre epiteliales y las células enteroendocrinas (Compartimento no proliferativo de células indiferenciadas), y en los dos tercios inferiores los progenitores proliferativos (Compartimento proliferativo). Las células diferenciadas (absortivas y mucosecretoras) se localizan en el tercio superior de la cripta y en el epitelio intercriptas (Compartimento no proliferativo terminalmente diferenciado) (Modificada de Lamprecht *et al.*, 2002; Sancho *et al.*, 2004).

La capacidad absorptiva del epitelio del colon se incrementa mediante invaginaciones hacia la submucosa, las criptas de Lieberkühn (Fig. 2). En la base de las criptas se localizan las células troncales pluripotenciales del epitelio colónico. Estas células (**Compartimiento no proliferativo de células indiferenciadas**) se dividen y generan progenitores que se amplifican por sucesivas divisiones y ascienden por la cripta ocupando aproximadamente los dos tercios inferiores de ésta (**Compartimiento proliferativo**). Durante esta migración tiene lugar un ciclo celular, en paralelo a la activación de programas de expresión génica propios de cada tipo celular diferenciado. En el tercio superior los progenitores dejan de dividirse y se diferencian a los distintos tipos de células del epitelio del colon que, posteriormente, mueren por apoptosis y se eliminan hacia la luz intestinal (**Compartimiento no proliferativo terminalmente diferenciado**) (Potten & Loeffler, 1990, Wright *et al.*, 2000; Lamprecht *et al.*, 2002; Sancho *et al.*, 2004) (Fig. 2).

1.4.- HISTOPATOLOGÍA Y ESTADIAJE

La homeostasis celular del epitelio se mantiene gracias a un balance dinámico entre la división celular continua y el desprendimiento de células en la superficie de las criptas colónicas. La alteración de este balance ocasiona proliferación celular incontrolada que conlleva a la formación de adenomas o pólipos los cuales eventualmente, pueden degenerar en CCR.

Todas estas alteraciones originan las diferentes variedades anatomopatológicas del CCR, las cuales son relativamente limitadas. Más del 90% son adenocarcinomas glandulares sin otra especificación. Además, se pueden distinguir:

* **Adenocarcinomas mucinosos**: esta designación se utiliza cuando más de un 50% de la lesión está compuesta de mucina. Esta variante se caracteriza por lagos de mucina extracelular que contienen epitelio maligno como estructuras acinares, restos celulares o células aisladas. Muchos carcinomas con inestabilidad de microsatélites (MSI+) son de este tipo.

* **Adenocarcinoma de células en anillo de sello**: esta variante se define por la presencia de más de un 50% de células con mucina intracitoplasmática. La típica

célula en anillo de sello tiene una gran vacuola de mucina que ocupa la mayoría del citoplasma y desplaza al núcleo.

* **Carcinoma medular:** esta es una rara variante caracterizada por capas de células malignas con un núcleo vesicular, un nucleolo prominente y abundante citoplasma y que exhibe una gran infiltración de linfocitos. Está asociada invariablemente al patrón MSI+.

* **Carcinoma escamoso:** tumor maligno derivado de un epitelio escamoso o con diferenciación escamosa. Se origina fundamentalmente en la unión ano-rectal.

* **Carcinoma adenoescamoso:** poco frecuente, muestra características tanto de carcinomas escamosos como de adenocarcinomas.

* **Tumores carcinoideos:** carcinomas constituídos por células que poseen gránulos de secreción. Los del intestino grueso no son muy frecuentes y se encuentran fundamentalmente en el apéndice y en el recto.

* **Linfomas, sarcomas y melanomas:** constituyen grupos histológicos minoritarios en el intestino grueso.

Cada uno de ellos presenta las características biológicas y moleculares propias de su estirpe celular. Macroscópicamente los adenocarcinomas pueden adoptar diversas formas, entre las que destacan: las vegetantes (con crecimiento hacia el interior de la luz) las formas infiltrantes y las formas ulcerantes.

En cuanto al estadiaje de la enfermedad según su extensión, existen diversas clasificaciones. La más extensamente utilizada, dada su sencillez, claridad y correspondencia con el pronóstico, es la clasificación original de Dukes de 1932 modificada por Astler & Coller en 1950. También existe la clasificación del sistema TNM (Tumor, Node, Metastasis Stage Grouping) (Unión Internacional Contra el Cáncer, 2004-2005) sin duda más correcta pero más compleja. En ella se tiene en cuenta, además de las capas del intestino afectas, el número de ganglios afectos, lo que también constituye un factor pronóstico de gran importancia.

A

ESTADIO	TNM	DUKES MODIFICADA
Estadio 0	Tis N0 M0	A <i>in situ</i> (limitado a la mucosa)
Estadio I	T1 N0 M0 T2 N0 M0	A Tumor limitado a la mucosa B1 El tumor no atraviesa la pared, ganglios negativos
Estadio II	T3 N0 M0 T4 N0 M0	B2 El tumor se extiende, macroscópicamente, más allá de la pared intestinal, ganglios negativos. B3 El tumor se extiende, macroscópicamente, más allá de la pared intestinal, ganglios negativos.
Estadio III	T2 N1-2 M0 T3-4 N1-2 M0 T4 N1-2 M0	C1 El tumor no atraviesa la pared, ganglios positivos. C2 Estadio B2 + Ganglios positivos C3 Estadio B3 + Ganglios positivos
Estadio IV	Todos T Todos N M1	Enfermedad metastásica o a distancia

B

TUMOR (T)	GÁNGLIOS LINFÁTICOS (N)	METÁSTASIS A DISTANCIA (M)
0 : sin signos de tumor is: <i>in situ</i> (limitado a la mucosa) 1 : infiltración de la submucosa 2 : infiltración de la muscular propia 3 : infiltración de la subserosa o de la grasa pericólica no peritonealizada 4 : infiltración de la estructuras adyacentes	0 : sin signos de infiltración 1 : de 1 a 3 ganglios linfáticos pericólicos positivos 2 : 4 o más ganglios pericólicos positivos 3 : cualquier ganglio positivo a lo largo de un vaso sanguíneo de nombre conocido	0 : sin metástasis 1 : cualquier metástasis a distancia

Tabla 2.- A: Clasificaciones de los diferentes del CCR (Estadio, TNM y Dukes modificada). B: Estadificación de TNM.

1.5.- DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

El estudio de un paciente con síntomas clínicos sospechosos de CCR tiene varios objetivos: confirmar la localización del cáncer primario, obtener confirmación histológica, detectar tumores primarios sincrónicos o adenomas y establecer la extensión de la enfermedad o estadio (Tabla 3). Entre las pruebas diagnósticas cabe destacar:

* **Radiología** y tomografía computerizada.

* **Endoscopia**: método simple para visualizar directamente y biopsiar lesiones sospechosas de malignidad.

* **Ecografía** puede ser utilizada para detectar metástasis hepáticas y para establecer la extensión local del tumor.

* **Marcadores tumorales**: no existen marcadores moleculares con valor pronóstico-diagnóstico en el CCR. El antígeno carcinoembrionario (CEA), habitualmente utilizado, no es lo suficientemente sensible ni específico para ser considerado un marcador diagnóstico primario.

DIAGNÓSTICO DE CERTEZA	DIAGNÓSTICO DE EXTENSIÓN
Examen físico	Bioquímica hepática
Análisis sanguíneo	Marcadores tumorales
Enema opaco	Radiografía de Tórax
Colonoscopia	Ecografía o TC hepático
Biopsia	Ecografía endorectal (cáncer de recto) PAAF o biopsias de metástasis sospechosas

Tabla 3.- Pruebas realizadas para el diagnóstico de certeza y extensión del cáncer colorrectal (Riesewyk *et al.*, 2000).

Dado que el CCR esporádico se desarrolla durante una o dos décadas, existe un amplio margen para la detección temprana. El 70% de los pacientes diagnosticados de CCR no muestran evidencia de metástasis. La eliminación quirúrgica del tumor es la terapia elegida para los tumores localizados, pero sólo es curativa en las fases tempranas del CCR y la tasa de recurrencia es del 50% (Sharma *et al.*, 2001). En muchos casos, la recurrencia supone la aparición de metástasis en otros órganos. La hepática es la metástasis más común del CCR, presentándose en el 20-35% de pacientes con enfermedad avanzada. Si la cirugía no es eficaz, no hay ningún tratamiento satisfactorio contra el cáncer de colon avanzado. La quimioterapia puede alargar y mejorar la calidad de vida del paciente, pero hasta la fecha no es curativa (Meyerhardt & Mayer, 2005).

2.- MODELO DE CARCINOGENÉISIS COLORRECTAL

El pólipo adenomatoso o adenoma, es considerado como la lesión precursora del CCR. La secuencia adenoma-carcinoma (proceso de cambio genético en las células epiteliales de la mucosa del colon) propuesta por Jackman & Mayo en 1951, prevalece como el elemento esencial de la etiología del CCR. Primero, porque se ha demostrado que el no extirpar los pólipos aumenta el riesgo de desarrollar CCR y el

extirparlos lo disminuye (Winawer *et al.*, 1993). Y segundo, porque individuos afectados de síndromes que predisponen al desarrollo de adenomas, como la PAF, invariablemente desarrollaran CCR en la tercera o cuarta décadas de la vida si no se les realiza colectomía preventiva (Rutsgi, 1994).

Sin embargo, no todos los adenomas progresan a cáncer. Asimismo, el potencial maligno de un adenoma puede predecirse, tanto por su tamaño como por la presencia de displasia de alto grado y la predominancia de vellosidades (Winawer *et al.*, 1993).

El concepto actual de carcinogénesis colorectal implica una cascada de fallos genéticos que afectan a genes reparadores del ADN, a proto-oncogenes y a genes supresores de tumores. La acumulación de estas alteraciones genéticas en el epitelio colónico requiere algunos años, normalmente décadas, lo que está de acuerdo con la edad media de los pacientes diagnosticados de CCR (alrededor de 65-70 años).

Hace años, Fearon & Vogelstein (1990) propusieron un modelo con las alteraciones genéticas asociadas a los diferentes estadios del CCR. El modelo propone que:

(a) el CCR es el resultado de la activación de ciertos oncogenes y de la inactivación de otros genes supresores;

(b) para que se produzca el fenotipo maligno es necesaria la mutación de varios genes; y,

(c) estas alteraciones genéticas ocurren en un orden preferente, aunque lo que determina las propiedades del tumor es la acumulación de cambios más que el orden de los mismos (Fearon & Vogelstein 1990; Kinzler & Vogelstein 1996).

Según estos autores, se requieren al menos siete alteraciones para que se desarrolle un tumor maligno y dichas alteraciones genéticas acompañarían la secuencia epitelio normal, displasia, adenoma temprano, adenoma tardío, carcinoma y metástasis (Fig. 3).

En síntesis, la lesión identificable más pequeña en la progresión del CCR es la cripta aberrante (*aberrant crypt foci*, ACF). Hay dos tipos de ACF: hiperplásicas y displásicas (Nucci *et al.*, 1997). Las ACF hiperplásicas son más comunes, presentan mutaciones en el oncogén *K-RAS* y rara vez continúan el desarrollo hacia CCR, desapareciendo probablemente por apoptosis (Pretlow *et al.*, 1993; Arends, 2000; Benito & Díaz-Rubio, 2006). Las displásicas presentan mutaciones en *APC* y son las precursoras del CCR (Powell *et al.*, 1992, Takayama *et al.*, 1998) (Fig. 3). Se han propuesto dos modelos sobre el origen y crecimiento de las ACF displásicas.

Vogelstein y colaboradores proponen que las células con *APC* mutado se localizan en la parte superior del epitelio colónico y desde allí se extienden mediante un movimiento lateral y hacia abajo para formar nuevas criptas (modelo *top-down*) (Shih *et al.*, 2001).

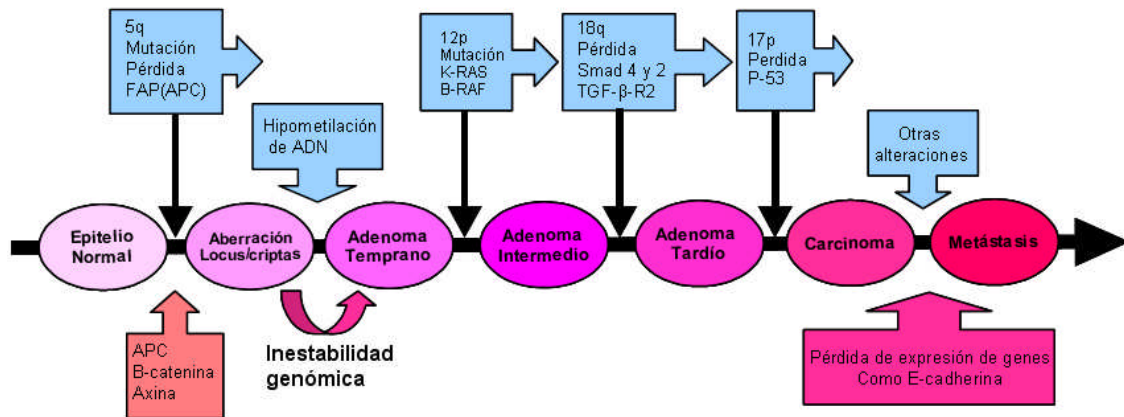


Figura 3.- Modelo de progresión del CCR. Se muestran las alteraciones genéticas asociadas a un estadio determinado. La inestabilidad genómica, como la provocada por la pérdida de expresión o función de los genes del sistema de reconocimiento y reparación de genes y cadenas no metiladas (MMR), acelera el proceso tumoral (Modificado de Fearon & Vogelstein, 1990).

Por el contrario, otros autores sostienen que las ACF se originan por alteraciones en las células troncales y que se expanden por movimiento hacia arriba de la cripta (modelo *bottom-up*) (Preston *et al.*, 2003).

La alteración de *APC* es suficiente para la iniciación del adenoma, pero para progresar a carcinoma, el adenoma tiene que sufrir otras mutaciones (Tabla 4). La ACF displásica se expande y da lugar a adenomas de varios centímetros. Un elevado porcentaje de estos adenomas posee mutaciones en *K-RAS* o en *B-RAF* (Rajagopalan *et al.*, 2002). Posteriores mutaciones inactivadoras en la ruta del factor de crecimiento transformante (TGF)- β (en *SMAD4*, *SMAD2* o *TGF- β R2*) confieren al adenoma características malignas adicionales (Takagi *et al.*, 1998; Grady *et al.*, 1999). La inactivación de *P53* se encuentra asociada a la transición de adenoma-carcinoma en el 50% de los casos de CCR (Lacopetta, 2003) (Fig. 3). Las modificaciones asociadas a la progresión del carcinoma y a la adquisición de propiedades invasivas y capacidad metastásica están menos claras, habiéndose descrito numerosas alteraciones como la pérdida de expresión de E-cadherina (Batlle *et al.*, 2002; Dhawan *et al.*, 2005).

GEN	CROMOSOMA	%	TIPO DE GEN	FUNCIÓN	COMENTARIO
K-ras	12p12	20 – 30	Oncogen	Traducción de señales	Mutaciones puntuales
Ciclina	Varios	4	Oncogen	Regular el ciclo celular	Sobreexpresión
Myc	8	60	Oncogen	Regular el ciclo celular	Sobreexpresión
APC	5q21	60	Supresor	Adhesión celular	Perdida de heterocigosidad
DCC	18q21-23	60	Supresor	Adhesión celular	Perdida de heterocigosidad
p-53	17q13.1	70	Supresor	Regular el ciclo celular	Mutación germinal
p-27	17p13.1	70	Supresor	Regular el ciclo celular	Perdida de expresión
Bax	19q13	70	Apoptosis	Inductor de apoptosis	Mutaciones
TGF-βR-II	3p22	50	Supresor	Traducción de señales	Mutaciones
MSH2	2p22	60	Susceptibilidad	Reparación de ADN	Mutaciones puntuales
MLH1	13p21	30	Susceptibilidad	Reparación de ADN	Mutaciones puntuales
PMS1	2q31-33	0-5	Susceptibilidad	Reparación de ADN	Mutaciones puntuales
PMS2	7p22	0-5	Susceptibilidad	Reparación de ADN	Mutaciones puntuales

Tabla 4.- Resumen de los genes más importantes implicados en CCR y su frecuencia (porcentaje de tumores que las poseen). Los CCR presentan otras anomalías menos frecuentes o que no están claramente asociadas a un estadio concreto.

Esta ruta, conocida como supresora, es válida para el 85% de los CCRs esporádicos y para los pacientes con FAP, y está asociada a un fenotipo de inestabilidad cromosómica con pérdida alélica y aneuploidía causado por las alteraciones en *APC* y *P53* (Fodde *et al.*, 2001; Lacopetta *et al.*, 2003; Rajagopalan *et al.*, 2003). Se ha descrito una segunda vía relacionada con CCR, la ruta mutadora, que se debe al silenciamiento epigenético o, menos frecuentemente, a la mutación de genes del sistema MMR. Estos tumores tienen un cariotipo normal pero presentan inestabilidad de microsatélites. Esta ruta es responsable de los pacientes con HNPCC y del 15% de los CCR esporádicos (Perucho, 1996; Veigl *et al.*, 1998).

2.1.- β -CATENINA EN LA HOMEOSTASIS DEL EPITELIO COLÓNICO

La correcta señalización de Wnt (del inglés “wingless”), mediada por β -catenina-TCF, es esencial para el mantenimiento del estado proliferativo indiferenciado de las células progenitoras del epitelio colónico (Van de Wetering *et*

al., 2002; Battle *et al.*, 2002; Peifer, 2002; Sancho *et al.*, 2003). Las proteínas Wnt constituyen una familia de moléculas de señalización altamente conservadas que regulan las señales intercelulares durante la embriogénesis y en procesos de diferenciación celular y progresión tumoral (Huelsenken & Birchmeier 2001; Giles *et al.*, 2003; Segditsas y Tomlinson, 2006; Herbst y Kolligs, 2007).

En la vía de transducción de señales, Wnt inhibe la fosforilación y degradación de la proteína β -catenina, la cual actúa como co-activador transcripcional de la expresión de genes implicados, por ejemplo, en mantener la proliferación celular. En ausencia de señal de Wnt, β -catenina se asocia a APC, a Axina y a la glucógeno sintasa quinasa-3 β (GSK-3 β). La GSK-3 β es una proteína con actividad serina/treonina quinasa y tiene como sustratos, dentro de la vía de Wnt, a Axina y APC, las cuales fosforilan a β -catenina marcándola para su ubiquitinación y degradación por el proteasoma (Giles *et al.*, 2003; Nelson & Nusse 2004; Gregorieff & Clevers 2005). Las proteínas Wnt actúan uniéndose a un receptor de membrana miembro de la familia Frizzled (familia de receptores de siete dominios transmembrana) activándolo (Fig. 4). El receptor activado favorece a su vez la activación, mediante fosforilación de otra proteína, Dishevelled (Dsh), la cual interacciona con la Axina evitando su unión a la GSK-3 β y a APC e impidiendo, por lo tanto, la degradación de β -catenina.

En células diferenciadas del epitelio intestinal, no existe señalización por Wnt, y el complejo multiproteico participaría en la degradación de β -catenina (Barth *et al.*, 1997; Eastman & Grosschedl, 1999; Polakis *et al.*, 1999 a,b; Segditsas y Tomlinson, 2006; Herbst y Kolligs, 2007). En estas condiciones, una fracción importante de la β -catenina celular se encontraría formando parte del complejo de adhesión célula-célula mediado por E-cadherina y los excedentes serían degradados por el proteasoma. En presencia de señales Wnt, este complejo se inactiva impidiéndose la degradación de β -catenina que, por lo tanto, se acumula en el citoplasma. β -catenina libre se transloca al núcleo, actuando como co-activador transcripcional de genes relacionados con el mantenimiento del fenotipo indiferenciado de las células troncales (como por ejemplo: *c-myc*, ciclina D1) (Giles *et al.*, 2003; Nelson y Nusse 2004; Gregorieff y Clevers, 2005; Segditsas y Tomlinson, 2006; Herbst y Kolligs, 2007).

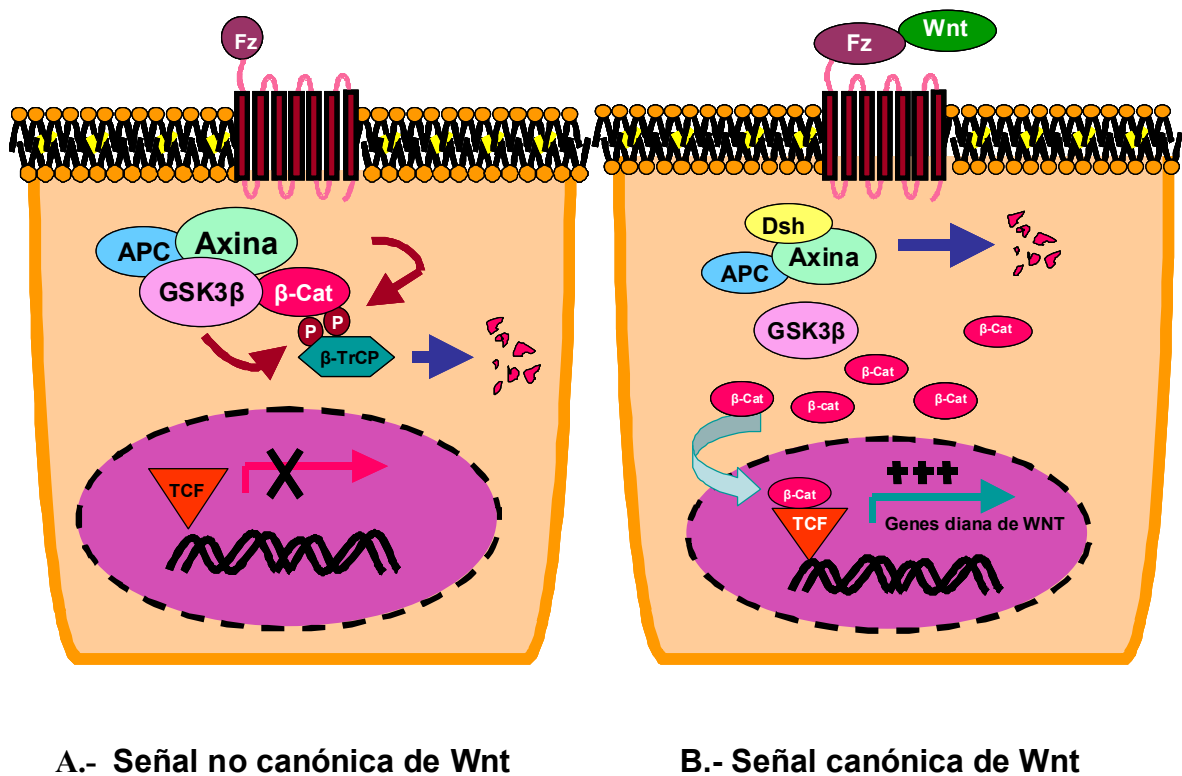


Figura 4.- (A) En ausencia de la señal de Wnt, GSK-3 β fosforila β -catenina en el complejo de destrucción (Axina, APC, GSK-3 β) para su degradación vía proteosoma. Por el contrario, en (B) la asociación de Wnt a Fz, ocasiona el desplazamiento de Axina (y quizás del complejo multiproteico completo) a la membrana plasmática interactuando directamente con Dsh/Fz. El desplazamiento da lugar a la degradación de Axina y/o a la disociación del complejo multiproteico. También GSK3 β puede ser desplazado de este complejo por acción de Dsh. β -catenina es entonces liberado del complejo multiproteico, acumulándose en el citoplasma de forma no fosforilada, y de allí se desplaza al núcleo donde promueve la transcripción de genes dianas de Wnt como *c-myc* o ciclina D1 (He, 2003; Clements & Kilmelman, 2003; Pinto y Clevers, 2005).

Las proteínas Wnt, provenientes de células estromáticas de la parte inferior de la mucosa (debajo de la cripta) son las encargadas de mantener el potencial proliferativo de la cripta, garantizando la supervivencia y/o mantenimiento de las células madres progenitoras, las cuales presentan β -catenina nuclear (Fig. 5). Asimismo, actúan también frenando la transición desde la región de proliferación a la de diferenciación (Wu *et al.*, 2003).

A medida que las células migran hacia las zonas más apicales de la cripta, éstas escapan de las señales Wnt y la actividad de β -catenina es inhibida, lo que conduce al silenciamiento de los genes diana, la parada del ciclo celular y la diferenciación. El principal mecanismo que suprime la actividad β -catenina es la

degradación de β -catenina y, es muy posible que también la traslocación núcleo-citoplasma de β -catenina por parte de APC.

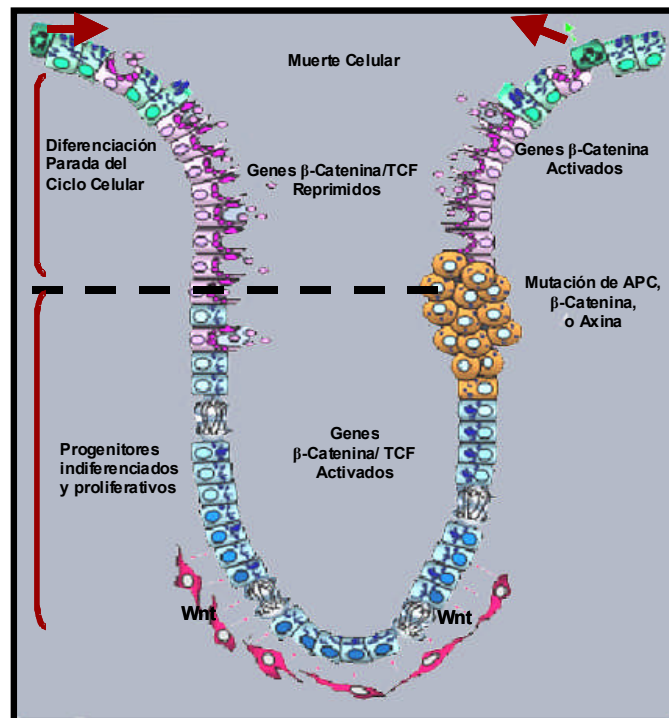


Figura 5.- Acción de la vía de Wnt durante la diferenciación terminal del epitelio intestinal. La actividad β -catenina impone el fenotipo proliferante y marca la compartimentalización de la expresión génica en la zona proliferante (inferior) en relación a parte terminal diferenciada (Modificado de Van de Wetering, 2002).

También ciertos dominios de la proteína APC favorece la translocación de β -catenina al citoplasma, sugiriendo que la degradación citoplasmática de ésta podría estar modulada por el propio APC dirigiendo o no su localización subcelular (Liu *et al.*, 2002; Neufeld *et al.*, 2000).

La no degradación de β -catenina (independiente de factores Wnt) ocurre en casi todos los CCR e impone a las células tumorales un fenotipo indiferenciado similar al de los progenitores intestinales con mayor capacidad de proliferación (Van de Wetering *et al.*, 2002). Esta activación tiene lugar en los estadios más tempranos del CCR y se considera iniciadora de la tumorigénesis (Morin *et al.*, 1997; Segditsas y Tomlinson, 2006; Herbst y Kolligs, 2007) (Fig. 5). El 75% de los CCR presentan mutaciones en *APC* que dan lugar a una proteína truncada que no se une a β -catenina o a Axina, impidiendo la formación adecuada del complejo de degradación (Miyoshi *et al.*, 1992; Näthke, 2004). Menos frecuentemente, y sólo en los tumores

que no presentan *APC* mutado, se observan mutaciones compensatorias en β -catenina (7,5%) o en Axina. Las mutaciones de β -catenina afectan a los residuos fosforilables impidiendo que sea marcada para degradación (Morin *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2002; He *et al.*, 2007).

3.- POSIBLES NUEVOS MARCADORES MOLECULARES EN CCR

Durante los últimos años el desarrollo de nuevas técnicas de biología molecular, ha permitido un conocimiento más preciso del ciclo celular, las proteínas en él involucradas y sus interrelaciones. Sobre la base de estos estudios moleculares y como hemos comentado anteriormente, se ha podido demostrar que la acumulación de alteraciones genéticas juega un papel decisivo en la iniciación y progresión de los fenómenos de la transformación oncogénica en general y del epitelio colónico en particular. Estas alteraciones incluyen la pérdida del equilibrio que define el balance entre la activación de genes promotores del ciclo (oncogenes) y la inactivación de genes supresores, con la consiguiente alteración o desregulación de la progresión del ciclo celular (Hanahan y Weinberg, 2000). Algunas de estas desregulaciones han demostrado tener influencia pronóstica.

En general, los factores pronósticos manejados hoy en día están relacionados con los hallazgos histopatológicos y otros hallazgos como tamaño tumoral, afectación ganglionar, invasión de estructuras adyacentes y metástasis a distancia. De todos ellos es reconocido que los de mayor significación pronóstica son, el tamaño tumoral con la profundidad de invasión, la presencia de ganglios linfáticos afectados y las metástasis a distancia.

El mejor pronóstico en tumores es el resultado del estudio de factores relacionados con la biología molecular tumoral y su posible relación con el comportamiento evolutivo de la enfermedad. Entre estos últimos, se han descrito varios antígenos que actúan como marcadores de distintas fases del ciclo celular (PCNA, AgNORs, Ki67, P-53 y BRCA-1 y 2) (Costa Ade *et al.*, 1999; Janczukowicz, 2003; Liebens *et al.*, 2007; Petitjean *et al.*, 2007).

El Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA), se determina mediante métodos inmunohistoquímicos sobre cortes histológicos. La acción de PCNA en la proliferación celular se basa en la función que ésta proteína ejerce sobre algunas formas de ADN polimerasa. PCNA, por lo tanto se puede considerar como un marcador de la fase G1 (síntesis baja de PCNA) que aumenta con el comienzo de la

fase S (síntesis alta de PCNA) para tornar a valores basales durante el periodo final de dicha fase.

También entre este grupo de marcadores se encuentran las Regiones organizadoras nucleares (NORs). Estas constituyen complejos proteicos de ARN polimerasa I, una proteína designada como C23 (nucleolina) y la proteína B23. Las NORs se hacen evidentes a través de coloraciones argénticas, motivo por el cual son conocidas como AgNORs.

El BRCA-1 y 2, son los primeros genes asociados a cáncer de mama que se describieron. Ambos genes son supresores de tumores. Se cree que las formas mutadas de estos genes son responsables del 50% de los casos de cáncer hereditario de mama, especialmente en mujeres jóvenes. El hombre portador de mutaciones del BRCA2 de igual forma presenta un riesgo mayor de padecer cáncer de mama (Liebens *et al.*, 2007).

El Ki67 es un antígeno que se determina mediante el anticuerpo monoclonal que lleva su nombre. Es un antígeno que se expresa en la parte final de la fase G2 y en la fase M del ciclo celular. Por lo tanto, el anticuerpo monoclonal Ki67 permite detectar inmunohistoquímicamente a las células que completan un ciclo y su expresión proporciona una medida directa de la fracción de crecimiento del tejido.

P53 es un gen supresor tumoral por lo que es un inhibidor de la formación tumoral. La pérdida de la función de p53 conduce a la tumorigenesis, y a una fracción grande de las mutaciones examinadas en tumores humanos. P53 es una proteína que desempeña un papel esencial en la regulación del ciclo celular, previniendo en las células la transición inadecuada de G1 a fase S. La pérdida de este control conduce a un crecimiento descontrolado de la célula asociada con el cáncer. La afectación genética más habitual es la delección de un alelo y mutación del restante (situación denominada pérdida del estado heterocigótico) (Petitjean *et al.*, 2007).

En el caso del cáncer colorrectal, aunque existen nuevas opciones terapéuticas, como la quimioterapia o radioterapia adyuvante, combinadas con la resección quirúrgica con intención curativa, todavía no se han definido con claridad sus indicaciones en los distintos estadios del cáncer colorrectal (Gerson, 2002). No existe hasta el momento un marcador o marcadores para la diagnosis de los adenocarcinomas de colon. En la actualidad los estudios de progresión tumoral se hacen en base a características morfo-histológicas. Por ello nos proponemos hacer un estudio inmunohistoquímico y molecular en los diferentes estadios benignos y malignos de CCR, basado en una combinación de la expresión de ciertos genes.

Entre ellos incluimos el antígeno nuclear marcador de proliferación Ki67 y el supresor tumoral p53, marcadores que, como ya se ha comentado, han sido ampliamente estudiados en todo tipo de cánceres. Además, existen otros posibles marcadores, como son el KLF6 y endoglina, que por su implicación en otros tipos de cáncer, podrían ser excelentes candidatos como valores diagnósticos y pronósticos en CCR.

3.1.- ASPECTOS GENERALES DE ENDOGLINA

Endoglina (CD105) es una glicoproteína homodimérica transmembrana que se expresa fundamentalmente en células endoteliales, tanto en arterias, como en venas y capilares (Cheifetz *et al.*, 1992; Bourdeau *et al.*, 2000). Su expresión se ve aumentada en estas células en zonas donde se está produciendo una angiogénesis activa (Duff *et al.*, 2003; Fonsatti *et al.*, 2003), en zonas donde hay una lesión vascular (Wang *et al.*, 1995; Conley *et al.*, 2000; Botella *et al.*, 2002), en el endotelio de algunas patologías de la piel (Van de Kerkhof *et al.*, 1998; Westphal *et al.*, 1993), en enfermedades autoinmunes (Marazuela *et al.*, 1995) y en la angiogénesis tumoral (Duff *et al.*, 2003; Fonsatti *et al.*, 2003) como en cáncer de pulmón (Miller *et al.*, 1999) o en el de mama (Fonsatti *et al.*, 2000). Sin embargo, la expresión de endoglina en la pared vascular no se limita al endotelio, también podemos encontrarla en fibroblastos del estroma perivascular (Matsubara *et al.*, 2000) y en células de músculo liso vascular (Adam *et al.*, 1998; Conley *et al.*, 2000).

Fuera del contexto endotelial se ha demostrado expresión de endoglina en el proceso de diferenciación de monocito a macrófago (Lastres *et al.*, 1992; O'Connell, *et al.*, 1992; Sanz-Rodríguez *et al.*, 2004 a), en sincitiotrofoblasto (Gougos *et al.*, 1992), en células estrelladas de hígado (Meurer *et al.*, 2005), en células mesangiales de riñón (Roy-Chaudhury *et al.*, 1997, Rodríguez-Barbero *et al.*, 2001), en células de la capa basal de la epidermis (Quintanilla *et al.*, 2003), fibroblastos cardíacos (Chen, *et al.*, 2004), en precursores eritroides (Buhning *et al.*, 1991) y finalmente también en ciertos tumores como en melanoma (Altomonte *et al.*, 1996; Bodey *et al.*, 1998) o cáncer de próstata (Liu *et al.*, 2002 b).

Existen también evidencias que apoyan que endoglina tiene un papel fundamental en la remodelación vascular y desarrollo cardiovascular. Así, se expresa en gran medida en las células mesenquimáticas del canal atrioventricular del endocardio durante la formación de las válvulas y del septo (Qu *et al.*, 1998; Vincent *et al.*, 1998). De hecho, ratones “*knock out*” para endoglina mueren a los 10-11.5

días *postcoitum* debido a importantes alteraciones cardiovasculares (Bourdeau *et al.*, 1999; Arthur *et al.*, 2000).

A pesar de que endoglina es una proteína de membrana, se pueden encontrar bajos niveles de la proteína soluble en plasma, libre o unida a TGF- β 1, debido a un corte proteolítico. Estos niveles pueden encontrarse aumentados en ciertas patologías. La concentración plasmática de complejos endoglina-TGF- β 1 parece estar aumentada en pacientes con cáncer de mama (Li *et al.*, 1998), mientras que altos niveles de endoglina soluble libre parecen correlacionarse con el riesgo de desarrollar metástasis en estos pacientes, por lo que se ha propuesto como un importante marcador pronóstico (Li *et al.*, 2000). Otros estudios muestran una elevada concentración de la proteína soluble en leucemia mieloide aguda, desórdenes mieloproliferativos crónicos (Calabro *et al.*, 2003) y en esclerosis sistémica (Fujimoto *et al.*, 2006). Recientemente se ha descrito una nueva forma de endoglina soluble de origen placentario, presente en el suero de mujeres embarazadas y que se encuentra aumentada en la enfermedad hipertensiva del embarazo (preeclampsia), correlacionándose con la severidad de esta patología (Venkatesha *et al.*, 2006; Levine *et al.*, 2006).

3.1.1.- Estructura y función

Endoglina es un componente del complejo de receptores de TGF- β , capaz de unir TGF- β 1 y TGF- β 3, con gran afinidad, en presencia de los correspondientes receptores tipo I y tipo II (Cheifetz *et al.*, 1992; Letamendia *et al.*, 1998; Barbara *et al.*, 1999). En estudios *in vitro* se ha observado que también es capaz de unir otros miembros de la superfamilia del TGF- β como son: Activina-A, BMP-2 y BMP-7 (*Bone morphogenetic protein 2, 7*), por lo que podría estar implicada en distintas vías de señalización (Barbara *et al.*, 1999).

Endoglina y betaglicano se consideran receptores accesorios de TGF- β , puesto que su papel en la señalización es indirecto, por lo que se les ha denominado receptores tipo III o correceptores. Contrariamente a endoglina, betaglicano es capaz de unir TGF- β *per se*, favoreciendo la accesibilidad del factor de crecimiento a sus receptores (Lopez-Casillas *et al.*, 1991).

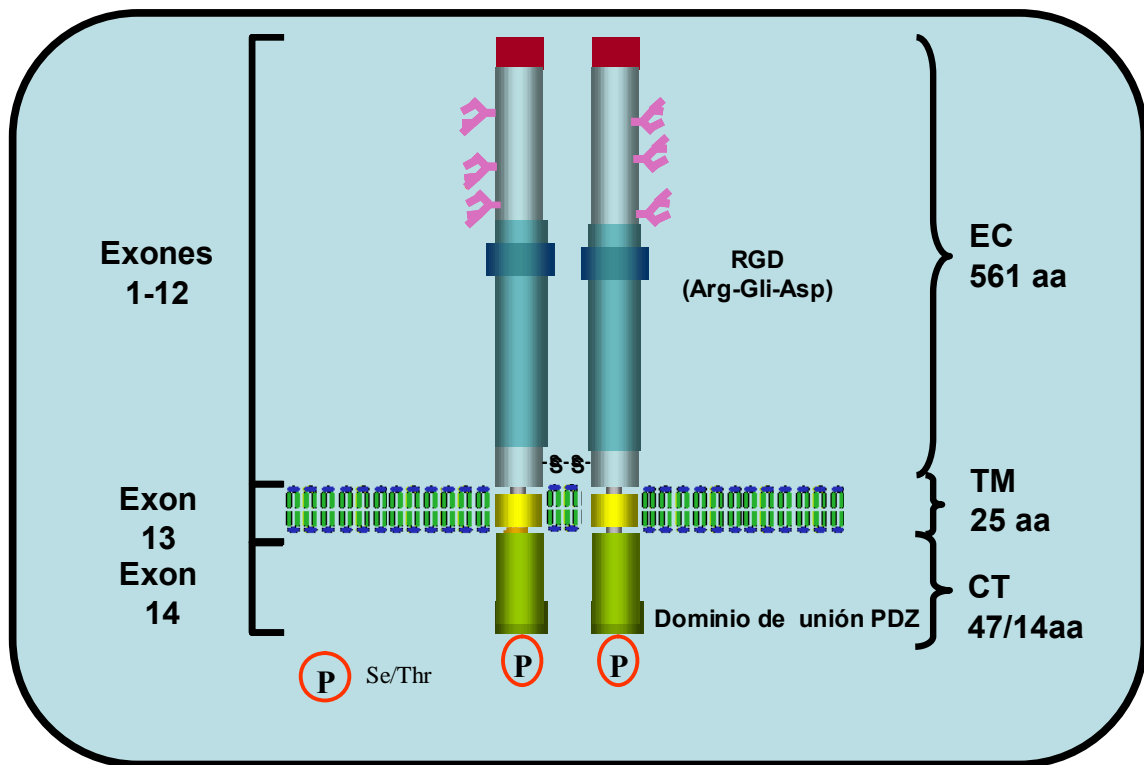


Figura 6.- Representación esquemática del dímero de endoglina. EC, región extracelular; TM, región transmembrana; CT, región citoplásmica.

Endoglina (Fig. 6) y betaglicano presentan un 70% de homología en sus regiones transmembrana y citoplásmica, siendo escasa la homología en la región extracelular (Gougos y Letarte, 1990; Lopez-Casillas *et al.*, 1991; Letamendia *et al.*, 1998). Ambas proteínas presentan un corto dominio citoplásmico rico en residuos de serina y treonina que carece de actividad enzimática. En sus tres últimos residuos carboxi-terminales se encuentra un dominio de unión a motivos PDZ tipo I de otras proteínas, que, en el caso de endoglina, parece ser importante en la regulación de su fosforilación por parte de los receptores tipo I y II (Lastres *et al.*, 1994; Guerrero-Esteo *et al.*, 2002; Koleva *et al.*, 2006). En su dominio extracelular, endoglina presenta el tripeptido RGD (arginina-glicina-ácido aspártico), el cual se postula que se encuentra implicado en adhesión celular (Gougos y Letarte, 1990; Cheifetz *et al.*, 1992). Este péptido se encuentra fundamentalmente en proteínas de la matriz extracelular, como fibronectina, vitronectina, factor von Willebrand, colágeno tipo I y fibrinógeno, y es reconocido por integrinas de la superficie celular (Ruoslahti, 1989). Sin embargo, la identidad de las proteínas de tipo integrina que potencialmente

podrían interactuar con el dominio RGD de endoglina, se desconoce hasta la fecha.

Se han descrito dos isoformas distintas de endoglina (L, “*large*” y S, “*small*”) con capacidad de unir TGF- β y que se diferencian en la composición de aminoácidos de sus colas citoplásmicas (Fig. 7). La forma predominante es endoglina L, formada por 633 aminoácidos de los cuales 47 forman el dominio intracelular, mientras que endoglina S está compuesta por 600 aminoácidos, con una corta cola citoplásmica de 14 aminoácidos. Esta diferencia se debe a que en la isoforma corta el último intrón de *endoglina* no se elimina, permaneciendo en el ARN mensajero maduro. Este intrón introduce un codón de parada prematuro que conduce a la traducción de una proteína más corta (Bellón *et al.*, 1993).

No se conoce con claridad el papel que desempeña endoglina S *in vivo*; se ha postulado, mediante estudios en ratón, que puede comportarse como una molécula antiangiogénica, contrariamente a la función proangiogénica que desempeña la isoforma L mayoritaria (Perez-Gomez *et al.*, 2005).

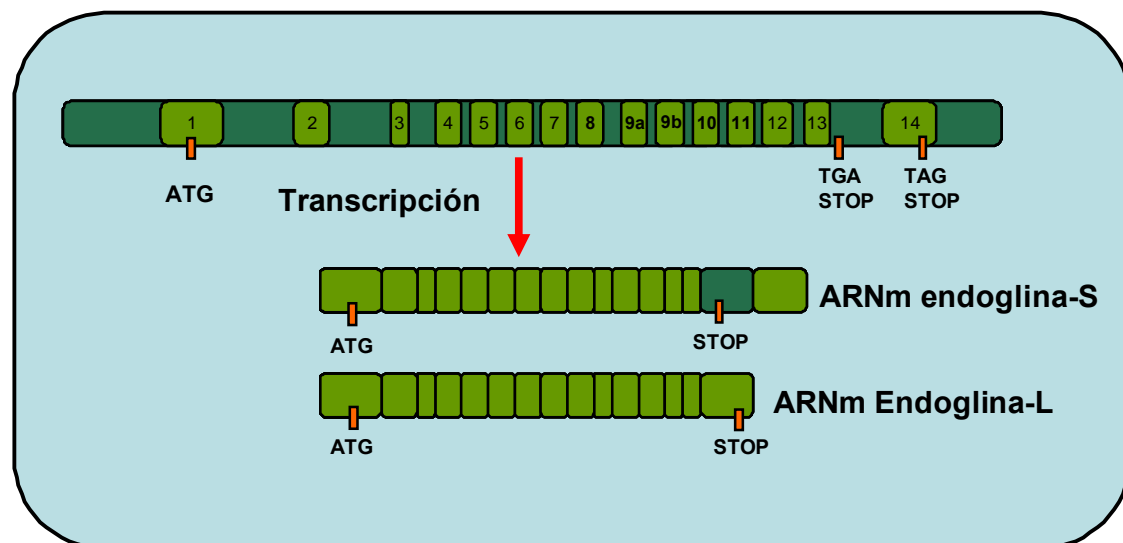


Figura 7.- Procesamiento alternativo del ARNm de endoglina. Cuando el último intrón de endoglina no se elimina, se introduce un codón de parada prematuro lo que da lugar a la isoforma corta.

3.1.2.- Patología asociada a mutaciones en el gen de Endoglina

Mutaciones en el gen de Endoglina causan la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria tipo I (HHT1). Esta es una enfermedad autosómica dominante producida

por una haploinsuficiencia de Endogлина en la célula endotelial. Clínicamente es una displasia vascular que se caracteriza por hemorragias nasales (epistaxis), manchas mucocutáneas (telangiectasias) y malformaciones arteriovenosas en órganos internos (cerebro, pulmón, tracto gastrointestinal e hígado).

3.1.3.- Funciones independientes de TGF- β

Aparte del papel de endogлина como correceptor de TGF- β , se ha propuesto que debe desempeñar funciones independientes de esta vía de señalización, basándose en el hecho de que en la superficie de la célula endotelial existen 100 veces más moléculas de endogлина que complejos receptores de TGF- β (Cheifetz *et al.*, 1992; Qu *et al.*, 1998).

Está descrito que la sobreexpresión de endogлина en fibroblastos y células de músculo liso vascular conduce a una alteración en la migración, adhesión y en la morfología celular, lo que sugiere un papel de endogлина en la organización del citoesqueleto celular (Guerrero-Esteo *et al.*, 1999). De hecho, en nuestro laboratorio se describió la interacción del dominio citoplásmico de endogлина con ZRP1, proteína asociada al citoesqueleto de actina (Sanz-Rodríguez *et al.*, 2004 b). ZRP1 pertenece a la familia de proteínas con dominios LIM, familia a la que también pertenece Zyxin, la cual desempeña un papel similar al de ZRP1, uniéndose igualmente al dominio citoplásmico de endogлина (Conley *et al.*, 2004). En ausencia de endogлина, ZRP-1 se localiza en regiones discretas de la membrana, similares a contactos focales de adhesión. Por el contrario cuando hay expresión de endogлина, ZRP-1 modifica su localización, encontrándose a lo largo de las fibras de estrés. Por lo tanto, parece que endogлина al interactuar con ZRP1, regula la formación y distribución del citoesqueleto de actina (Sanz-Rodríguez *et al.*, 2004 b).

También se ha implicado a endogлина en la regulación de la adhesión y motilidad de células tumorales de próstata (Liu *et al.*, 2002 b). En este estudio se observó que la sobre-expresión de endogлина aumentaba la adhesión de células prostáticas mientras que disminuía su capacidad migratoria e invasiva. De la misma manera, la eliminación de endogлина produjo el efecto opuesto, es decir, aumentó la capacidad migratoria e invasiva de estas células. Mediante ensayos de inmunofluorescencia en células tumorales, detectaron que endogлина se localizaba en puntos de adhesión focal, lo que apoyaba el posible papel de endogлина como regulador de la adhesión. Otros datos que apoyaban este hecho fueron que la

pérdida de expresión de endogлина en líneas celulares humanas de cáncer de próstata, así como en diferentes células tumorales procedentes de enfermos, daba lugar a una pérdida de adhesión celular. Por lo tanto, todos estos datos sugieren que la pérdida de expresión de endogлина parece estar implicada en la progresión tumoral del cáncer prostático, al menos *in vitro*.

Por otro lado, se ha descrito a endogлина como un importante regulador de la función de la enzima Óxido Nítrico Sintasa endotelial (eNOS), actuando como una proteína puente entre ésta y la HSP90 citoplásmica (*Heat Shock Protein 90*) (García-Cárdena & Folkman, 1998). Así, se ha descrito que en células endoteliales de pacientes con HHT1, la interacción entre eNOS y HSP90 se ve disminuida, conduciendo a una mayor producción de radicales libres que podrían explicar, al menos en parte, las malformaciones arterio-venosas presentes en estos pacientes (Toporsian *et al.*, 2005).

3.1.4.- Endogлина en cáncer

Endogлина se expresa en varios tipos de cáncer tales como leucemias, melanomas, coriocarcinomas, cáncer de próstata, y cáncer de ovario (Lastres *et al.*, 1992; Altomonte *et al.*, 1996; Letamendia *et al.*, 1998; Evangelou *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2002), pero su papel en el proceso tumoral es poco conocido. Recientemente se ha descrito el papel de endogлина en la carcinogénesis de piel (Quintanilla *et al.*, 2003). Mediante inmunohistoquímica se encontró que endogлина se expresaba en epidermis humana y de ratón y en los apéndices de la piel, como folículos pilosos y glándulas sudoríparas. En la epidermis interfolicular normal, endogлина esta restringida a los queratinocitos basales y está ausente en las células que se diferencian de las capas suprabasales. La expresión folicular de endogлина es alta en los queratinocitos del bulbo piloso, pero disminuye en las partes distales del bulbo. Para estudiar el papel de endogлина en la carcinogénesis de piel *in vivo*, ratones heterocigotos para endogлина se sometieron a carcinogénesis química. La reducción de endogлина tuvo un efecto dual en la carcinogénesis. Por una parte, inhibió la aparición temprana de papilomas benignos, pero incrementó la progresión maligna hacia carcinomas altamente indiferenciados. Estos resultados son muy similares a los descritos previamente en ratones transgénicos que sobre-expresan TGF- β 1 en la epidermis (Cui *et al.*, 1995). Estos datos sugieren que endogлина podría atenuar la

señalización de TGF- β en epidermis normal e interferir con la progresión de la carcinogénesis de piel (Siegel & Massague, 2003).

El modelo de carcinogénesis de piel de ratón ha mostrado ser una excelente herramienta para la comprensión del desarrollo tumoral (Frame *et al.*, 1998). En este modelo, la vía del TGF- β 1 parece ser un modulador positivo de la progresión tumoral. Dependiendo del estadio temprano de progresión, este factor es capaz de inducir una transdiferenciación maligna epitelio-mesenquima (TEM) *in vitro* (Caulin *et al.*, 1995).

Además de HHT1 como patología endotelial causada por mutaciones en Endogлина, es muy posible que ésta sea también diana de mutaciones en procesos de tumorigénesis. Como miembro de la familia de receptores de TGF- β , endogлина puede mantener la homeostasis de aquellos tipos celulares en los que se expresa, en condiciones fisiológicas normales, mediando el efecto antiproliferativo y apoptótico del TGF- β . Por otra parte, se conocen mutaciones de miembros del sistema de TGF- β , ligadas al desarrollo de cáncer humano, como es el caso de mutaciones en las Smads, y el cáncer de colon (Siegel & Massagué, 2003). Por tanto, en los procesos de tumorigénesis, cabe esperar, no sólo alteraciones en los niveles de expresión de endogлина, sino también mutaciones que afecten a su propia funcionalidad.

3.2.- KLF6 Y LA FAMILIA KRÜPPEL DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

KLF6 pertenece a la familia de los factores de transcripción Krüppel que se caracterizan por poseer dominios de unión al ADN llamados “dedos de Zinc”. Esta familia incluye al menos 15 miembros y regulan procesos muy diversos como son el crecimiento celular, la transmisión de señales y la diferenciación (Bieker *et al.*, 2001; Dang *et al.*, 2000). Los genes de la familia KLF están muy conservados a lo largo de la evolución, con homólogos que se expresan en pez Cebra y en *Xenopus Laevis* (Oates *et al.*, 2001; Huber *et al.*, 2001). Todos los miembros de esta familia poseen una región carboxi-terminal muy conservada de 80 aminoácidos que constituyen el dominio de unión al ADN (dedos de Zin) (Fig. 8). Por otra parte, la región N-terminal de cada miembro de esta familia tiene un dominio de transactivación distinto (Philipsen y Suske 1999). Los miembros de esta familia se dividen filogenéticamente en cuatro subgrupos y actualmente se designan por un número (desde KLF1 hasta KLF15) (Bieker *et al.*, 2001).



Figura 8.- Representación de la estructura de un miembro de la familia KLF, con sus tres dedos de Zn, interaccionando por el surco mayor del ADN.

Mientras que los dominios de unión al ADN de los KLFs son idénticos, sus dominios de transactivación divergentes son responsables de regular distintas actividades biológicas. Algunos de los miembros de esta familia son activadores, otros represores y otros, por ejemplo KLF6, son bifuncionales porque transactivan algunos genes y reprimen otros (Bieker *et al.*, 2001). Los KLFs pueden homo o heterodimerizar bien con otros KLFs o con otros factores de transcripción heterólogos (Merika y Orkin, 1995; Sur *et al.*, 2002). Recientemente se ha documentado la interacción física y la sinergia funcional entre KLF6 y SP1 (Botella *et al.*, 2002) y KLF6 con KLF4 (Okano *et al.*, 2000). Las proteínas de esta familia son específicas de tejido, como es el caso de KLF1 (o EKLF) que se expresa en eritrocitos (Hodge *et al.*, 2006), o más comúnmente son de expresión ubicua como KLF6 y KLF7 (Ratzu *et al.*, 1998; Matsumoto *et al.*, 1998). Las proteínas KLFs pueden estar fosforiladas, acetiladas, o ubiquitiniladas (Zhang *et al.*, 2001; 2003). Entre los estímulos inductores o represores de la expresión de estas proteínas están el daño tisular, el estrés celular, y diversas citoquinas (Bieker *et al.*, 2001).

Las proteínas KLFs juegan un papel fundamental en el desarrollo, como lo demuestra el hecho de que los ratones “knock-out” para KLF6 son letales. Precisamente los modelos de “knock-outs” en ratones para los KLFs han revelado funciones de los mismos en la activación de células T (KLF2) (Wu y Lingrel, 2005), estabilidad de los vasos sanguíneos (KLF2) (Susuki *et al.*, 2005), eritropoiesis (KLF1)

(Nuez *et al.*, 1995), y en la integridad de la barrera epitelial (KLF4) (Segre *et al.*, 1999).

3.2.1.- KLF6 y su papel como activador de transcripción y supresor tumoral

El gen de KLF6 consta de 4 exones de 218, 574, 124 y 525 pb, respectivamente (Fig. 9). La mayor parte del exón 2 codifica para el dominio de transactivación de KLF6, y la mayoría de las mutaciones que se han visto en el gen ocurren en este exón (Chen *et al.*, 2003). Los dedos de zinc, que son codificados por los exones 2, 3 y 4, están muy conservados evolutivamente. Tras ellos se encuentra el dominio amino terminal, que es rico en residuos ácidos y representa el dominio de activación transcripcional (Fischer *et al.*, 2001). Contiene, además, dos sitios susceptibles de ser fosforilados por la proteína Kinasa C, lo cual sugiere que podrían darse modificaciones postraduccionales que posiblemente estarían implicadas en la modulación de la función de KLF6 (Slavin *et al.*, 2004).

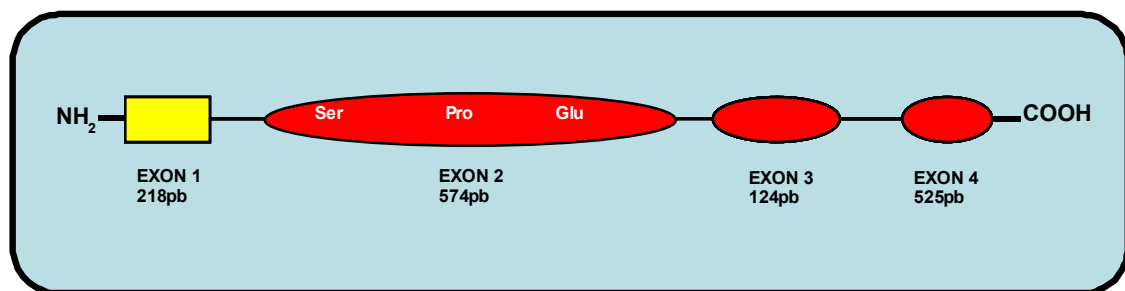


Figura 9.- Estructura de KLF-6 con sus 4 exones y sus pares de bases correspondientes, sus dos dominios terminales y los tres exones conservados evolutivamente (Rojo).

La proteína codificada por KLF6 posee 283 aminoácidos con un dominio de transactivación N-terminal de 202 aminoácidos y un dominio C-terminal con el clásico motivo de unión al ADN en “dedos de Zinc” de 81 aminoácidos característico de la familia Krüppel. El dominio de transactivación es rico en prolinas y serinas con múltiples sitios de fosforilación potencial, y una secuencia que define una posible diana de degradación proteasómica (Ratzu *et al.*, 1998). KLF6 se describió inicialmente como un factor activador de colágeno tipo I (Ratzu *et al.*, 1998), HIV (Suzuki *et al.*, 1998), y de una glicoproteína específica de embarazo (Koritschoner *et al.*, 1997). Actualmente la lista de dianas transcripcionales de KLF6 incluye a TGF-β1 y sus receptores (Kim *et al.*, 1998), la proteína chaperona de colágeno HSP-47

(Yasuda, *et al.*, 2002), la óxido nítrico sintasa (Warke *et al.*, 2003), el activador del plasminógeno de tipo urokinasa (Kojima *et al.*, 2000), la leucotrieno sintasa (Zhao *et al.*, 2000), endoglina (Botella *et al.*, 2002), los genes de queratina (Okano *et al.*, 2000; Chiambaretta *et al.*, 2002). Además KLF6 se induce durante la adipogénesis (Inuzuka *et al.*, 1999), donde reprime la actividad de la proteína transmembrana Dlk-1 para inducir la diferenciación de adipocitos. Durante la reparación de heridas, KLF6 se induce como un gen de respuesta inmediata en varios contextos, incluyendo la activación de las células estrelladas tras daño hepático (Ratziu *et al.*, 1998) o tras heridas en el endotelio (Botella *et al.*, 2002).

La capacidad antiproliferativa de KLF6 se descubrió al ver que suprimía significativamente el crecimiento celular hepático cuando se expresaba en hepatocitos de ratones transgénicos, mediante la activación del inhibidor dependiente de cdk/ciclina, p21/WAF1 (Fig. 10).

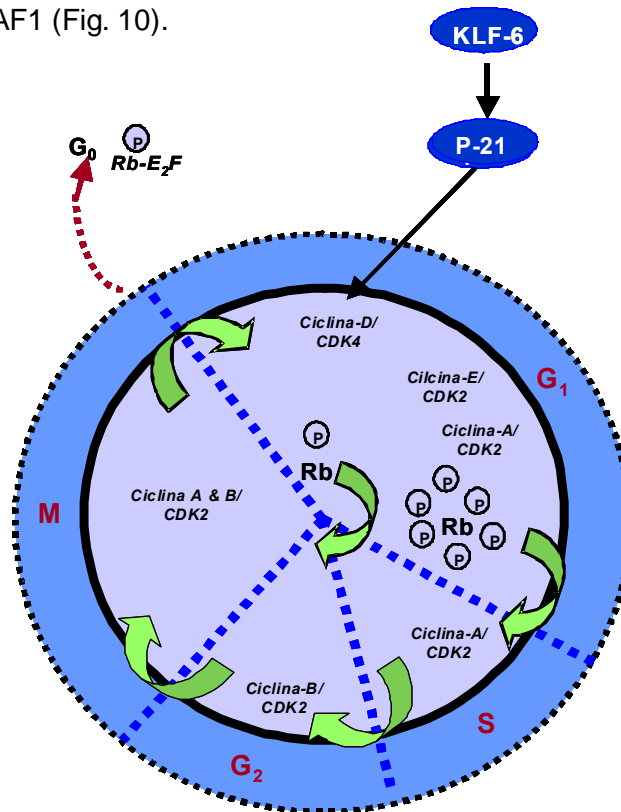


Figura 10.- Capacidad antiproliferativa de KLF6 en hepatocitos.

La acción supresora de una excesiva proliferación celular por parte de KLF6 está ligada a la activación de la proteína p21, la cual es inhibidora de las Cdk (Quinasas dependientes de Ciclinas). Esta inhibición de las Cdk previene la fosforilación de otra proteína, retinoblastoma (Rb), la cual es una fosfoproteína

nuclear que está diferentemente fosforilada en residuos de serina y treonina durante el ciclo celular. La fosforilación de Rb por las Cdks marca la entrada en fase S y el irreversible compromiso de la célula a salir de la fase G1. La evasión de los caminos de Rb y de las quinasas dependientes de ciclinas es un mecanismo alternativo común por el cual las células tumorales escapan del punto de restricción de G1. La proteína p21, por lo tanto, inhibe el ciclo celular, haciendo que se detenga en el paso de G1 a S e inhibiendo así la proliferación celular (Fig. 11). Estos hallazgos sugieren que KLF6 provoca la parada del ciclo celular mediante la activación de p21, así la pérdida o mutación de KLF6 eliminaría un freno de la proliferación celular (Benzeno *et al.*, 2004).

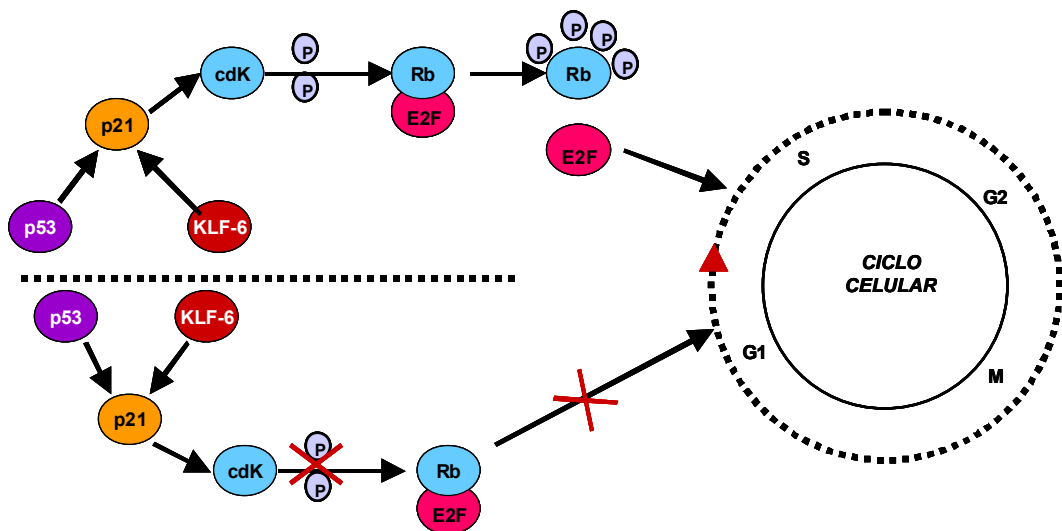


Figura 11.- Acción supresora de KLF-6 sobre el crecimiento celular.

Dada la localización de KLF6 en la región 10p15, que se encuentra frecuentemente delecionada en cáncer de próstata y en otras neoplasias, se estableció un nexo de unión entre la alta frecuencia de pérdida de heterocigosidad y/o mutación de KLF6, primero en cáncer de próstata (Narla *et al.*, 2001) y luego en carcinoma de colon (Reeves *et al.*, 2004) y en hepatocarcinoma (Wang *et al.*, 2003). Estos hallazgos también han sido corroborados en cáncer de próstata (Chen *et al.*, 2003), carcinoma nasofaríngeo (Chen *et al.*, 2002) y glioma (Jeng *et al.*, 2003).

KLF6 ha sido el primer factor de la familia Krüppel que se ha caracterizado como un supresor tumoral en cáncer, aunque muchos otros KLFs tienen papeles importantes en la regulación del crecimiento y apoptosis mediante unión a

oncogenes y a supresores tumorales, o a través de la regulación de genes que modulan el crecimiento (Black *et al.*, 2001).

3.2.2.- Inactivación de KLF6 como supresor tumoral en cáncer

La inactivación de los genes supresores de tumores tiene un papel central en la patogénesis del cáncer. La definición clásica de un supresor tumoral sugiere que la pérdida de ambos alelos de un supresor tumoral contribuye al desarrollo del fenotipo maligno. La hipótesis de dos mutaciones o “two hits” se aplica a KLF6 basándose en la demostración de la pérdida de la heterocigosidad unida a su mutación en una fracción significativa de cánceres de próstata (Narla *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2003) y colon (Reeves *et al.*, 2004). La inactivación dual clásica de los supresores de tumores incluye tanto la pérdida física del locus supresor de tumores (LOH), como la mutación inactivadora del alelo que permanece, si bien hay otros modos de inactivación génica del alelo que es retenido mediante silenciamiento transcripcional por metilación de promotores (Jones y Laird, 1999), o más recientemente por procesamiento alternativo de los transcritos que dan lugar a formas proteicas aberrantes sin función. Una definición más funcional de los supresores tumorales dada por Haber y Harlow (1997) también se aplica a KLF6: “son genes que sufren mutaciones inactivadoras de su función en el desarrollo del cáncer”. En este sentido, se han identificado mutantes de KLF6 en cáncer de próstata y de colon que, a diferencia de la forma normal de KLF6 carecen de la capacidad de activar a p21, responsable de los efectos supresores de p53 y de KLF6 (Narla *et al.*, 2001; Reeves *et al.*, 2004; Wahl *et al.*, 2000).

El procesamiento alternativo de transcritos se ha descrito en otros genes supresores de tumores como WT-1 (Hastie *et al.*, 2001), mdm-2 (Sigalas *et al.*, 1996), WWOX (Driouch *et al.*, 2002), NF1 (Vandenbroucke, *et al.*, 2002 a) y PTEN (Sharrard y Maitland, 2000). Además, las mutaciones en los sitios de procesamiento del ARN en cáncer pueden conducir a la producción incrementada de un producto de procesado no habitual como se ha descrito para p53 (Varley *et al.*, 2001) y APC (Charames *et al.*, 2002). Por tanto, la identificación de formas de procesado alternativo de KLF6 en tumores humanos concuerda con otros casos emergentes en la literatura. Sin embargo, no hay muchos estudios que hayan cuantificado el procesado alternativo en genes supresores de tumores, o hayan establecido una relación entre las formas de procesado alternativo y las mutaciones de un gen

supresor tumoral dentro del propio tejido tumoral como es el caso de KLF6. Además, hay que mencionar que la generación de formas alternativas de procesamiento del ARN en KLF6, podría conducir a un fenotipo tumoral incluso sin pérdida de la heterocigosidad (LOH) o de mutaciones somáticas inactivadoras ya que estas formas de procesamiento del ARN anormal, podrían tener un efecto de dominancia negativa que suprimiera el alelo normal de KLF6.

En el sistema de KLF6 se ha descrito la existencia de formas alternativas de procesado del ARN mensajero del gen, que dan lugar a proteínas defectuosas en las regiones de unión al ADN (Narla *et al.*, 2005 a) (Fig. 12 y 13). Se han aislado hasta 3 variantes distintas, que se diferencian de la forma normal de KLF6 por poseer solo 2, 1 o ningún dedo de Zinc. Son las variantes 1, 2, y 3. Estas variantes no son funcionalmente activas comparadas con la normal, porque no pueden translocarse al núcleo, donde los factores de transcripción ejercen su función.

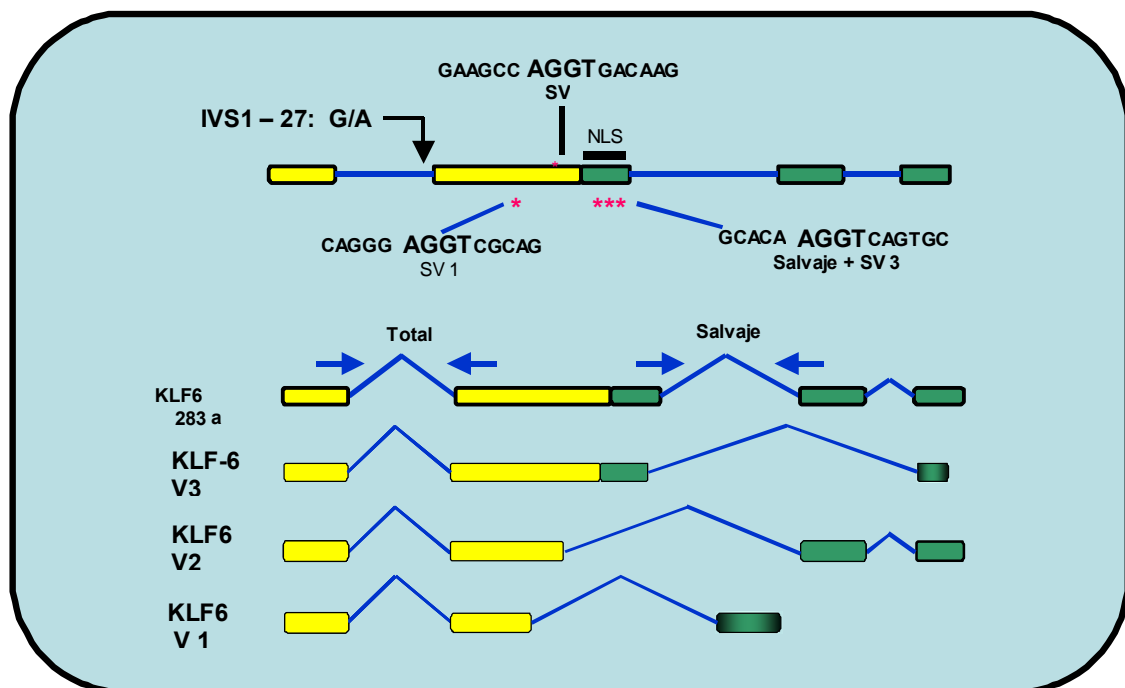


Figura 12.- Estructura y organización genómica de KLF-6. El esquema representa la forma salvaje y las variantes de "Splicing" alternativas (V1, V2 y V3) de KLF6. (NLS) Secuencia de localización nuclear (Modificado de Narla *et al.*, 2005 a).

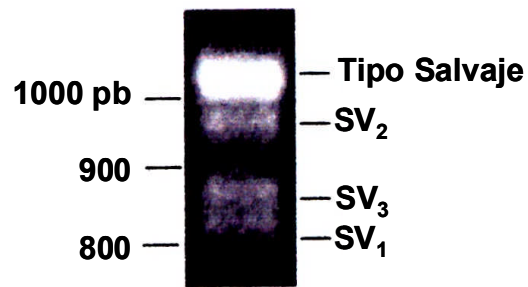


Figura 13.- Localización de KLF-6 salvaje y sus variantes de “Splicing” con RT-PCR en células 293T (Modificado de Narla *et al.*, 2005 a).

Los resultados publicados en cáncer de próstata (Narla *et al.*, 2005 a) muestran la proporción de formas alternativas de procesamiento de KLF6 en este tipo de tumores, frente a tejido prostático normal, observándose una relación entre la presencia de más formas de procesamiento alternativo, y los tumores de próstata.

II.- HIPÓTESIS y OBJETIVOS

Los factores pronósticos utilizados habitualmente en el CCR se basan en análisis histopatológicos, así como en el tamaño del tumor, afectación ganglionar, invasión de estructuras adyacentes y metástasis. Sin embargo, hasta el momento no existe un marcador o marcadores para el diagnóstico y/o pronóstico del CCR.

Endogлина (CD105), proteína transmembrana que forma parte del complejo de receptores del TGF- β y que se expresa abundantemente en la superficie de células endoteliales, está relacionada con la progresión tumoral en carcinomas epiteliales; la disminución de su expresión da lugar, por un lado, a una disminución de papilomas benignos, pero, por otro lado, aumenta la progresión de los mismos a carcinomas altamente indiferenciados. Por otro lado, KLF6 es un gen supresor tumoral cuyas mutaciones y formas de “splicing” alternativo podrían estar relacionadas con varios tipos de cáncer, incluyendo próstata y hepatocarcinoma.

Por lo tanto, endogлина podría ser empleada como factor pronóstico y KLF6 como marcador diagnóstico en CCR.

El **objetivo general** del presente estudio es el estudio histológico y molecular de los diversos estadios de progresión tumoral en CCR humano determinando si endogлина y KLF6 pueden ser utilizados como valor pronóstico y diagnóstico, respectivamente. Para abordar este estudio se propone los siguientes objetivos específicos:

- Estudio inmunohistoquímico de biopsias de adenomas y adenocarcinomas de colon humanas, usando 4 marcadores antigénicos: Ki67, p53, y los dos nuevos marcadores propuestos: endogлина y KLF6.
- Análisis de la expresión de los ARN mensajeros de endogлина y KLF6 y de sus posibles formas de “splicing” alternativos en relación al estadio tumoral en biopsias tumorales.
- Estudio de expresión y localización subcelular de endogлина y KLF6 en dos líneas celulares tumorales de carcinoma de colon humano: Caco-2 y SW-480 como modelos de células de CCR con diferente grado de progresión tumoral.
- Analizar la relevancia de la capacidad diagnóstica y pronóstica de los marcadores tumorales propuestos en el CCR.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1.- REACTIVOS Y ANTICUERPOS

El **medio de cultivo** utilizado fue DMEM complementado con L-glutamina y piruvato, para el caso de las líneas celulares de cáncer de colon, y medio MCDB-131 para la línea celular HMEC-1; ambos medios eran de GIBCO. El suero fetal bovino (SFB) y la tripsina-EDTA (1x) eran de GIBCO. Los antibióticos utilizados fueron: penicilina y G-sulfato de estreptomina (10.000 U/ml-10.000 µg/ml) de GIBCO. Los antibióticos utilizados fueron: penicilina y G-sulfato de estreptomina (10.000 U/ml-10.000 µg/ml) (GIBCO). Todo el material de plástico empleado en los cultivos se obtuvo de Costar.

Los **colorantes** utilizados fueron: azul de toluidina (AT) de Merck, Hoechst 33258 (H-33258) de Riedel-de Haën. Para la estimación de la **viabilidad celular** se usó azul tripan de Sigma.

Los productos empleados para la **electroforesis de ADN**, incluidos los marcadores de ADN, fueron de Pharmacia y la proteinasa K de Sigma. En las **electroforesis de proteínas e inmunodetecciones**, el patrón de albúmina y el reactivo de determinación de proteínas fueron de Biorad. Los productos utilizados en la preparación de geles de poliacrilamida así como el patrón de proteínas eran de Bio-Rad. El kit de quimioluminiscencia ECL fue de Amersham.

Los **tampones, soluciones salinas y reactivos en general** se prepararon con productos de las casas comerciales: Sigma, Merck, Bio-Rad y Gibco. Otros compuestos químicos usados fueron: Mowiol 40-88 de Aldrich, dodecil sulfato de sodio (SDS), isopropanol, formaldehído (FA) y xilol, todos ellos de Merck. Triton X-100, poli-L-lisina, seroalbúmina bovina (BSA) y diaminobenzidina (DAB) de Sigma. DePeX (Serva), estreptavidina conjugada con peroxidasa (Zymed), (Sigma).

En los estudios de **RT-PCR**, la extracción de ARN a partir de muestras incluidas en parafina se realizó utilizando el "Optimum FFPE ARN Isolation kit" de Ambion Diagnostics. La extracción de ARN de fragmentos de tumores congelados o fijados en formalina tamponada se realizó con el "RNAeasy kit" de Qiagen. El ARN se amplificó usando la transcriptasa reversa para RT-PCR de Roche. La amplificación por PCR del ADN complementario (ADNc) se realizó usando la polimerasa "Taq Hotmaster" de Eppendorf.

En los estudios de **inmunohistoquímica, inmunofluorescencia y Western blot** se emplearon los anticuerpos primarios para las diferentes proteínas que se mencionan en la Tabla 5:

Anticuerpo 1°	Aplicación	Procedencia	Anticuerpo 2°	PM Aparente	Casa Comercial
P-53	IH	ratón	IgG	50 KDa	Dako Corporation
Ki-67	IH	ratón	IgG	345 y 395 KDa.	Dako Corporation
Endoglina	IH IF	Conejo ratón	IgG	180 KDa	Dako Corporation
KLF-6	IH IF WB	Conejo ratón	IgG	50 – 90 KDa	Santa Cruz Biotechnology
B-Catenina	IH IF WB	ratón	IgG	92 KDa	Biosciences Pharminger
E-Caderina	IH IF WB	ratón	IgG	120 KDa	Transduction Laboratpries
G-Actina	IH IF WB	ratón	IgG	42 kDa	Transduction Laboratpries

Tabla 5.- Información de los anticuerpos primarios, procedencia y pesos moleculares de las proteínas que los reconocen. IF: inmunofluorescencia; WB: Western blot; IH: Inmunohistoquímica. Todos los anticuerpos se utilizaron a las diluciones recomendadas por los fabricantes.

Los anticuerpos secundarios usados fueron: para inmunofluorescencia anti-IgG de ratón acoplado a Alexa®-488 y anti-IgG de conejo acoplado a Alexa®-488, ambos de Molecular Probes; para inmunodetección por Western blots, anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa (IgG de conejo, Amersham-Pharmacia) y anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa (IgG de cabra, Dako). Todos los anticuerpos se prepararon en tampón de bloqueo (PBS-BSA, 0.5%) y se utilizaron a las concentraciones recomendadas por las casas comerciales. En los ensayos de inmunohistoquímica se utilizó una solución comercial del anticuerpo secundario biotilado (Multi Link Universal, BioGenex®). Para la determinación de actina se utilizó faloidina conjugada a tetrametil-rodamina (TRITC) de Sigma.

2.- MUESTRAS PATOLÓGICAS

Con el fin de estudiar la implicación de Endoglin y KLF6 en el carcinoma colorrectal, hemos seleccionado material quirúrgico de los archivos del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Central de la Defensa Gomez-Ulla de Madrid, según los siguientes criterios:

- 1.- Se seleccionaron exclusivamente adenomas (tubulares y tubulovelloso) y adenocarcinomas de intestino grueso.
- 2.- Tan solo se eligieron aquellos casos en los que, tanto en el material incluido en parafina como el obtenido en fresco de piezas quirúrgicas, presentaban áreas de tumor y áreas sin afectación tumoral microscópica (áreas no tumorales de intestino grueso).
- 3.- Se seleccionaron enfermos sin patología neoplásica asociada.
- 4.- Como controles normales se obtuvieron 3 piezas de intestino grueso, procedentes de autopsias de pacientes que no presentaban antecedentes patológicos a nivel colorrectal.
- 5.- Asimismo, para ciertos estudios (RT-PCR) se seleccionaron piezas de adenocarcinomas que fueron fijados en formalina tamponada, pero que no fueron incluidas en parafina.

De acuerdo a lo anterior, se han obtenido 90 casos de neoplasias de intestino grueso. 45 de los casos corresponden a adenomas con diversos grados de displasia: displasia ligera (15), displasia moderada (15) y displasia severa (15). Los 45 restantes corresponden a pacientes diagnosticados de adenocarcinoma (T1; T2 y T3) usando la clasificación histológica de los tres primeros estadios de TNM (American Joint Comité for Cancer Staining). No se consideró la edad, sexo, tamaño tumoral ni la existencia de metástasis a nivel ganglionar o en órganos distantes (Estadio T3 de la clasificación TNM).

2.1.- OBTENCION DE LAS MUESTRAS TISULARES

Las piezas tumorales (adenomas y adenocarcinomas) así como los controles (procedentes de autopsias) se fijaron en formaldehído tamponado al 10% durante 24-48 horas. Seguidamente se deshidrataron en alcohol y posteriormente se incluyeron

en parafina de acuerdo a protocolos convencionales. Se realizaron cortes de 4 µm que fueron teñidos con hematoxilina-eosina, para seleccionar los bloques con neoplasia y áreas no tumorales del intestino grueso afectado.

2.2.-TECNICAS INMUNOHISTOQUIMICAS

Se realizaron técnicas de inmunohistoquímica para estudiar el patrón de expresión y localización subcelular de endoglin y KLF6 en las células neoplásicas y en los controles. El estudio de los factores de proliferación tumoral se realizó con anticuerpos para Ki67. Por último, también se estudió la expresión de la proteína del gen supresor tumoral p53.

Las técnicas de inmunohistoquímica se efectuaron sobre secciones de tejido incluido en parafina. El método inmunohistoquímico utilizado y que se detalla a continuación, fue el de estreptavidina-biotina-peroxidasa (SBP) y se basó en la técnica de Hsu y col. (1981).

- 1) Los cortes histológicos de cada bloque seleccionado (se obtuvieron 8 cortes de 4 µm de grosor del material incluido en parafina) fueron adheridos a portaobjetos tratados con Poli-L-lisina.
- 2) Posteriormente se desparafinaron en xilol y se deshidrataron en alcoholes progresivos.
- 3) Seguidamente se llevó a cabo la Inhibición de la peroxidasa endógena con 100 ml de metanol + 1 ml de peróxido de hidrógeno de 110 Vol. durante 30 min. Este proceso se intercala entre los dos pases por alcohol absoluto durante la deshidratación.
- 4) Los determinantes antigénicos se expusieron por calentamiento de las secciones en Olla a presión en tampón Citrato Plus pH-6 concentrado (10X) (1:1) (BioGenex®) hasta la primera ebullición (3 min.). Posteriormente, se dejó enfriar a temperatura ambiente (de 10 a 15 min.) y a continuación las preparaciones se lavaron con PBS.
- 5) Seguidamente, las muestras se bloquearon con suero no inmune (BioGenex®) durante 20 minutos a temperatura ambiente, y posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario (1h) a temperatura ambiente. Posteriormente, las preparaciones se lavaron en PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario biotilado 20 min a temperatura ambiente.

- 6) Seguidamente, las muestras se lavaron en PBS y se expusieron al complejo estreptavidina-peroxidasa (BioGenex®) durante 20 min. a temperatura ambiente.
- 7) Posteriormente las muestras se lavaron en agua destilada y los cortes fueron revelados con DAB (0,5 mg/ml en PBS) y se lavaron en agua oxigenada.
- 8) Por último se realizó la tinción de contraste nuclear con hematoxilina de Harris, las muestras se deshidrataron y se montaron en definitivo con resina sintética DePex.

2.3.- ESTUDIO EVALUATIVO

Con objeto de evaluar la actividad proliferativa y la expresión de la proteína p53 en las muestras, se determinó el porcentaje de núcleos que expresaban Ki67 y p53 tanto en las células tumorales de adenoma y adenocarcinoma como en las áreas no tumorales de intestino grueso.

Fueron estudiados 10 cortes al azar de cada caso, seleccionándose 10 campos de cada sección estudiada, en los que se estimaron un total de 800-1500 núcleos, tanto de células tumorales (Lesión) como de células epiteliales no tumorales (tejido adyacente). Se consideraron positivos todos los núcleos que presentaron reacción positiva, independientemente de la intensidad de la misma .

En el caso de KLF-6 y Endogлина, se consideró la expresión positiva de las células del tejido tumoral y del adyacente no tumoral, mediante una valoración cualitativa, considerándose los siguientes parámetros:

- a) Nula:** cuando no había expresión de estos anticuerpos.
- b) Baja:** cuando la expresión era en menos de 33% de las células.
- c) Moderada:** cuando un de 33 a 66% de las células mostraban inmunotinción positiva.
- d) Alta:** cuando la expresión se mostraba sobre el 66% de las células.

3.- LÍNEAS CELULARES

Se han empleado diferentes líneas celulares establecidas de cáncer de colon. Dichas líneas se describen a continuación.

* **SW-480:** La línea celular SW-480 fue cedida por el Dr. Alberto Muñoz del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB). Estas células fueron aisladas de un nódulo metastásico de colon humano, establecida como adenocarcinoma y capaces de expresar elementos de diferenciación característicos de las células intestinales maduras. Estas células se utilizan habitualmente como herramienta para estudios *in vitro* de patologías intestinales.

* **SW-480-R y SW-480-ADH:** Las sub-poblaciones de SW-480 (también cedidas por el Dr. A. Muñoz, IIB), denominadas SW-480-ADH (adherentes) y S-W480-R (redondeadas), se obtuvieron a partir de cultivos de SW-480 por dilución límite. Estas poblaciones mantienen de modo estable su diferente morfología.

* **CACO-2:** La línea celular Caco-2, establecida por Fogh y Trempe (1975), fue derivada de un carcinoma de colon humano. A nivel genético, presenta mutaciones en APC, p-53, e inestabilidad cromosómica.

También, como control positivo para la expresión de endogлина se utilizó la línea celular endotelial de microvaculatura, **HMEC-1**.

4.- RT-PCR

4.1.- EXTRACCIÓN DE ARN A PARTIR DE TEJIDO INCLUIDO EN PARAFINA

Los estudios de expresión génica se iniciaron con la evaluación del tipo y cantidad de los ARN mensajeros (ARNm) específicos para endogлина y KLF6. Para ello se realizó la extracción del ARN total. Normalmente la extracción de ARN a partir de estas muestras resulta difícil y suele dar un bajo rendimiento ya que el proceso de fijación produce una interacción entre los ácidos nucleicos y las proteínas, y además el ARN se ve modificado por la adición covalente de grupos metilo. Este tipo de modificaciones del ARN puede hacer que no sea un buen substrato para la reacción de la transcriptasa reversa en los procesos de RT-PCR.

Para llevar a cabo la extracción de ARN a partir de muestras incluidas en parafina, se utilizó el "Optimum FFPE RNA Isolation kit". El proceso se empezó siempre con una desparafinización usando xilol. Tras este paso, se obtuvo un sedimento seco que se sometió a digestiones sucesivas con Proteinasa K, y a una

purificación selectiva a través de una columna donde queda retenido el ARN. Tras varios lavados el ARN se eluyó de la columna y se disolvió en agua. Todos los pasos de purificación se realizaron según las recomendaciones del fabricante (AMBION).

4.2.- EXTRACCIÓN DE ARN A PARTIR DE TEJIDO FIJADO EN FORMALINA

La extracción de ARN a partir de fragmentos de tumores fijados en formalina se realizó utilizando 60 mg de tejido. El tejido se maceró en el tampón de lisis RLT del "RNAeasy kit", de acuerdo con las recomendaciones de la casa comercial, en presencia de un 1% de β -mercaptoetanol. Seguidamente se procedió a la extracción del ARN, según el protocolo, purificando, lavando y eluyendo el ARN de las columnas del "kit". Éste se recuperó en un volumen de 30 microlitros de agua, libre de RNAsas y DNAsas.

La concentración de ARN total, procedente tanto de las muestras en parafina como de fragmentos frescos, se valoró en un espectrofotómetro por absorbancia a 260 nm.

4.3.- EXPRESIÓN DEL ARN DE ENDOGLINA Y KLF6

Los niveles relativos de expresión de los genes de interés, *Endoglina* y *KLF6* se determinaron mediante transcripción reversa (RT) del ARN total, seguido de la amplificación del ADN complementario (ADNc) así obtenido por PCR.

Para la RT se utilizó un microgramo de ARN total, usando la transcriptasa reversa de AMV, para RT-PCR de Roche. Como cebadores se utilizó una mezcla al azar de hexanucleótidos que anillan en diversas partes a lo largo de los transcritos, siguiendo el protocolo indicado por Roche.

La amplificación por PCR del ADNc se realizó usando la polimerasa "Taq, Hotmaster" de Eppendorf, en 200 μ M de una mezcla de desoxinucleótidos tri-fosfato (dNTPs) y las siguientes parejas de oligonucleótidos:

1.- Para la amplificación del tallo citoplásmico de Endoglina en sus dos formas de procesado, corta o larga, se usaron los siguientes oligonucleótidos:

Endo-cit "Forward": 5' GAATCTGGTACATCTACTCGC 3'

Endo-cit "Reverse": 5' GGCTATGCCATGCTGCTGGTGG 3'

Para la variante de procesamiento Endo-L (endoglina larga) se esperaría un tamaño de amplificación de unos 150 pares de bases (pb), mientras que la variante Endo-S (endoglina corta) sería de 284 pb (casi 300 pb).

2.- Para las diferentes variantes de procesado de KLF6:

KLF6 salvaje “Forward”: 5'-CGG ACG CAC ACA GGA GAA AA-3'

KLF6 salvaje “Reverse”: 5'- CGG TGT GCT TTC GGA AGT G-3'.

KLF6 total “Forward”: 5'- CTG CCG TCT CTG GAG GAG T-3'

KLF6 total “Reverse”: 5'- TCC ACA GAT CTT CCT GGC TGT C-3'.

El tamaño esperado para la amplificación de KLF6 salvaje es de 112 pb, mientras que el tamaño esperado para la amplificación total de KLF6, común a las diferentes formas de procesado alternativo, es de 99 pb.

3.- La Guanin Adenosil Fosfato deshidrogenada (GAPDH) usado como control endógeno:

GAPDH “Forward”: 5'- CAA TGA CCC CTT CAT TGA CC-3'

GAPDH “Reverse”: 5'- GAT CTC GCT CCT GGA AGA TG-3'.

El tamaño del producto de PCR de la GAPDH es de unos 400 pb.

La PCR se inició con la desnaturalización del ADN a 95 °C durante 2 min. Seguidamente, se realizaron de treinta a treinta y cinco ciclos con:

- Desnaturalización a 95 °C durante 30 seg
- Anillamiento a 52 °C durante 30 seg
- Elongación a 68 °C durante 45 seg

La PCR finalizó con la elongación a 68 °C durante 7 min, seguido de un enfriamiento a 4 °C. El termociclador empleado fue de la casa Applied Biosystems, Gene Amp 2700.

Los fragmentos de ADN amplificado se separaron en geles de Agarosa “NuSieve” (Pharmacia), al 5%, y se tiñeron en una solución de bromuro de etidio a una concentración de 10 µg/ml, antes de su fotografiado en un transiluminador de Ultravioleta (UV) con cámara y película 667 de Polaroid.

5.- CULTIVOS CELULARES

5.1. CONDICIONES DE CULTIVO

En el caso de las líneas celulares de cáncer de colon, las células se cultivaron en Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) complementado con 2 mM glutamina, 10% de suero fetal bovino (SFB) y 5% de antibióticos (Penicilina-G-sulfato de estreptomicina; 10.000 U/ml-10.000 U/ml) para evitar la contaminación bacteriana. La línea HMEC-1 se cultivo en medio MCDB-131 suplementado con SFB y antibióticos. Los cultivos se mantuvieron en un incubador Steri Cult 200 (Hucoa-Erloss) a 37 °C, 95% de humedad y 5% de CO₂ en frascos de 25 cm² de superficie (F25) o sobre cubreobjetos de vidrio (10 mm. de diámetro) situados en placas de cultivo de 6, 12 o 24 pocillos. El desarrollo del cultivo se verificó observando el cambio de color del medio, como indicativo de la ocurrencia de procesos metabólicos y revisando los cultivos en el microscopio de luz visible. Los medios se cambiaron diariamente o cada dos días, según el linaje celular, hasta un 70% de confluencia celular.

5.2.- DENSIDAD DE SIEMBRA Y ESTIMACIÓN Y VIABILIDAD CELULAR

Una vez que las células alcanzaron la confluencia adecuada, se tripsinizaron (tripsina-EDTA 1X GIBCO), se contabilizaron (nº células/ml de suspensión) y se sembraron en nuevos F-25, usando concentraciones entre 5 x 10⁴ células/mL y 60 x 10⁴ células/mL. Posteriormente se incubaron hasta obtener monocapas de las diversas líneas celulares con la densidad adecuada (aproximadamente un 70%). El número de células presente en los cultivos se determinó mediante el uso de una cámara de Neubauer.

La viabilidad de las células en cultivo se determinó empleando el método de exclusión con el colorante azul tripán. Para ello, las células se tripsinizaron, se centrifugaron para eliminar los restos de tripsina (10 min a 1.200 rpm) y se resuspendieron en 300 µl de PBS al que se le añadió 200 µl del colorante azul tripán (1:10 solución comercial). Seguidamente se estimó el porcentaje de células muertas (azules) en relación al de células vivas (sin teñir) utilizando para ello la cámara de Neubauer.

5.3.- MORFOLOGÍA CELULAR

La evaluación morfológica de los diferentes tipos celulares utilizados en el estudio se realizó mediante microscopía de contraste de fases o microscopía de campo claro, utilizando la tinción clásica con AT. Para ello, las células crecidas en cubreobjetos fueron fijadas en metanol frío (-20 °C) durante 10 minutos. Posteriormente, las células se dejaron secar al aire y se tiñeron con AT (0,05% en agua destilada) durante 30 seg. Finalmente, las células se lavaron abundantemente con agua destilada, se dejaron secar al aire y se montaron en DePex.

5.4.- INMUNOFLUORESCENCIA

En estos casos, las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio estériles depositados en placas de cultivo. Una vez alcanzada la densidad requerida, las células fueron lavadas dos veces con PBS y fijadas, bien en metanol a -20 °C durante 10 min. o en FA al 3,5% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente las células fueron lavadas 3 veces en PBS y según el caso, permeabilizadas con Tritón X-100 al 0.2% en PBS durante 15 minutos. A continuación, las muestras se incubaron con 50 µl de los correspondientes anticuerpos primarioa (para E-cadherina, β -catenina, KLF6 o Endoglina), diluidos en PBS-0,5% BSA, en una cámara húmeda durante 1 hora a 37°C o 4°C dependiendo del anticuerpo. A continuación, las células se incubaron con los correspondientes anticuerpos secundarios, conjugados con diferentes sondas fluorescentes, durante 1 hora a 37°C o a 4°C. Por último, los núcleos fueron contrastados mediante tinción con Hoescht-33258 (1µg/ml), durante 1 min. Finalmente, las células se lavaron con PBS, se montaron en Mowiol y se visualizaron en el microscopio de fluorescencia.

5.5.- DETERMINACIÓN DE ACTINA FILAMENTOSA

Para la detección de la actina filamentosa (actina F), se utilizó faloidina conjugada con isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC). Para ello, las células sembradas sobre cubreobjetos, fijadas con FA al 3,5% en PBS y permeabilizaron con Tritón X-100 (0.2% en PBS), se incubaron con faloidina-TRITC (0,1 mg/ml) en una disolución 1:400 durante 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda. Por

último, las células se lavaron con PBS (5 veces durante 5 minutos), se contratiñeron con H-33258 y se montaron con Mowiol.

5.6.- ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA Y WESTERN BLOT

5.6.1.- Obtención de extractos celulares

Los extractos de proteínas se obtuvieron a partir de células cultivadas en los F25. En todos los casos, las muestras se mantuvieron a 4 °C durante el proceso de extracción para evitar la degradación de las proteínas. Para ello, los F25 de cada tipo celular se lavaron 2 veces rápidamente con PBS para eliminar los restos de medio de cultivo. A continuación, las células se lisaron con 1 ml de tampón de lisis (10 mM Tris HCl pH 7.4 , 1% SDS, suplementado con inhibidores de proteasas; 1 mM ortovanadato, 1 mM PMSF y 10 mg/ml aprotinina) durante 30 minutos en agitación. Posteriormente, las células se rasparon, se recogieron y centrifugaron durante 5 min a 10.000 rpm. Los sobrenadantes se cuantificaron mediante el método colorimétrico del Bincinoniato (BCA, Pierce) siguiendo las instrucciones del fabricante, cuantificando posteriormente la cantidad de proteína por absorbancia a 562 nm en un lector de placas (Tecan).

La separación de las proteínas se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Las muestras proteicas fueron hervidas previamente a 100 °C durante 5 minutos, en tampón de carga Laemmli (Tris-HCl 10 mM pH 6,8; 2% SDS; 5% β -mercaptoetanol, 10% glicerol y azul de bromofenol). La separación de las proteínas se realizó a 100 mV durante aproximadamente 1 h. Para las electroforesis de proteínas se utilizó un equipo Mini Protean II y una fuente de alimentación modelo 200/2.0, ambos de Bio-Rad.

5.6.2.- Detección de proteínas por Western Blot

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se electrotransfirieron a membranas de PVDF Immobilon (Millipore) utilizando un equipo de transferencia de proteínas Trans-blot SD Transfer Cell (BioRad) a 80 mV durante 1:30 horas a 4°C. Una vez realizada la transferencia, las membranas fueron teñidas con rojo Ponceau para corroborar la presencia de proteínas. Posteriormente se procedió a su determinación mediante inmunodetección siguiendo un protocolo de Western Blot convencional.

Para ello, las membranas primero fueron bloqueadas en Tris-HCl, 0,5% Tween-20 y 5% de leche en polvo (TTBS) y a continuación se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con los correspondientes anticuerpos primarios (monoclonales de ratón contra endogлина y G-actina, y policlonał de conejo para KLF-6). Posteriormente, las membranas se lavaron 3 veces durante 2 minutos con TTBS y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa (Jackson Immuno Research Laboratories) durante 1 h a temperatura ambiente y agitación suave. A continuación se realizaron 2 lavados rápidos (uno de 15 minutos y dos de 5 minutos) con abundante solución TTBS. Por último la determinación de las proteínas se realizó mediante autoradiografía (películas AGFA-Curix) con el reactivo quimioluminiscente ECL (Amersham-Biosciences, ECL + Plus™).

6.- OBSERVACIONES MICROSCÓPICAS

La microscopía de fluorescencia se realizó utilizando un microscopio Olympus BX61 acoplado a una cámara de captura digital Olympus DP50, empleando luz de excitación ultravioleta (filtro de excitación BP 360-370 y filtro de barrera BA 420) para H-33258, de excitación azul (filtro de excitación BP 460-490 y filtro de barrera BA 520IF) para FITC y de excitación verde (filtro de excitación DM 570 y filtro de barrera BA 590) para TRITC. Las imágenes se procesaron con el programa Adobe Photoshop®.

Las imágenes de microscopía confocal fueron captadas con un Microscopio Confocal Invertido Leica TCS-SP5 y procesadas con el software asociado.

7.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de la expresión, tanto de las variables cuantitativas (p53 y ki67) como de las semicuantitativas (endogлина y KLF6), se realizó de acuerdo a una división según un diagnóstico principal entre muestras de cáncer (adenocarcinomas), y muestras de no cáncer (controles y adenomas). Además, dentro de cada grupo, se tuvieron en cuenta la expresión de estas variables en los distintos estadios (Adenoma: leve, moderado y grave; Adenocarcinoma: T1, T2 y T3). Se aplicó el paquete estadístico SSPC en el centro de cálculo del CSIC. Las pruebas estadísticas fueron: i) análisis de correlación de las 4 variables en los grupos principales y en los estadios, ii) análisis de varianza ANOVA y iii) el test t-Student.

Dado que este tipo de análisis paramétrico no mostró en todos los casos correlaciones significativas, debido a las dificultades de trabajar con variables semicuantitativas, también se efectuó un análisis estadístico de tipo no paramétrico. Para ello, se realizó el test de rangos de Mann-Whitney-Wicolxon en pruebas pareadas entre todas las combinaciones posibles de estadios tumorales y no tumorales, y las representaciones gráficas de los resultados significativos se expresaron mediante los gráficos de Box-Whiskers.

Además de la estadística pareada, los análisis se llevaron a cabo para todos los resultados en su conjunto.

IV. RESULTADOS

1.- ANATOMÍA PATOLÓGICA

1.1.- HISTOLOGÍA

Del total de los 90 pacientes estudiados, 45 fueron diagnosticados histológicamente como adenoma de intestino grueso (tubulares o tubulovelloso) con displasia epitelial leve, moderada y grave, y 45 de adenocarcinoma de colon en estadio T1, T2 y T3. Los casos controles analizados (3) presentaron un epitelio de revestimiento con luces glandulares de sección longitudinal y circular, revestidas por un epitelio cilíndrico simple con enterocitos de citoplasma amplio y claro y numerosas células caliciformes. La lámina propia está constituida por un tejido conjuntivo con leve infiltrado inflamatorio inespecífico y musculatura lisa (Fig. 14 A-B).

En las regiones de transición de la mucosa normal a la patológica, se observaron focos adenomatosos formados por glándulas displásicas (Fig. 15 A-F). En determinadas áreas se apreciaron zonas de transición en las que el epitelio se transforma en pseudoestratificado y donde las células epiteliales muestran una alteración de su polaridad, con desorganización y pérdida de la capacidad mucosecretora (Fig. 15 B). Esta transición de epitelio normal a epitelio displásico se realiza de manera brusca siendo los cambios más evidentes a nivel de las criptas de Lieberkhün (Fig. 15 E)

En los adenomas leves se observó una proliferación de luces glandulares y estructuras vellositarias que se encuentran revestidas por un epitelio cilíndrico pseudoestratificado con un eje central de tejido conjuntivo vascularizado en el cual se muestra un leve infiltrado inflamatorio de tipo crónico inespecífico. Asimismo, se observa como el epitelio conserva la mucosecreción, y los núcleos son redondeados, pequeños e isomórficos. El número de células en división aparentemente es bajo (Fig. 16 A-B).

En el caso de los adenomas con displasia moderada, los citoplasmas de los enterocitos son eosinófilos, lo que evidencia una pérdida de la mucosecreción. Los núcleos son mayores, redondeados y muestran un moderado pleomorfismo, siendo los nucleolos muy evidentes (Fig. 16 C-D).

Por último, en relación a los adenomas con displasia grave, las células muestran pérdida total de la mucosecreción y gran pleomorfismo nuclear y no se observó infiltración del eje conjuntivo-vascular (Fig.16 E-F).

Por otro lado, en los casos analizados de adenocarcinomas (Figs 17 y 18), en nuestro estudio observamos una neoformación de estirpe epitelial y diferenciación glandular que asienta e infiltra intestino grueso y que se encuentra constituida en la mayoría de los casos por luces glandulares de diferente talla y morfología. Las glándulas se encuentran revestidas por un epitelio cilíndrico pseudoestratificado de células con citoplasma amplio eosinófilo y núcleo pleomórfico con nucleolo prominente y con escasas o ninguna vacuola de mucosecreción (Fig. 17 A-D). Dichas luces glandulares asientan sobre un estroma de tejido conjuntivo fibrosado que de manera general muestra infiltrado inflamatorio de tipo crónico inespecífico y focos de sufusión hemorrágica (Fig. 17 C). En determinadas áreas, el carcinoma se muestra mas indiferenciado con luces glandulares irregulares o conformando nidos sólidos o un aspecto cribiforme, observándose núcleos que muestran gran atipia, gran pleomorfismo y nucleolo prominente (Fig.17 D y Fig. 18 A-F).

Dependiendo de la profundidad de la infiltración tumoral en la pieza intestinal se observaron los siguientes estadios:

T1: Infiltración hasta submucosa. (Fig. 17 A-B)

T2: Infiltración hasta muscular (Fig. 17 C-D).

T3: Infiltración hasta serosa (Fig. 18 A-F).

1.2.- INMUNOHISTOQUÍMICA

A continuación se resume la expresión de cada una de las proteínas marcadoras estudiadas de forma cuantitativa, Ki67 y p53 como porcentaje de núcleos marcados, y de forma semicuantitativa en endoglina y en KLF6.

1.2.1.- Factor de proliferación Ki67

En las luces glandulares no tumorales del intestino grueso afectado se observó inmunotinción para Ki67 en las células basales, fundamentalmente en el fondo de las criptas de Lieberkhün (Fig. 19 A-B). También se detectó inmunorreactividad para Ki67 en las células tumorales de los adenomas, existiendo

mayor marcaje a medida que aumentaba el grado de displasia de adenoma leve (Fig. 20 A-B), moderado (Fig. 20 C-D) a grave (Fig. 20 E-F).

En los carcinomas, se observó una mayor expresión de Ki67 en los núcleos de las células neoplásicas. Esta expresión de Ki67 no es uniforme en todo el carcinoma observándose focos de mayor expresión junto a focos de menor expresión. No se observó una relación directa entre pleomorfismo nuclear y la mayor expresión de Ki67 (Fig. 21 A-F).

1.2.2.- Proteína p53

Se observó escasa expresión de la proteína p53 de manera ocasional en algún núcleo de los enterocitos de los casos controles (Fig. 19 C-D). En los adenomas aumentaba la expresión nuclear de proteína p53 (Fig. 22 A-F).

En el carcinoma, en los estadios T1 y T2 la expresión de p53 en las células neoplásicas es alta (Fig. 23 A-D), observándose disminución de la expresión en estadios mas avanzados (T3); expresándose tan solo en el núcleo de algunas células tumorales (Fig. 23 E-F).

1.2.3.- Endogлина

Se observó inmunorreactividad para endogлина en las células glandulares normales (Fig. 24 A-B). Esta expresión es citoplasmática fundamentalmente a nivel de basal y paranuclear y sobretodo en las células situadas en el fondo de las criptas. El endotelio de los vasos de la lámina propia mostró un ligero marcaje.

En las células tumorales (Fig. 25 A-F) así como en las células del carcinoma invasivo (Fig. 26 A-F) existía una expresión citoplasmática de endogлина. Esta expresión alcanzaba su mayor grado en el estadio T2, para disminuir de forma radical cuando la tumoración se hace mas agresiva e invasiva en el estadio T3.

1.2.4.- KLF-6

Se observó una leve expresión de KLF-6 en las células glandulares normales, tanto a nivel nuclear como citoplasmático (Fig. 24 C-D). La expresión de KLF6 en los adenomas fue mayor a medida que aumentaba la displasia celular (Fig. 27 A-F). En la fase de adenoma grave, la expresión citoplasmática era más evidente, mientras

Epitelio de colon

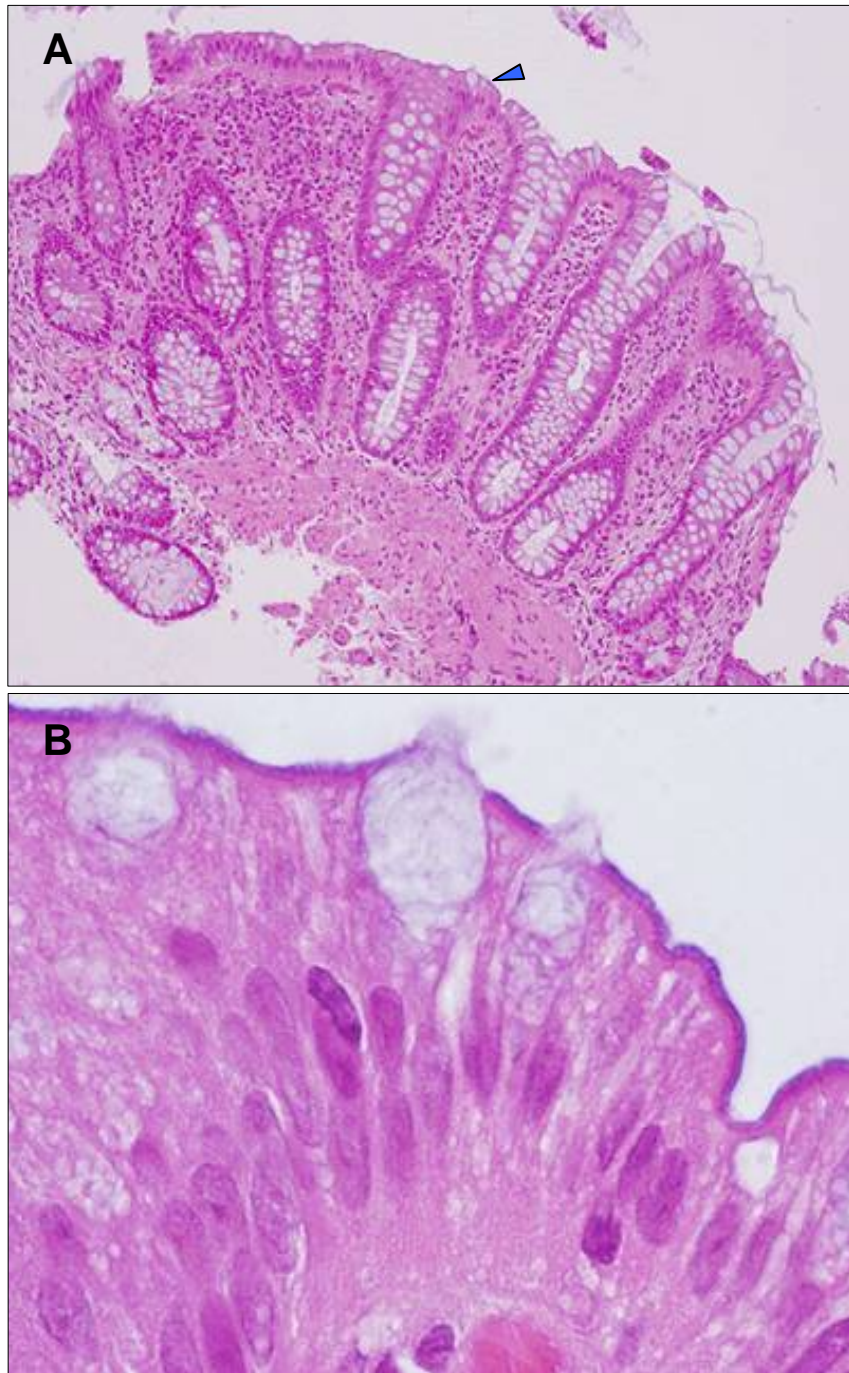


Figura 14.- Biopsia de intestino grueso de un caso control (H-E).

A: Pared del colon de un caso control que incluye la mucosa y la submucosa. Se observa el epitelio de revestimiento y glándulas intestinales con predominio de células caliciformes y la lámina propia que contiene una variable cantidad de células inmunocompetentes (X200).

B: Detalle de la mucosa intestinal del caso control anterior (flecha) en el que se aprecia el epitelio de revestimiento constituido por abundantes enterocitos y varias células caliciformes. Los enterocitos presentan un marcado ribete estriado y núcleos elongados, isomórficos, de cromatina laxa y nucleolos de pequeñas dimensiones (X1000).

Displasia epitelial

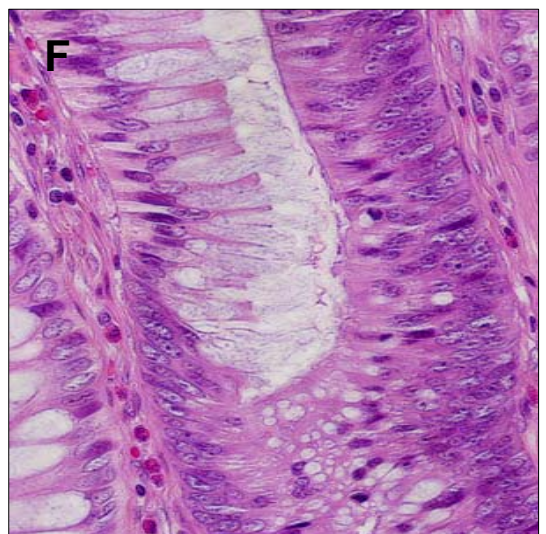
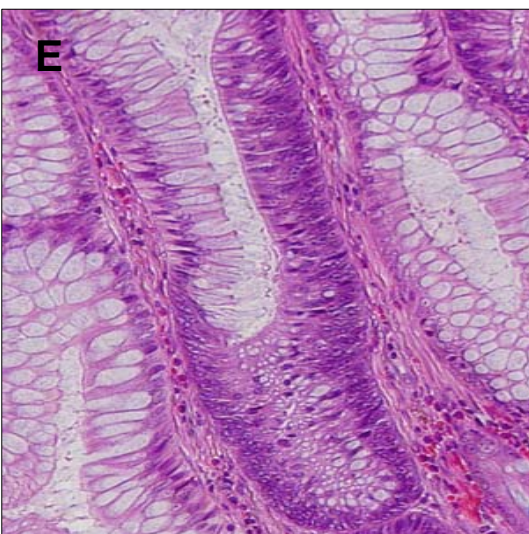
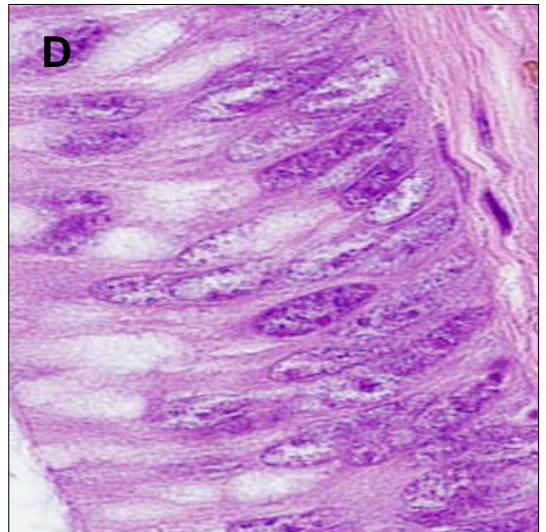
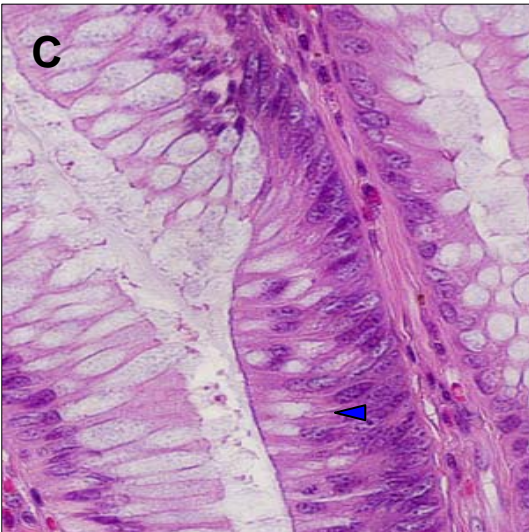
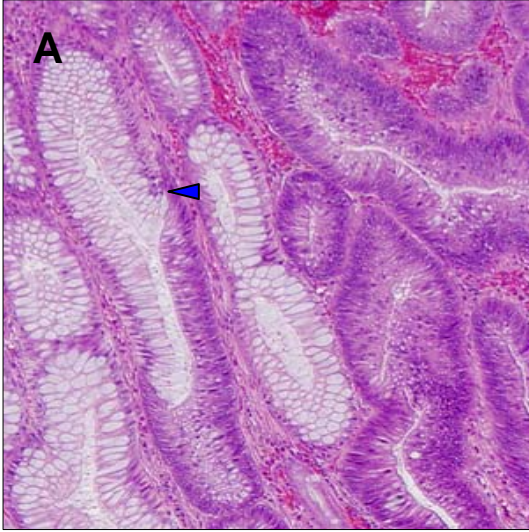


Figura 15.- Biopsia de intestino grueso con displasia epitelial (H-E).

A: Imagen panorámica de un área de la mucosa colónica con displasia epitelial leve, en la vecindad de glándulas intestinales normales (X100).

B: Detalle de la imagen anterior (cabeza de flecha). Zona de transición entre el epitelio colónico normal y el displásico, caracterizado por aumento del número de células epiteliales, desorganización y pseudoestratificación de sus núcleos y desdiferenciación del citoplasma (X200).

C: La transición entre las células caliciformes y el epitelio displásico es brusca. Las células displásicas presentan pobre diferenciación y su citoplasma contiene escasas vacuolas de contenido mucoso, perdiéndose las características de las células caliciformes (X400).

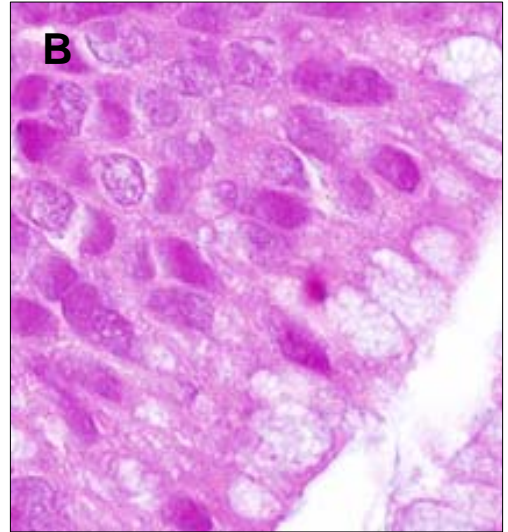
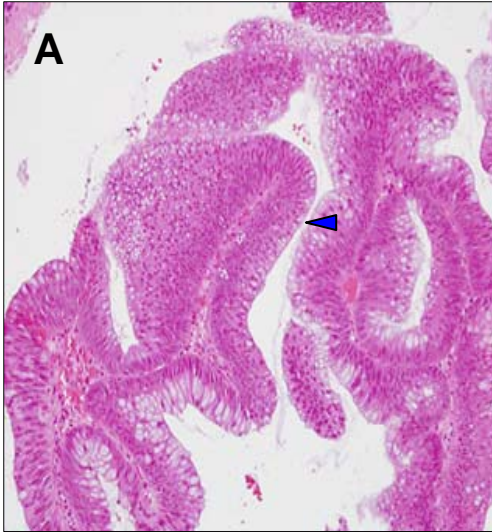
D: Detalle de la imagen anterior (cabeza de flecha) de un área displásica caracterizada por la presencia de núcleos grandes con cromatina en grumos, dispuestos desordenadamente. El citoplasma de estas células contiene pequeñas vacuolas mucosas y aumento de la eosinofilia (X1000).

E: Detalle de la imagen A, representando el fondo de una cripta de Lieberkhün. Nótese la importante pseudoestratificación y el pleomorfismo nuclear del epitelio displásico con respecto a la disposición basal de los núcleos de las células caliciformes de la mucosa colónica normal (X200).

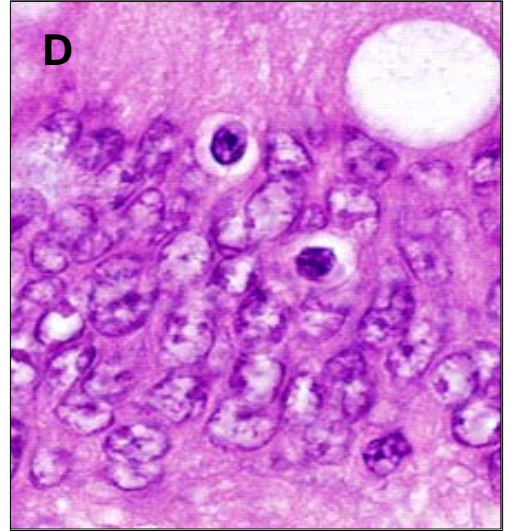
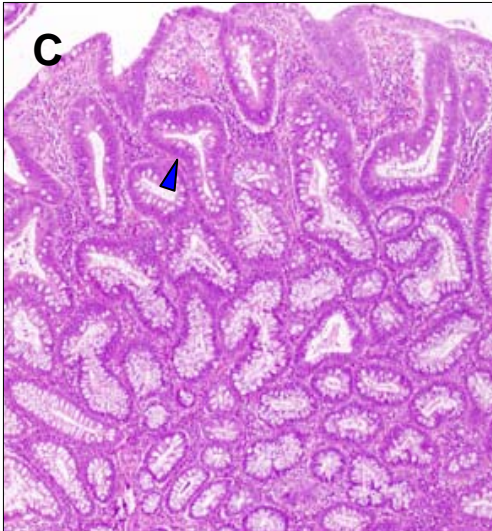
F: Los cambios displásicos del epitelio colónico son más evidentes en los fondos proliferativos de las criptas de Lieberkhün (X400).

Adenomas con diferente grado de displasia

Leve



Moderado



Grave

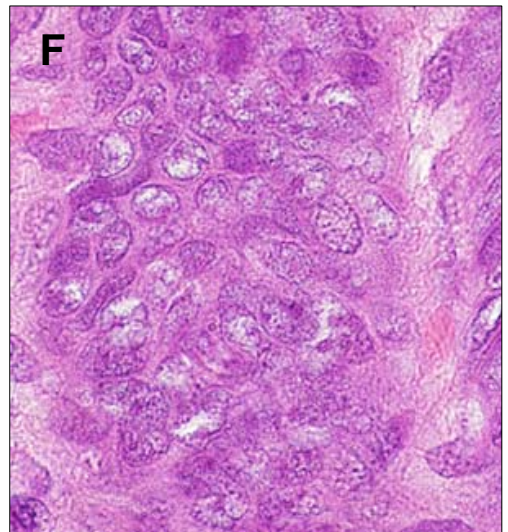
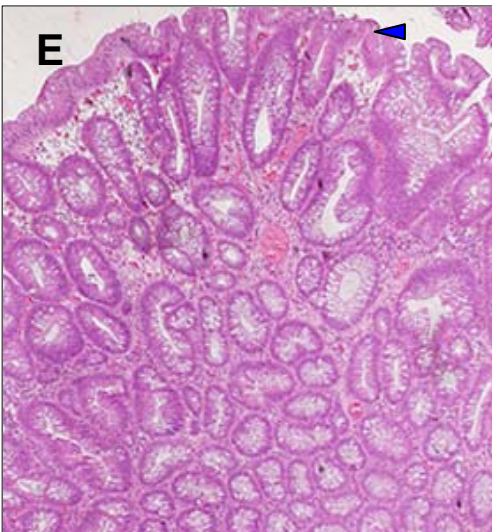


Figura 16.- Adenomas de intestino grueso con diferentes grados de displasia (H-E).

A: Adenoma con displasia leve. Se observa una formación adenomatosa de hábito vellositario formada por estructuras papilares, revestidas por epitelio intestinal con células pseudoestratificadas (40X).

B: Adenoma con displasia leve. Detalle de la imagen anterior (cabeza de flecha) mostrando un área formada por abundantes células con diferente grado de diferenciación mucosecretora. Los núcleos son pequeños, redondos y con cromatina densa. No se observa, sin embargo, importante variabilidad en el tamaño o en la forma nuclear y tampoco se observan figuras mitóticas (X1000).

C: Adenoma con displasia moderada. Se observan numerosas glándulas de tamaño variable y con escasa lámina propia (X40).

D: Detalle de la imagen anterior (cabeza de flecha) mostrando el acúmulo de células pleomórficas con cromatina distribuida irregularmente, nucleolos muy evidentes y citoplasma muy escaso y sin diferenciación de vacuolas mucosecretoras. En la porción superior de la imagen se aprecia la presencia de una gran vacuola mucosecretora (X1000).

E: Adenoma con focos de displasia grave. Se observa un adenoma intestinal con desorganización de las glándulas intestinales y epitelio con evidentes características de displasia (X40).

F: Área de la mucosa colónica adyacente al adenoma de la figura anterior (cabeza de flecha) en la que se aprecia un foco de displasia intensa, caracterizada por células desdiferenciadas con muy escaso citoplasma y núcleos pleomórficos y heterocromáticos (X1000).

Adenocarcinomas de colon

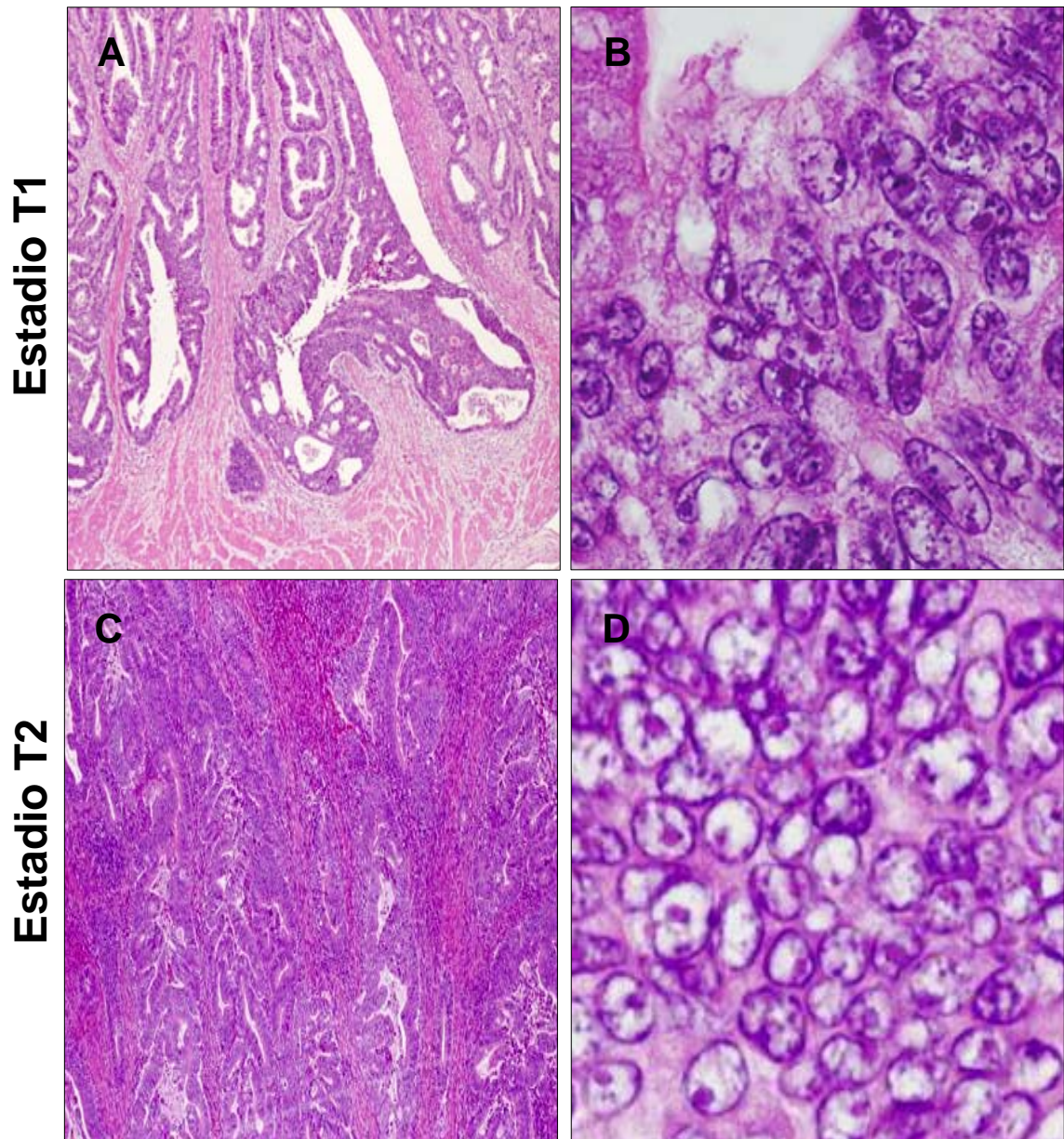


Figura 17.- Adenocarcinoma de intestino grueso (H-E).

A: Adenocarcinoma bien diferenciado de intestino grueso (estadio T1) que penetra en la porción superficial de la muscular propia. Se observan abundantes glándulas distribuidas irregularmente, con áreas sólidas focales. Las células tumorales presentan moderada diferenciación mucosecretora (X40).

B: Detalle de la imagen anterior mostrando células epiteliales malignas pobremente diferenciadas con intenso pleomorfismo nuclear (X1000).

C: Adenocarcinoma pobremente diferenciado de intestino grueso (estadio T2) en el que se observan escasas formaciones glandulares irregulares. El intersticio es escaso y contiene abundantes vasos sanguíneos y focos hemorrágicos (X40).

D: Detalle de la imagen anterior mostrando células epiteliales desdiferenciadas con citoplasma escaso y sin diferenciación mucosecretora. Los núcleos son pleomórficos y los nucleolos son de grandes dimensiones (X1000).

Adenocarcinomas de colon (Estadio T3)

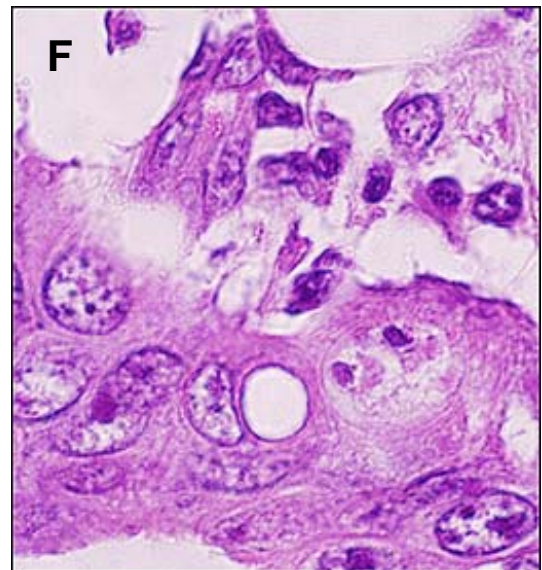
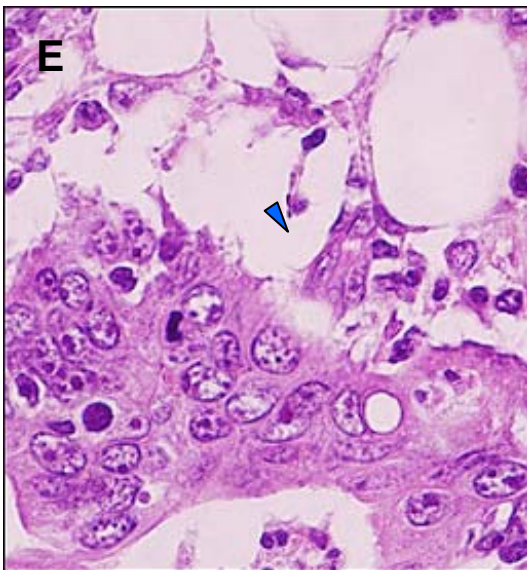
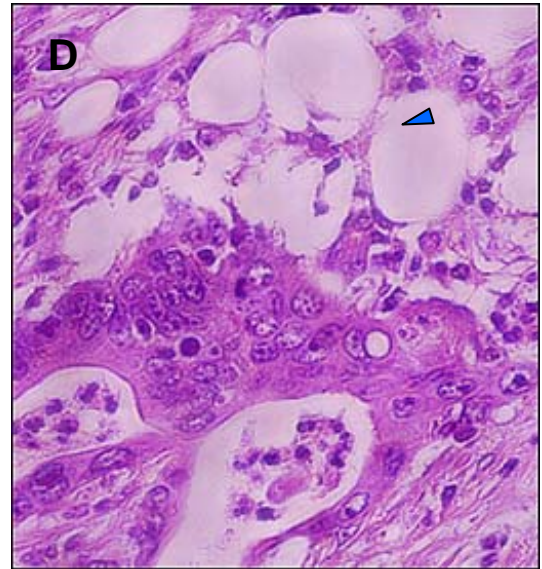
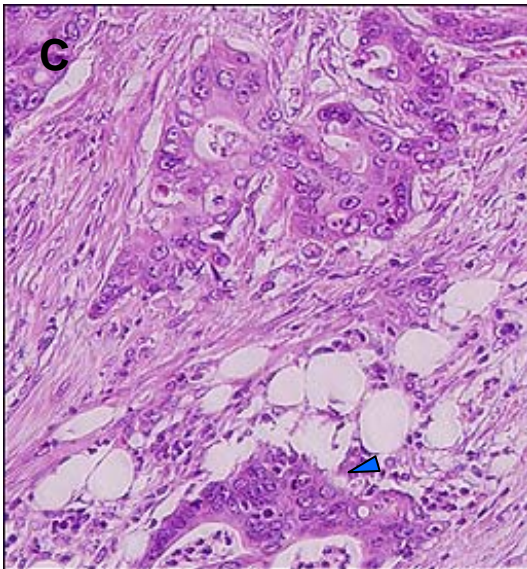
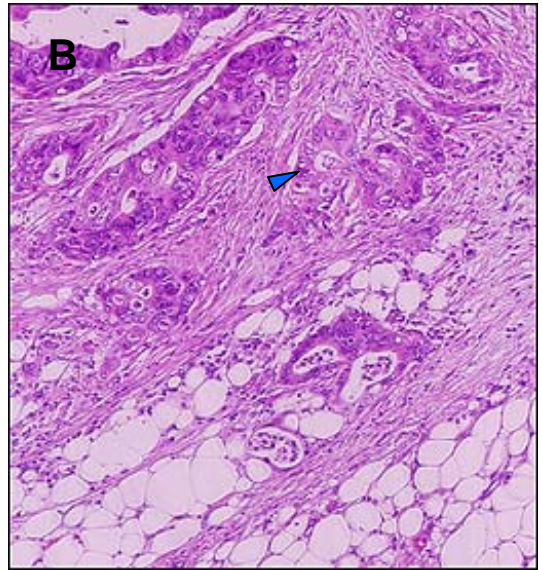
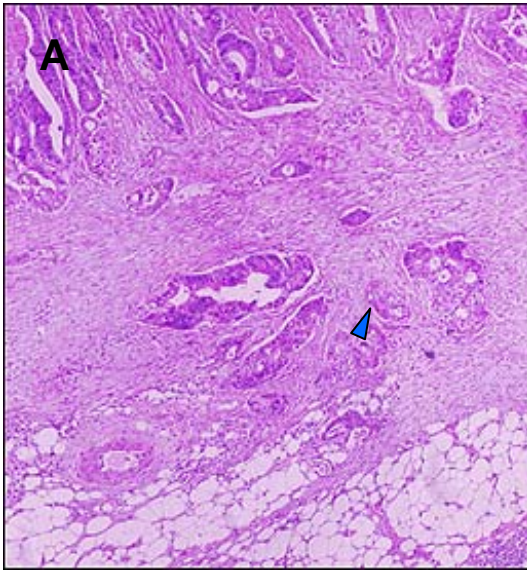


Figura 18.- Adenocarcinoma de colon (estadio T3) (H-E).

A: Adenocarcinoma indiferenciado que penetra ampliamente en la submucosa, muscular intestinal, alcanzando la serosa. Las glándulas tumorales presentan núcleos pseudoestratificados, hipercromáticos y escasa diferenciación del citoplasma con mínima formación de vacuolas mucosecretoras. En la lámina propia se observan abundantes acúmulos de tejido linfoide (X40).

B: Detalle de la figura anterior (cabeza de flecha) del adenocarcinoma infiltrando la pared intestinal. Las glándulas proliferantes son muy irregulares. Existe una ligera-moderada reacción desmoplásica del estroma tumoral (X100).

C: Detalle de la figura anterior (cabeza de flecha). Se observa un adenocarcinoma indiferenciado en el que alternan áreas glandulares con áreas sólidas (X200).

D: Detalle de la figura anterior (cabeza de flecha) en el que se aprecia que las células epiteliales glandulares malignas se encuentran completamente indiferenciadas, alternadas con las áreas sólidas del tumor (X400).

E: Detalle de la figura anterior (cabeza de flecha) mostrando las células tumorales indiferenciadas (X600).

F: Detalle de la figura anterior (cabeza de flecha) en la que se aprecian células epiteliales pobremente diferenciadas con núcleos pleomorficos (X1000).

Epitelio de Colon Expresión de Ki67 y p53

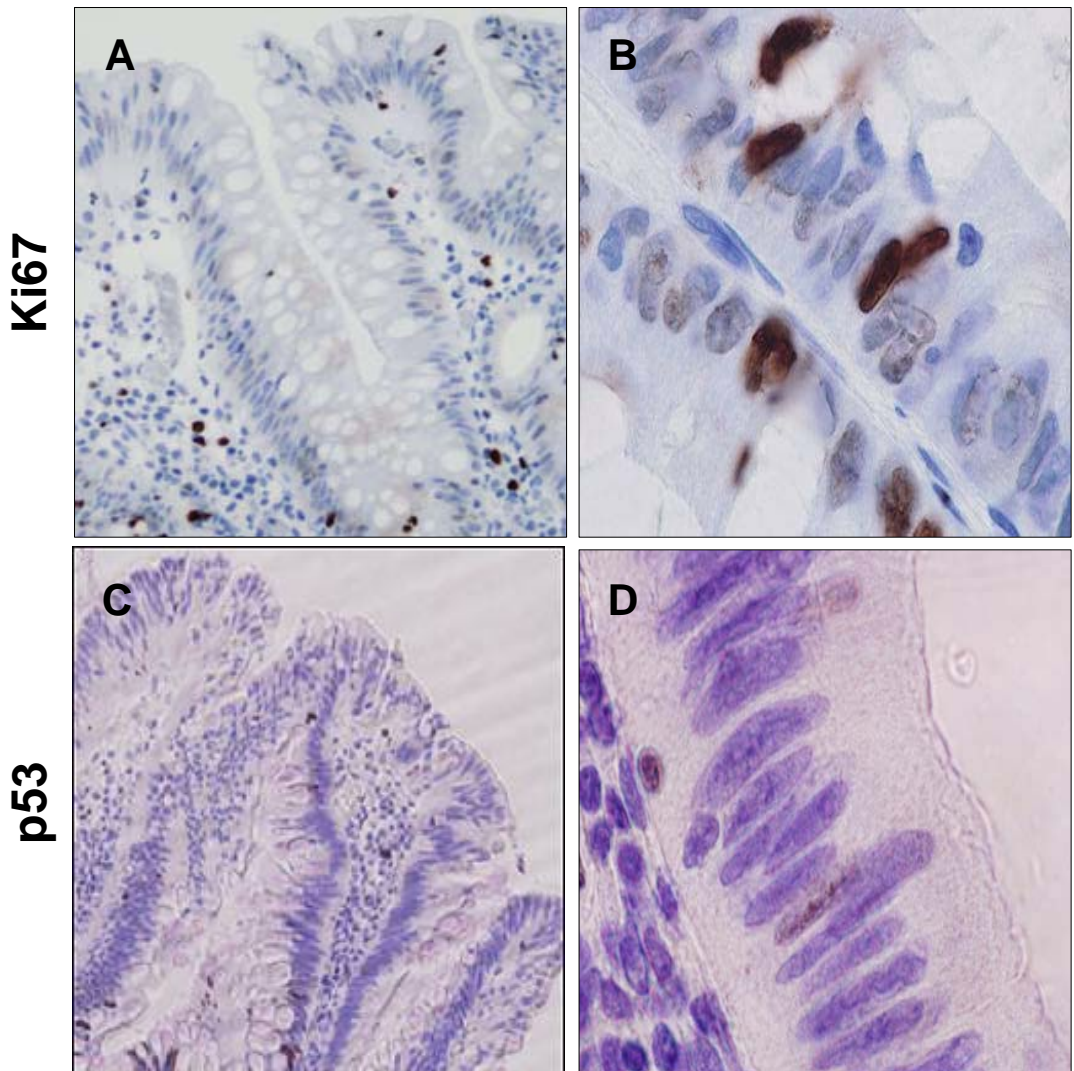


Figura 19.- Expresión de Ki67 y de p53 en epitelio de colon de un caso control.

A: Epitelio intestinal con escasas células Ki67 positivas (expresión nuclear), las cuales se disponen en el fondo de las criptas de Lieberkhün (X200).

B: Detalle de criptas glandulares con células Ki67 positivas (X1000).

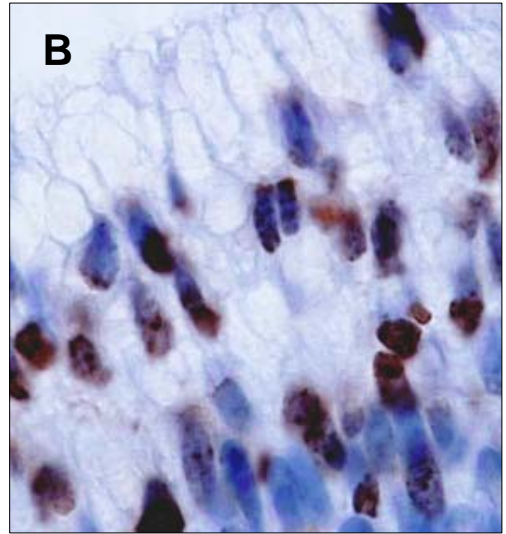
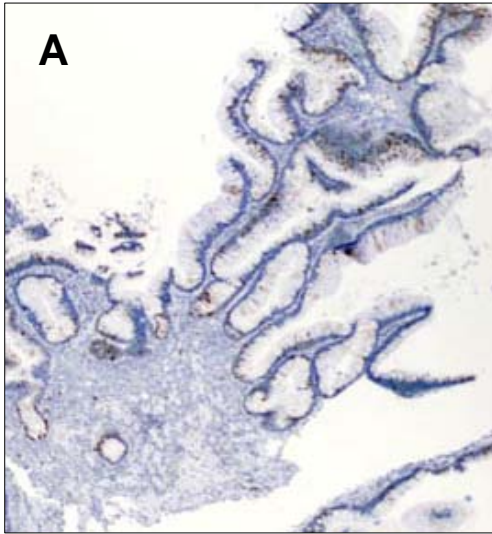
C: Imagen panorámica de la mucosa de intestino grueso normal con escasa expresión de p53, sólo en algunos de los núcleos de los enterocitos (X100).

D: Detalle del epitelio mostrando las células del intestino de colon carentes de expresión de p53 (X1000).

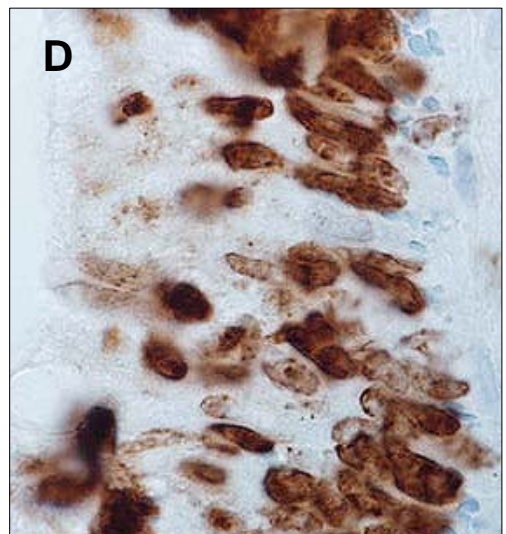
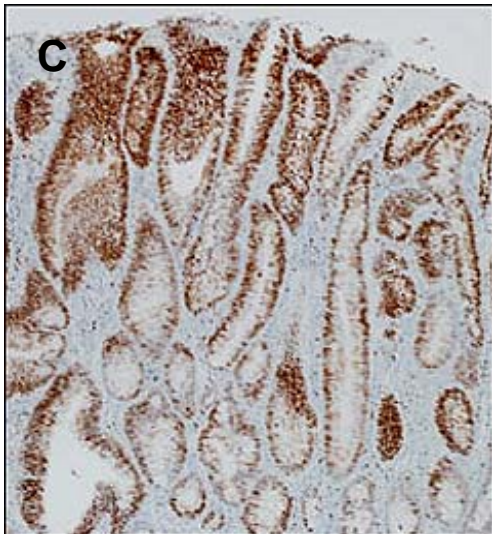
Adenomas de colon

Expresión de Ki67

Leve



Moderada



Grave

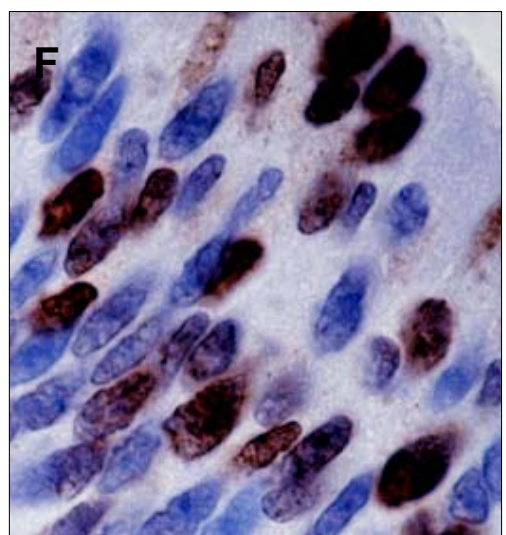
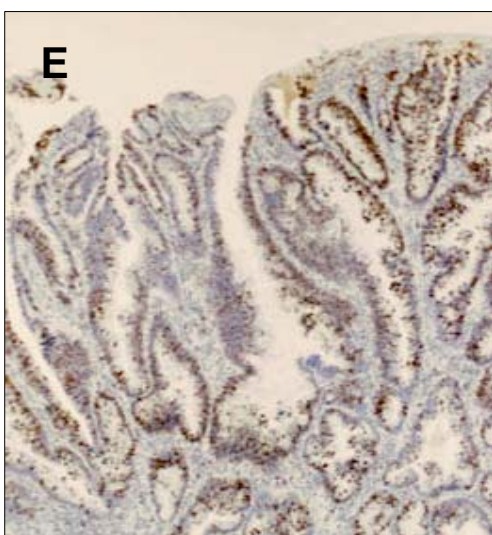


Figura 20.- Expresión de Ki67 en adenomas de colon con diferentes grados de displasia.

A: Imagen panorámica de un adenoma leve. Se observa un epitelio intestinal con células pseudoestratificadas y núcleos positivos para el marcador de proliferación celular Ki67 (X40).

B: Detalle de la imagen anterior mostrando células con diferente grado de diferenciación mucosecretora, núcleos amorfos y pequeños, con cromatina compacta y expresión moderada de Ki67 (X1000).

C: Imagen panorámica de adenoma de colon con displasia epitelial moderada, constituido por glándulas de diferentes tamaños. Las células epiteliales proliferantes presentan reacción positiva para Ki67 (X40)

D: Detalle de la región epitelial anterior en la que se observan células con núcleos hiper Cromáticos y pequeños con distribución irregular de la cromatina. El grado de positividad a Ki67 no es homogéneo en todas las células (X1000).

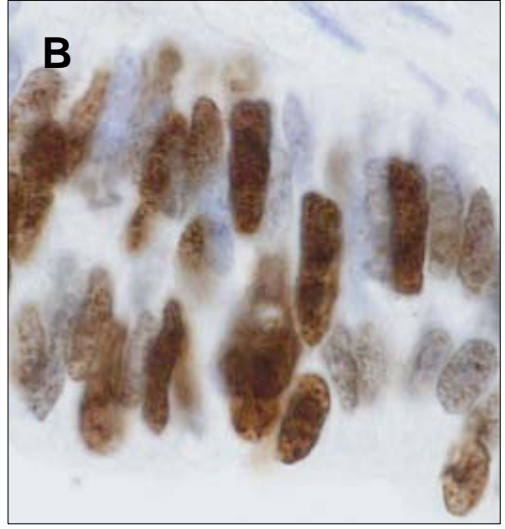
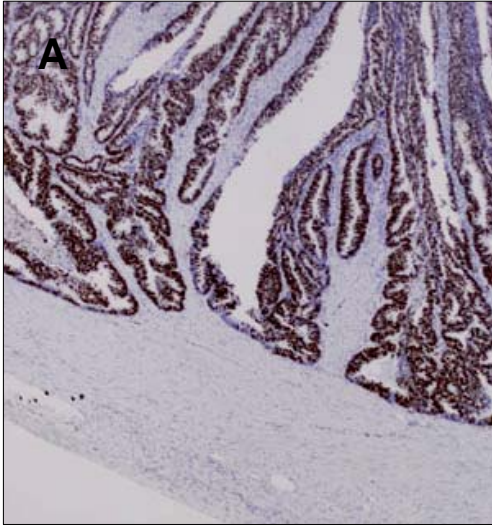
E: Proliferación glándular adenomatosa grave, con glándulas muy irregulares y formaciones pseudopapilares en la luz. La lámina propia presenta glándulas de pequeño tamaño de tipo microinfiltrativo. Existe reacción positivo para el Ki67 (X40).

F: Detalle de la región anterior de las glándulas proliferantes mostrando la desorganización del epitelio y la intensa expresión de Ki67 en la mayoría de las células en proliferación (X1000).

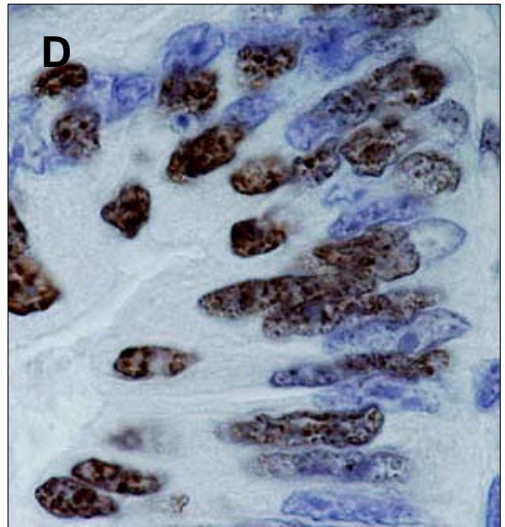
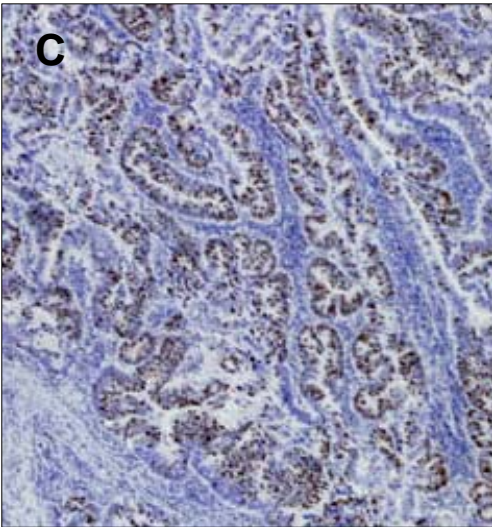
Adenocarcinomas de colon

Expresión de Ki67

Estadio T1



Estadio T2



Estadio T3

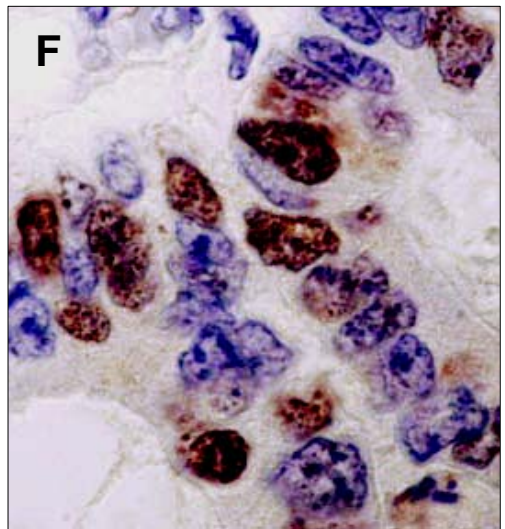
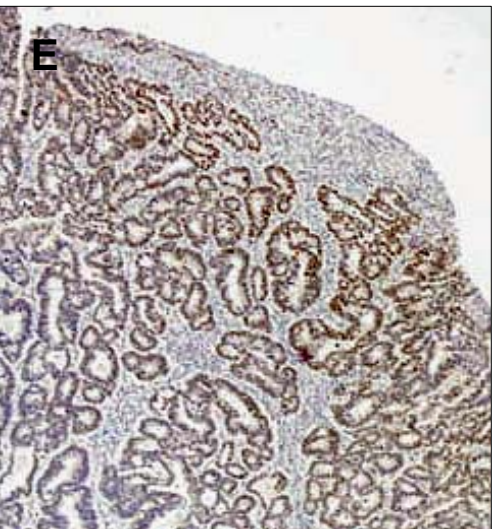


Figura 21.- Expresión de Ki67 en adenocarcinoma de colon (estadios T1, T2 y T3).

A: Adenocarcinoma bien diferenciado de patrón papilar que infiltra focalmente la submucosa intestinal (estadio T1). El epitelio muestra numerosos núcleos Ki67 positivos (X40).

B: Detalle de la imagen anterior mostrando el epitelio pseudoestratificado, núcleos pleomórficos, la mayoría de los cuales son positiva para Ki67 (X1000).

C: Imagen panorámica de un adenocarcinoma moderadamente diferenciado e infiltrante en la pared muscular (estadio T2), que muestra glándulas muy irregulares. Se observa que la tinción nuclear de Ki67 es muy variable (X40).

D: Detalles de la imagen anterior mostrando que no existe una relación directa entre el pleomorfismo nuclear y la mayor expresión de Ki67 (X1000).

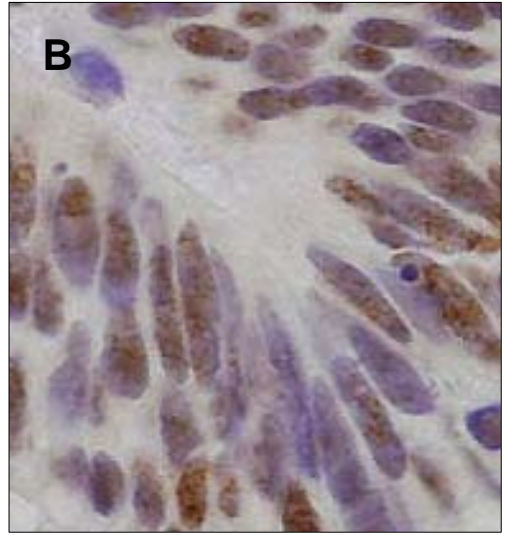
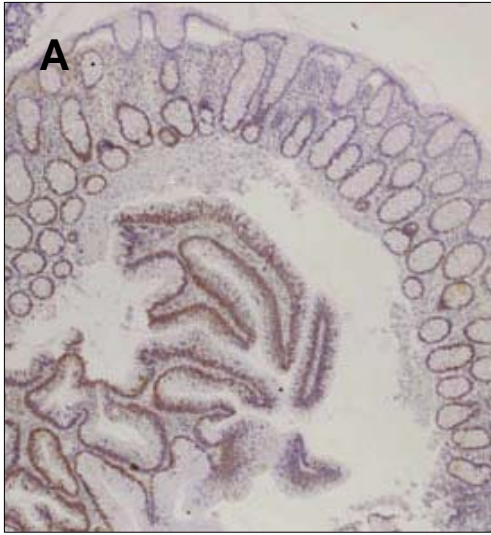
E: Imagen panorámica de un adenocarcinoma bien diferenciado, constituido por glándulas proliferantes con escasa lámina propia circundante que llega hasta la profundidad de la muscular propia (estadio T3) (X40).

F: Detalle de la figura anterior en el que alternan células epiteliales malignas Ki67 positivas y negativas. Destacan células muy pleomórficas con núcleos irregulares, de aspecto moruliforme negativos para Ki67 (X1000).

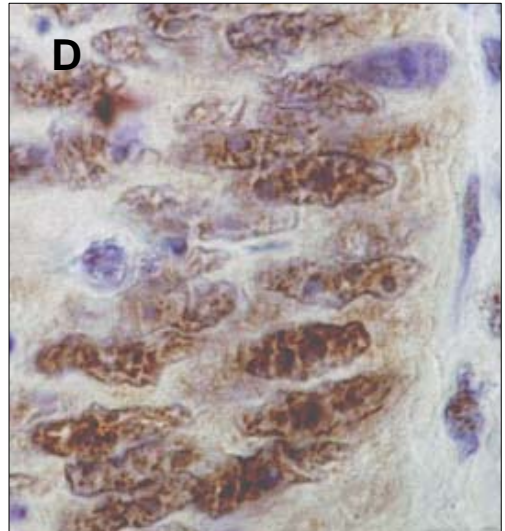
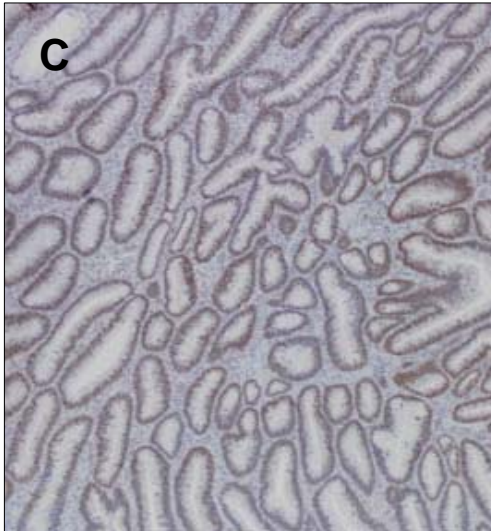
Adenomas de colon

Expresión de p53

Leve



Moderado



Grave

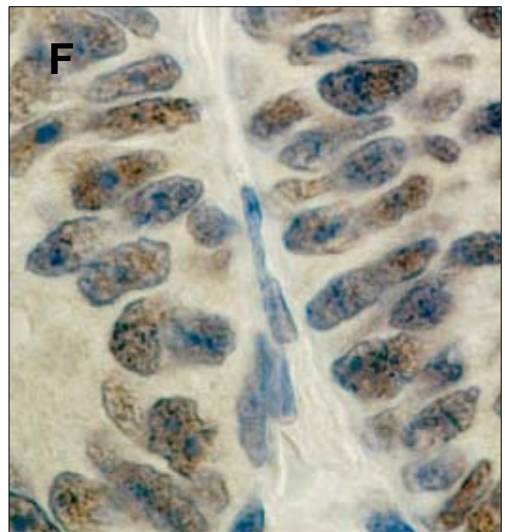
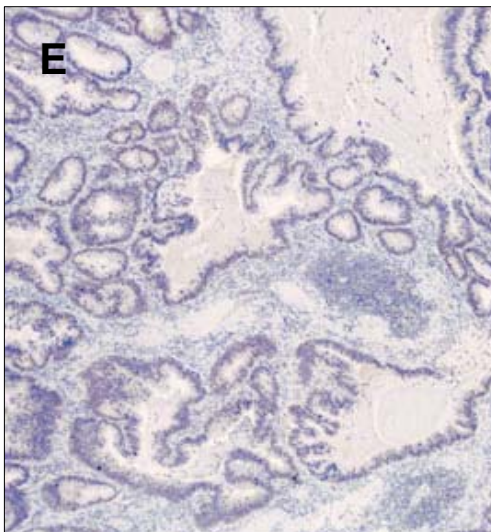


Figura 22.- Expresión de p53 en adenomas de colon con diferentes grados de displasia.

A: Imagen panorámica de un adenoma vellosos con intensa expresión nuclear de p53 si se compara con el menor número de células positivas en el fondo de las glándulas intestinales normales adyacentes (X40).

B: Detalle de la imagen anterior mostrando como la mayoría de las células del adenoma presentan un intenso marcaje nuclear de p53. Nótese la ausencia de pleomorfismo en las células epiteliales proliferantes (X1000).

C: Imagen panorámica de un adenoma tubular constituido por múltiples glándulas y escaso intersticio (X40).

D: Detalle de la figura anterior en la que se observan células proliferantes con núcleos irregulares hiper cromáticos. La detección nuclear de p53 se observa en la mayoría de las células epiteliales proliferantes (X1000).

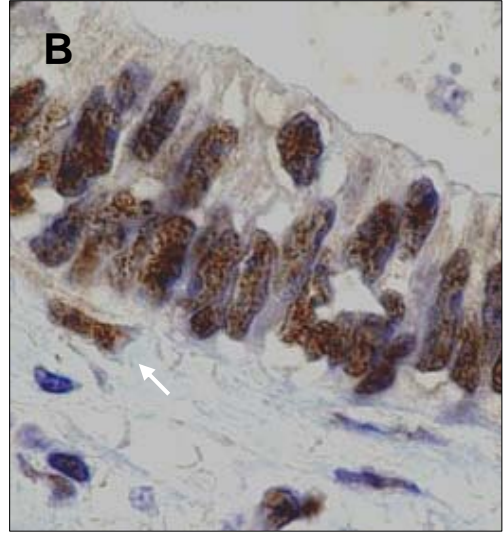
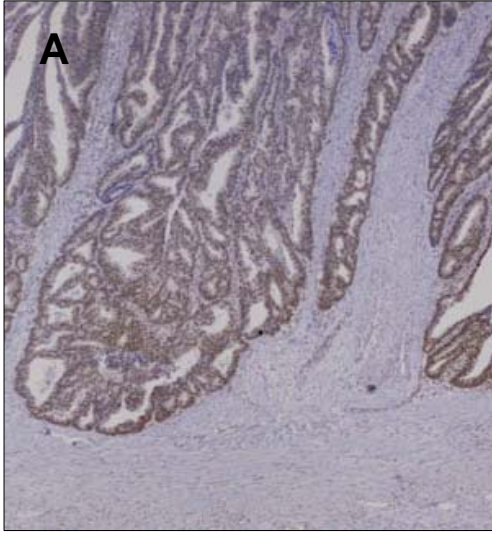
E: Imagen panorámica de adenoma colorrectal con glándulas muy irregulares, algunas dilatadas quísticamente y rodeadas por un estroma con moderada reacción desmoplásica (X40).

F: Detalle del adenoma anterior constituido por glándulas epiteliales con células pleomórficas, disqueratosis nuclear y una variable expresión de p53 en las células proliferantes (X1000).

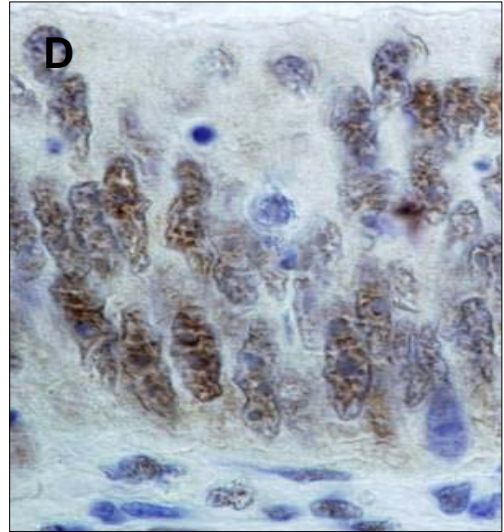
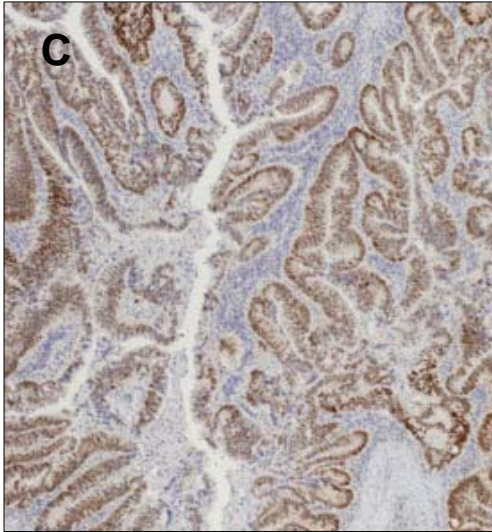
Adenoarcinomas de colon

Expresión de p53

Estadio T1



Estadio T2



Estadio T3

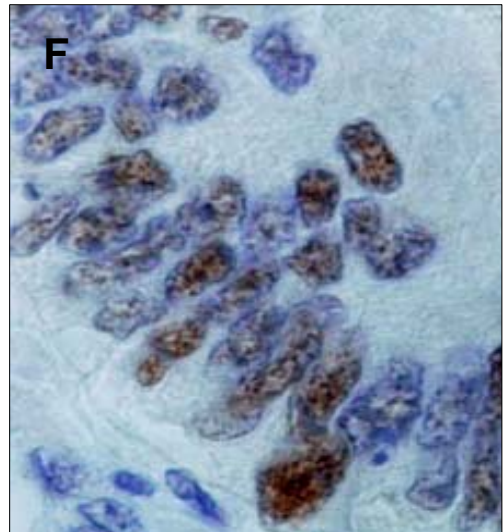
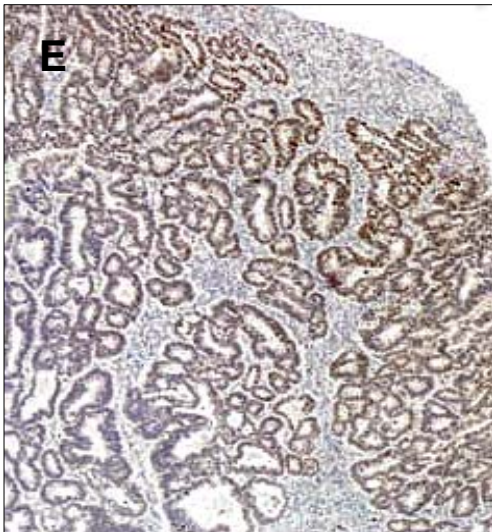


Figura 23.- Expresión de p53 en adenocarcinoma de colon (estadios T1, T2 y T3)

A: Imagen panorámica de un adenocarcinoma de colon (estadio T1). Se observa una proliferación glandular maligna bien diferenciada que penetra en la submucosa colónica (X4).

B: Detalle de la imagen anterior mostrando una glándula tumoral formada por un epitelio pseudoestratificado con células de tipo enteroide y una elevada positividad de p53 en las células proliferantes. En el estroma adyacente se observan algunos fibroblastos positivos a p53 (flecha blanca) (X100).

C: Imagen panorámica de un adenocarcinoma de colon moderadamente diferenciado (estadio T2) que presenta una proliferación de glándulas muy irregulares con evidente marcaje de p53 (X40).

D: Detalle de la imagen anterior mostrando células con núcleos pleomórficos, de gran tamaño y ténue marcaje de p53 (X1000).

E: Imagen panorámica de un adenocarcinoma bien diferenciado que, sin embargo, llega a infiltrar la capa muscular externa del colon y penetra puntualmente en la serosa peritoneal (estadio T3). Nótese la presencia de glándulas muy irregulares con positividad para p53 (X40).

F: Detalle del epitelio glandular constituido por células desdiferenciadas con núcleos muy irregulares y de gran tamaño. p53 se expresa en la mayoría de las células tumorales y las células negativas muestran vestigios de inmunomarcaje. Los núcleos son pleomórficos (X100).

Epitelio de colon

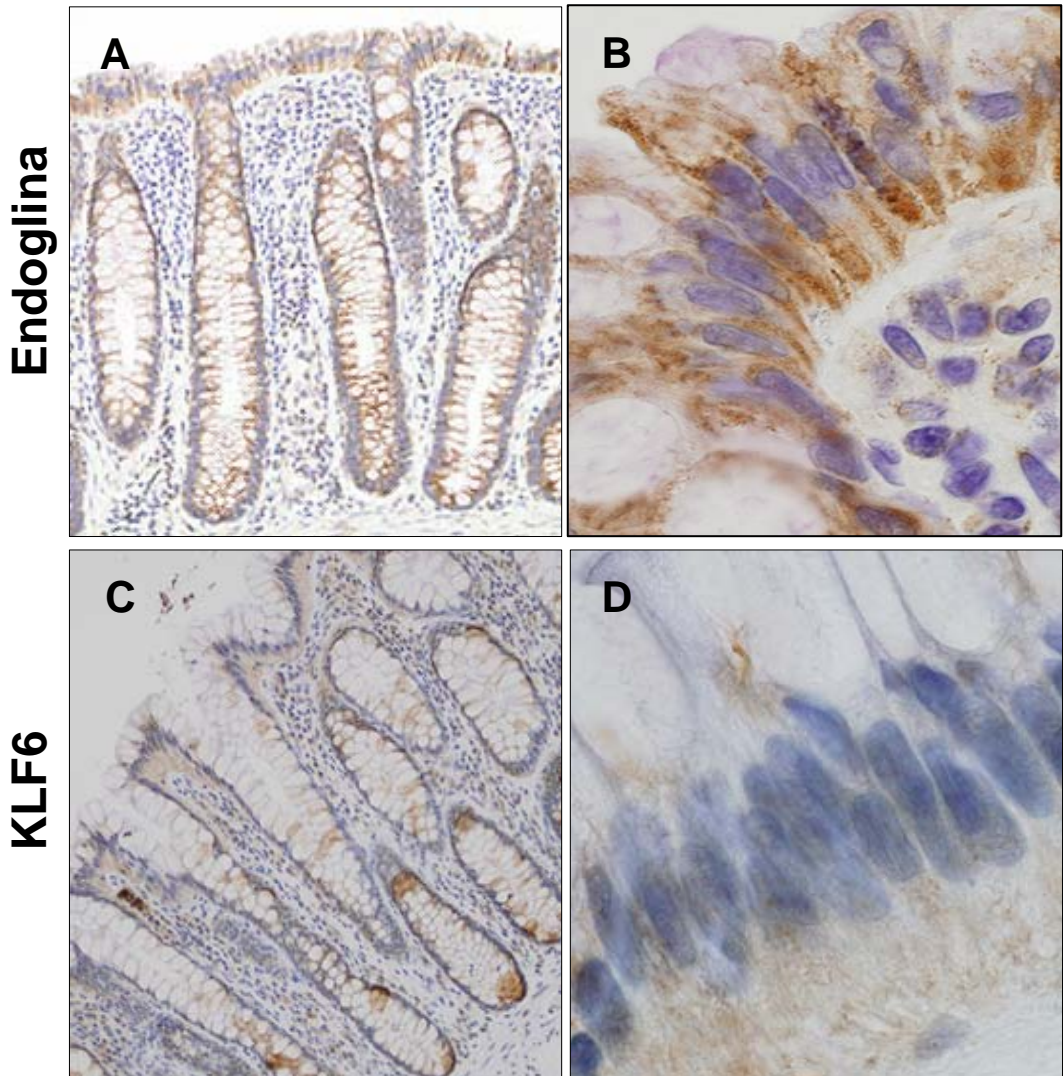


Figura 24.- Expresión de endoglina en el intestino grueso normal.

A: Pared de intestino grueso normal en el que se observa una marcada expresión de Endoglina en el citoplasma de las células del epitelio de revestimiento y glandular. La expresión de endoglina aparentemente es mayor en el fondo de las criptas con respecto al epitelio superficial y el de los conductos glandulares (X40).

B: Detalle de la figura anterior mostrando una intensa expresión de endoglina en el citoplasma de las células del epitelio superficial intestinal. Subyacentemente se observan células de la lámina propia con trazas de inmunotinción (X1000).

C: Imagen panorámica de la mucosa de colon. La inmunoexpresión de KLF6 aparentemente es mayor en el fondo de las criptas de Lieberkhün con respecto al epitelio superficial y el de los conductos glandulares (X40).

D: Detalle de la imagen anterior, donde se observa la expresión de KLF6, tanto en la zona nuclear como en el citoplasma de las células epiteliales intestinales. No se observa expresión de KLF6 en las células mucosecretoras (X1000).

Adenomas de colon

Expresión de Endogлина

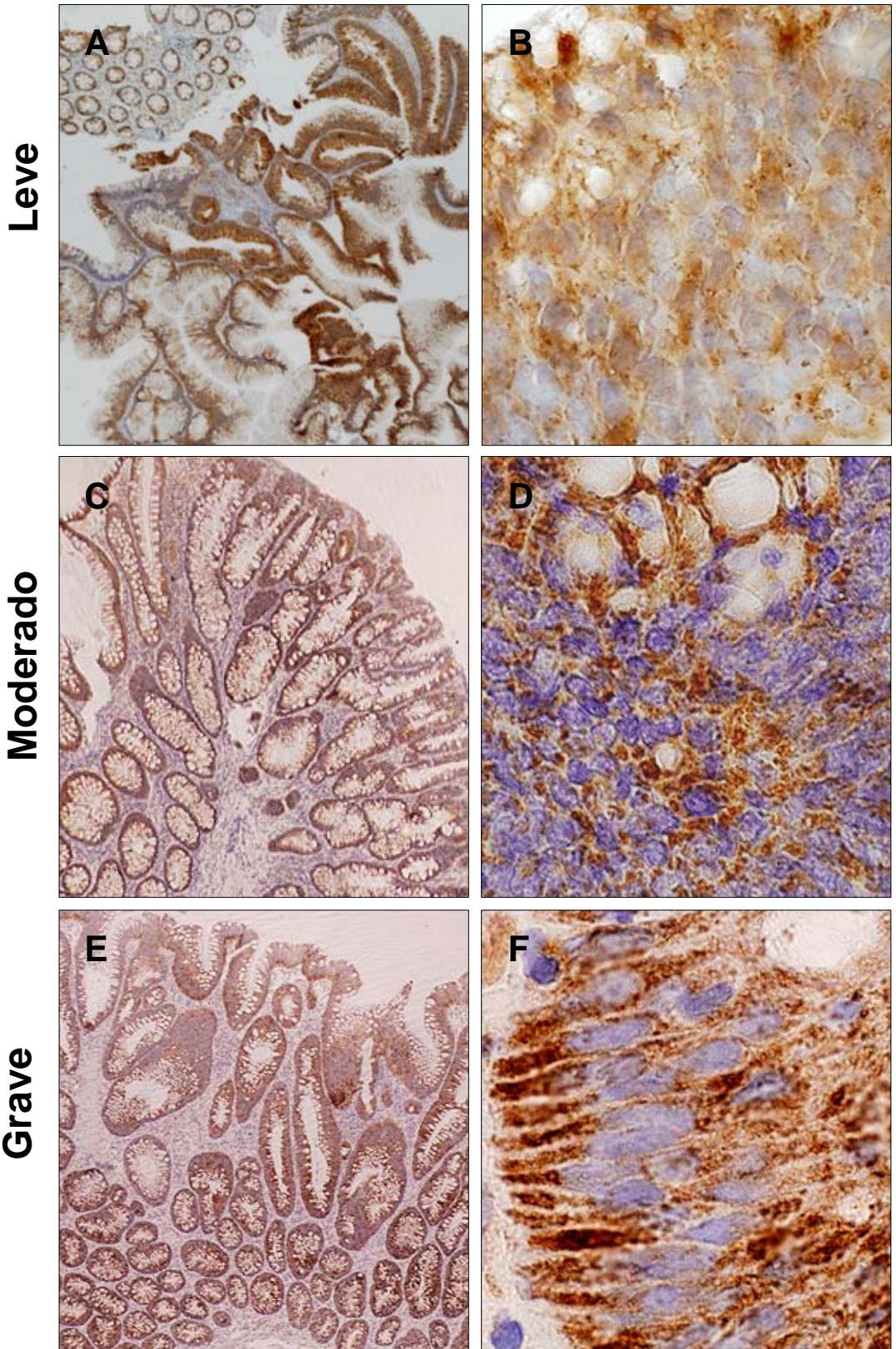


Figura 25.- Expresión de endoglina en adenomas de colon con diferentes grados de displasia.

A: Adenoma tubulovelloso con displasia leve en el que se observan formaciones papilares revestidas por células epiteliales con abundante inmunotinción de endoglina en el citoplasma. En la parte superior de la imagen se observa mucosa de intestino grueso normal con menor expresión de endoglina comparada con la de las células displásicas adyacentes (X40).

B: Detalle de la imagen anterior (cabeza de flecha) mostrando moderada expresión de Endoglina en el citoplasma perinuclear (X1000).

C: Adenoma tubular de intestino grueso con intensa inmunoreactividad de endoglina (X40).

D: Detalle de la imagen anterior en la que destaca un epitelio glandular moderadamente diferenciado con abundantes gránulos citoplasmáticos positivos para endoglina (X1000).

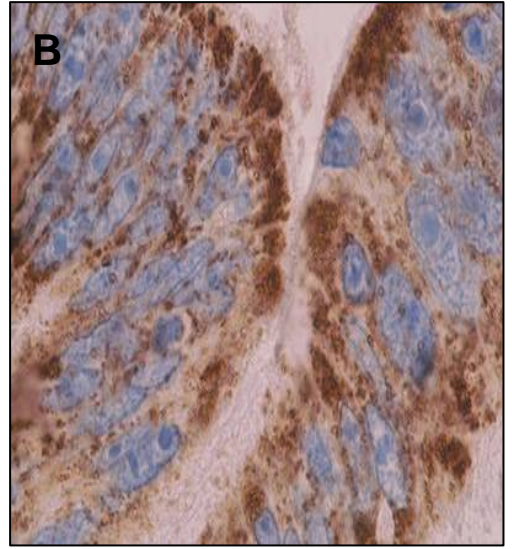
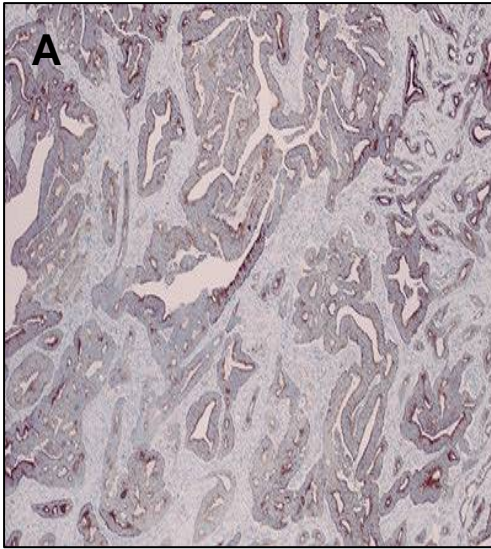
E.: Adenoma de colon con displasia severa. Formación adenomatosa tubular observándose células epiteliales presentan escasa diferenciación citoplasmática y una evidente inmunotinción de endoglina, la cual es mas intensa en las formaciones papilares que en las glándulas adenomatosas intestinales (X40).

F: Detalle de la imagen anterior (cabeza de flecha) mostrando la proliferación de células pobremente diferenciadas y con elevada expresión de endoglina (X1000).

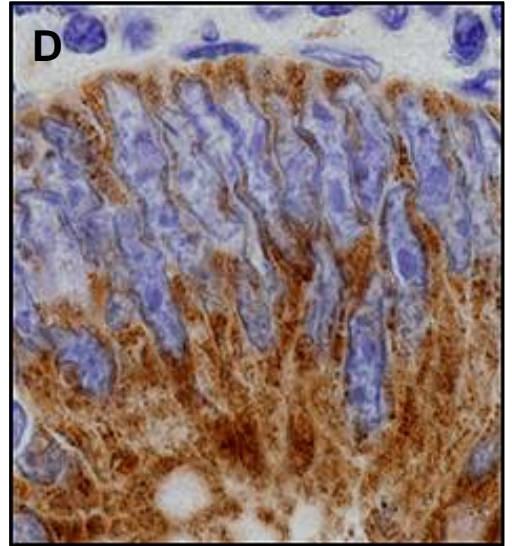
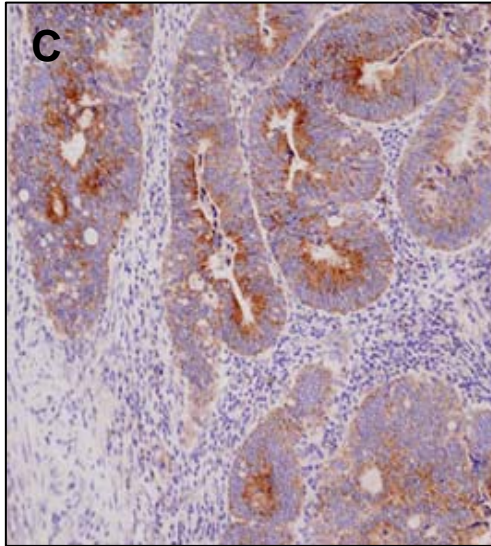
Adenocarcinomas de colon

Expresión de Endogлина

Estadio T1



Estadio T2



Estadio T3

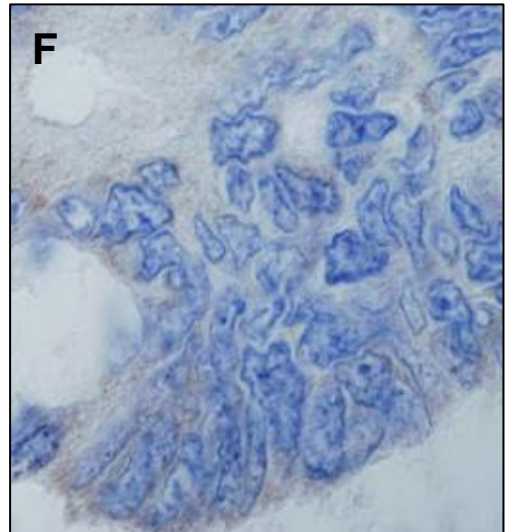
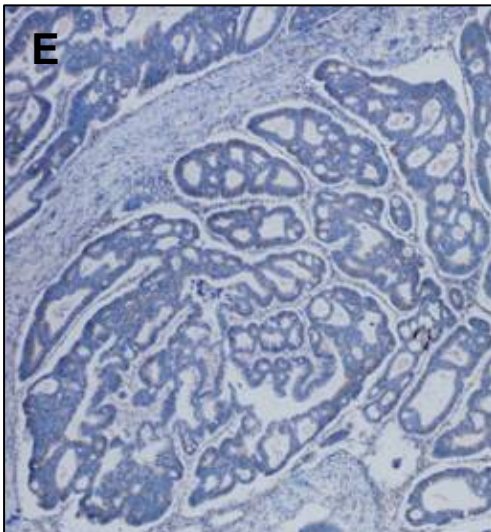


Figura 26.- Expresión de endogлина en el cáncer colorrectal (estadios T1, T2 y T3)

A: Adenocarcinoma moderadamente diferenciado (T1) caracterizado por la presencia de glándulas irregulares. Se observa inmunotinción positiva para endogлина (X40).

B: Detalle de la imagen anterior en la que se destaca un epitelio tumoral con pseudoestratificación celular y con moderado marcaje de endogлина. Núcleos hipercromáticos amorfos con presencia de nucleolos (100X).

C: Adenocarcinoma indiferenciado (estadio T2). Las glándulas infiltrantes son irregulares y existe un aumento evidente en la expresión de endogлина a nivel citoplasmático (X40)

D: Detalle de la imagen anterior donde las células epiteliales malignas están distribuidas difusamente o formando glándulas irregulares con variable expresión de endogлина. Los núcleos son hipercromáticos, los nucleolos evidentes y carecen de inmunotinción para endogлина (X100).

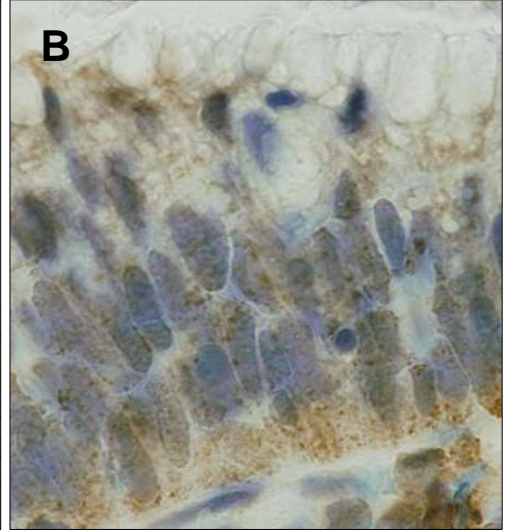
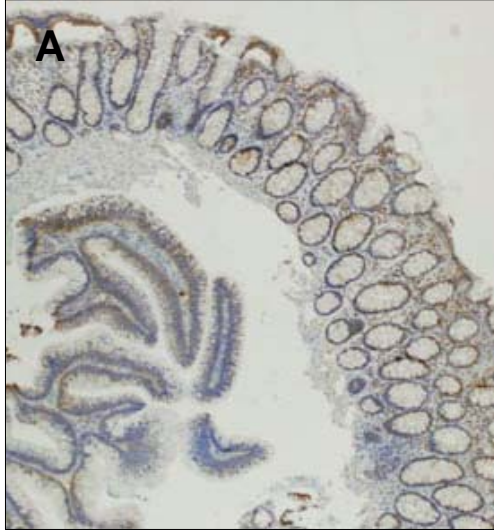
E: Adenocarcinoma moderadamente diferenciado (estadio T3). Se observan formaciones glandulares irregulares. Las células epiteliales no presentan expresión de endogлина (X400).

F: Detalle de la imagen anterior mostrando células desdiferenciadas con poco citoplasma y carentes de expresión de endogлина. La mayoría de los núcleos son hipercromáticos (X1000).

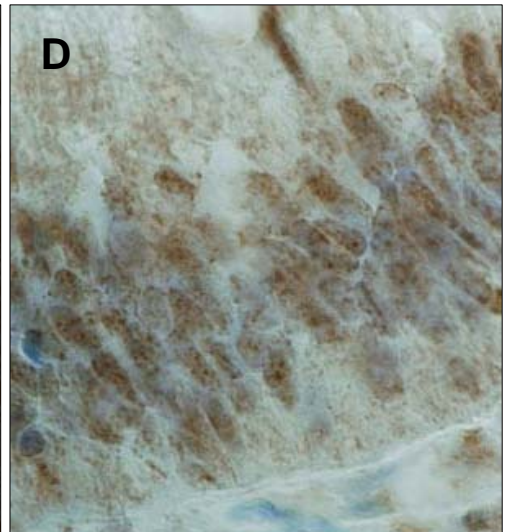
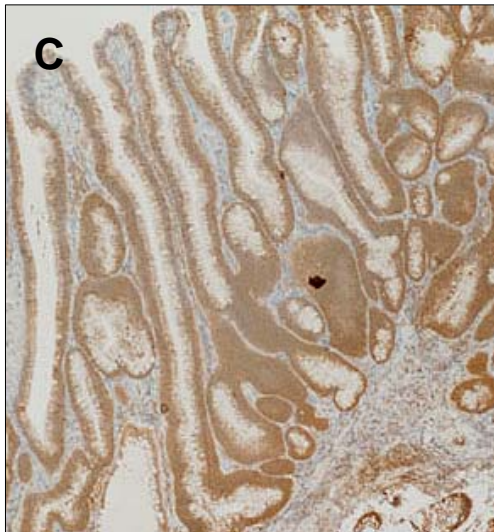
Adenomas de colon

Expresión de KLF6

Leve



Moderado



Grave

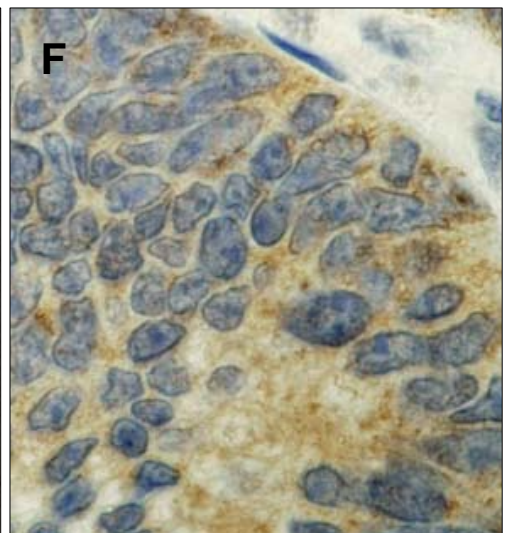
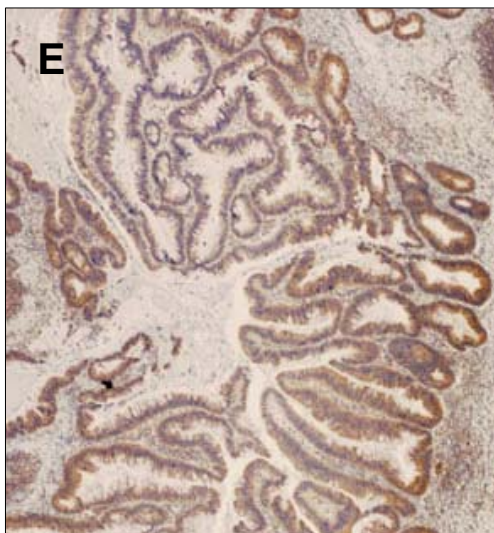


Figura 27.- Expresión de KLF6 en adenomas de colon con displasia intestinal.

A: Adenoma de colon con displasia epitelial leve adyacente a mucosa intestinal normal. La expresión de KLF6 es semejante en el epitelio superficial y en el epitelio glandular y sensiblemente menor que el de las formaciones vellositarias del epitelio adenomatosos (X40).

B: Detalle del epitelio adenomatoso con moderado pleomorfismo y pseudoestratificación celular y suave marcaje de KLF6 en el citoplasma basal y apical. Destaca una ténue pero evidente expresión nuclear de KLF6 (X1000).

C: Adenoma de intestino grueso con displasia moderada e intensa inmunoexpresión de KLF6 en las formaciones papilares y glandulares proliferantes (X40).

D: Detalle de la imagen anterior de células epiteliales con patrón de crecimiento sólido y moderada expresión de KLF6 tanto a nivel citoplasmático como nuclear (X1000).

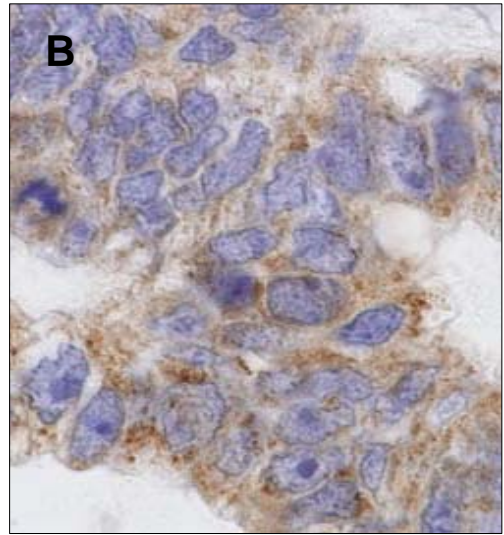
E: Adenoma de intestino grueso con displasia grave. Se observan formaciones glandulares muy irregulares pero localizadas exclusivamente en la mucosa intestinal. La expresión de KLF6 es ligeramente mayor en la base de las glándulas que en la porción superficial adenomatosa (X40).

F: Área epitelial sólida bien delimitada de la lámina propia adyacente. Las células proliferantes presentan irregularidades nucleares y citoplasma desdiferenciado en el cual aparecen gránulos KLF6 positivos. No se aprecia expresión de KLF6 nuclear (X1000).

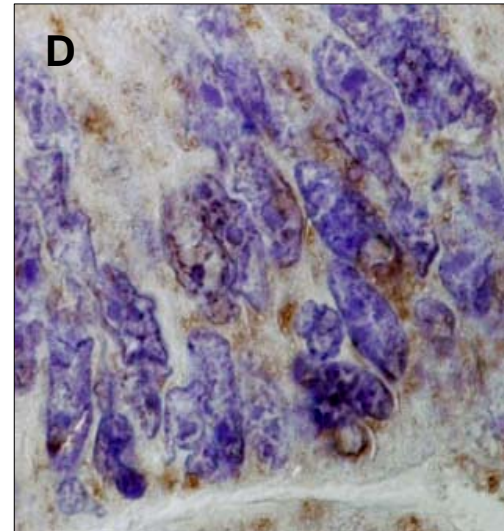
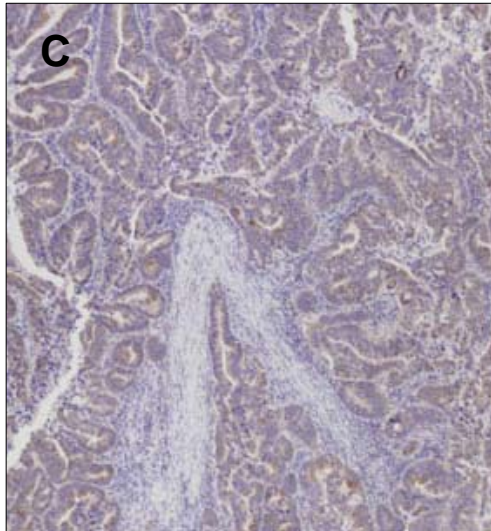
Adenocarcinomas de colon

Expresión de KLF6

Estadio T1



Estadio T2



Estadio T3

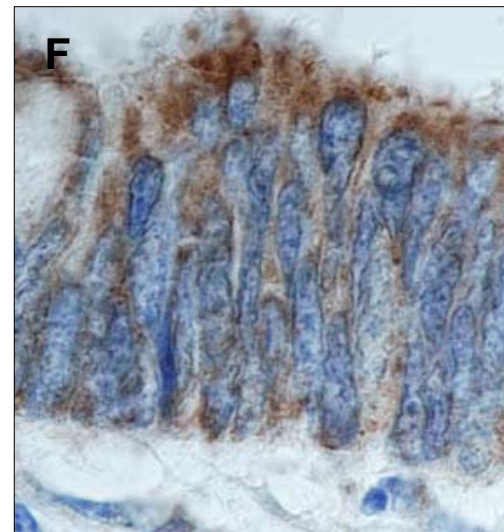
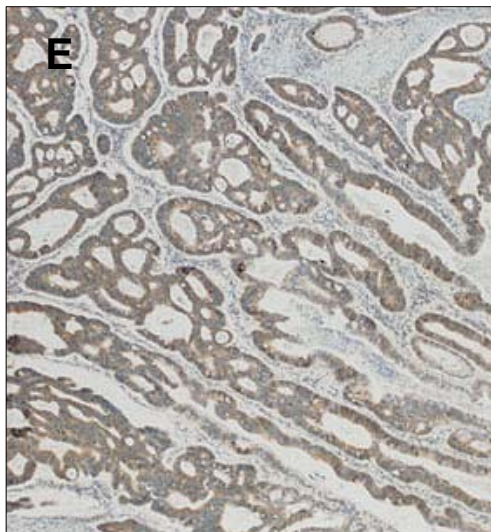


Figura 28.- Expresión de KLF6 en adenocarcinomas de colon.

A: adenocarcinoma bien diferenciado de colon (estadio T1) caracterizado por la presencia de glándulas irregulares infiltrantes (X40).

B: Detalle de la figura anterior de un epitelio tumoral con abundante pseudoestratificación celular e intenso marcaje de KLF6 en la superficie del epitelio glandular. Nótese vestigios de inmunotinción en el núcleo (X1000).

C: Adenocarcinoma moderadamente diferenciado (estadio T2). Las glándulas infiltrantes son irregulares y presentan un evidente inmunomarcaje citoplasmático de KLF6 (X40).

D: Detalle de la imagen anterior donde las células epiteliales malignas están distribuidas difusamente o formando glándulas irregulares con variable expresión de KLF6 en el citoplasma perinuclear. Los núcleos son hiper Cromáticos y aparentemente carecen de inmunotinción para KLF6 (X1000).

E: Adenocarcinoma moderadamente diferenciado (estadio T3). Se observan formaciones glandulares muy irregulares que alternan con áreas tumorales sólidas. Las células epiteliales presentan variable expresión de KLF6 (X40).

F: Detalle de la imagen anterior de un patrón sólido de crecimiento del carcinoma constituido por células desdiferenciadas con escaso citoplasma y mínima expresión de KLF6. Los núcleos son KLF6 negativos (X1000).

que la nuclear disminuyó notablemente. En el carcinoma hay mayor expresión citoplasmática a medida que aumenta la agresividad e invasión tumoral, en especial en la superficie del epitelio glandular, no observándose expresión nuclear (Fig. 28 A-F).

De manera resumida, los análisis de expresión mediante inmunohistoquímica de los diferentes marcadores estudiados (Ki67, p53, endoglina y KLF6), sugieren que las variaciones de expresión de los mismos en los diferentes estadios de adenomas y adenocarcinomas se comportan como aparece en la Tabla 6.

	ADENOMAS			ADENOCARCINOMAS			NORMAL
	LEVE	MODERADO	GRAVE	T1	T2	T3	
Ki67	+	++	+++	+++	+++	+++	+
p53	+	+	++	+++	+++	++	+
Endoglina	+	++	+++	++	+++	-	+
KLF-6	+	++	+++	++	++	+++	+

Tabla 6.- Expresión cualitativa de Ki67, p53, endoglina y KLF6 en los diferentes estadios de adenomas y de adenocarcinomas estudiados mediante inmunohistoquímica. +++: máxima expresión; -: expresión negativa.

1.3.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

1.3.1. Caracterización de Ki67

Existen diferencias significativas entre los valores de expresión de Ki67 en adenomas y adenocarcinomas, especialmente en la fase más avanzada de adenocarcinoma (T3), cuyos valores de Ki67 son más elevados que en cualquier estadio previo. Las diferencias se visualizan bien en los gráficos de Box Whiskers (Fig. 29), donde los valores de la variable Ki67 en los tres grupos correspondientes a adenocarcinomas están siempre por encima de los pertenecientes a adenomas.

Sin embargo, las diferencias observadas en las lesiones no son tan evidentes en los tejidos adyacentes a las mismas, donde los valores de este marcador son prácticamente iguales entre adenomas y adenocarcinomas.

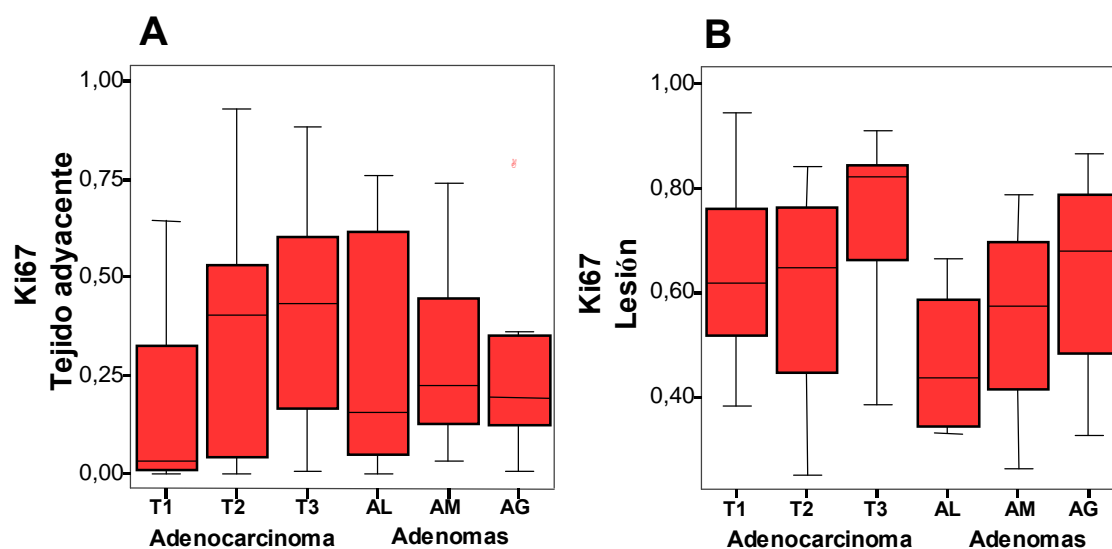


Figura 29.- Gráficos de Box Whiskers mostrando la variación en la expresión de Ki67 en los casos de adenomas y adenocarcinomas estudiados (A) y en las lesiones adyacentes a los mismos (B). T: adenocarcinoma (estadios, 1, 2 y 3); A: adenoma (L, leve; M, moderado; G, grave).

Como análisis estadísticos básicos se estudiaron la media y la desviación estándar en relación al número de casos evaluados. Los resultados para Ki67 se muestran en la Tabla 7.

Marcador	Estadio	DESCRIPTORES BÁSICOS				
		n	Media	Desviación estandard	Valor mínimo	Valor máximo
Ki67 Lesión	AC T1	10	0.6478	0.17127	0.38	0.95
	AC T2	11	0.5827	0.21027	0.25	0.84
	AC T3	10	0.7216	0.21156	0.30	0.91
	Total	31	0.6485	0.20084	0.25	0.95
Ki67 Tejido adyacente	AC T1	10	0.1765	0.22537	0.00	0.64
	AC T2	11	0.3456	0.29762	0.00	0.93
	AC T3	10	0.4219	0.32075	0.01	0.88
	Total	31	0.3156	0.29356	0.00	0.93

Tabla 7.- Valores estadísticos básicos de expresión de Ki67 en los adenocarcinomas estudiados y en las lesiones adyacentes a los mismos. T: adenocarcinoma (estadios, 1, 2 y 3); N: número de casos analizados.

Asimismo, se realizó el estudio de expresión de este marcador entre pares independientes. Como se observa en la Tabla 8, en este análisis, demostró que sólo existían diferencias significativas en la lesión y no en los tejidos adyacentes a la

misma, y sólo entre los pares: adenoma leve-adenocarcinoma T1 y T3; adenoma moderado-adenocarcinoma T3; y entre adenoma leve-adenoma moderado.

Pares de estadios		Ki67 Lesión P≤0.05	Ki67 Tejido Adyacente P≤0.05
Carcinoma T1	AL	0.017	0.383
Carcinoma T3	AL	0.005	0.310
	AM	0.054	0.259
Adenoma Leve	AM	0.027	0.827

Tabla 8.- Análisis de la expresión de Ki67 entre pares independientes de adenomas y adenocarcinomas. T: adenocarcinoma (estadios, 1, 2 y 3); A: adenoma (L, leve; M, moderado; G, grave). Se muestran exclusivamente los pares en los que se observaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

Estos resultados fueron corroborados mediante el análisis de Mann Whitney (no paramétrico) como queda reflejado en la Tabla 9.

Pares de estadios		Ki67 Lesión P≤0.05	Ki67 Tejido adyacente P≤0.05
Carcinoma T1	AL	0.028	0.450
Carcinoma T3	AL	0.013	0.364
	AM	0.029	0.364
Adenoma Leve	AG	0.028	0.650

Tabla 9.- Expresión de Ki67 entre pares independientes de adenomas y adenocarcinomas mediante el análisis no paramétrico de Mann Whitney. T: adenocarcinoma (estadios, 1, 2 y 3); A: adenoma (L, leve; M, moderado; G, grave). Se muestran solamente los pares en los que se observaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

Mediante estos dos análisis, paramétrico y no paramétrico, podemos concluir que las diferencias de expresión de Ki67 sólo son significativas en la lesión, y en ésta, entre los pares independientes: adenoma leve-adenocarcinoma T1 y T3; adenoma moderado-adenocarcinoma T3, pero no entre adenomas.

Asimismo, se analizó la expresión de Ki67 en la lesión y en el tejido adyacente a la misma utilizando los tests estadísticos: T de student y Wilcoxon. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 10.

Las diferencias de expresión de Ki67 entre tejido adyacente (sano) y tejido tumoral fueron significativas en todos los estadios, tanto de adenocarcinomas como de adenomas.

Estadios	T de student Lesión/Tejido adyacente P≤0.05	Wilcoxon Lesión/Tejido adyacente P≤0.05
T1	0.000	0.047
T2	0.004	0.022
T3	0.003	0.005
AL	0.043	0.007
AM	0.008	0.013
AG	0.000	0.007

Tabla 10.- Expresión de Ki67 en la lesión y en el tejido adyacente. Análisis mediante la T de student y el test de Wilcoxon.

1.3.2. Caracterización de p53

En las lesiones, la proteína p53 presenta valores de expresión muy elevados en todos los casos de adenomas y adenocarcinomas analizados. Además, en los estadios T1 y T2 de adenocarcinoma, la mayor parte de los valores están muy próximos a la mediana.

Sin embargo, tal y como se observa en los gráficos de Box Wiskers en adenomas, los niveles de expresión son bastante más bajos que en el resto de adenocarcinomas, donde los niveles de expresión son muy altos (Fig. 30).

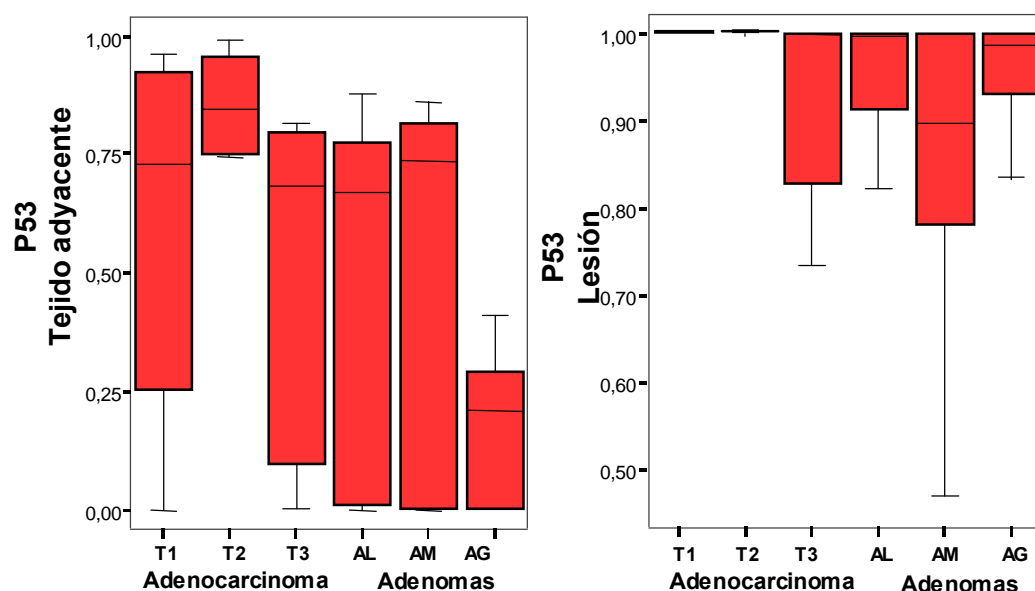


Figura 30.- Gráficos de Box Whiskers mostrando la variación en la expresión de p53 en los casos de adenomas y adenocarcinomas estudiados (A) y en las lesiones adyacentes a los mismos (B). T: adenocarcinoma (estadios, 1, 2 y 3); A: adenoma (L, leve; M, moderado; G, grave).

Respecto a los análisis estadísticos básicos, se muestra la media, la desviación estándar y el número de casos evaluados en la Tabla 11.

Marcador	Estadio	DESCRIPTORES BÁSICOS				
		n	Media	Desviación estándar	Valor mínimo	Valor máximo
P53 Lesión	AC T1	10	0.9390	0.15599	0.51	1.00
	AC T2	11	0.9923	0.01846	0.94	1.00
	AC T3	10	0.9018	0.18276	0.45	1.00
	Total	31	0.9459	0.13743	0.45	1.00
P53 Tejido adyacente	AC T1	10	0.5743	0.39154	0.00	0,96
	AC T2	11	0.7552	0.29555	0.09	0.99
	AC T3	10	0.5172	0.34144	0.00	0.82

Tabla 11.- Valores estadísticos básicos de expresión de p53 en los adenocarcinomas estudiados y en las lesiones adyacentes a los mismos. T: adenocarcinoma (estadios, 1, 2 y 3); N: número de casos analizados.

El estudio de expresión de este marcador entre pares independientes se observa en la Tabla 12. Este análisis demostró que existían diferencias significativas en la lesión, sólo entre los pares: adenocarcinoma T2 y adenoma moderado. Por otro lado, en el tejido adyacente, se obtuvieron diferencias significativas entre los pares independientes: adenocarcinoma T1-adenoma grave; adenocarcinoma T3-adenoma leve y grave.

Pares de estadios		p53 Lesión P≤0.05	p53 Tejido adyacente P≤0.05
Carcinoma T1	AG		0.009/0.0012
	AM	0.016/0.025	
Carcinoma T3	AL		0.000/0.000
	AG		0.011/0.015

Tabla 12.- Análisis de la expresión de p53 entre pares independientes de adenomas y adenocarcinomas. T: adenocarcinoma (estadios, 1, 2 y 3); A: adenoma (L, leve; M, moderado; G, grave). Se muestran exclusivamente los pares en los que hay diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

De la misma manera que en el caso de Ki67, los resultados fueron corroborados mediante el análisis de Mann Whitney (Tabla 13).

A partir de ambos análisis (paramétrico y no paramétrico), podemos concluir que las diferencias de expresión de p53 sólo son significativas en la lesión y en ésta, entre los pares independientes: adenoma moderado-adenocarcinoma T.

Pares de estadios		p53 Lesión P≤0.05	p53 Tejido adyacente P≤0.05
Carcinoma T2	T3		0.020
	AL		0.041
	AM	0.020	0.037
	AG		0.001
Carcinoma T3	AG		0.034
Adenoma Leve	AG		0.049

Tabla 13.- Expresión de p53 entre pares independientes de adenomas y adenocarcinomas mediante el análisis no paramétrico de Mann Whitney. T: adenocarcinoma (estadios, 1, 2 y 3); A: adenoma (L, leve; M, moderado; G, grave). Se muestran solamente los pares en los que se observaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

La expresión de p53 en la lesión y en el tejido adyacente a la misma también se estudió utilizando la T de student y el test de Wilcoxon. Los resultados obtenidos e presentan en la Tabla 14.

Estadios	T de student Lesión/Tejido adyacente P≤0.05	Wilcoxon Lesión/Tejido adyacente P≤0.05
T1	0.009	0.005
T2	0.025	0.003
T3	0.023	0.028
AL	0.005	0.007
AM	0.005	0.008
AG	0.000	0.005

Tabla 14.- Expresión de p53 en la lesión y en el tejido adyacente. Análisis mediante la T de student y el test de Wilcoxon.

Las diferencias de expresión de p53 entre tejido adyacente y tejido tumoral fueron significativas en todos los estadios, tanto de adenocarcinomas como de adenomas.

1.3.3. Caracterización de endoglina

Como muestran los gráficos de Box Whisker, los valores semicuantitativos de endoglina en la lesión son muy altos e iguales en todos los estadios, tanto de adenocarcinoma como de adenoma, con excepción del estadio T3 de adenocarcinoma. En este caso, la mediana y los valores de expresión son inferiores al resto de los estadios (Fig. 31).

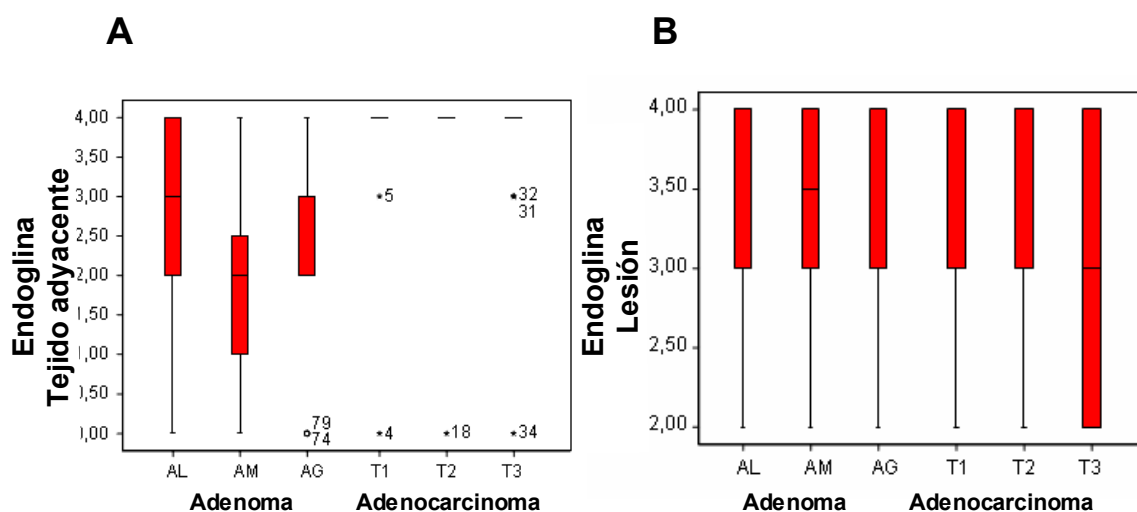


Figura 31.- Gráficos de Box Whiskers mostrando la variación en la expresión de endoglina en los casos de adenomas y adenocarcinomas estudiados (A) y en las lesiones adyacentes a los mismos (B). T: adenocarcinoma (estadios, 1, 2 y 3); A: adenoma (L, leve; M, moderado; G, grave).

Mediante el test de rangos de Mann-Whitney-Wilcoxon, podemos observar que, en los tejidos adyacentes a las lesiones, los valores de expresión de endoglina son más altos en adenocarcinomas que en adenomas. Sin embargo, en las lesiones sucede al revés: endoglina se expresa más en adenomas que en adenocarcinomas (Tabla 15).

Marcador		n	Media de rangos	Suma de rangos
Endoglina Lesión	Adenocarcinoma	36	41.61	1498.00
	Adenoma	46	41.41	1905.00
	Total	82		
Endoglina Adyacente	Adenocarcinoma	36	55.29	1990.50
	Adenoma	46	30.71	1412.50
	Total	82		

Tabla 15.- Expresión de endoglina en la lesión y en el tejido adyacente, tanto en adenocarcinomas como en adenomas. Análisis mediante el test de rangos de Mann-Whitney-Wilcoxon.

En el análisis de endoglina, también se realizó el estudio de expresión de este marcador entre pares independientes. Como se observa en la Tabla 16, este análisis demostró que endoglina se expresa más en los tejidos adyacentes a adenocarcinomas que en los adyacentes a adenomas. Sin embargo, las diferencias de expresión de endoglina en las lesiones no mostraron valores significativos.

Pares de estadios		Endoglina Lesión P≤0.05	Endoglina Tejido adyacente P≤0.05
Carcinoma T1	AL	0,818	0.025
Carcinoma T2	AL	0,892	0.007
	AM	0,797	0.001
	AG	0,763	0.003
Carcinoma T3	AL	0,482	0.023
	AM	0,536	0.002
	AG	0,560	0.005

Tabla 16.- Análisis de la expresión de endoglina entre pares independientes de adenomas y adenocarcinomas. T: adenocarcinoma (estadios, 1, 2 y 3); A: adenoma (L, leve; M, moderado; G, grave). Se muestran exclusivamente los pares en los que hay diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

1.3.4. Caracterización de KLF6

En los gráficos de Box Whisker, se puede apreciar que la expresión de KLF6 es mucho más elevada en lesiones, y dentro de estas, es mayor en adenocarcinomas que en adenomas (Fig. 32).

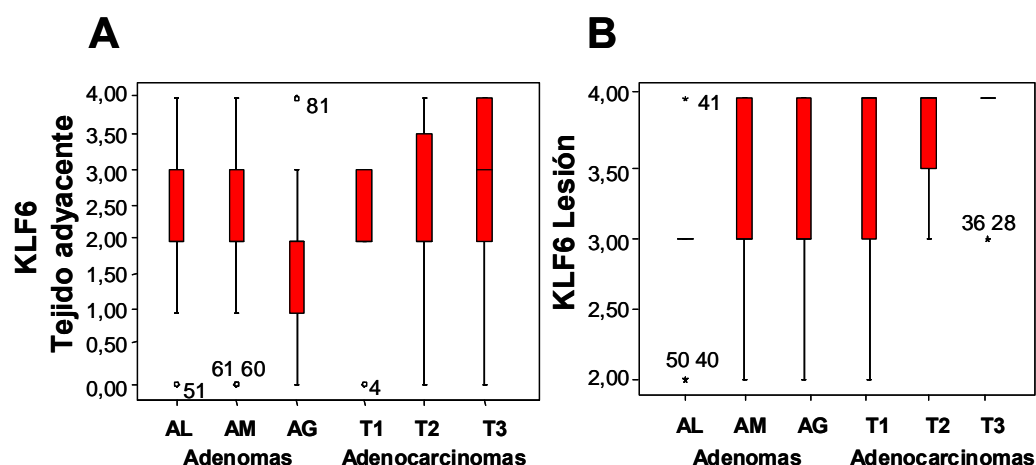


Figura 32.- Gráficos de Box Whiskers mostrando la variación en la expresión de KLF6 en los casos de adenomas y adenocarcinomas estudiados (A) y en las lesiones adyacentes a los mismos (B). T: adenocarcinoma (estadios, 1, 2 y 3); A: adenoma (L, leve; M, moderado; G, grave).

Mediante el test de rangos de Mann-Whitney-Wilcoxon, podemos observar que KLF6 posee valores más elevados en adenocarcinomas que en adenomas, en las lesiones. Los mismos resultados de expresión se observaron en los tejidos adyacentes a la lesión (Tabla 17).

Marcador		n	Media de rangos	Suma de rangos
KLF6 Lesión	Adenocarcinoma	36	52.25	1881.00
	Adenoma	46	33.09	1522.00
	Total	82		
KLF6 Adyacente	Adenocarcinoma	36	47.38	1705.50
	Adenoma	46	36.90	1697.50
	Total	82		

Tabla 17.- Expresión de KLF6 en la lesión y en el tejido adyacente, tanto en adenocarcinomas como en adenomas. Análisis mediante el test de rangos de Mann-Whitney-Wilcoxon.

Asimismo, también se realizó el estudio de expresión la expresión de KLF6 entre pares independientes (Tabla 18). Este análisis demostró que las diferencias de expresión de KLF6 sólo son significativas en las lesiones, y en éstas, entre los pares independientes: adenoma leve-adenocarcinoma T2 y T3; adenoma moderado-adenocarcinoma T2 y T3 y adenoma grave- adenocarcinoma T2 y T3. Sin embargo, no hay diferencias significativas entre los diferentes estadios de adenomas ni entre los de adenocarcinomas.

Pares de estadios		KLF6 Lesión P≤0.05	KLF6 Tejido adyacente P≤0.05
Carcinoma T2	AL	0.000	0.644
	AM	0.017	0.396
	AG	0.026	0.068
Carcinoma T3	AL	0.000	0.144
	AM	0.011	0.064
	AG	0.018	0.015

Tabla 18.- Análisis de la expresión de endoglina entre pares independientes de adenomas y adenocarcinomas. T: adenocarcinoma (estadios, 1, 2 y 3); A: adenoma (L, leve; M, moderado; G, grave). Se muestran exclusivamente los pares en los que hay diferencias significativas (P≤0.05).

2. ANÁLISIS POR RT-PCR DE CARCINOMA DE COLON HUMANO

2.1. EXPRESION DE ENDOGLINA

La expresión de endoglina en células de epitelio de colon de los casos controles fue prácticamente nula o inexistente en todos los tejidos sanos analizados, tras 30 ciclos de amplificación. Tal y como se muestra en la figura 33 A, fueron necesarios 35 ciclos de amplificación para encontrar trazos de endoglina en tejido sano. En este sentido, se ha descrito expresión de endoglina en otro tipo de células

epiteliales, en concreto el grupo de Quintanilla *et al.*, (2003) describieron la expresión de esta proteína en células de la capa basal de epidermis murina. En el análisis de los procesos de crecimiento pre-malignos del epitelio de colón (adenomas), se observó expresión de endogлина en el 50% de las muestras analizadas, siendo especialmente marcada en los adenomas moderados (Fig. 33 B-C). En estas situaciones también se observó la aparición de ambas formas de procesamiento alternativo de endogлина, larga y corta, con aproximadamente un 50% de expresión de cada una de ellas (Fig. 33 B-C).

La expresión de endogлина se incrementó de forma progresiva en los primeros estadios de adenocarcinoma de colon (T1 y T2), mientras que disminuyó drásticamente en el estadio T3, la fase más avanzada analizada. La figura 34 muestra dicha variación en la expresión de endogлина; mientras en el estadio T1 (Fig. 34 B) no hay prácticamente expresión o es muy semejante a la encontrada en los adenomas (ver: Fig. 33), en el estadio T2 (Fig. 34 C) se produce un aumento considerable en la expresión de esta proteína, que coincide con la aparición de las dos formas de procesamiento alternativo de los ARN mensajeros, con una distribución aproximada del 50% de cada una de ellas. La expresión de ambas formas de procesamiento decae casi por completo en el estadio más avanzado (T3) de carcinoma de colón (Fig. 34 D).

La figura 35 muestra una serie de 8 tumores diferentes en estadio T2, observándose en todos ellos la aparición de las dos formas, larga (salvaje) y corta (de procesamiento alternativo) de endogлина (A). Se muestra, además, la cuantificación por densitometría de ambas formas (B), expresada como cociente: endogлина L/endogлина total (L+S). En esta relación, cuanto menor sea este cociente, mayor será su procesamiento alternativo; es decir, mayor cantidad de endogлина corta.

Asimismo, para corroborar estos resultados se llevaron a cabo ensayos de RT-PCR a partir del ARNm obtenido de muestras incluidas en parafina (Fig. 35 C). En estas muestras también se detectó la presencia del transcrito normal de endogлина y su forma de procesamiento alternativo; si bien en este caso, no se preserva tan bien la forma corta, frente a la forma larga. Es posible que el proceso de fijación y parafinado ocasione una peor conservación de los transcritos, y de ahí que en estas muestras, en comparación con las fijadas *in toto* (A), se esté detectando una menor expresión de la forma S de endogлина, la cual es más larga.

En resumen, podemos decir que los resultados obtenidos por RT-PCR, en los que se observó que la máxima amplificación del transcrito de endogлина, tuvo lugar

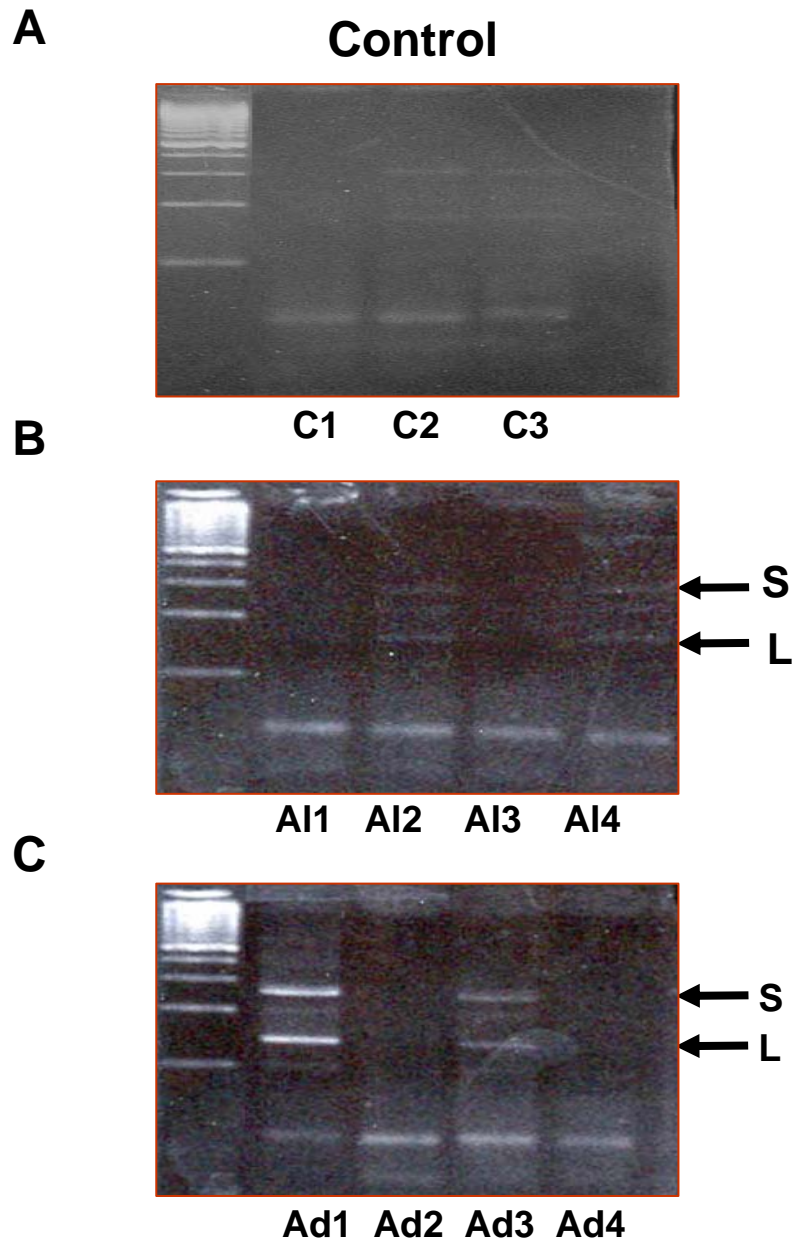


Figura 33.- RT-PCR de *endogлина* de epitelio de colon (A), y en dos tipos de adenomas; de grado leve (B) y moderado (C), (Al) denota leve y (Ad) moderado. S (“short”) marca la posición de la banda de 290 pb correspondiente a la forma de procesado alternativo de *endogлина* que da lugar a la forma corta, y L (“large”) hace referencia a la banda de 125 pb correspondiente al procesado transcripcional normal de *endogлина*. Las fotos se muestran tras 35 ciclos de amplificación partiendo de 1µg de RNA total, retrotranscrito a cDNA, y usando ¼ del cDNA total correspondiente a la RT. Cada carril corresponde a una muestra de un paciente distinto. Pb hace referencia al patrón de tamaño del ADN.

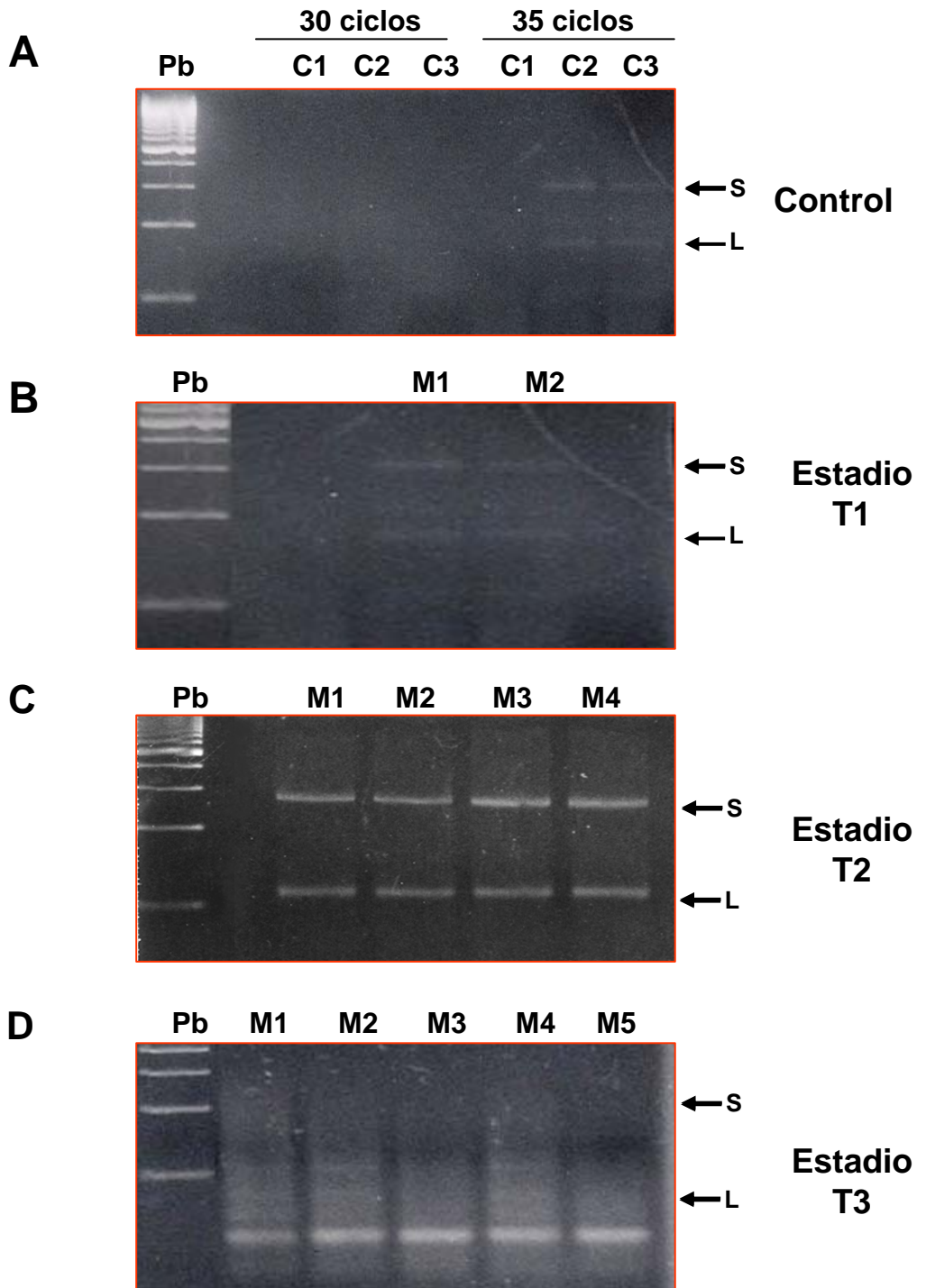


Figura 34.- RT-PCR de *endoglina* mostrando la evolución de los transcritos largos (125 pb) y cortos (290 pb) a lo largo del proceso de carcinogénesis de colon. (A) epitelio sano de colon. Se muestra el resultado tras 30 y 35 ciclos de amplificación, partiendo de 1µg de ARN total. Únicamente tras 35 ciclos se observa una ligera expresión de endoglina. (B) estadio T1 mostrando la expresión de endoglina. (C) aumento en la expresión de los transcritos largos y cortos de *endoglina* en estadio T2. (D) Ausencia casi total de amplificación de los transcritos de *endoglina* en el estadio T3. Las flechas señalan en todos los casos la altura de los dos transcritos alternativos. M1, M2, M3, M4 y en su caso M5, hacen referencia a muestras de distintos pacientes. Pb al patrón de tamaño del ADN.

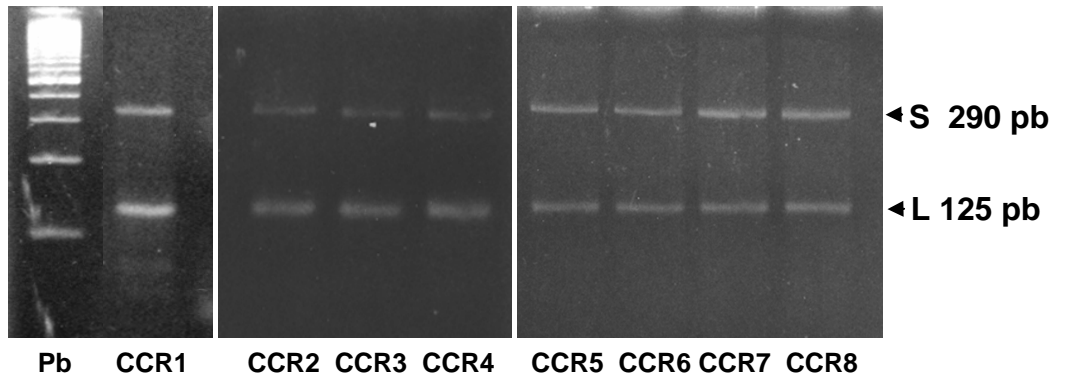
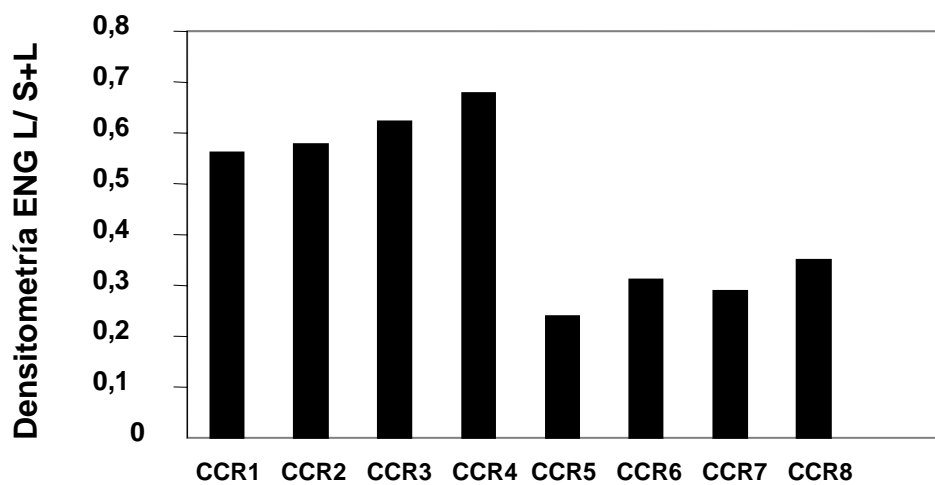
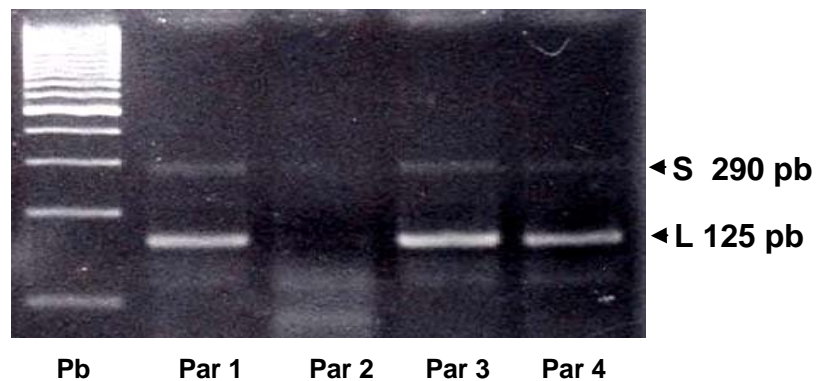
A**B****C**

Figura 35.- RT-PCR mostrando la evolución de los transcritos largos L (125 pb) y cortos S (290 pb) de Endoglina en el estadio T2 de carcinoma de colon. En (A) se muestra la RT-PCR de 8 tumores diferentes fijados en formaldehído y en (B) la cuantificación del procesado alternativo como cociente de Endoglina larga frente a Endoglina total (larga + corta). En (C) los resultados son similares a (A), pero obtenidos a partir de secciones de parafina de tumores en estadio T2.

en el estadio T2 de adenocarcinomas, coinciden con los obtenidos en los ensayos de inmunohistoquímica. Es de destacar que en esta fase de mayor expresión de endogлина, detectamos también entre un 30% y un 60% de ARNs mensajeros correspondientes a la forma corta de endogлина (o forma de procesado alternativo) (Bellón *et al.*, 1993). En la forma corta, el dominio citoplásmico de endogлина solo tiene 14 aminoácidos de los 47 que posee en la forma Larga.

2.2. EXPRESION DE KLF-6

KLF6, un factor de transcripción de expresión ubicua perteneciente a la familia Krüppel-Like-Factors, muestra una expresión moderada en epitelio de colon normal (Fig. 36 A).

Con el fin de estudiar las diversas formas de procesado alternativo descritas por Narla *et al.* (2005), se llevaron a cabo ensayos de RT-PCR usando parejas de oligonucleótidos complementarias, bien al dominio de los 3 dedos de Zinc presentes únicamente en el mensajero de la forma nativa de la proteína (salvaje), o bien una pareja de oligonucleótidos correspondiente a la zona común conservada en todas las formas de procesado alternativo (variantes, V1, V2 o V3) del ARNm de KLF6. A estas formas las designaremos como amplicón total. El origen de las distintas formas de procesamiento alternativo, los amplicones a los que darían lugar y los oligos utilizados para la amplificación se han representado en la figura 10 de la Introducción (tomada de Narla *et al.* (2005) y en los Materiales y Métodos, respectivamente.

En la figura 36 se observa la predominancia de formas normales (salvajes) en epitelio normal de colon (A) y en adenomas (B), si bien en algunas muestras de adenomas hay una disminución notable de la forma salvaje de KLF-6. No obstante, esta situación cambia al analizar las muestras de adenocarcinoma (Fig. 37). En estas muestras se observó la aparición progresiva de las formas de procesado alternativo, lo que produjo un aumento en la cantidad del amplificado total (salvaje+variantes) con respecto al salvaje, como se puede observar en el estadio T1 (Fig. 37 A). En el estadio T2 se observó un aumento en la expresión de KLF6, al tiempo que aparecieron bandas más pequeñas al tamaño esperado para el amplicón total. Probablemente, éstas son resultado de la aparición de nuevas formas aberrantes que no se ajustan a las formas variantes “standard” descritas por Narla *et al.* (2005) (posiblemente debido a la presencia de deleciones).

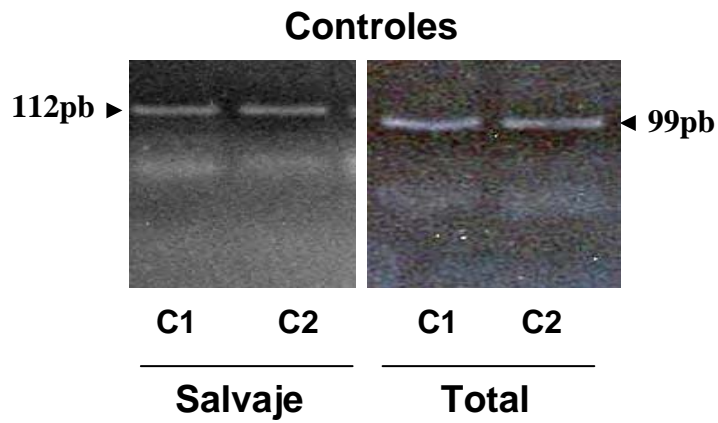
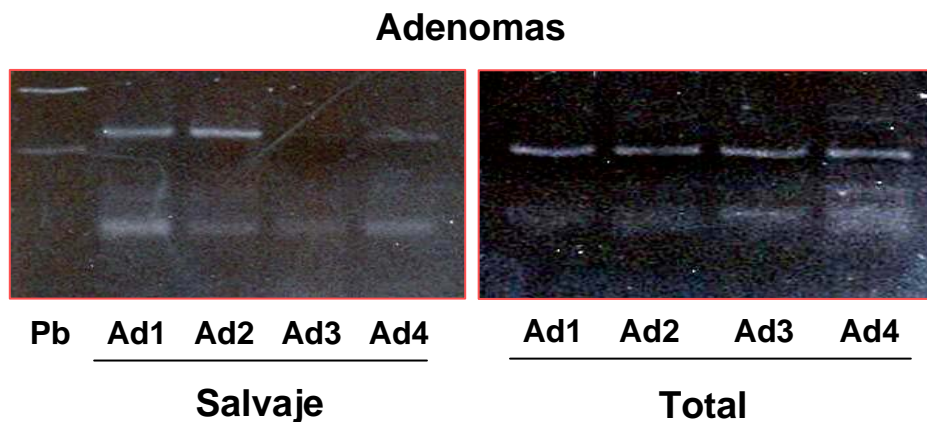
A**B**

Figura 36.- RT-PCR de KLF6 mostrando la expresión los ARNs normales (salvajes) y totales (salvaje+ formas alternativas de procesado) en epitelio sano de colon (A) y en adenomas (B). Los ARN transcritos tienen un tamaño de 112 pb en el caso de la forma salvaje de KLF6, y de 99 pb en el caso del amplicon total. En la parte inferior de los geles se pueden observar bandas que corresponden a oligonucleótidos sobrantes. Las RT-PCRs se realizaron con 1 µg de RNA total y 35 ciclos de amplificación. Pb corresponde al patrón de tamaño de AND, Ad a muestras de adenomas y C control.

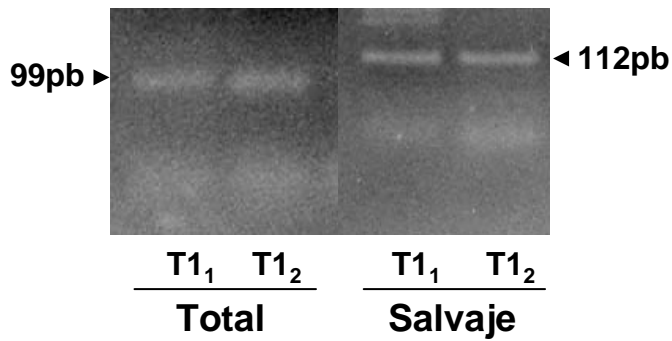
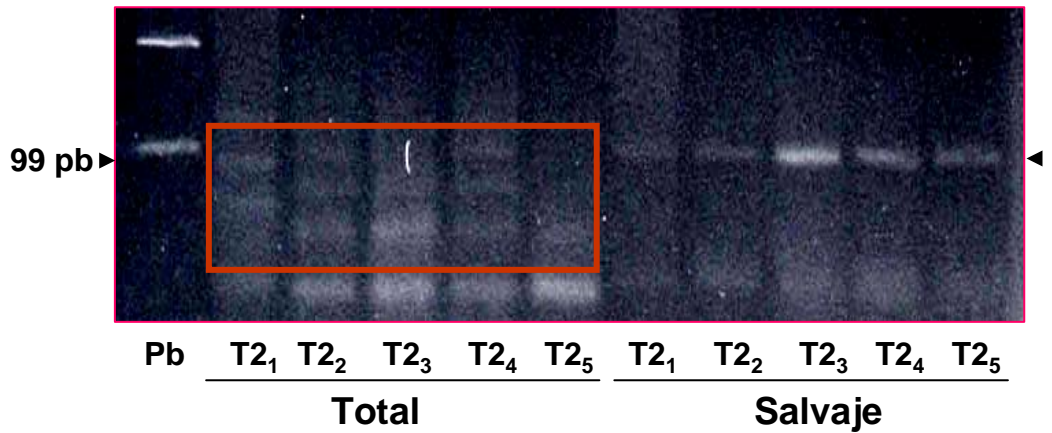
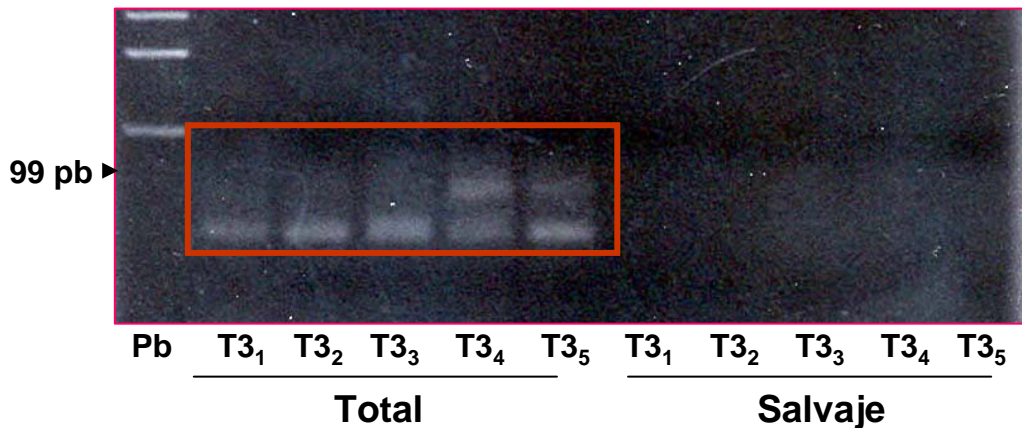
A**Estadio T1****B****Estadio T2****C****Estadio T3**

Figura 37.- Expresión de ARNs mensajeros de KLF6 en muestras de carcinoma de colon. En el estadio T1 (A) se observan bandas de 112 pb (forma salvaje) y de 99 pb (Total), en una proporción similar. En el estadio T2 (B) a medida que el proceso de carcinogénesis avanza, se detecta un predominio de formas alternativas de procesamiento de los transcritos de KLF6 (encuadrados en rojo). Estas formas no solo aparecen como bandas de 99 pb, sino como bandas de tamaños inferiores debido a la aparición de formas anómalas. En estadio T3 (C), no se detectan bandas correspondientes al transcrito normal de KLF6 (Salvaje), y sin embargo si detectamos bandas de amplificación de las formas de procesamiento alternativo. Pb denota el patrón de tamaño del ADN. T1, T2 o T3 hace referencia a muestras de diferentes estadios de adenocarcinoma.

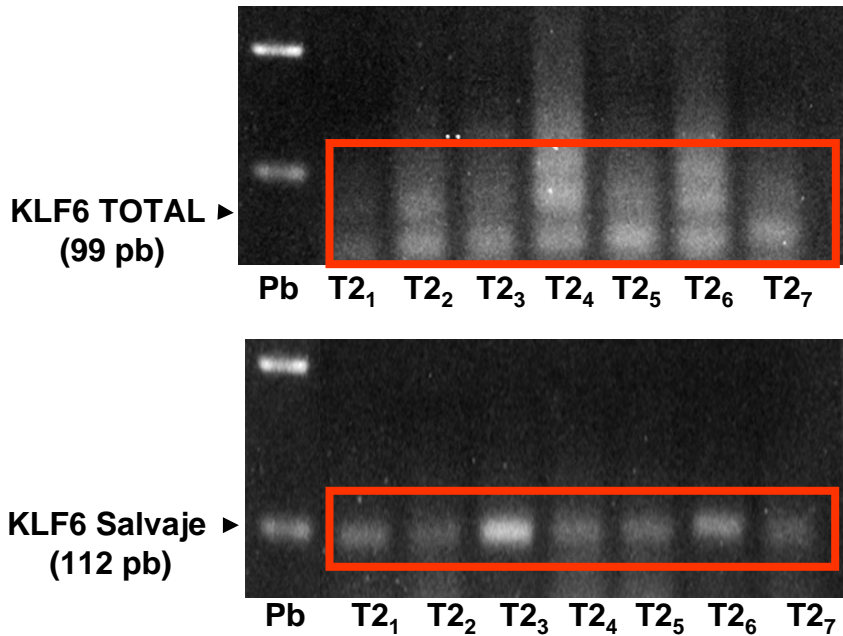
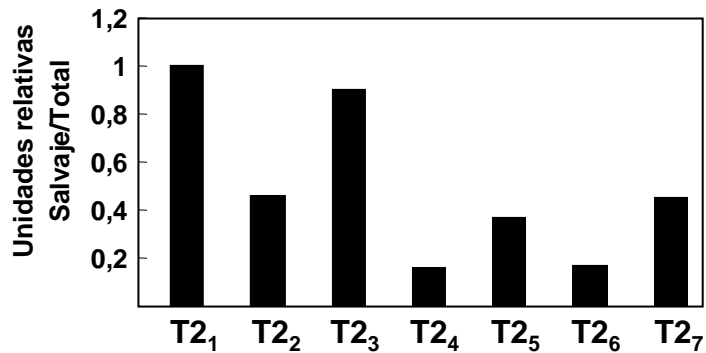
A**B**

Figura 38.- RT-PCR del ARNm de KLF6 y relación entre la forma salvaje y las formas de procesado alternativo en muestras de adenocarcinoma de colon en estadio T2. En (A) los transcritos correspondientes al ARNm salvaje de KLF6 tienen un tamaño de 112 pb mientras que el amplicón total tiene un tamaño de 99 pb. En (B) se muestra una cuantificación del grado de procesamiento alternativo de KLF6 en este estadio T2. Se representa el cociente de los valores obtenidos por densitometría de las formas salvaje y las totales. Un cociente igual a 1 indica procesado normal del transcrito de KLF6. Sin embargo cuanto menor sea el cociente mayor será el grado de aparición de formas de procesado alternativo. El recuadro rojo indica las bandas de amplificación consideradas para la densitometría. T₂₁-T₂₇ denota muestras procedentes de distintos tumores. Pb se refiere al patrón de tamaño de ADN usado.

Finalmente, en el estadio T3, se observó una predominancia total de las formas de procesado alternativo ya que no se obtuvo la amplificación de la forma salvaje de KLF6 (Fig. 37 C). Estos resultados coinciden con lo observado en la progresión del cáncer de próstata por Narla *et al.* (2005) en el que se producía un aumento progresivo de las formas de procesado alternativo a medida que aumenta el proceso de malignización en este tipo de cáncer.

La figura 38 representa la cuantificación en detalle de las diversas formas de procesado total y de la forma salvaje de KLF6 a partir de 7 muestras de tumores en estadio T2. Como se puede observar, en la mayoría de estas muestras la expresión de las formas alternativas es mayor a la forma normal, tal y como se deduce del cociente entre formas salvajes/formas totales, que posee un valor menor de 0.5 en 5 de los 7 tumores analizados.

En general, estos resultados corroboran los obtenidos en los ensayos de inmunohistoquímica, en los que se observó un aumento progresivo de la expresión de KLF6 a medida que avanza el proceso de malignización tumoral (ver Figs. 27 y 28). En este caso, si bien las PCRs no son cuantitativas, si podemos ver un aumento general en la intensidad de la señal de los amplicones de KLF6. Sin embargo, lo que es más significativo, es el cambio en la aparición de formas de procesamiento alternativo. Desde la expresión del mensajero normal de KLF6 (que es funcional) en epitelio sano y adenomas, hasta la aparición predominante de formas de procesamiento alternativo en el caso de muestras de CCR. Estas variantes de procesamiento (al menos las descritas anteriormente) no son funcionales tal y como se demostró en el caso de cáncer de próstata, descrito por Narla *et al.* (2005).

3.- ESTUDIOS EN CULTIVOS CELULARES

3.1.- MORFOLOGÍA DE LAS LÍNEAS CELULARES

Las figuras 39 y 40 muestran la morfología de las líneas celulares de adenocarcinoma de colon utilizadas en el estudio Caco-2 y SW-480. Las células Caco-2 crecen en monocapa formando colonias bien organizadas, en las que cada célula interacciona con las vecinas, característica de las células epiteliales. Los núcleos de las células interfásicas presentan cromatina laxa y nucleolos bien definidos. Las células SW-480 constituyen una población heterogénea formada por

células alargadas fusiformes, bien adheridas al sustrato y núcleos con cromatina laxa (SW-480ADH) y células de forma redondeada, de menor tamaño y que se organizan formando cadenas celulares o en agregados. Además, muestran una escasa adhesión entre ellas y con el sustrato (SW-480R). Las diferencias morfológicas entre ambos tipos de poblaciones celulares, aisladas y crecidas separadamente, se confirman en la figura 40 (A-B, A'-B') y en la que además, se aprecia la elevada basofilia del citoplasma de la población SW-480ADH en comparación con el de SW-480R.

3.2.- EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN

La distribución y expresión de algunos de los componentes del complejo de adhesión célula-célula en células epiteliales, cadherina-E/cateninas, se observa en las Figuras 41 y 42. En células Caco-2 se aprecia una intensa expresión de cadherina-E a nivel de membrana plasmática. Sin embargo, la distribución y organización de la proteína no es igual en la región basal y en la apical de las células. Mientras en la región apical la proteína se dispone de forma homogénea, en la basal aparece más irregular y difusa. Asimismo, se observan zonas en las que las membranas de las células vecinas aparecen separadas (Fig. 41 A). Por el contrario, las células SW-480, tanto las ADH como las R (Fig. 42), presentan una menor expresión de la cadherina-E en relación a lo observado en Caco-2. En ambas poblaciones celulares, esta proteína se muestra tanto difusa como en forma de puntos discretos fluorescentes a nivel de membrana. También se observa reacción fluorescente, a modo de puntos discretos, en el citoplasma de ambas poblaciones celulares pero especialmente en las ADH (Fig. 42 A'-D').

En las uniones célula-célula, la cadherina-E a través de su región citoplasmática se une a las cateninas para formar los complejos de adhesión cadherina/cateninas. Por ello, a continuación analizamos la expresión de β -catenina en nuestros modelos celulares (Figs. 43 y 44). La inmunofluorescencia indirecta para esta proteína muestra que en células Caco-2, β -catenina presenta un patrón de localización semejante al de cadherina-E, tanto en las regiones basales como apicales de las células. También se puede apreciar una cierta fluorescencia difusa en el citoplasma, especialmente en la región basal. Sin embargo, ninguna de las dos poblaciones celulares de SW-480 (ADH y R) mostró expresión de la proteína a nivel de membrana. La localización de la misma es principalmente nuclear, aunque

también se puede observar una cierta expresión difusa en el citoplasma. Este patrón de localización de β -catenina en SW-480 ha sido previamente descrito por Larriba *et al.* (2005).

Los complejos de adhesión célula-célula mediados por cadherina conectan con los microfilamentos de actina de forma altamente organizada. Las figuras muestran la distribución de los microfilamentos de actina, tras su determinación mediante faloidina-TRITC (Figs. 45 y 46), en células Caco-2 y en SW-480 y observados en microscopía de fluorescencia bajo luz de excitación verde. Las diferentes micrografías obtenidas desde la región apical a la basal de células Caco-2, ponen de manifiesto que los microfilamentos se disponen de manera relativamente organizada. Se sitúan preferentemente en la región subcortical, en las regiones medias y apicales, y formando fibras de estrés en las regiones basales, en la unión de las células al sustrato. Por el contrario, en las dos poblaciones celulares de SW-480 (R y ADH) (Fig. 46 A-C y A'-C'), la actina se dispone de forma más desorganizada y difusa. En ambos casos se localiza principalmente como actina subcortical y en ninguno de los dos tipos celulares se pueden apreciar fibras de estrés. No obstante, en las regiones de contacto entre células se observa una mayor intensidad de fluorescencia, indicando mayor organización de la actina filamentosa, incluso en las regiones basales de las células redondeadas (Fig. 46 C).

3.3.- EXPRESIÓN DE ENDOGLINA

Endoglina es una glicoproteína transmembrana, altamente expresada en células endoteliales. En la figura 47, se muestra la inmunodetección de esta proteína y su patrón de expresión, en forma de punteado, en la línea celular endotelial HMEC-1 y en la línea celular de cáncer de colon, Caco-2. Mientras que todas las células HMEC-1, utilizadas como control positivo, muestran expresión de endoglina, en las células Caco-2, la expresión de esta proteína es variable; se observan colonias grandes en las que las células no presentan inmunotinción (Fig. 47 B-B') y otras que presentan una expresión generalizada (Fig. 47 C-C'), y todas las células de colonias pequeñas presentan inmunoreactividad a nivel de membrana (Fig. 47 D-D'). En el caso de las dos líneas de adenocarcinoma de colon, SW-480ADH y SW-480R (Fig. 48), la expresión de endoglina y su distribución en la membrana fue muy similar a la observada en las células HMEC-1. Estos datos corroboran los resultados obtenidos en los ensayos de Western-blot, en los que Caco-2 mostraron expresión moderada

de endoglina, mientras que SW480-ADH y SW480-R presentaban niveles muy parecidos de esta proteína (ver: Figs. 51 y 52)

3.4.- EXPRESIÓN DE KLF6

KLF6, un factor de transcripción de expresión ubicua, y descrito recientemente como un gen supresor tumoral, en situaciones fisiológicas normales puede ser detectado tanto en el citoplasma como en el núcleo. Narla *et al.* (2005) describieron que este factor de transcripción posee una serie de formas de procesamiento alternativo (V1, V2 y V3). Estas variantes se caracterizan por no presentar ni los dominios de unión al ADN (dominios en dedos de Zn), ni la región de localización nuclear que están presentes en la forma salvaje de KLF6. Parece ser que esto podría ser la causa por la que estas variantes no se localizan en el núcleo y por lo tanto son formas de KLF6 no funcionales. En el caso de la línea celular Caco-2, KLF6 se detecta tanto en el núcleo como en el citoplasma (Fig. 49), coincidiendo con los resultados obtenidos en los ensayos de Western-blot en los que se detectó mayoritariamente la forma salvaje de esta proteína (Figs. 51 y 52). Asimismo, en el caso de las líneas SW-480ADH y SW-480R, KLF6 se localizó en el núcleo y en el citoplasma (Fig. 50). La localización citoplasmática sugiere la presencia de formas de procesamiento alternativo, hecho corroborado en los ensayos de Western-blot en los que se obtuvieron formas de procesamiento alternativo de KLF6.

CACO-2

SW-480

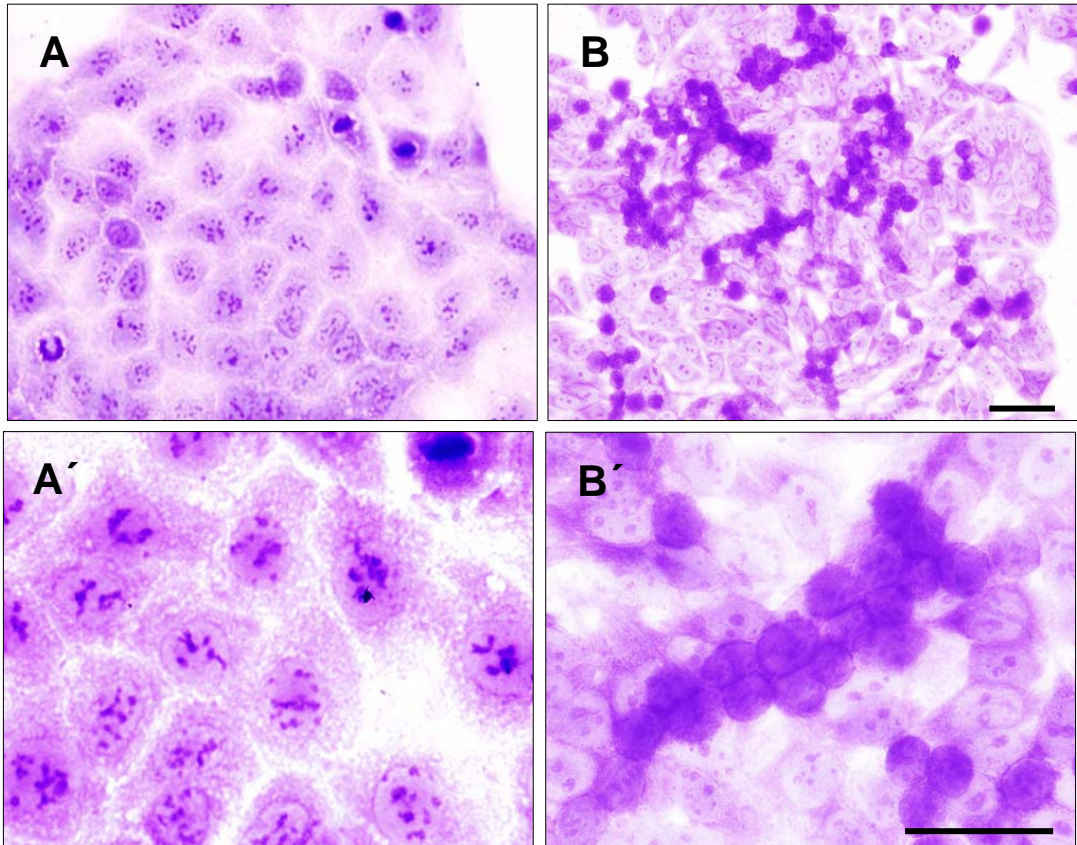


Figura 39.- Morfología de las líneas celulares de adenocarcinoma de colon Caco-2 y SW-480. La población celular de Caco-2 es homogénea, las células crecen en monocapa formando colonias bien organizadas y presentan núcleos con cromatina laxa con varios nucleolos evidentes (A, A'). Por el contrario, la población de SW-480 es heterogénea, formada por células fusiformes y células redondeadas. Las primeras, presentan un citoplasma intensamente teñido, núcleos bien definidos con más de un nucleolo y las segundas, son de menor tamaño, con escaso citoplasma y nucleolos poco evidentes (B, B'). Las células, crecidas sobre portaobjetos, fueron fijadas en metanol y posteriormente teñidas con AT. Barra de escala: 20 μ m

SW- 480 ADH

SW- 480 R

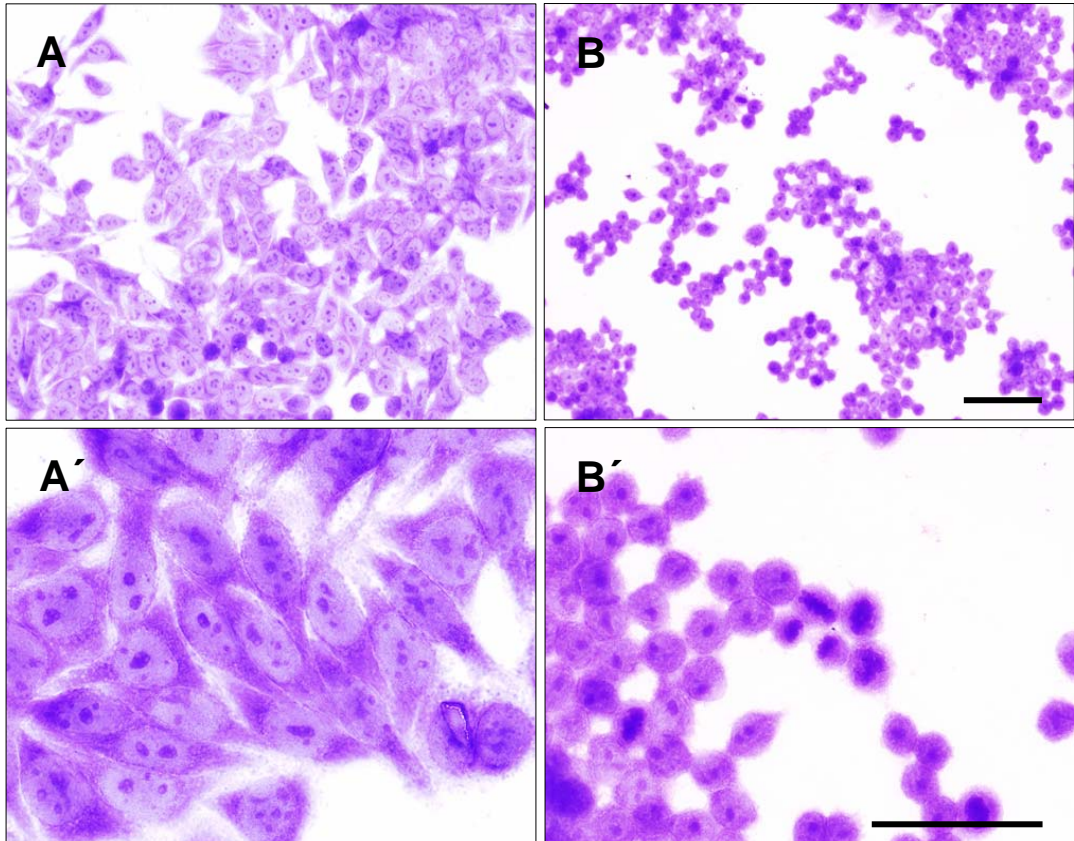


Figura 40.- Morfología de las dos poblaciones celulares de la línea de adenocarcinoma de colon SW-480. La población SW-480ADH (adheridas), es homogénea y está formada por células fusiforme con citoplasma intensamente teñido, núcleos bien definidos y presencia de más de un nucleolo, además presentan una elevada adherencia al sustrato. La población de SW-480R (redondeadas), presentan baja adherencia a sustrato, forman agregados, con escaso citoplasma, núcleo poco definido y presencia de uno o dos nucleolos. Las células se crecieron en cubreobjetos, se fijaron en metanol y posteriormente fueron teñidas con AT. Barra de escala: 20 μ m

Cadherina-E, CACO-2

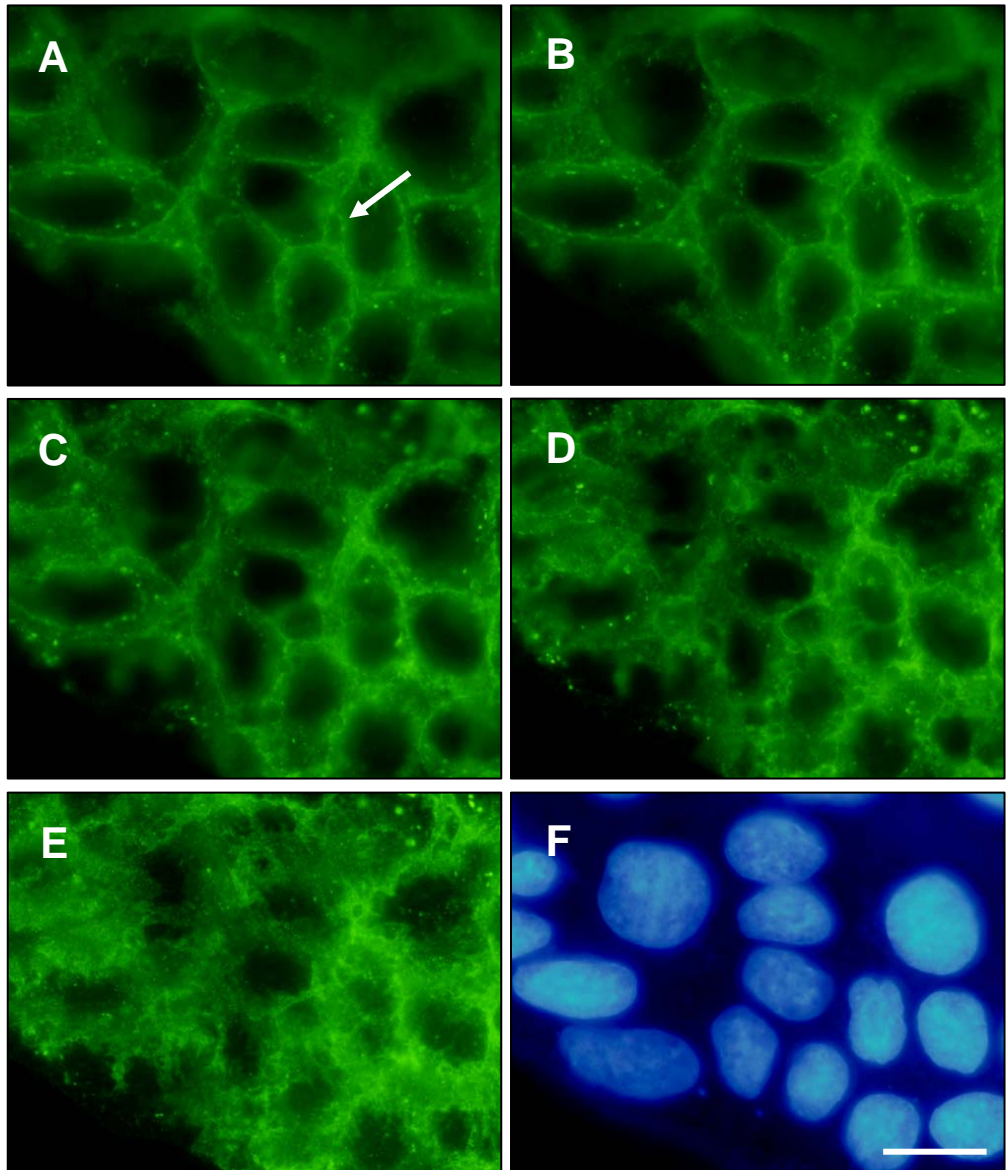


Figura 41.- Variación de la expresión y distribución de cadherina-E en células Caco-2 a diferentes planos focales; A: zona apical, E: zona basal. La cadherina-E se sitúa en las uniones célula-célula y se observa una mayor expresión en la región basal (E) en relación a la apical (A). La adhesión no es homogénea, existiendo regiones en las que las membranas celulares aparecen separadas (flecha). En E se muestra la tinción nuclear con H-33258. Barra de escala: 20 μ m.

SW-480R

SW-480ADH

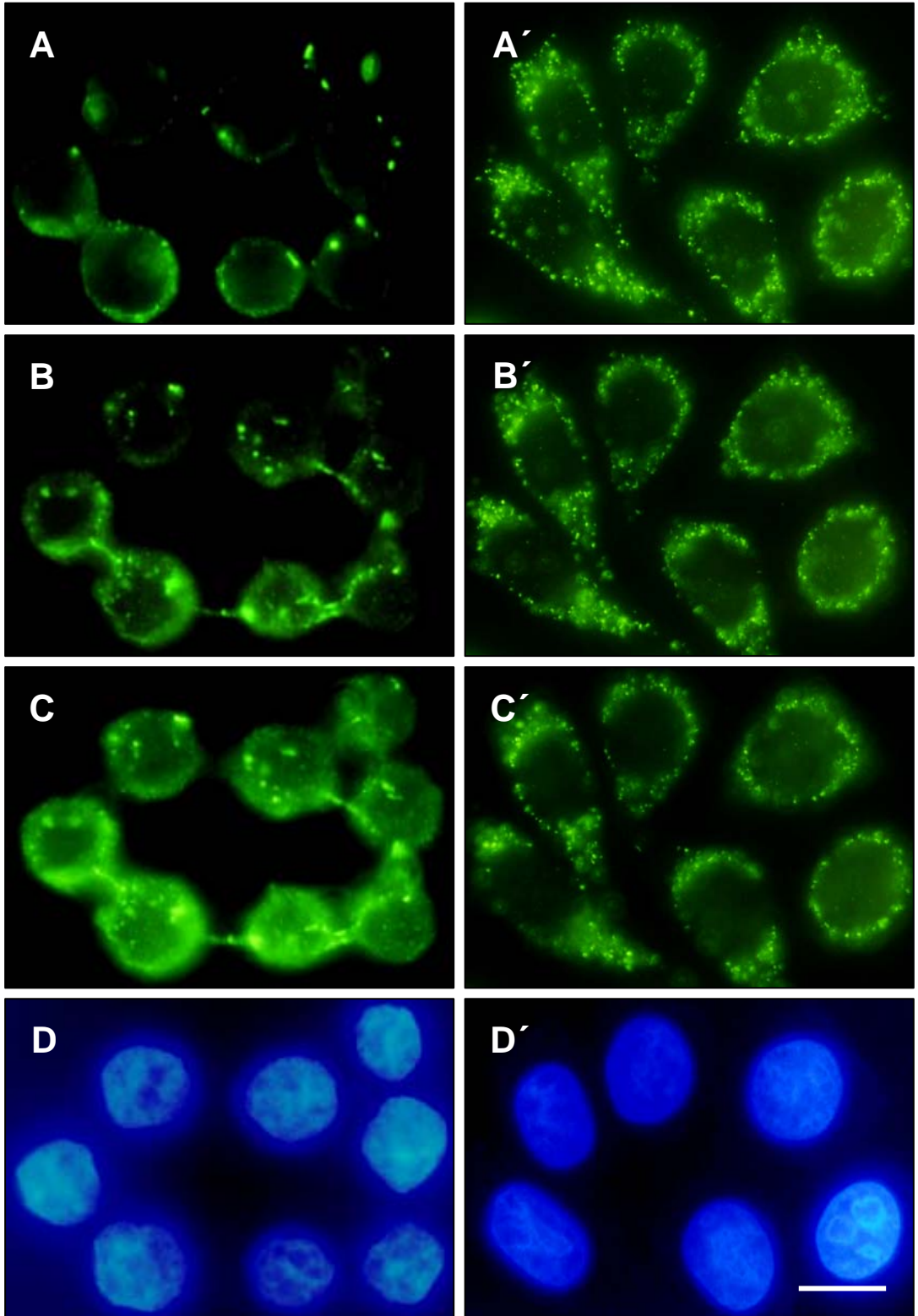


Figura 42.- Fotografías secuenciales a diferentes planos focales, desde la zona apical (A, A') a la basal (C, C'), mostrando la expresión de cadherina-E en las células SW-480. Ambas poblaciones celulares, adheridas (ADH) y redondeadas (R), muestran cadherina-E desorganizada, la cual se distribuye tanto de forma difusa como en puntos discretos a lo largo de la membrana. En D y D' se muestra la contratinción nuclear con H-33258. Barra de escala: 10 μ m.

β -Catenina, CACO-2

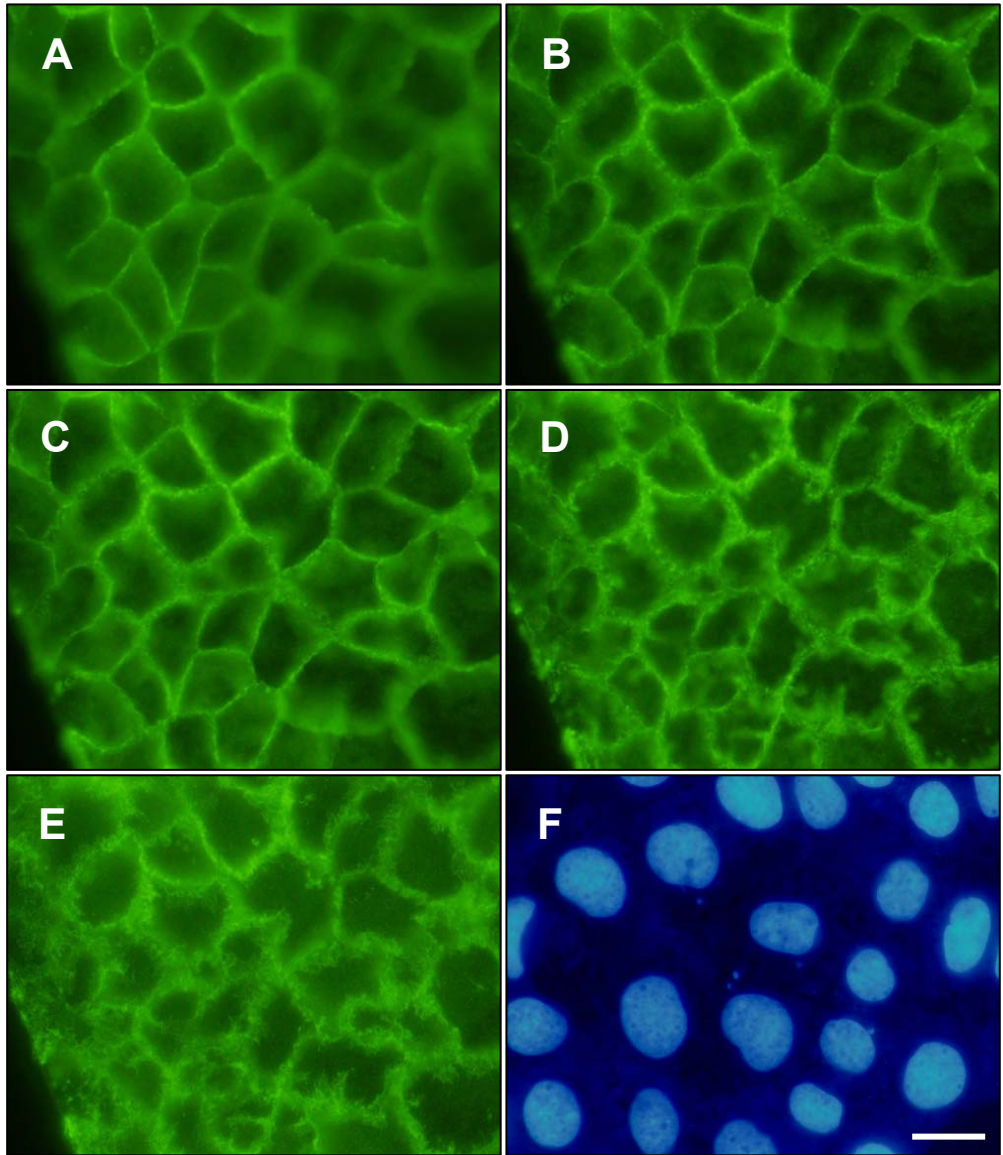


Figura 43.- Expresión de β -Catenina en células Caco-2 a diferentes planos focales: desde la región apical (A) a la basal (E). β -Catenina se localiza principalmente a nivel de membrana, observándose bien organizada en la región apical y desorganizada en la basal. Asimismo, se aprecia cierta fluorescencia difusa en la zona basal de las células (E). Los núcleos fueron contrateñidos con H-33258 (F'). Barra de escala: 10 μ m.

β -Catenina, SW-480

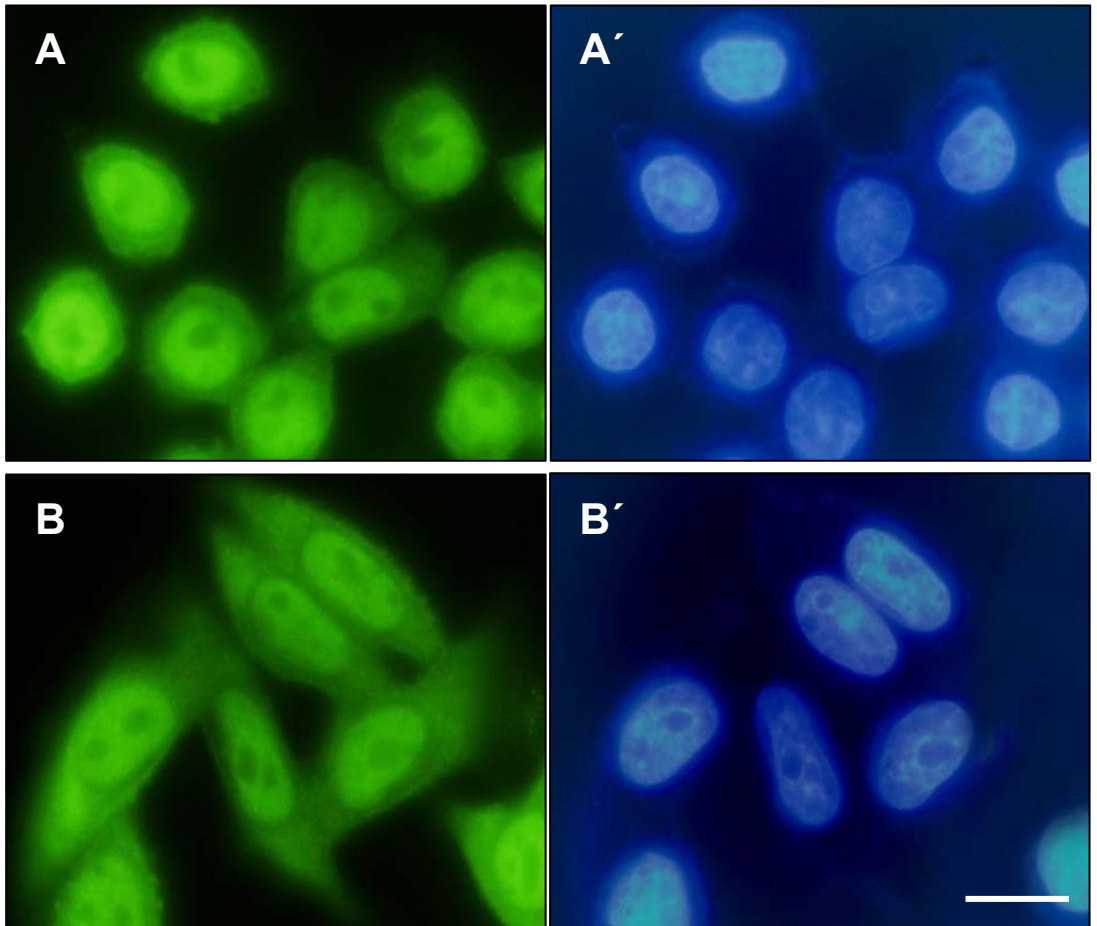
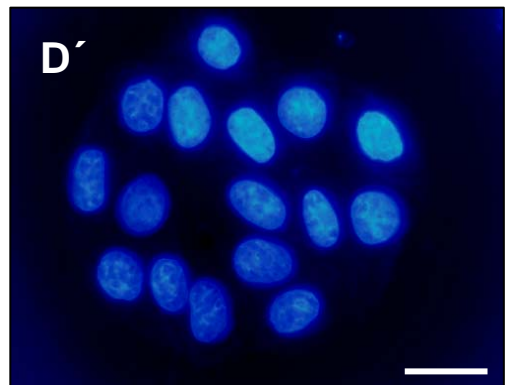
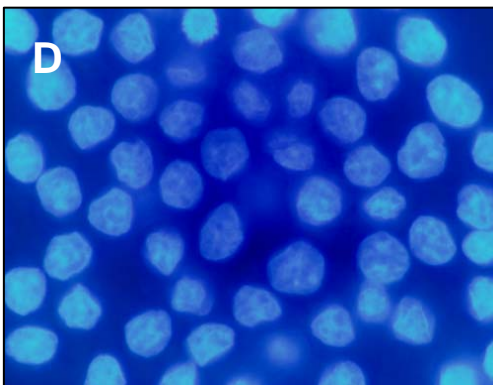
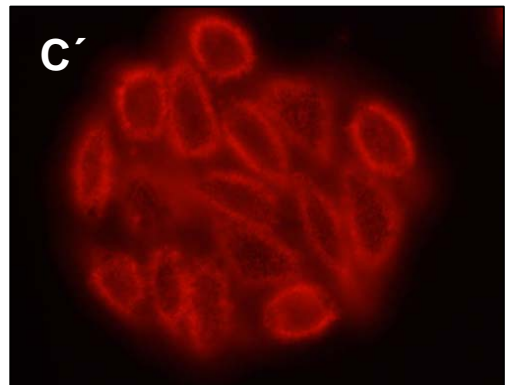
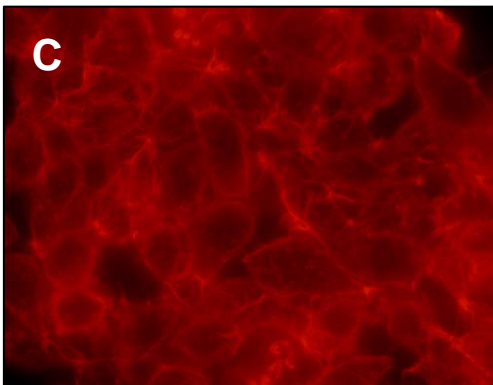
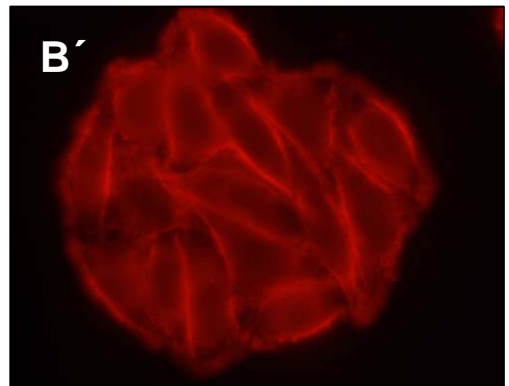
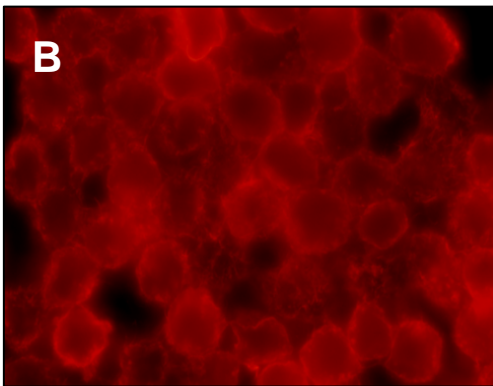
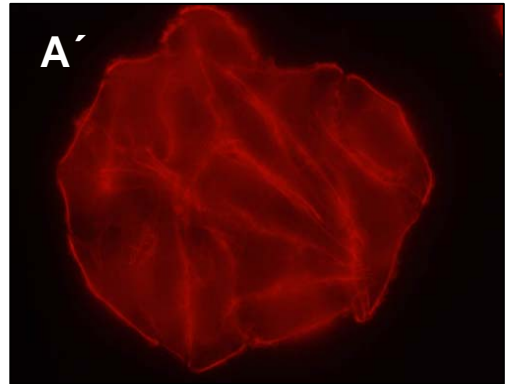
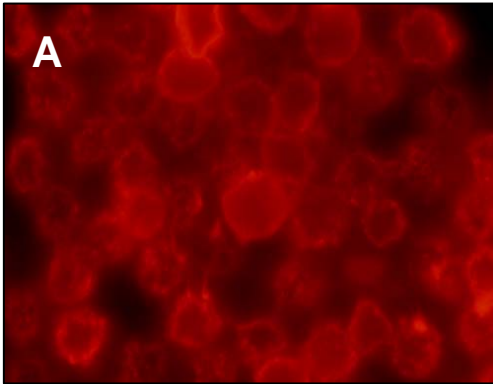


Figura 44.- Expresión de β -Catenina en células SW-480R (A) y SW-480ADH (B). Ambas poblaciones celulares muestran una elevada expresión de β -Catenina, la cual se sitúa principalmente en el núcleo, aunque también aparece de forma difusa en el citoplasma. Los núcleos fueron contrateñidos con H-33258(A',B'). Barra de escala: 10 μ m.

SW-480R

SW-480ADH



CACO-2

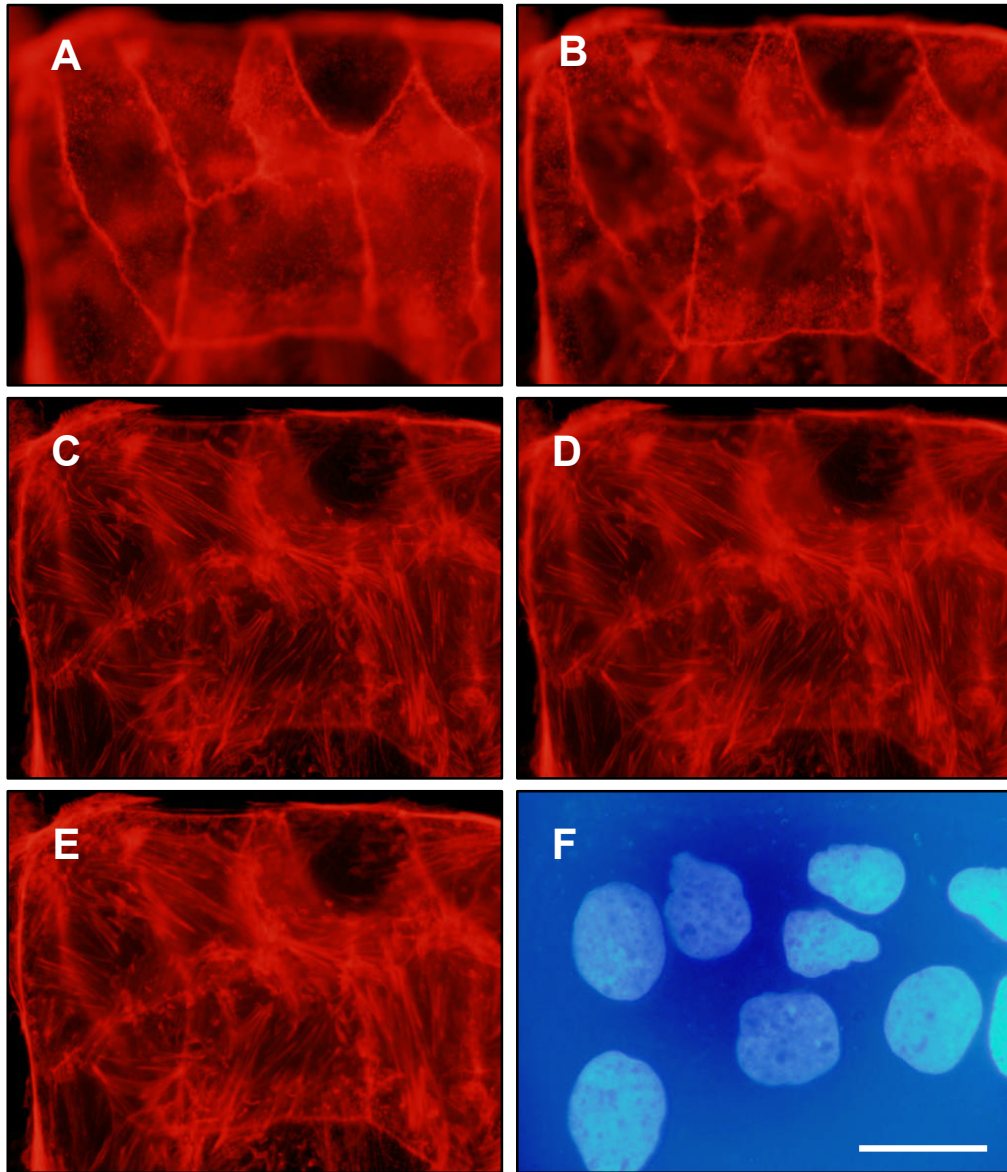


Figura 45.- Distribución de actina filamentosa en los diferentes planos focales apical medio y basal (de A a E) de células Caco-2. Los microfilamentos de actina se disponen de forma ordenada en las zonas subcorticales en la región apical, mientras que en la región basal se disponen formando fibras de estrés, importantes en la adhesión al sustrato. Los núcleos fueron contrateñidos con H-33258 (F). Barra de escala: 15 μ m.

Figura 47.- Inmunodetección de endoglina en la línea celular endotelial HMEC-1 (A) y en la de cáncer de colon, Caco-2 (B, C y D). Endoglina, una proteína endotelial, se expresa en la membrana con una distribución en forma de punteado, como se puede apreciar en la línea celular HMEC-1 (A), utilizada como control positivo. En la línea celular Caco-2, se puede apreciar una expresión heterogénea de endoglina. Las colonias grandes, expresan niveles heterogéneos de endoglina, encontrándose colonias negativas (B-B') y positivas (C-C'). Sin embargo, todas las colonias pequeñas son positivas para esta proteína (D-D'). B-D': contraincubación nuclear con H-33258. Barra de escala: (A) 20 μ M; (B-D) 75 μ m.

Endoglin

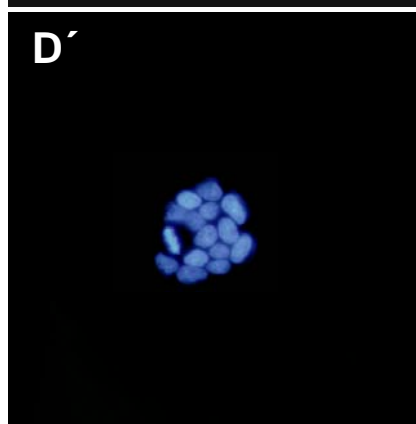
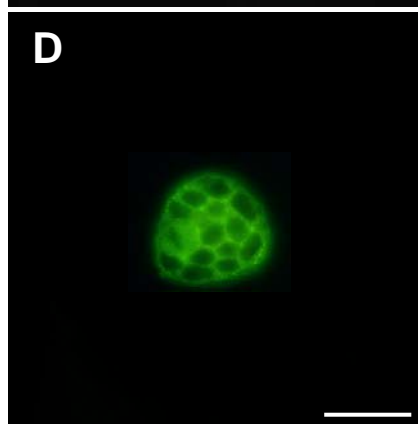
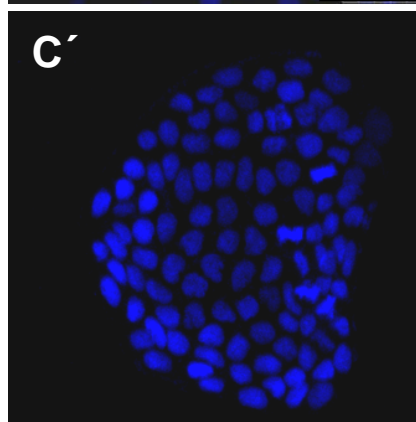
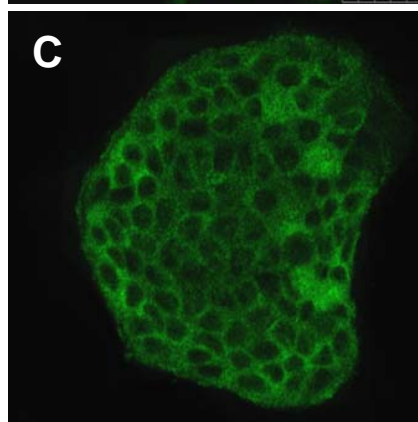
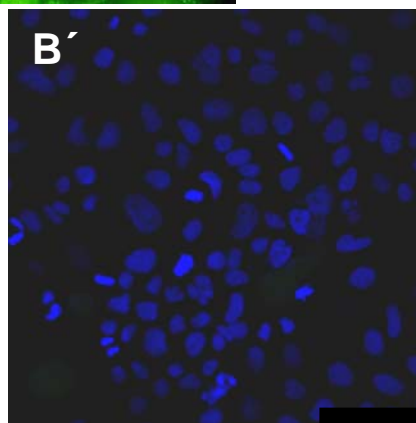
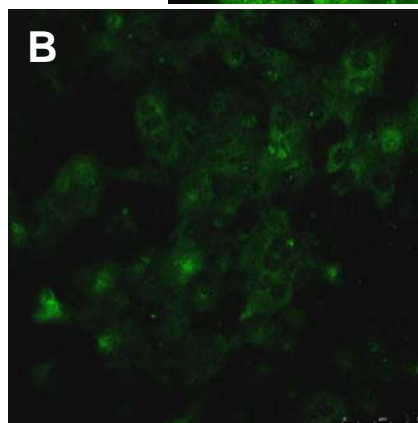
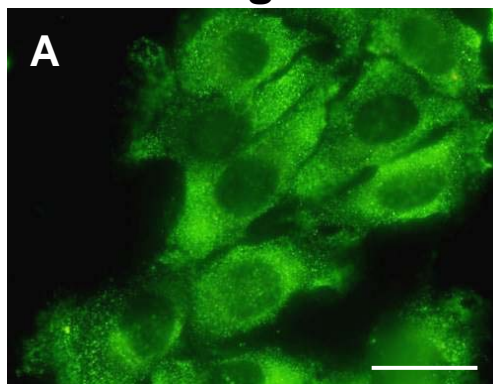


Figura 46.- Microfotografías de un mismo campo tomadas a diferentes planos focales, desde la zona apical a la basal (A-C) de células SW-480, redondeadas (R) o adheridas (ADH). Se aprecia una marcada expresión de actina en las regiones subcorticales, tanto a nivel apical como basal. Las células no presentan adhesión entre ellas, pero sí con el sustrato. En la región basal, se observa un aumento de la expresión de actina, debido a la forma plana que adopta la célula para facilitar su adhesión al sustrato. Los núcleos fueron contrateñidos con H-33258 (D, D´). Barra de escala: 15 μ m.

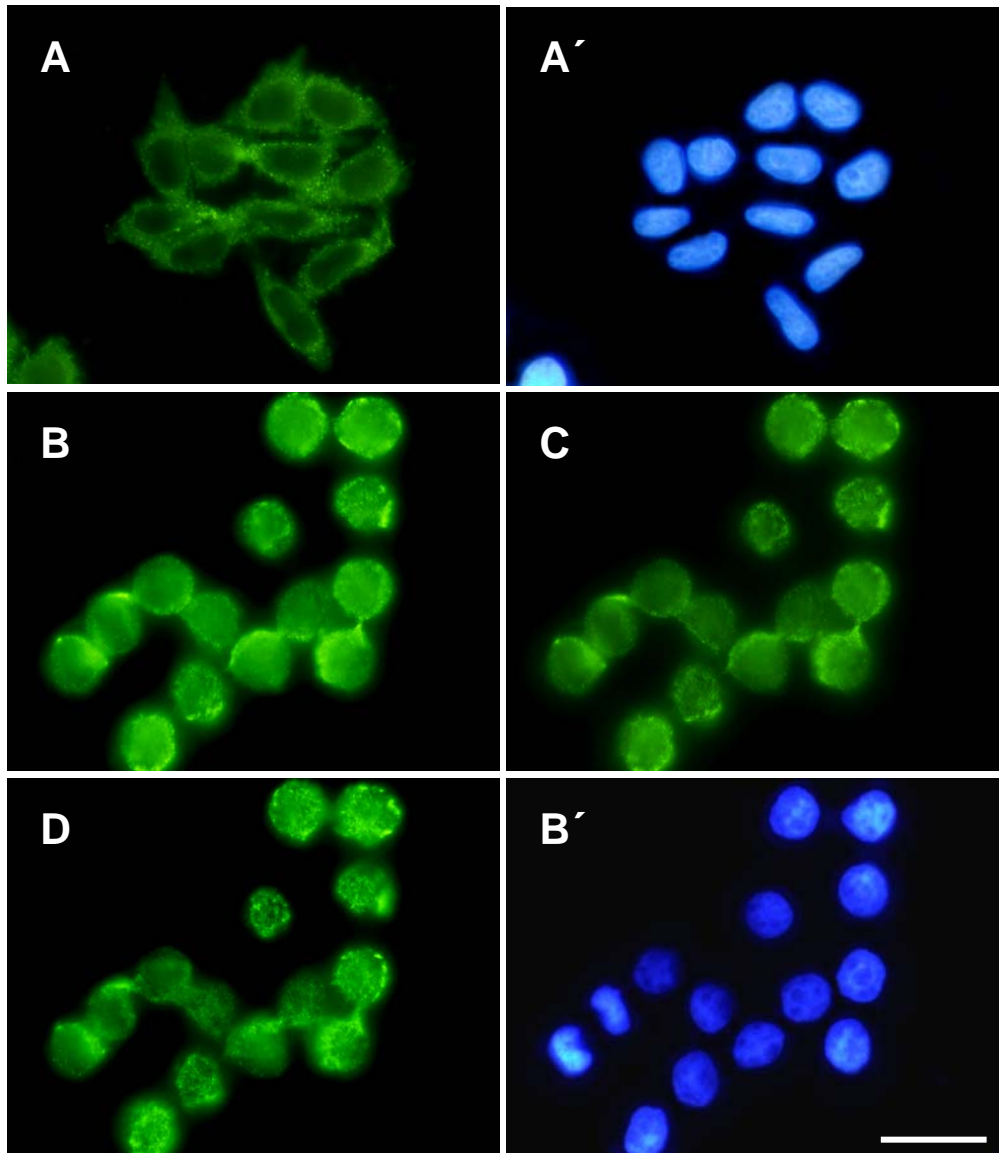


Figura 48.- Inmunodetección de endoglina en la línea de cáncer de colon SW480. Ambas subpoblaciones SW480-ADH (A) y SW480-R (B-D), presentan niveles de expresión similares, entre ellas y a la de HMEC-1 utilizada como control positivo (ver Fig. 47). De la subpoblación R se muestra la expresión de endoglina en las regiones basales (A), medias (C) y apicales (D). A' y B' muestran la contratinción nuclear con H-33258. Barra de escala: 20 μ m

KLF6, CACO-2

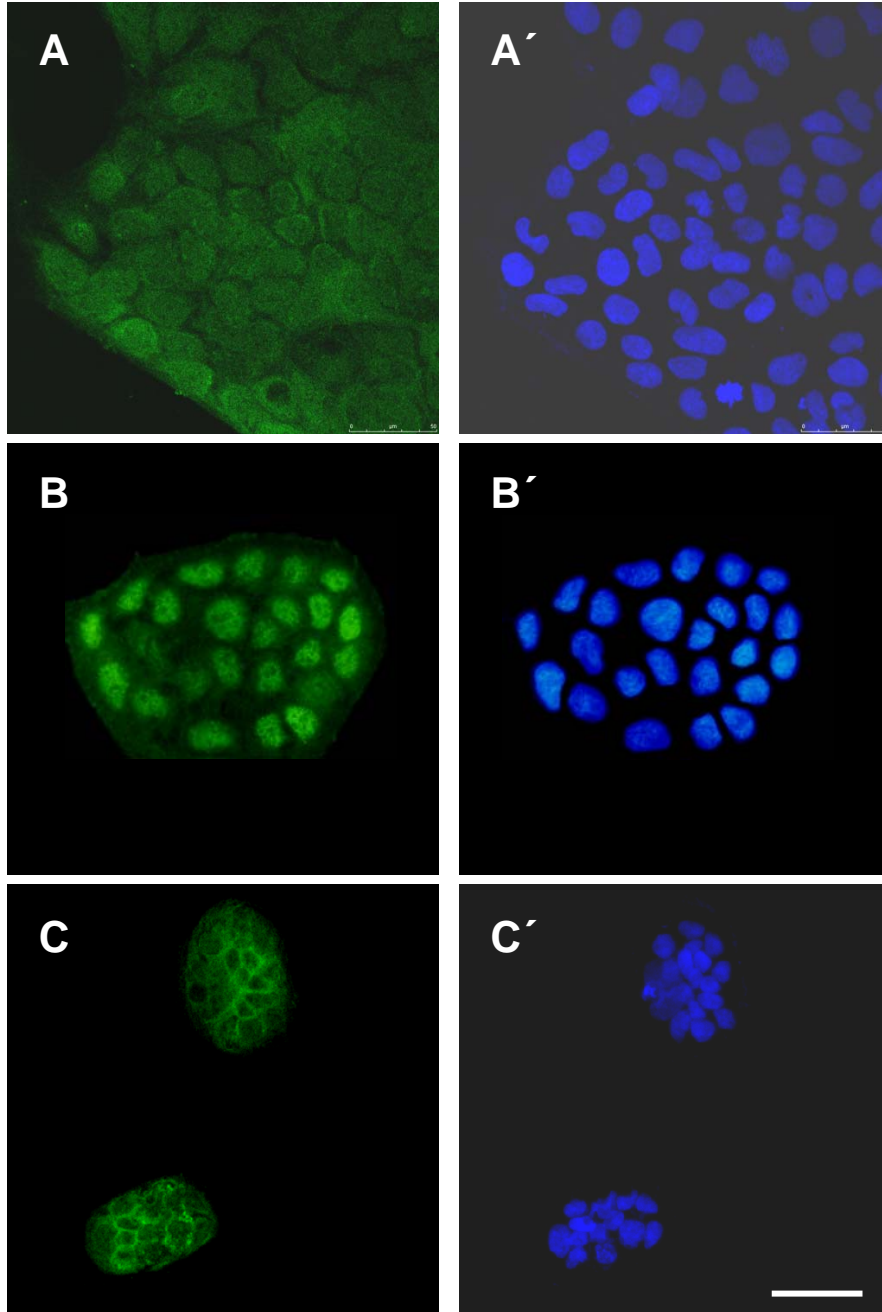


Figura 49.- Expresión y distribución de KLF6 en células Caco-2. Se observan colonias grandes con distribución de la proteína tanto en el núcleo como en el citoplasma (A-B) y colonias pequeñas las cuales presentan inmunoreactividad principalmente a nivel citoplasmático (C). En A'-C' se muestra la tinción nuclear con H-33258. Barra de escala: 20 μ m.

KLF6

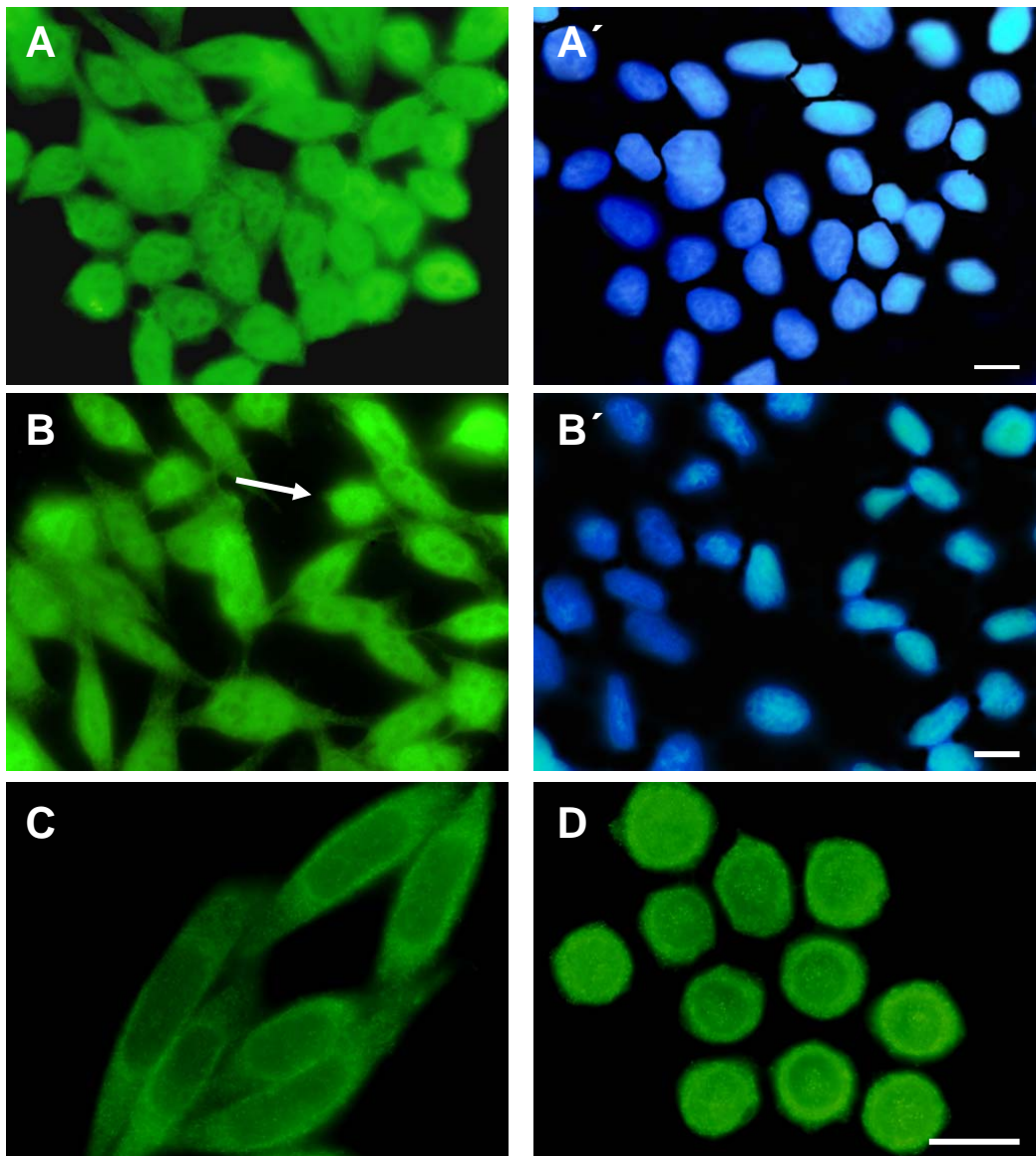


Figura 50: Expresión de KLF6, en células SW-480. En A y B se observa la expresión a nivel del citoplasma y nuclear, en especial en las células redondeadas (flecha blanca). En C y D, se núcleos se observa la expresión del marcador en células SW-480ADH y SW-480R. En A' y B' se muestra la contratinción nuclear con H-33258. Barra de escala: 15 μ m.

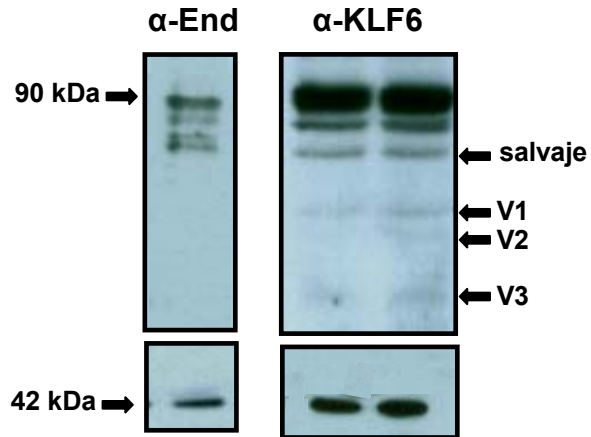
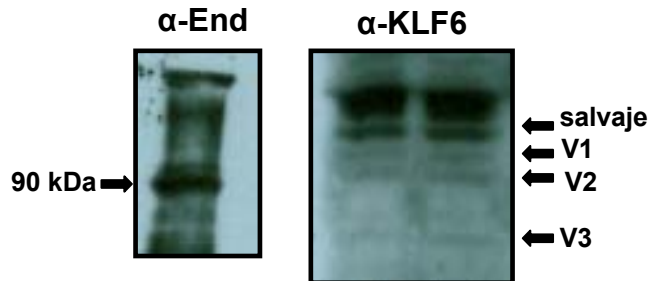
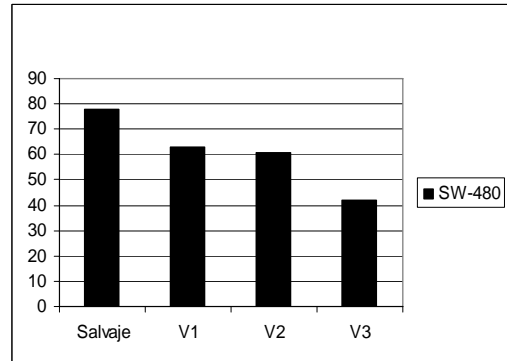
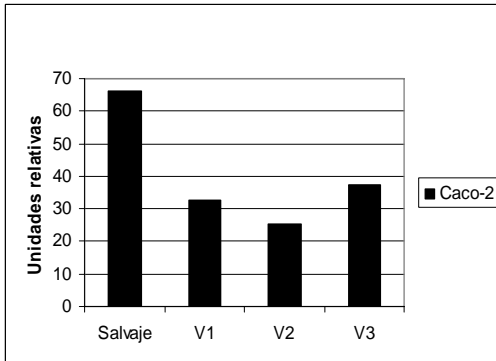
A**Caco-2****B****SW480**

Figura 51.- Análisis por Western-blot de la expresión de endogлина y KLF6 en las líneas celulares Caco-2 y SW-480. Ambas líneas celulares expresan endogлина y KLF6, así como sus variantes de procesamiento alternativo (V1, V2 y V3).

A

	Salvaje	V1	V2	V3	Total	Cociente
Caco-2	66.23	32.76	25.45	37.4	161.84	0.41
SW-480	77.86	62.95	60.52	41.87	243.20	0.32



B

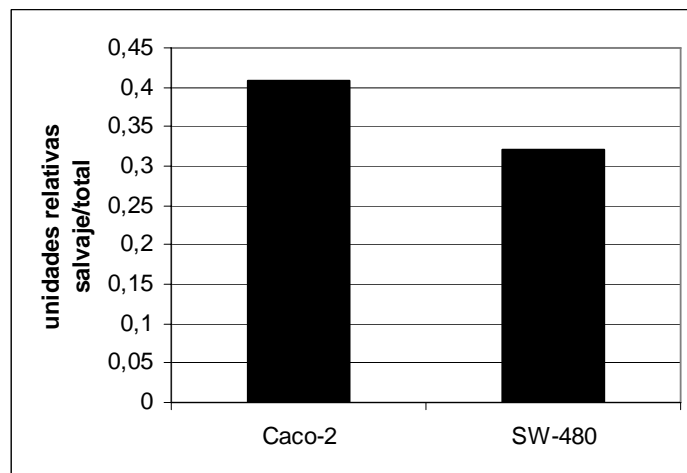


Figura 52.- Densitometría de las bandas correspondientes a las formas salvajes y de procesado alternativo (V1, V2 y V3) de KLF6, en las líneas celulares Caco-2 y SW-480 (A). En (B) se muestra el resultado del cociente forma salvaje/formas totales. Cuanto más expresión de formas de procesado alternativo, menor será el valor de este cociente.

V. DISCUSIÓN

En la actualidad el pronóstico y tratamiento de una gran mayoría de neoplásicas se basan principalmente en el estadiaje clínico e histopatológico. Sin embargo, estos están mejorándose utilizando marcadores celulares y moleculares implicados en la progresión del tumor. Llegar a entender los procesos celulares responsables de la progresión y diseminación del tumor, podría ser muy importante, no sólo para el diagnóstico y pronóstico de los resultados del tratamiento, sino también en el posible desarrollo de nuevas estrategias o drogas terapéuticas dirigidas específicamente sobre los factores responsables de la invasividad del tumor. En este trabajo, nos hemos centrado en el CCR en el cual la metástasis a distancia, predominantemente al hígado, constituye la principal causa de mortalidad, siempre y cuando no se elimine quirúrgicamente el tumor primario.

5.1. ENDOGLINA COMO FACTOR PRONÓSTICO DEL CCR

Son muchos los estudios que han relacionado a endogлина con la progresión tumoral utilizándola en la mayor parte de ellos como factor pronóstico mediante un doble abordaje: identificando su forma soluble en plasma, como en el caso del cáncer de mama (Li y cols., 2000) o en melanoma (Brasoveanu *et al.*, 1997); o utilizándola como marcador de neoangiogénesis. En este último caso, endogлина se ha empleado como marcador en el cáncer nasofaríngeo (Saad *et al.*, 2005), cáncer de mama (Kumar *et al.*, 1999), cáncer de ovario (Henriksen *et al.*, 1995) o incluso en el cáncer colorrectal (Saad *et al.*, 2004). Utilizar a endogлина como marcador de angiogénesis se debe al hecho de que esta proteína se expresa principalmente en células endoteliales (Gougos y Letarte, 1988; Li *et al.*, 2000, 2001). Por otro lado, mutaciones en el gen de endogлина son las responsables de la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria de Tipo I (HHT1), una enfermedad autosómica dominante caracterizada por hemorragias recurrentes, epistaxias nasales, telangiectasias cutáneas y en la mucosa, así como malformaciones arteriovenosas, pulmonares, hepáticas y cerebrales. Asimismo, la expresión de endogлина es regulada durante el desarrollo cardíaco en humanos y en pollo y ratones “knock-out” para esta proteína mueren a los 10-10,5 días de desarrollo debido a importantes anomalías cardíacas y vasculares (Bourdeau *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999; Arthur *et al.*, 2000).

Numerosos grupos de investigación han descrito que endoglina además de expresarse en células endoteliales, también lo hace en otros tipos celulares como en el sincitiotrofoblasto de la placenta (Gougos *et al*, 1992), células estromales (St-Jacques *et al*, 1994; Robledo *et al*, 1996), células de la musculatura lisa vascular (Adam *et al*, 1998) y en diversas células hematopoyéticas (Lastres *et al*, 1992; Buhning y Muller 1991). Quintanilla *et al*. (2003), describieron que los queratinocitos de ratón expresaban endoglina y además, su expresión parecía estar implicada en la progresión del cáncer de piel. Nuestros resultados, muestran por primera vez que endoglina se expresa, aunque con unos niveles muy bajos, en las células de la mucosa intestinal. La presencia de esta proteína en la mucosa normal de colon, queda restringida a las células epiteliales, siendo su expresión aparentemente mayor en el fondo de la criptas de Lieberkhün. Este patrón de expresión se altera cuando aparecen lesiones hiperproliferativas: adenomas y adenocarcinomas.

Endoglina se ha empleado como factor pronóstico en diversos tipos de cánceres debido a su implicación en angiogénesis. Sin embargo, nunca se ha empleado como factor pronóstico analizando su expresión en las células epiteliales de CCR humano. Para ello hemos llevado a cabo el estudio de 90 casos de neoplasias de intestino grueso. 45 de los casos corresponden a adenomas tubulovelloso con diversos grados de displasia: ligera (15), moderada (15) y severa (15). Los 45 restantes corresponden a pacientes diagnosticados de adenocarcinoma, usando la clasificación histológica de los tres primeros estadios de TNM (American Joint Comité for Cancer Staining) y a casos controles.

Los resultados obtenidos a nivel de RT-PCR mostraron que la expresión de endoglina aumentaba progresivamente desde las neoplasias adenomatosas hasta el estadio T2 de adenocarcinoma. Sin embargo, en el estadio de mayor malignidad de adenocarcinoma (T3) la expresión de endoglina disminuyó drásticamente hasta ser negativa en prácticamente todos los tumores analizados. De la misma manera, los ensayos de inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo anti-endoglina, mostraron que el patrón de expresión de esta proteína era idéntico al obtenido a nivel de ARNmensajero: la expresión de endoglina aumentó progresivamente desde los estadios más benignos de adenomas hasta el estadio T2 de adenocarcinoma donde alcanzo su máximo grado de expresión. Por último, en el estadio T3 de adenocarcinoma, no detectamos expresión de endoglina en el epitelio de colon. Los datos estadísticos obtenidos a partir de la cuantificación de las células positivas y negativas para endoglina en los ensayos de inmunohistoquímica, indican que este

aumento progresivo en la expresión de esta proteína en los tejidos tumorales, al menos en los casos analizados, no es significativo. Por lo tanto, sería necesario llevar a cabo este mismo ensayo con un mayor número de casos para poder corroborar el incremento en la expresión de esta proteína y comprobar su significación.

Por otro lado, tras el análisis estadístico, se pudo comprobar que la expresión de endoglina en los tejidos adyacentes a las lesiones se incrementaba de manera significativa con el estadio del tumor, siendo más elevados en adenocarcinomas que en adenomas. Cabría pensar que las células adyacentes al tumor podrían estar expresando endoglina como mera protección frente a la malignización. En este sentido, Chuang *et al.* (2006), demostraron que, en carcinoma escamoso de lengua, la expresión de endoglina era mayor en la región adyacente al tumor, indicando que dicha expresión podría implicar un potencial más agresivo en los estadios T1 y T2 en la zona de crecimiento. Estos autores postulan que endoglina sería un posible factor pronóstico útil en la detección del cáncer precoz.

Los resultados obtenidos sobre la expresión de endoglina en muestras histológicas se complementaron mediante ensayos de inmunotinción y Western-blot en las líneas de cáncer de colon: SW-480 y Caco-2. Ambas líneas corresponden a diferentes estadios de adenocarcinoma, siendo la más avanzada en cuanto a grado de malignidad, la línea celular SW-480. En los ensayos de inmunotinción se obtuvieron resultados muy semejantes a los observados en tumores. La línea celular Caco-2, que podría corresponder a neoplasias adenomatosas benignas/moderadas mostró resultados heterogéneos en cuanto a la expresión de endoglina. Las colonias de gran tamaño, que podrían corresponder a células poco proliferativas, fueron negativas para endoglina, mientras que las colonias de pequeño tamaño y más proliferativas, expresaban niveles más elevados de esta proteína a nivel de membrana. Estos datos obtenidos en la línea celular Caco-2 no sólo coinciden con los obtenidos mediante inmunohistoquímica y RT-PCR realizadas en tumores humanos, sino que el hecho de que endoglina no se exprese en células no proliferativas y si lo haga en células que proliferan, ha sido anteriormente descrito en células endoteliales por otros investigadores (Fonsatti *et al.*, 2001; Lebrin *et al.*, 2004). En el caso de la línea celular SW-480, tanto en la población adherente (SW-480ADH) como en la redondeada (SW-480R), correspondiente a un grado mayor de malignidad (adenomacarcinoma), expresaban altos niveles de endoglina en su membrana.

Por otro lado, los datos de Western-blot sugieren que la línea celular SW-480 expresa en su membrana celular niveles de endogлина ligeramente superiores a los encontrados en Caco-2. No obstante, los resultados obtenidos a nivel de Western-blot con estas líneas celulares deberán ser corroborados con tumores humanos, análisis complicados de llevarse a cabo debido a la dificultad del proceso de extracción de proteínas a partir de tejidos fijados en formol.

Uno de los resultados más relevantes en el estudio de la expresión de endogлина obtenido por RT-PCR e inmunohistoquímica en tumores de CCR, es la disminución drástica de ésta en la transición del estadio T2 al estadio T3 (mayor malignidad) de adenocarcinoma. Resultados similares fueron descrito recientemente por el grupo de Quintanilla *et al.* (2003) en un modelo de carcinogénesis en piel de ratones heterocigotos para endogлина. En este modelo, la disminución de las dosis génicas de endogлина ocasionó efectos muy importantes en la neoplasia epitelial, afectando tanto a los estadios tempranos como a los tardíos del proceso tumoral. La disminución de endogлина redujo el crecimiento de los tumores benignos, pero, sin embargo, aceleró la transformación maligna y el desarrollo de los carcinomas pobremente diferenciados muy agresivos. Este efecto dual de endogлина es similar al observado por primera vez en ratones transgénicos que sobre-expresaban TGF- β 1 (Cui *et al.*, 1996). El resultado de este estudio, junto con el de otros laboratorios, permitió postular un papel dual de TGF- β 1 en el proceso de carcinogénesis (Akhurst y Balmain, 1999; Massague *et al.*, 2000; Derynck *et al.*, 2001; Rich *et al.*, 2001). TGF- β actúa, en estadios muy tempranos, como un supresor en el proceso de formación de tumores debido a su función antimitótica descrita en células epiteliales (Alexandrow y Moses, 1995). En estadios más avanzados, TGF- β estimula la progresión maligna induciendo la transición epitelio-mesénquima hacia un fenotipo invasivo y metastático (ver revisión: Pardali y Moustakas, 2007). Este efecto de TGF- β tiene lugar en las propias células tumorales y ocurre a través de receptores ser/treonin kinasas (Oft *et al.*, 1998; Portella *et al.*, 1998). Teniendo en cuenta el mecanismo de acción del TGF-beta, nuestros resultados, al igual que los obtenidos por el grupo de Quintanilla y colaboradores en epidermis de ratón, sugieren fuertemente que los niveles de endogлина en la superficie de las células epiteliales de colon son críticas para mediar el efecto inhibitorio de TGF- β . En los primeros estadios del CCR encontramos expresión de endogлина; sin embargo, en el estadio de mayor malignidad, previo a la metástasis, las células epiteliales pierden la

expresión de endogлина, permitiendo de esta manera la progresión maligna y la metástasis mediada por TGF- β .

Por otro lado, se ha descrito que la disminución de endogлина en células en cultivo de cáncer de próstata, aumenta la migración e invasión celular, mientras que un aumento en la expresión de esta proteína da lugar a efectos opuesto (Liu *et al.*, 2002). Estos datos sugieren que los niveles de expresión de endogлина podrían modular la adhesión y motilidad en células epiteliales, que estaría en línea con nuestros resultados, en los que la disminución de esta proteína tiene lugar en el estadio de mayor malignidad de adenocarcinomas, previo a la metástasis.

Unas de las funciones que lleva a cabo endogлина es la de atenuar la señalización mediada por TGF- β 1, inhibiendo numerosas respuestas celulares como el efecto antiproliferativo de esta citoquina (Lastres *et al.*, 1996; Letamendía *et al.*, 1998; Diez-Marques *et al.*, 2002). Aunque el mecanismo por el cual endogлина modula la respuesta de TGF- β aun no se conoce en profundidad, datos publicados por el grupo del Dr. Bernabéu, sugirieron que endogлина interacciona directamente con los receptores tipo I y II de TGF- β , regulando así su estado de fosforilación y por tanto su actividad señalizadora (Guerrero-Esteo *et al.*, 2002).

Por lo tanto, en base a los resultados de este trabajo en relación al patrón de expresión de endogлина durante el proceso de carcinogénesis en el CCR, y a los obtenidos por Quintanilla y colaboradores en su modelo de carcinogénesis en piel de ratón, podemos postular que endogлина puede mediar la intensidad de las respuestas celulares mediadas por TGF- β . Ello, nos permitiría señalar a endogлина con una diana potencial sobre la que diseñar estrategias terapéuticas para controlar la progresión tumoral mediada por el factor de crecimiento TGF- β .

La expresión de endogлина en la superficie celular ocurre a lo largo de la progresión tumoral pero cae justo en las fases más avanzadas de la enfermedad. Esta disminución de endogлина se relaciona con un aumento de la forma soluble de esta proteína en plasma. Tal y como han descrito en trabajos previos, como en el caso de cáncer de mama (Li *et al.*, 2000) o en neoplasias mieloides (Calabro *et al.*, 2003), la presencia de endogлина soluble en plasma, constituiría un mal factor pronóstico. En este mismo sentido, Quintanilla *et al.* (Comunicación personal) han demostrado que en carcinogénesis en piel, el nivel de endogлина aumenta en la progresión tumoral, pero en las fases de mayor malignidad, desaparece la tinción en la superficie de los queratinocitos y pasa a localizarse en plasma, en forma de proteína soluble. Por tanto, postulamos que la detección de endogлина en la superficie

de las células epiteliales colónicas estaría relacionada con un buen pronóstico, mientras que la presencia de endoglina soluble indicaría fases muy avanzadas en la progresión tumoral del CCR. Para confirmar esta hipótesis sería necesario un estudio en profundidad, utilizando muestras de sangre de pacientes en diferentes estadios de CCR en los que se analizaría la presencia de endoglina soluble en el plasma.

Otro dato muy interesante a nivel de endoglina, es la aparición durante la progresión del CCR de una forma de procesamiento alternativo, denominada endoglina corta (Bellón *et al.*, 1993). Mientras que en el epitelio sano de colon, no detectamos a nivel de ARNm mensajero la forma corta de endoglina, parece ser que en estadios de adenoma y sobre todo en el estadio T2 de adenocarcinoma, las células epiteliales expresan esta forma de procesado alternativo. Cabe destacar que en esta fase (T2) de mayor expresión de endoglina, se detectó entre un 30% y un 60% de ARNs mensajeros correspondientes a la forma corta de endoglina (o forma de procesado alternativo).

Tanto la forma larga de endoglina como la corta, se expresan en la membrana celular en forma de homodímeros unidos por puentes disulfuro (Gougos y Letarte, 1990; Bellón *et al.*, 1993). Unos de los residuos implicados en el establecimiento de estos puentes es la Cys-582, localizada en el dominio extracelular de endoglina (Guerreo-Esteo *et al.*, 2002). El grupo de Quintanilla *et al.* (2005) describió que ambas formas de procesado alternativo de endoglina eran capaces de formar heterodímeros entre ellas, a través de uniones covalentes que se establecían entre sus dominios extracelulares homólogos. De esta manera, en aquellas células en las que se expresen las dos isoformas de la proteína, la presencia de heterodímeros de endoglina corta-larga, además de los heterodímeros corta-corta y larga-larga, añadirían un nivel mayor de complejidad a esta proteína. En este sentido, cabe hipotetizar, que la capacidad de modular la respuesta de TGF- β , como resultado de la interacción de los dominios citoplásmicos, tanto de endoglina corta como endoglina larga con los receptores de TGF- β (Guerrero-Esteo *et al.*, 2002), o de la asociación de esta proteína con componentes del citoesqueleto (Sanz-Rodríguez *et al.*, 2004; Conley *et al.*, 2004), debería ser diferente para cada uno de los dímeros de endoglina. Por lo tanto, y como ya hemos mencionado anteriormente, si el papel de endoglina en la progresión del CCR está mediado por su papel como modulador de la señalización de TGF- β , una sobre-expresión de la forma corta de procesamiento, podría interferir en la interacción de los homodímeros L-L con los receptores de TGF- β , compitiendo en su asociación a través del dominio extracelular

y secuestrando la forma salvaje de endoglina en dímeros L-S. Sin embargo, sería necesario llevar a cabo más experimentos para poder confirmar esta hipótesis.

5.2. KLF6 COMO FACTOR DIAGNOSTICO EN EL CCR

Uno de los papeles fundamentales que llevan a cabo la familia de factores de transcripción de los KLFs es el mantenimiento de la homeostasis de las células de mamífero, regulando sus procesos de proliferación y diferenciación (Bieker, 2001; Black *et al.*, 2001). Un miembro de esta familia, KLF6 ha sido identificado como un gen supresor de tumores en diferentes tipos de cáncer. En particular, se ha descrito que KLF6 inhibe la proliferación, promueve la apoptosis y mantiene al gen de MMP9 silenciado, por lo que participa activamente en cáncer (Buendía, 2007). Día a día van aumentando el número de estudios que intentan esclarecer los mecanismos por los que este gen supresor de tumores está funcionalmente inactivado en diversos cánceres humanos. En diferentes neoplasias humanas, como en cáncer de próstata (Narla *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2003), cancer colorectal (Reeves *et al.*, 2004; Cho *et al.*, 2006), carcinoma hepato celular (Kremer-Tal *et al.*, 2004), gliomas (Jeng *et al.*, 2003), carcinoma nasofaríngeo (Chen *et al.*, 2002) se han identificado mutaciones somáticas y pérdida alélica en KLF6. Asimismo, KLF6 es transcripcionalmente silenciado en células de cáncer esofágico mediante la hipermetilación de su promotor (Yamashita *et al.*, 2002) y es inhibido significativamente en muestras de cáncer de pulmón en estadios muy tempranos y en líneas celulares de cáncer de pulmón (Kettunen *et al.*, 2004; Ito *et al.*, 2004), así como en algunas líneas celulares de cáncer de próstata (Narla *et al.*, 2001) y de cáncer hepático (Kremer-Tal *et al.*, 2004, 2007), no habiéndose identificado los mecanismos de inactivación en estos casos. Por otro lado, la expresión de KLF6 está disminuida e incluso ausente en numerosas líneas celulares de glioblastoma y en muestras de pacientes con gliomas primarios. La reconstitución de la proteína salvaje de KLF6 en estos casos, revierte el crecimiento tumoral, tanto *in vivo* como *in vitro* (Kimmelman *et al.*, 2004).

Gracias a todos los estudios llevados a cabo sobre el posible papel de KLF6 en cáncer, se ha sugerido que las vías complementarias por las que este supresor tumoral es capaz de regular el desarrollo y la progresión del cáncer de próstata son dos. La primera, una disminución en la expresión de la proteína salvaje de KLF6 que daría lugar a un aumento en la proliferación y tumorigenicidad *in vivo*. Este hecho proporcionaría una importancia relevancia biológica al permitir correlacionar una

disminución en la expresión de esta proteína con un mal pronóstico, como ha sido descrito para el cáncer de pulmón y de próstata (Glinsky *et al.*, 2004; Kettunen *et al.*, 2004).

La segunda, consiste en un aumento en las formas de procesamiento alternativo. El procesamiento alternativo es un mecanismo crucial para la obtención de una diversidad proteica, a partir de un solo gen y un solo ARN mensajero. Las diferentes isoformas de procesamiento alternativo de una proteína dada, pueden mostrar efectos biológicos diferentes que, incluso, pueden llegar a ser efectos antagonistas. Por esta razón, se necesita un control muy exhaustivo en la síntesis de estas isoformas, para de esta manera asegurar un orden perfecto en los procesos celulares que tienen lugar en un organismo pluricelular. Las mutaciones que tiene lugar en los puntos implicados en el control del procesamiento alternativo o la alteración de la actividad de proteínas reguladoras de estos procesos, podrían tener un profundo impacto en la patogénesis humana, en particular, en el desarrollo y progresión de tumores. Hasta la fecha son muchos los genes en los que ya se han encontrado mutaciones en elementos implicados en el procesamiento alternativo, entre ellos: LKB1 (Hastings *et al.*, 2005), KIT (Chen *et al.*, 2005), CDH17 (Wang *et al.*, 2005), BRCA1 (Mazoyer *et al.*, 1998) y KLF6 (Narla *et al.*, 2005).

En los resultados obtenidos mediante inmunohistoquímica sobre expresión de la proteína de KLF6 en los diferentes estadios del CCR, se observó un incremento progresivo en la expresión de esta proteína, a medida que aumentaba la malignidad de la lesión (adenoma < adenocarcinoma). El análisis estadístico de los datos obtenidos por inmunohistoquímica en los tumores, revelan que este aumento de expresión de KLF6, en las lesiones tanto premalignas (adenomas) como malignas (adenocarcinomas) son significativas.

Sin embargo, estos resultados nos están indicando una mayor expresión de todas las formas existentes de KLF6, la forma salvaje y las formas de procesamiento alternativo descritas para su ARN mensajero (V1, V2 y V3; Narla *et al.*, 2005). Fue necesario realizar estudios de RT-PCR a partir del ARN mensajero de los diferentes tumores, para poder analizar si el aumento en la expresión de KLF6 se debe exclusivamente a su forma salvaje o las isoformas de procesamiento alternativo. Las RT-PCR revelaron la predominancia de forma salvajes de KLF6 en epitelio normal de colón y en adenomas, si bien en algunas muestras de adenomas hubo una disminución notable. No obstante, esta situación cambió al analizar los tumores de adenocarcinoma ya que se observó la aparición progresiva de las formas de

procesado alternativo, lo que ocasionó un aumento en la cantidad del amplificado total (salvaje+variantes) con respecto al salvaje, como ocurría en el estadio T1. En el estadio T2 se observó un aumento en la expresión de KLF6, al tiempo que aparecieron bandas de menor tamaño del esperado para el amplicón total. Probablemente, estas son resultado de la aparición de nuevas formas aberrantes, posiblemente debido a la presencia de deleciones, que no se ajustan a las formas de procesamiento alternativo descritas por Narla *et al.*, (2005). Por último, lo más destacado de este estudio, fue que en el estadio de mayor malignidad (T3), se observó una predominancia total de las formas de procesado alternativo ya que no se obtuvo la amplificación de la forma salvaje de KLF6. Estos resultados coinciden con lo observado en la progresión del cáncer de próstata por Narla *et al.*, (2005) en el que se producía un aumento progresivo de las formas de procesado alternativo a medida que aumenta el proceso de malignización en este tipo de cáncer.

Los resultados a nivel de ARN mensajero, obtenidos por RT-PCR, fueron corroborados con ensayos a nivel de proteína mediante inmunotinción y Western-blot. KLF6 se inmunolocalizó tanto en el citoplasma como en el núcleo de las dos líneas celulares de cáncer de colon utilizadas. No obtuvimos diferencias en cuanto a su localización subcelular entre las dos poblaciones, adherentes y redondeadas, de SW-480. Evidentemente, no pudimos discriminar entre las formas salvajes y las variantes de KLF6 mediante ensayos de inmunofluorescencia, ya que el anticuerpo utilizado reconoce un epítipo presente en todas ellas. No ocurrió lo mismo cuando analizamos estas proteínas, con el mismo anticuerpo, pero en ensayos de Western-blot. Cada una de las formas de procesado alternativo de KLF6, presentan diferente motilidad electroforética, lo que nos permitió analizarlas en las dos líneas celulares. Ambas expresaban, tanto la forma salvaje como las tres variantes de procesamiento alternativo de KLF6 descritas, V1, V2 y V3. Aparentemente no parece haber diferencias de expresión entre las diferentes formas en las dos líneas celulares. Sin embargo, gracias a la densitometría de las bandas correspondientes a cada una de las formas y la realización del cociente: forma salvaje/formas totales, pudimos comprobar que este cociente era menor en el caso de SW-480. Estos resultados sugieren que la línea celular SW-480, presenta niveles más elevados de las variantes de procesado alternativo que la línea Caco-2, correspondiente a un estado menor de malignidad. Esta progresión con respecto a la aparición de las variantes V1, V2 y V3 de KLF6, alcanzaría su máximo nivel en el estadio T3 de adenocarcinoma, en el cual ya no pudimos detectar mensajero de KLF6 salvaje por RT-PCR.

Recientemente, DiFeo *et al.* (2006) han observado un marcado incremento de la variante V1 de KLF6 tanto en la línea de cáncer de ovario SKOV-3, como en pacientes con tumores de ovario. Este incremento ocurre concomitantemente con una reducción de la expresión de E-cadherina, reconocido supresor de la invasión, y con cambios en la localización subcelular de β -catenina (translocación nuclear). Estos resultados concuerdan con las variaciones de expresión de KLF6 observadas en nuestras líneas celulares; SW-480 que presenta niveles más elevados de las variantes de procesamiento alternativo de KLF6, muestra menor expresión de E-cadherina y localización nuclear de β -catenina, mientras que la línea celular Caco-2 presenta elevada expresión de E-cadherina y β -catenina muestra una localización de membrana, todo ello de células en etapas más tempranas de progresión tumoral.

No obstante, aunque datos similares a los que hemos obtenido en el CCR, han sido descritos por Narla *et al.*, (2005) en el cáncer de próstata, sería necesario realizar otros experimentos para poder implicar directamente estas isoformas de procesamiento de KLF6 en la progresión del CCR. Sin embargo, los datos obtenidos en nuestro trabajo, tanto a nivel de ARNmensajero como de proteína, sugieren que las variantes de KLF6 poseen una función antagonista a la capacidad que posee la forma salvaje de KLF6 de actuar como supresor tumoral *in vivo*. En este sentido, el incremento en la generación de formas de procesamiento alternativo de KLF6, podría contribuir a que las células adquirieran un fenotipo tumorigénico, independientemente de si se produce pérdida alélica, mutaciones somáticas inactivantes o metilación de promotor, muy probablemente mediante una actividad dominante-negativa sobre la función de la proteína salvaje.

El posible papel que puedan tener las alteraciones del mecanismo de procesamiento alternativo, se está observando en un amplio rango de enfermedades humanas (Faustino & Cooper, 2003) y especialmente en cáncer (Venables *et al.*, 2004). De igual manera, algunos análisis genómicos de varios genes, sugieren la existencia de formas de procesamiento alternativo inducidas por el propio proceso de carcinogénesis. Algunos ejemplos de genes supresores de tumores en los que se han identificado formas de procesamiento alternativo incluyen a WT-1 (Hastie *et al.*, 2001), mdm-2 (Sigalas *et al.*, 1996), WWOX (Driouch *et al.*, 2002), y NF1 (Vandenbroucke *et al.*, 2002). En general, la desregulación del procesamiento alternativo de numerosos genes y la subsiguiente generación de distintos transcritos, podría estar reflejando algún fallo en el mecanismo de regulación de este proceso (incluidos genes que lo regulan), por lo tanto podría tener un papel, aunque sea

pequeño, en la progresión del cáncer. Aun así, en nuestro caso y basándonos en los hallazgos de Narla *et al.*, (2005) postulamos que estas formas de procesamiento que se inducen y sobreexpresan durante el proceso de tumorigénesis colorectal, más que ser un simple producto resultado del cáncer, están implicadas en promover la tumorigénesis. De esta manera, podemos concluir que el análisis de KLF6, tanto el de su forma salvaje como el de las isoformas de procesamiento alternativo, y en base a su implicación directa en la progresión del CCR, podría ser un excepcional marcador para el diagnóstico clínico del CCR, sobre todo a la hora de analizar el estadio de la enfermedad para así poder llevar a cabo un correcto tratamiento clínico.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Adam PJ, Clesham GJ, Weissberg PL. Expression of endoglin mRNA and protein in human vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998, 247:33-37.
- Akhurst RJ, Balmain A. Genetic events and the role of TGF beta in epithelial tumour progression. *J Pathol.* 1999, 187:82-90.
- Alexandrow MG, Moses HL. Transforming growth factor beta 1 inhibits mouse keratinocytes late in G1 independent of effects on gene transcription. *Cancer Res.* 1995, 55:3928-3932.
- Altomonte M, Montagner R, Fonsatti E, Colizzi F, Cattarossi I, Brasoveanu LI, Nicotra MR, Cattelan A, Natali PG, Maio M. Expression and structural features of endoglin (CD105), a transforming growth factor beta1 and beta3 binding protein, in human melanoma. *Br J Cancer.* 1996, 74:1586-1591.
- Arends JW. Molecular interactions in the Vogelstein model of colorectal carcinoma. *J Pathol.* 2000, 190:412-416.
- Arthur HM, Ure J, Smith AJ, Renforth G, Wilson DI, Torsney E, Charlton R, Parums DV, Jowett T, Marchuk DA, Burn J, Diamond AG. Endoglin, an ancillary TGFbeta receptor, is required for extraembryonic angiogenesis and plays a key role in heart development. *Dev Biol.* 2000, 217:42-53.
- Arthur HM, Ure J, Smith AJ, Renforth G, Wilson DI, Torsney E, Charlton R, Parums DV, Jowett T, Marchuk DA, Burn J, Diamond AG. Endoglin, an ancillary TGFbeta receptor, is required for extraembryonic angiogenesis and plays a key role in heart development. *Dev Biol.* 2000, 217:42-53.
- Barbara NP, Wrana JL, Letarte M. Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J Biol Chem.* 1999, 274:584-594.
- Brasoveanu LI, Fonsatti E, Visintin A, Pavlovic M, Cattarossi I, Colizzi F, Gasparollo A, Coral S, Horejsi V, Altomonte M, Maio M. Melanoma cells constitutively release an anchor-positive soluble form of protectin (sCD59) that retains functional activities in homologous complement-mediated cytotoxicity. *J Clin Invest.* 1997, 100:1248-1255.

- Barth AI, Nathke IS, Nelson WJ. Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol.* 1997, 9:683-690.
- Batlle E, Henderson JT, Beghtel H, van den Born MM, Sancho E, Huls G, Meeldijk J, Robertson J, van de Wetering M, Pawson T, Clevers H. Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell.* 2002, 111:251-263.
- Bellón T, Corbi A, Lastres P, Cales C, Cebrian M, Vera S, Cheifetz S, Massague J, Letarte M, Bernabeu C. Identification and expression of two forms of the human transforming growth factor-beta-binding protein endoglin with distinct cytoplasmic regions. *Eur J Immunol.* 1993, 23:2340-2345.
- Benito M, Díaz-Rubio E. Molecular biology in colorectal cancer. *Clin Transl Oncol.* 2006, 8: 391-398.
- Benzeno S, Narla G, Allina J, Cheng GZ, Reeves HL, Ban. MS, Odin JA, Diehl JA, Germain D, Friedman SL. Cyclin-dependent kinase inhibition by the KLF6 tumor suppressor protein through interaction with cyclin D1. *Cancer Res.* 2004, 64:3885-3891.
- Bieker JJ. Kruppel-like factors: three fingers in many pies. *J Biol Chem.* 2001, 276: 34355-34358.
- Black AR, Black JD, Azizkhan-Clifford J. Sp1 and kruppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer. *J Cell Physiol.* 2001, 188:143-160.
- Bodey B, Bodey B Jr, Siegel SE, Kaiser HE. Upregulation of endoglin (CD105) expression during childhood brain tumor-related angiogenesis. *Anti-angiogenic therapy. Anticancer Res.* 1998, 18:1485-1500.
- Botella LM, Sanchez-Elsner T, Sanz-Rodriguez F, Kojima S, Shimada J, Guerrero-Esteo M, Cooreman MP, Ratziu V, Langa C, Vary CP. Transcriptional activation of endoglin and transforming growth factor-beta signaling components by cooperative interaction between Sp1 and KLF6: their potential role in the response to vascular injury. *Blood.* 2002, 100:4001-4010.
- Bourdeau A, Cymerman U, Paquet ME, Meschino W, McKinnon WC, Guttmacher AE, Becker L, Letarte M. Endoglin expression is reduced in normal vessels but still detectable in arteriovenous malformations of patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia type I. *Am J Pathol.* 2000, 156:911-923.

- Bourdeau A, Dumont DJ, Letarte M. A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Clin Invest.* 1999, 104:1343-1351.
- Boyle P, Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol.* 2005, 3:481-488.
- Buendía MA. Tumour suppressors in hepatocellular carcinoma: many are called, but few are chosen. *J. Hepatol.* 2007, 46:546-548.
- Buhring HJ, Muller CA, Letarte M, Gougos A, Saalmuller A, van Agthoven AJ, Busch FW. Endoglin is expressed on a subpopulation of immature erythroid cells of normal human bone marrow. *Leukemia.* 1991, 5:841-857.
- Calabro L, Fonsatti E, Bellomo G, Alonci A, Colizzi F, Sigalotti L, Altomonte M, Musolino C and Maio M Differential levels of soluble endoglin (CD105) in myeloid malignancies. *J Cell Physiol.* 2003, 194:171-175.
- Caulin C, Scholl FG, Frontelo P, Gamallo C, Quintanilla M. Chronic exposure of cultured transformed mouse epidermal cells to transforming growth factor-beta 1 induces an epithelial-mesenchymal transdifferentiation and a spindle tumoral phenotype. *Cell Growth Differ.* 1995, 6:1027-1035.
- Charames GS, Cheng H, Gilpin CA, Hunter AG, Berk T, Bapat B: A novel aberrant splice site mutation in the APC gene. *J Med Genet.* 2002, 39:754-757.
- Cheifetz S, Bellon T, Cales C, Vera S, Bernabeu C, Massague J, Letarte M. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem.* 1992, 267:19027-19030.
- Chen C, Hyytinen ER, Sun X, Helin HJ, Koivisto PA, Frierson HF, Jr., Vessella RL, Dong JT. Deletion, Mutation, and Loss of Expression of KLF6 in Human Prostate Cancer. *Am J Pathol.* 2003, 162:1349-1354.
- Chen HK, Liu X Q, Lin J, Chen TY, Feng QS, Zeng YX. Mutation analysis of KLF6 gene in human nasopharyngeal carcinomas. *Ai Zheng.* 2002, 21:1047-50.
- Chen K, Mehta JL, Li D, Joseph L, Joseph J. Transforming growth factor beta receptor endoglin is expressed in cardiac fibroblasts and modulates profibrogenic actions of angiotensin II. *Circ Res.* 2004, 95:1167-1173.
- Chen L L, Sabripour M, Wu E F, Prieto V G, Fuller G N and Frazier M L A mutation-created novel intra-exonic pre-mRNA splice site causes constitutive activation of KIT in human gastrointestinal stromal tumors. *Oncogene.* 2005, 24:4271-4280.

- Chiambaretta F, Blanchon L, Rabier B, Kao WW, Liu JJ, Dastugue B, Rigal D, Sapin V: Regulation of corneal keratin-12 gene expression by the human Kruppel-like transcription factor 6. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002, 43:3422-3429.
- Cho YG, Choi BJ, Kim CJ, Song JW, Kim SY, Nam SW, Lee SH, Yoo NJ, Lee JY, Park WS. Genetic alterations of the KLF6 gene in colorectal cancers. *APMIS.* 2006, 114:458-464.
- Chuang HC, Su CY, Huang HY, Chien CY, Chen CM, Huang CC. High expression of CD105 as a prognostic predictor of early tongue cancer. *Laryngoscope.* 2006, 116:1175-1179.
- Clements WK, Kimelman D. Wnt signalling gets XEEKy. *Nat Cell Biol.* 2003, 5:861-863.
- Conley BA, Smith JD, Guerrero-Esteo M, Bernabeu C, Vary CP. Endoglin, a TGF-beta receptor-associated protein, is expressed by smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis.* 2000, 153:323-335.
- Conley BA, Koleva R, Smith JD, Kacer D, Zhang D, Bernabeu C, Vary CP. Endoglin controls cell migration and composition of focal adhesions: function of the cytosolic domain. *J Biol Chem.* 2004, 279:27440-2749.
- Costa Ade L, de Araujo NS, Pinto Ddos S, de Araujo VC. PCNA/AgNOR and Ki-67/AgNOR double staining in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 1999, 1:438-441.
- Cui W, Fowles DJ, Cousins FM, Duffie E, Bryson S, Balmain A, Akhurst RJ. Concerted action of TGF-beta 1 and its type II receptor in control of epidermal homeostasis in transgenic mice. *Genes Dev.* 1995, 9:945-955.
- Cui W, Kemp C J, Duffie E, Balmain A and Akhurst R J Lack of transforming growth factor-beta 1 expression in benign skin tumors of p53null mice is prognostic for a high risk of malignant conversion. *Cancer Res.* 1994, 54: 5831-5836.
- Dang DT, Pevsner J, Yang VW. The biology of the mammalian Kruppel-like family of transcription factors. *Int J Biochem Cell Biol.* 2000, 32:1103-1121.
- De La Chapelle A. Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nature Revs Cancer.* 2004, 4:769-780.
- Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet.* 2001, 29:117-29.
- Dhawan P, Singh AB, Deane NG, No Y, Shiou SR, Schmidt C, Neff J, Washington MK, Beauchamp RD. Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. *J Clin Invest.* 2005, 115:1765-1776.

- DiFeo A, Narla G, Camacho-Vanegas O, Nishio H, Rose SL, Buller RE, Friedman SL, Walsh MJ, Martignetti JA. E-cadherin is a novel transcriptional target of the KLF6 tumor suppressor. *Oncogene*. 2006, 25:6026-6031.
- Diez-Marques L, Ortega-Velazquez R, Langa C, Rodriguez-Barbero A, Lopez-Novoa J M, Lamas S, Bernabeu C. Expression of endoglin in human mesangial cells: modulation of extracellular matrix synthesis. *Biochim Biophys Acta*. 2002, 1587:36-44.
- Driouch K, Prydz H, Monese R, Johansen H, Lidereau R, Frengen E. Alternative transcripts of the candidate tumor suppressor gene, WWOX, are expressed at high levels in human breast tumors. *Oncogene*. 2002, 21:1832-1840.
- Duff SE, Li C, Jeziorska M, Kumar S, Saunders MP, Sherlock D, O'Dwyer ST, Jayson GC. Vascular endothelial growth factors C and D and lymphangiogenesis in gastrointestinal tract malignancy. *Br J Cancer*. 2003, 89:426-430.
- Eastman Q, Grosschedl R. Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by Wnt and other signals. *Curr Opin Cell Biol*. 1999, 11:233-240.
- Evangelou A, Jindal SK, Brown TJ, Letarte M. Down-regulation of transforming growth factor beta receptors by androgen in ovarian cancer cells. *Cancer Res*. 2000, 60:929-935.
- Faustino N A and Cooper T A Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev*. 2003, 17:419-437.
- Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990, 61:759-767.
- Fischer EA, Verpont MC, Garrett-Sinha LA, Ronco PM, Rossert JA. Klf6 is a zinc finger protein expressed in a cell-specific manner during kidney development. *J Am Soc Nephrol*. 2001, 12:726-735.
- Fodde R, Smits R, Clevers H. APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*. 2001, 1:55-67.
- Fonsatti E, Jekunen AP, Kairemo KJ, Coral S, Snellman M, Nicotra MR, Natali PG, Altomonte M, Maio M. Endoglin is a suitable target for efficient imaging of solid tumors: in vivo evidence in a canine mammary carcinoma model. *Clin Cancer Res*. 2000, 6:2037-2043.
- Fonsatti E, Del Vecchio L, Altomonte M, Sigalotti L, Nicotra MR, Coral S, Natali PG, Maio M. Endoglin: An accessory component of the TGF-beta-binding receptor-complex with diagnostic, prognostic, and bioimmunotherapeutic potential in human malignancies. *J Cell Physiol*. 2001, 188:1-7.

- Fonsatti E, Sigalotti L, Arslan P, Altomonte M, Maio M. Emerging role of endoglin (CD105) as a marker of angiogenesis with clinical potential in human malignancies. *Curr Cancer Drug Targets*. 2003, 3:427-432.
- Frame S, Crombie R, Liddell J, Stuart D, Linardopoulos S, Nagase H, Portella G, Brown K, Street A, Akhurst R, Balmain A. Epithelial carcinogenesis in the mouse: correlating the genetics and the biology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1998, 353:839-845.
- Fujimoto M, Hasegawa M, Hamaguchi Y, Komura K, Matsushita T, Yanaba K, Kodera M, Takehara K, Sato S. A clue for telangiectasis in systemic sclerosis: elevated serum soluble endoglin levels in patients with the limited cutaneous form of the disease. *Dermatology*. 2006, 213:88-92.
- Garcia-Cardena G, Folkman J. Is there a role for nitric oxide in tumor angiogenesis? *J Natl Cancer Inst*. 1998, 90:560-561.
- Gerson LB, Shetler K, Triadafilopoulos G. Prevalence of Barrett's esophagus in asymptomatic individuals. *Gastroenterology*. 2002, 123: 461-467.
- Giles RH, van Es JH, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2003, 1653:1-24.
- Glinghammar B, Rafter J. Carcinogenesis in the colon: interaction between luminal factors and genetic factors. *Eur J Cancer Prev*. 1999, Suppl 1: S87-94.
- Glinsky GV, Glinskii AB, Stephenson AJ, Hoffman RM, Gerald WL. Gene expression profiling predicts clinical outcome of prostate cancer. *J Clin Invest*. 2004, 113:913-923.
- Gloeckler Ries LA, Reichman ME, Lewis DR, Hankey BF, Edwards BK. Cancer survival and incidence from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) program. *Oncologist*. 2003, 8:541-52. Comment in: *Oncologist*. 2003, 8:539-540.
- Gougos A, Letarte M. Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line. *J Immunol*. 1988, 141:1925-1933.
- Gougos A, Letarte M. Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J Biol Chem*. 1990, 265: 8361-8364.
- Gougos A, St Jacques S, Greaves A, O'Connell PJ, d'Apice AJ, Buhning HJ, Bernabeu C, van Mourik JA, Letarte M. Identification of distinct epitopes of

- endoglin, an RGD-containing glycoprotein of endothelial cells, leukemic cells, and syncytiotrophoblasts. *Int Immunol.* 1992, 4:83-92.
- Grady WM, Myeroff LL, Swinler SE, Rajput A, Thiagalingam S, Lutterbaugh JD, Neumann A, Brattain MG, Chang J, Kim SJ, Kinzler KW, Vogelstein B, Willson JK, Markowitz S. Mutational inactivation of transforming growth factor beta receptor type II in microsatellite stable colon cancers. *Cancer Res.* 1999, 59:320-324.
- Gregorieff A, Clevers H. Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes Dev.* 2005, 19:877-890.
- Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, Joslyn G, Stevens J, Spirio L, Robertson M. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell.* 1991, 66: 589-600.
- Guerrero-Esteo M, Lastres P, Letamendia A, Perez-Alvarez MJ, Langa C, Lopez LA, Fabra A, Garcia-Pardo A, Vera S, Letarte M, Bernabeu C. Endoglin overexpression modulates cellular morphology, migration, and adhesion of mouse fibroblasts. *Eur J Cell Biol.* 1999, 78:614-623.
- Guerrero-Esteo M, Sanchez-Elsner T, Letamendia A, Bernabeu C. Extracellular and cytoplasmic domains of endoglin interact with the transforming growth factor-beta receptors I and II. *J Biol Chem.* 2002, 277:29197-29209.
- Haber D, Harlow E: Tumour-suppressor genes: evolving definitions in the genomic age. *Nat Genet.* 1997, 16:320-322.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000, 100:57-70.
- Hastie ND: Life, sex, and WT1 isoforms--three amino acids can make all the difference. *Cell.* 2001, 106:391-394.
- Hastings ML, Resta N, Traum D, Stella A, Guanti G, Krainer AR. An LKB1 AT-AC intron mutation causes Peutz-Jeghers syndrome via splicing at noncanonical cryptic splice sites. *Nat Struct Mol Biol.* 2005, 12:54-59.
- He X. A Wnt-Wnt situation. *Dev Cell.* 2003, 4: 791-797.
- He XC, Yin T, Grindley JC, Tian Q, Sato T, Tao WA, Dirisina R, Porter-Westpfahl KS, Hembree M, Johnson T, Wiedemann LM, Barrett TA, Hood L, Wu H, Li L. PTEN-deficient intestinal stem cells initiate intestinal polyposis. *Nat Genet.* 2007, 39:189-98.
- Herbst A, Kolligs FT. Wnt signaling as a therapeutic target for cancer. *Methods Mol Biol.* 2007, 361:63-91.

- Henriksen R, Gobl A, Wilander E, Oberg K, Miyazono K, Funa K Expression and prognostic significance of TGF-beta isotypes, latent TGF-beta 1 binding protein, TGF-beta type I and type II receptors, and endoglin in normal ovary and ovarian neoplasms. *Lab Invest.* 1995, 73:213-220.
- Hill LB, O'Connell JB, Ko CY. Colorectal cancer: epidemiology and health services research. *Surg Oncol Clin N Am.* 2006, 15:21-37.
- Hodge D, Coghill E, Keys J, Maguire T, Hartmann B, McDowall A, Weiss M, Grimmond S, Perkins A. A global role for EKLF in definitive and primitive erythropoiesis. *Blood.* 2006, 107:3359-3370.
- Hsu SM, Raine L, Fanger H. A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. *Am J Clin Pathol.* 1981, 75: 734-738.
- Huber TL, Perkins AC, Deconinck AE, Chan FY, Mead PE, Zon LI. Neptune, a Kruppel-like transcription factor that participates in primitive erythropoiesis in *Xenopus*. *Curr Biol.* 2001, 18:1456-1461.
- Huelsken J, Birchmeier W. New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates. *Curr Opin Genet Dev.* 2001, 11:547-553.
- Inuzuka H, Wakao H, Masuho Y, Muramatsu MA, Tojo H, Nanbu-Wakao R: cDNA cloning and expression analysis of mouse zf9, a Kruppel-like transcription factor gene that is induced by adipogenic hormonal stimulation in 3T3-L1 cells. *Biochim Biophys Acta.* 1999, 1447:199-207.
- Ito G, Uchiyama M, Kondo M, Mori S, Usami N, Maeda O, Kawabe T, Hasegawa Y, Shimokata K and Sekido Y Kruppel-like factor 6 is frequently down-regulated and induces apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Res.* 2004, 64:3838-3843.
- Janczukowicz J. The prognostic role of proliferation activity in human CNS tumours: the determination of AgNOR, PCNA and Ki-67 expression. Part 1: AgNOR expression in CNS tumours. *Folia Neuropathol.* 2003, 2:97-101.
- Jemal A, Kulldorff M, Devesa SS, Hayes RB, Fraumeni JF Jr. A geographic analysis of prostate cancer mortality in the United States, 1970-89. *Int J Cancer.* 2002, 101:168-174.
- Jeng YM, Hsu HC: KLF6, a putative tumor suppressor gene, is mutated in astrocytic gliomas. *Int J Cancer.* 2003, 105:625-629.

- Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet.* 1999, 21:163-167.
- Karlen P, Lofberg R, Brostrom O, Leijonmarck CE, Hellers G, Persson PG. Increased risk of cancer in ulcerative colitis: a population-based cohort study. *Am J Gastroenterol.* 1999, 4:1047-1052.
- Kettunen E, Anttila S, Seppanen J K, Karjalainen A, Edgren H, Lindstrom I, Salovaara R, Nissen A M, Salo J, Mattson K, Hollmen J, Knuutila S and Wikman H. Differentially expressed genes in nonsmall cell lung cancer: expression profiling of cancer-related genes in squamous cell lung cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 2004, 149:98-106.
- Kim Y, Ratziu V, Choi SG, Lalazar A, Theiss G, Dang Q, Kim SJ, Friedman SL. Transcriptional activation of transforming growth factor beta1 and its receptors by the Kruppel-like factor Zf9/core promoter-binding protein and Sp1. Potential mechanisms for autocrine fibrogenesis in response to injury. *J Biol Chem.* 1998, 273:33750-33758.
- Kimmelman AC, Qiao RF, Narla G, Banno A, Lau N, Bos PD, Nunez Rodriguez N, Liang BC, Guha A, Martignetti JA, Friedman SL, Chan AM. Suppression of glioblastoma tumorigenicity by the Kruppel-like transcription factor KLF6. *Oncogene.* 2004, 23:5077-5083.
- Kinzler KW, Nilbert MC, Su LK, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, Smith KJ, Preisinger AC, Hedge P, McKechnie D, et al. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science.* 1991, 253:661-665.
- Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell.* 1996, 87:159-170.
- Kojima S, Hayashi S, Shimokado K, Suzuki Y, Shimada J, Crippa MP, Friedman SL. Transcriptional activation of urokinase by the Kruppel-like factor Zf9/COPEB activates latent TGF-beta1 in vascular endothelial cells. *Blood.* 2000, 95:1309-1316.
- Koleva RI, Conley BA, Romero D, Riley KS, Marto JA, Lux A, Vary CP. Endoglin structure and function: Determinants of endoglin phosphorylation by transforming growth factor-beta receptors. *J Biol Chem.* 2006, 281:25110-25123.
- Koritschoner NP, Bocco JL, Panzetta-Dutari GM, Dumur CI, Flury A, Patrio LC. A novel human zinc finger protein that interacts with the core promoter element of a TATA box-less gene. *J Biol Chem.* 1997, 272:9573-9580.

- Kremer-Tal S, Reeves HL, Narla G, Thung SN, Schwartz M, Difeo A, Katz A, Bruix J, Bioulac-Sage P, Martignetti JA, Friedman SL. Frequent inactivation of the tumor suppressor Kruppel-like factor 6 (KLF6) in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2004, 40:1047-1052.
- Kremer-Tal S, Narla G, Chen Y, Hod E, DiFeo A, Yea S, Lee JS, Schwartz M, Thung SN, Fiel IM, Banck M, Zimran E, Thorgeirsson SS, Mazzaferro V, Bruix J, Martignetti JA, Llovet JM, Friedman SL. Downregulation of KLF6 is an early event in hepatocarcinogenesis, and stimulates proliferation while reducing differentiation. *J Hepatol*. 2007, 46: 645-654.
- Kumar S, Ghellal A, Li C, Byrne G, Haboubi N, Wang JM, Bundred N. Breast carcinoma: vascular density determined using CD105 antibody correlates with tumor prognosis. *Cancer Res*. 1999, 59:856-861.
- Kuo CT, Veselits ML, Barton KP, Lu MM, Clendenin C, Leiden JM. The LKLF transcription factor is required for normal tunica media formation and blood vessel stabilization during murine embryogenesis. *Genes Dev*. 1997, 11: 2996-3006 (b).
- Lacopetta B, Elsaleh H, Zeps N. Microsatellite instability in colon cancer. *N Engl J Med*. 2003, 349:1774-1776.
- Lambert R, Provenzale D, Ectors N, Vainio H, Dixon MF, Atkin W, Werner M, Franceschi S, Watanabe H, Tytgat GN, Axon AT, Neuhaus H. Early diagnosis and prevention of sporadic colorectal cancer. *Endoscopy*. 2001, 33:1042-1064.
- Lamprecht SA, Lipkin M. Migrating colonic crypt epithelial cells: primary targets for transformation. *Carcinogenesis*. 2002, 23:1777-1780.
- Lastres P, Bellon T, Cabanas C, Sanchez-Madrid F, Acevedo A, Gougos A, Letarte M, Bernabeu C. Regulated expression on human macrophages of endoglin, an Arg-Gly-Asp-containing surface antigen. *Eur J Immunol*. 1992, 22:393-397.
- Lastres P, Letamendia A, Zhang H, Rius C, Almendro N, Raab U, Lopez LA, Langa C, Fabra A, Letarte M, Bernabeu C. Endoglin modulates cellular responses to TGF-beta 1. *J Cell Biol*. 1996, 133:1109-1121.
- Lastres P, Martin-Perez J, Langa C, Bernabeu C. Phosphorylation of the human-transforming-growth-factor-beta-binding protein endoglin. *Biochem J*. 1994, 301:765-768.

- Latarjet, M; Ruiz Liard, A. "Anatomía Humana". Ed.: Médica Panamericana. 4ª edición. México, 2004.
- Lebrin F, Goumans MJ, Jonker L, Carvalho RL, Valdimarsdottir G, Thorikay M, Mummery C, Arthur HM, ten Dijke P. Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction. *EMBO J.* 2004, 23:4018-4028.
- Letamendia A, Lastres P, Botella LM, Raab U, Langa C, Velasco B, Attisano L, Bernabeu C. Role of endoglin in cellular responses to transforming growth factor-beta. A comparative study with betaglycan. *J Biol Chem.* 1998, 273: 33011-33019.
- Levine RJ, Lam C, Qian C, Yu KF, Maynard SE, Sachs BP, Sibai BM, Epstein FH, Romero R, Thadhani R, Karumanchi SA; CPEP Study Group. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med.* 2006, 355:992-1005.
- Li C, Guo B, Bernabeu C, Kumar S. Angiogenesis in breast cancer: the role of transforming growth factor beta and CD105. *Microsc Res Tech.* 2001, 52: 437-449.
- Li C, Guo B, Wilson PB, Stewart A, Byrne G, Bundred N, Kumar S. Plasma levels of soluble CD105 correlate with metastasis in patients with breast cancer. *Int J Cancer.* 2000, 89:122-126.
- Li C, Hampson I N, Hampson L, Kumar P, Bernabeu C, Kumar S. CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor beta1 on human vascular endothelial cells. *Faseb J.* 2000, 14:55-64.
- Li CG, Wilson PB, Bernabeu C, Raab U, Wang JM, Kumar S. Immunodetection and characterisation of soluble CD105-TGFbeta complexes. *J Immunol Methods.* 1998, 218:85-93.
- Li DY, Sorensen LK, Brooke BS, Urness LD, Davis EC, Taylor DG, Boak BB, Wendel DP. Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science.* 1999, 284: 1534-1537.
- Liebens FP, Carly B, Pastijn A, Rozenberg S. Management of BRCA1/2 associated breast cancer: a systematic qualitative review of the state of knowledge in 2006. *Eur J Cancer.* 2007, 43:238-257.
- Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, Zhang Z, Lin X, He X. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dualkinase mechanism. *Cell.* 2002, 108:37-47 (a).

- Liu Y, Jovanovic B, Pins M, Lee C, Bergan RC. Over expression of endoglin in human prostate cancer suppresses cell detachment, migration and invasion. *Oncogene*. 2002, 21:8272-82781(b).
- López-Abente G, Pollan M, Aragonese N, Pérez-Gómez B, Henández Barrera V, Lópe V, Suarez B. State of cancer in Spain: incidence. *An Sist Sanit Navar*. 2004, 2:165-173.
- Lopez-Beltran A, Qian J, Montironi R, Luque RJ, Bostwick DG. Atypical adenomatous hyperplasia (adenosis) of the prostate: DNA ploidy analysis and immunophenotype. *Int J Surg Pathol*. 2005, 2:167-173.
- López-Casillas F, Cheifetz S, Doody J, Andres JL, Lane WS, Massague J. Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF-beta receptor system. *Cell*. 1991, 67:785-795.
- Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2003, 348: 919-932.
- Marazuela M, Sanchez-Madrid F, Acevedo A, Larranaga E, de Landazuri MO. Expression of vascular adhesion molecules on human endothelia in autoimmune thyroid disorders. *Clin Exp Immunol*. 1995,102:328-334.
- Marra G, Boland CR. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: the syndrome, the genes, and historical perspectives. *J Natl Cancer Inst*. 1995, 87:1114-1125.
- Massague J, Blain SW, Lo RS. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell*. 2000, 103:295-309.
- Matsubara S, Bourdeau A, Brugge KG, Wallace C, Letarte M. Analysis of endoglin expression in normal brain tissue and in cerebral arteriovenous malformations. 2000, 31:2653-2660.
- Matsumoto N, Laub F, Aldabe R, Zhang W, Ramirez F, Yoshida T, Terada M. Cloning the cDNA for a new human zinc finger protein defines a group of closely related Kruppel-like transcription factors. *J Biol Chem*. 1998, 273:28229-28237.
- Mazoyer S, Puget N, Perrin-Vidoz L, Lynch HT, Serova-Sinilnikova OM, Lenoir GM. A BRCA1 nonsense mutation causes exon skipping. *Am J Hum Genet*. 1998, 62:713-715.
- Merika M, Orkin SH. Functional synergy and physical interactions of the erythroid transcription factor GATA-1 with the Kruppel family proteins Sp1 and EKLF. *Mol Cell Biol*. 1995, 15:2437-2447.

- Meurer SK, Tihaa L, Lahme B, Gressner AM, Weiskirchen R. Identification of endoglin in rat hepatic stellate cells: new insights into transforming growth factor beta receptor signaling. *J Biol Chem.* 2005, 280:3078-3087.
- Meyerhardt JA, Mayer RJ. Systemic therapy for colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2005, 352:476-487.
- Miller DW, Graulich W, Karges B, Stahl S, Ernst M, Ramaswamy A, Sedlacek HH, Muller R, Adamkiewicz J. Elevated expression of endoglin, a component of the TGF-beta-receptor complex, correlates with proliferation of tumor endothelial cells. *Int J Cancer.* 1999, 81:568-572.
- Miyaki M, Konishi M, Tanaka K, Kikuchi-Yanoshita R, Muraoka M, Yasuno M, Igari T, Koike M, Chiba M, Mori T. Germline mutation of MSH6 as the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet.* 1997, 17:271-282.
- Miyoshi Y, Nagase H, Ando H, Horii A, Ichii S, Nakatsuru S, Aoki T, Miki Y, Mori T, Nakamura Y. Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum Mol. Genet.* 1992, 1:229-233.
- Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW. Activation of b-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in b-catenin or APC. *Science.* 1997, 275:1787-1790.
- Narla G, DiFeo A, Reeves HL, Schaid DJ, Hirshfeld J, Hod E, Katz A, Isaacs WB, Hebbing S, Komiya A, McDonnell SK, Wiley KE, Jacobsen SJ, Isaacs SD, Walsh PC, Zheng SL, Chang BL, Friedrichsen DM, Stanford JL, Ostrander EA, Chinnaiyan AM, Rubin MA, Xu J, Thibodeau SN, Friedman SL, Martignetti JA. A germline DNA polymorphism enhances alternative splicing of the KLF6 tumor suppressor gene and is associated with increased prostate cancer risk. *Cancer Res.* 2005, 65:1213-122 (a).
- Narla G, DiFeo A, Yao S, Banno A, Hod E, Reeves HL, Qiao RF, Camacho-Vanegas O, Levine A, Kirschenbaum A, Chan AM, Friedman SL, Martignetti JA. Targeted inhibition of the KLF6 splice variant, KLF6 SV1, suppresses prostate cancer cell growth and spread. *Cancer Res.* 2005, 65:5761-5768 (b).
- Narla G, Heath KE, Reeves HL, Li D, Giono LE, Kimmelman AC, Glucksman MJ, Narla J, Eng FJ, Chan AM, Ferrari AC, Martignetti JA, Friedman SL. KLF6, a candidate tumor suppressor gene mutated in prostate cancer. *Science.* 2001, 294:2563-2566.
- Näthke I. APC at a glance. *J Cell Sci.* 2004, 117: 4873-4875.

- Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science*. 2004, 303:1483-1487.
- Neufeld KL, Zhang F, Cullen BR, White RL. APC-mediated downregulation of beta-catenin activity involves nuclear sequestration and nuclear export. *EMBO Rep*. 2000, 1:519-523.
- Nucci MR, Robinson CR, Longo P, Campbell P, Hamilton SR. Phenotypic and genotypic characteristics of aberrant crypt foci in human colorectal mucosa. *Hum Pathol*. 1997, 12:1396-1407.
- Nuez B, Michalovich D, Bygrave A, Ploemacher R, Grosveld F. Defective haematopoiesis in fetal liver resulting from inactivation of the EKLF gene. *Nature*. 1995, 375:316-318.
- Oates AC, Pratt SJ, Vail B, Yan Y, Ho RK, Johnson SL, Postlethwait JH, Zon LI. The zebrafish *klf* gene family. *Blood* 2001, 98:1792-1801.
- O'Connell PJ, McKenzie A, Fiscaro N, Rockman SP, Pearse MJ, d'Apice AJ. Endoglin: a 180-kD endothelial cell and macrophage restricted differentiation molecule. *Clin Exp Immunol*. 1992, 90:154-159.
- Oft M, Heider KH, Beug H. TGFbeta signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis. *Curr Biol*. 1998, 8:1243-1252.
- Okano J, Opitz OG, Nakagawa H, Jenkins TD, Friedman SL, Rustgi AK. The Kruppel-like transcriptional factors Zf9 and GKLf coactivate the human keratin 4 promoter and physically interact. *FEBS Lett*. 2000, 473:95-100.
- Pardali K, Moustakas A. Actions of TGF-beta as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2007, 1775:21-1762.
- Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol*. 2001, 9: 533-543.
- Parkin DM. International variation. *Oncogene*. 2004, 38:6329-6340.
- Peifer M. Colon construction. *Nature*. 2002, 410:274-275.
- Perez-Gomez E, Eleno N, Lopez-Novoa JM, Ramirez JR, Velasco B, Letarte M, Bernabeu C, Quintanilla M. Characterization of murine S-endoglin isoform and its effects on tumor development. *Oncogene*. 2005, 24:4450-4461.
- Perucho M. Cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Biol Chem*. 1996, 377: 675-684.
- Petitjean A, Achatz MI, Borresen-Dale AL, Hainaut P, Olivier M. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene*. 2007, 26:2157-2165.

- Philipsen S, Suske G. A tale of three fingers: the family of mammalian Sp/XKLF transcription factors. *Nucleic Acids Res.* 1999, 27:2991-3000.
- Pinto D, Clevers H. Wnt. Stem cells and cancer in the intestine. *Biol Cell.* 2005, 97: 185-96.
- Polakis P, Hart M, Rubinfeld B. Defects in the regulation of beta-catenin in colorectal cancer. *Adv Exp Med Biol.* 1999. 470:23-32 (a).
- Polakis P. The oncogenic activation of beta-catenin. *Curr Opin Genet Dev.* 1999, 9: 15-21 (b).
- Portella G, Cumming SA, Liddell J, Cui W, Ireland H, Akhurst RJ, Balmain A. Transforming growth factor beta is essential for spindle cell conversion of mouse skin carcinoma in vivo: implications for tumor invasion. *Cell Growth Differ.* 1998, 9:393-404.
- Potten CS, Loeffler M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development.* 1990, 110:1001-1012.
- Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, Vogelstein B, Kinzler KW. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature.* 1992, 359:235-237.
- Preston SL, Wong WM, Chan AO, Poulson R, Jeffery R, Goodlad RA, Mandir N, Elia G, Novelli M, Bodmer WF, Tomlinson IP, Wright NA. Bottom-up histogenesis of colorectal adenomas: origin in the monocryptal adenoma and initial expansion by crypt fission. *Cancer Res.* 2003, 63:3819-3825.
- Pretlow TP, Brasitus TA, Fulton NC, Cheyer C, Kaplan EL. K-ras mutations in putative preneoplastic lesions in human colon. *J Natl Cancer Inst.* 1993, 85: 2004-2007.
- Qu Z, Huang X, Ahmadi P, Stenberg P, Liebler JM, Le AC, Planck SR, Rosenbaum JT. Synthesis of basic fibroblast growth factor by murine mast cells. Regulation by transforming growth factor beta, tumor necrosis factor alpha, and stem cell factor. *Int Arch Allergy Immunol.* 1998, 15:47-54.
- Quintanilla M, Ramirez JR, Perez-Gomez E, Romero D, Velasco B, Letarte M, Lopez-Novoa JM, Bernabeu C. Expression of the TGF-beta coreceptor endoglin in epidermal keratinocytes and its dual role in multistage mouse skin carcinogenesis. *Oncogene.* 2003, 22:5976-5985.
- Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature.* 2002, 418:934.

- Rajagopalan H, Nowak MA, Vogelstein B, Lengauer C. The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003, 3:695-701.
- Ratziu V, Lalazar A, Wong L, Dang Q, Collins C, Shaulian E, Jensen S, Friedman SL: Zf9, a Kruppel-like transcription factor up-regulated in vivo during early hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998, 95:9500-9505.
- Reeves HL, Narla G, Ogunbiyi O, Haq AI, Katz A, Benzeno S, Hod E, Harpaz N, Goldberg S, Tal-Kremer S, Eng FJ, Arthur MJ, Martignetti JA, Friedman SL. Kruppel-like factor 6 (KLF6) is a tumor-suppressor gene frequently inactivated in colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2004, 126:1090-1103.
- Rich J, Borton A and Wang X Transforming growth factor-beta signaling in cancer. *Microsc Res Tech*. 2001, 52:363-373.
- Riesewyk C, Hawyard C, Enser V, Northover J. Referral and diagnostic process in suspected colorectal cancer needs to be improved to achieve two week target. *BMJ*. 2000, 321:1527.
- Robledo MM, Hidalgo A, Lastres P, Arroyo A G, Bernabeu C, Sanchez-Madrid F and Teixido J Characterization of TGF-beta 1-binding proteins in human bone marrow stromal cells. *Br J Haematol*. 1996, 93:507-514.
- Rodriguez-Barbero A, Obreo J, Eleno N, Rodriguez-Pena A, Duwel A, Jerkic M, Sanchez-Rodriguez A, Bernabeu C, Lopez-Novoa JM. Endoglin expression in human and rat mesangial cells and its upregulation by TGF-beta I. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001. 282:142-147.
- Roy-Chaudhury P, Simpson JG, Power DA. Endoglin, a transforming growth factor-beta-binding protein, is upregulated in chronic progressive renal disease. *Exp Nephrol*. 1997, 5: 55-60.
- Ruoslahti E. Proteoglycans in cell regulation. *J Biol Chem*. 1989, 264:13369-13372.
- Rustgi AK. Hereditary gastrointestinal polyposis and nonpolyposis syndromes. *N Engl J Med*. 1994, 331:1694-702.
- Saad RS, El-Gohary Y, Memari E, Liu YL, Silverman JF. Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in esophageal adenocarcinoma. *Hum Pathol*. 2005, 36:955-961.
- Sancho E, Batlle E, Clevers H. Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004, 20:695-723.
- Sanz-Rodriguez F, Fernandez-L A, Zarrabeitia R, Perez-Molino A, Ramirez JR, Coto E, Bernabeu C, Botella LM. Mutation analysis in Spanish patients with

- hereditary hemorrhagic telangiectasia: deficient endoglin up-regulation in activated monocytes. *Clin Chem.* 2004, 50:2003-2011 (a).
- Sanz-Rodriguez F, Guerrero-Esteo M, Botella LM, Banville D, Vary CP, Bernabeu C. Endoglin regulates cytoskeletal organization through binding to ZRP-1, a member of the Lim family of proteins. *J Biol Chem.* 2004, 279:32858-32868 (b).
- Segre JA, Bauer C, Fuchs E. Klf4 is a transcription factor required for establishing the barrier function of the skin. *Nat Genet.* 1999, 22:356-360.
- Segditsas S, Tomlinson I. Colorectal cancer and genetic alterations in the Wnt pathway. *Oncogene.* 2006, 25:7531-7537.
- Seitz HK, Maurer B, Stickel F. Alcohol consumption and cancer of the gastrointestinal tract. *Dig Dis.* 2005, 23:297-303.
- Sharma DC. Johns Hopkins and RCC face drug trial allegations. *Lancet Oncol.* 2001, 9:530
- Sharrard RM, Maitland NJ. Alternative splicing of the human PTEN/MMAC1/TEP1 gene. *Biochim Biophys Acta.* 2000. 1494:282-285.
- Shih IM, Wang TL, Traverso G, Romans K, Hamilton SR, Ben-Sasson S, Kinzler KW, Vogelstein B. Top-down morphogenesis of colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001. 98:2640-265.
- Siegel PM, Shu W, Massague J. Mad upregulation and Id2 repression accompany transforming growth factor (TGF)-beta-mediated epithelial cell growth suppression. *J Biol Chem.* 2003, 278:35444-35450.
- Sigalas I, Calvert AH, Anderson JJ, Neal DE, Lunec J. Alternatively spliced mdm2 transcripts with loss of p53 binding domain sequences: transforming ability and frequent detection in human cancer. *Nat Med.* 1996, 2:912-917.
- Slavin DA, Koritschoner NP, Prieto CC, Lopez-Diaz FJ, Chatton B, Bocco JL. A new role for the Kruppel-like transcription factor KLF6 as an inhibitor of c-Jun proto-oncoprotein function. *Oncogene.* 2004, 23:8196-8205.
- Solomon MJ, Schnitzler M. Cancer and inflammatory bowel disease: bias, epidemiology, surveillance, and treatment. *World J Surg.* 1998, 4:352-458.
- St-Jacques S, Cymerman U, Pece N, Letarte M. Molecular characterization and in situ localization of murine endoglin reveal that it is a transforming growth factor-beta binding protein of endothelial and stromal cells. *Endocrinology.* 1994, 134:2645-2657.

- Sur I, Uden AB, Toftgard R: Human Kruppel-like factor5/KLF5. synergy with NF-kappaB/Rel factors and expression in human skin and hair follicles. *Eur J Cell Biol.* 2002, 81:323-334.
- Suzuki T, Yamamoto T, Kurabayashi M, Nagai R, Yazaki Y, Horikoshi M. Isolation and initial characterization of GBF, a novel DNA-binding zinc finger protein that binds to the GC-rich binding sites of the HIV-1 promoter [In Process Citation]. *J Biochem. (Tokyo).* 1998, 124:389-395.
- Suzuki T, Aizawa K, Matsumura T, Nagai R. Vascular implications of the Kruppel-like family of transcription factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005, 25: 1135-1141.
- Takagi Y, Koumura H, Futamura M, Aoki S, Ymaguchi K, Kida H, Tanemura H, Shimokawa K, Saji S. Somatic alterations of the SMAD-2 gene in human colorectal cancers. *Br J Cancer.* 1998, 78:1152-1155.
- Takayama T, Katsuki S, Takahashi Y, Ohi M, Nojiri S, Sakamaki S, Kato J, Kogawa K, Miyake H, Niitsu Y. Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer. *N Engl J Med.* 1998, 339:1277-1284.
- Toporsian M, Gros R, Kabir MG. A role for endoglin in coupling eNOS activity and regulating vascular tone revealed in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Circ Res.* 2005, 96:684-692.
- Van den Brandt PA, Goldbohm RA. Nutrition in the prevention of gastrointestinal cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2006, 20:589-603.
- Van de Kerkhof PC, Rulo HF, van Pelt JP, van Vlijmen-Willems IM, De Jong EM. Expression of endoglin in the transition between psoriatic uninvolved and involved skin. *Acta Derm Venereol.* 1998, 78:19-21.
- Van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau W, Oving I, Hurlstone A, van der Horn K, Battle E, Coudreuse D, Haramis AP, Tjon-Pon-Fong M, Moerer P, van den Born M, Soete G, Pals S, Eilers M, Medema R, Clevers H. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell.* 2002, 111:241-250.
- Vandenbroucke I, Callens T, De Paepe A and Messiaen L Complex splicing pattern generates great diversity in human NF1 transcripts. *BMC Genomics.* 2002, 3:13 (a).
- Vandenbroucke I, Vandesompele J, De Paepe A, Messiaen L. Quantification of NF1 transcripts reveals novel highly expressed splice variants. *FEBS Lett.* 2002, 522:71-76 (b).

- Varley JM, Attwooll C, White G, McGown G, Thorncroft M, Kelsey AM, Greaves M, Boyle J, Birch JM. Characterization of germline TP53 splicing mutations and their genetic and functional analysis. *Oncogene*. 2001, 20:2647-2654.
- Veigl ML, Kasturi L, Olechnowicz J, Ma AH, Lutterbaugh JD, Periyasamy S, Li GM, Drummond J, Modrich PL, Sedwick WD, Markowitz SD. Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998, 95:8698-8702.
- Venables JP. Aberrant and alternative splicing in cancer. *Cancer Res*. 2004, 64:7647-7654.
- Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T, Kim YM, Bdolah Y, Lim KH, Yuan HT, Libermann TA, Stillman IE, Roberts D, D'Amore PA, Epstein FH, Sellke FW, Romero R, Sukhatme VP, Letarte M, Karumanchi SA. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med*. 2006, 12:642-9. Erratum in: *Nat Med*. 2006, 12:862.
- Vincent EB, Runyan RB, Weeks DL. Production of the transforming growth factor-beta binding protein endoglin is regulated during chick heart development. *Dev Dyn*. 1998, 213:237-247.
- Wahl G, Vafa O. Genetic instability, oncogenes, and the p53 pathway. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2000. 65:511-520.
- Wang S, Zhang W, Chen X, Chang Q. A candidate tumor suppressor gene of primary hepatocellular carcinoma - KLF6. *J Hepatol*. 2003, 38:301.
- Wang XQ, Luk JM, Leung PP, Wong BW, Stanbridge EJ, Fan ST. Alternative mRNA splicing of liver intestine-cadherin in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2005, 11:483-489.
- Wang X, Feuerstein GZ, Gu JL, Lysko PG, Yue TL. Interleukin-1 beta induces expression of adhesion molecules in human vascular smooth muscle cells and enhances adhesion of leukocytes to smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 1995, 115:89-98.
- Warke VG, Nambiar MP, Krishnan S, Tenbrock K, Geller DA, Koritschoner NP, Atkins JL, Farber DL, Tsokos GC. Transcriptional activation of the human inducible nitric-oxide synthase promoter by Kruppel-like factor 6. *J Biol Chem*. 2003, 278:14812-14819.
- Watson P, Lin KM, Rodriguez-Bigas MA, Smyrk T, Lemon S, Shashidharan M, Franklin B, Karr B, Thorson A, Lynch HT. Colorectal carcinoma survival

- among hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma family members. *Cancer*. 1998, 83:259-266.
- Westphal JR, Willems HW, Schalkwijk CJ, Ruiter DJ, de Waal RM. A new 180-kDa dermal endothelial cell activation antigen: in vitro and in situ characteristics. *J Invest Dermatol*. 1993, 100:27-34.
- Winawer SJ, Flehinger BJ, Schottenfeld D, Miller DG. Screening for colorectal cancer with fecal occult blood testing and sigmoidoscopy. *J Natl Cancer Inst*. 1993, 85:1311-1318.
- Winawer SJ, St John DJ, Bond JH, Rozen P, Burt RW, Waye JD, Kronborg O, O'Brien MJ, Bishop DT, Kurtz RC, Shike M, Swaroop SV, Levin B, Fruhmorgen P, Lynch HT. Prevention of colorectal carcinoma. Current WHO guidelines for early detection of colorectal carcinoma. World Health Organization Collaborating Center for the Prevention of Colorectal Cancer. *Leber Magen Darm*. 1996, 26:139-140.
- Wright N., Epithelial stem cell repertoire in the gut: clues to the origin of cell lineages, proliferative units and cancer. *Int. J. Exp. Path.* 2000, 81:117–143.
- Wu S, Cetinkaya C, Munoz-Alonso MJ, von der Lehr N, Bahram F, Beuger V, Eilers M, Leon J, Larsson LG. Myc represses differentiation-induced p21^{CIP1} expression via Miz-1-dependent interaction with the p21 core promoter. *Oncogene*. 2003, 22:351-260.
- Wu J, Lingrel JB. Kruppel-like factor 2, a novel immediate-early transcriptional factor, regulates IL-2 expression in T lymphocyte activation. *J Immunol*. 2005, 175: 3060-3066.
- Yamashita K, Upadhyay S, Osada M, Hoque M O, Xiao Y, Mori M, Sato F, Meltzer S J, Sidransky D. Pharmacologic unmasking of epigenetically silenced tumor suppressor genes in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Cell*. 2002, 2:485-495.
- Yasuda K, Hirayoshi K, Hirata H, Kubota H, Hosokawa N, Nagata K. The Kruppel-like factor Zf9 and proteins in the Sp1 family regulate the expression of HSP47, a collagen-specific molecular chaperone. *J Biol Chem*. 2002, 277: 44613-44622.
- Zhang W, Kadam S, Emerson BM, Bieker JJ. Site-specific acetylation by p300 or CREB binding protein regulates erythroid Kruppel-like factor transcriptional activity via its interaction with the SWI-SNF complex. *Mol Cell Biol*. 2001, 21: 2413-2422.

Zhang Z, Teng CT. Phosphorylation of Kruppel-like factor 5 (KLF5/IKLF) at the CBP interaction region enhances its transactivation function. *Nucleic Acids Res.* 2003, 31:2196-2208.

Zhao JL, Austen KF, Lam BK. Cell-specific transcription of leukotriene C(4) synthase involves a Kruppel-like transcription factor and Sp1. *J Biol Chem.* 2000, 275: 8903-8910.

ABREVIATURAS

- **ACF** : “Aberrant Crypt foci”
- **AgNORs** : Regiones organizadoras nucleolares argirofilas
- **ANG** : Angiogénesis
- **APC** : “Adenomatous Polyposis Coli”
- **B23** : Fosfoproteína nucleolar, con actividad chaperona
- **BMP** : Proteína morfogenética ósea
- **B-RAF** : v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
- **BRCA** : Gen asociado con el cáncer de mama
- **C23** : Nucleolina
- **CCHNP** : Cáncer colorrectal hereditario no polipósico
- **CCR** : Cáncer colorrectal
- **Cdks** : Quinasas dependientes de Ciclinas
- **CEA** : Antígeno de Carcinoma Embrionario
- **c-erbB-2** : Oncogen implicado en cáncer mamario,
- **Dsh** : “Dishevelled”
- **GSK-3 β** : Glucógeno sintasa quinasa-3 β
- **HHT1** : Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria tipo I
- **HSP90** : Heat Shock Protein 90
- **Ki67** : Factor de proliferación celular
- **KLF** : Factores de transcripción Krüppel
- **KLF6** : Krüppel-like factor 6
- **LOH** : Pérdida de la Heterocigosidad
- **MLH** : Gen de reparación
- **MMR** : Reparación de genes y cadenas no metiladas (“mismatch repair”)
- **MSH** : Gen de reparación
- **MSI+** : Inestabilidad microsatélites
- **p21** : Oncogen, regulador de p53
- **P53** : Supresor Tumoral
- **PAF** : Poliposis Adenomatosa Familiar
- **PCNA** : Antígeno Nuclear de Proliferación Celular
- **PTEN** : Modulador importante del ciclo celular proliferativo y de la muerte celular programada
- **Rb** : Retinoblastoma
- **RE** : Receptores de estrógenos
- **RGD** : Dominio extracelular de endoglina formada por: arginina-glicina-ácido aspártico
- **RP** : Receptores de Progesterona
- **SMAD** : Gen supresor tumoral
- **TEM** : Transición epitelio-mesénquima
- **TGF- β** : Factor de crecimiento transformante beta
- **TNM** : “Tumor, Node, Metastasis Stage Grouping”
- **Wnt** : “Wingless”
- **ZRP1** : Dominio citoplásmico de Endoglina
- **DMEM** : Dulbecco’ s Modified Eagle’s Medium

- **SFB** : Suero fetal de bovino
- **EDTA** : Acido etilendiaminotetra acético
- **AT** : Azul de toluidina
- **MTT** : 3-(4-5-dimetiltiazol-2-il) 2,5 bromuro difeniltetrazolio
- **SDS** : Dodecil Sulfato de Sodio
- **PFA** : Paraformaldehido
- **BSA** : Suero de Albúmina Bovino
- **DAB** : Diaminobezidina
- **TRITC** : Faloidina conjugada a tetrametil-rodamina
- **NOS** : Sin otra especificación (not otherwise specified)
- **RT- PCR** : Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
- **FITC** : Fluoresceína-5-isotiocianato
- **TRITC** : Tetramethylrhodamine-5-isothiocianato
- **PAS** : Ácido periodico Schiff
- **SBP** : Estreptavidina-biotina-peroxidasa
- **DAB** : Diaminobencidina
- **GAPDH** : Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
- **BCA** : Ácido bicinconínico
- **SDS** : Dodecil sulfato de sodio
- **PDVF** : Polyvinylidene Difluoride, membranes
- **TTBS** : Buffers Tris Salino-Tween
- **ECL** : Eletrogenerated chemiluminescence
- **RT** : Transcriptasa reversa