



Universitat
de les Illes Balears

TESIS DOCTORAL
2021

**ESTUDIO DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL Y EL ESTRÉS
OXIDATIVO EN ESTADIOS AVANZADOS DE CÁNCER DE
COLON**

Reyniel Hernández López



Universitat
de les Illes Balears

TESIS DOCTORAL
2021

**ESTUDIO DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL Y EL ESTRÉS
OXIDATIVO EN ESTADIOS AVANZADOS DE CÁNCER DE
COLON**

Reyniel Hernández López

**Programa Oficial de Doctorado en Investigación Translacional en
Salud Pública y Enfermedades de Alta Prevalencia**

**Directores: Dr. Jordi Oliver Oliver
Dr. Jorge Sastre Serra
Dr. Daniel Gabriel Pons Miró**

Tutor: Dr. Adamo Valle Gómez

Doctor por la *Universitat de les Illes Balears*

Con el beneplácito de los directores:

Dr. Jordi Oliver Oliver

Catedrático de Universidad de Bioquímica
y Biología Molecular

Dr. Jorge Sastre Serra

Profesor contratado doctor

Dr. Daniel Gabriel Pons Miró

Profesor contratado doctor

Área de Bioquímica y Biología Molecular
Depto. Biología Fundamental y Ciencias de la Salud

El interesado

Reyniel Hernández López

**A mis padres,
a mi esposa,
a mis hijos.**

La sabiduría consiste en saber cuál es el siguiente paso;
la virtud, en llevarlo a cabo.

David Starr Jordan

AGRADECIMIENTOS

Una vez leí que somos de media el 90 % de las personas que están a nuestro alrededor, y coincido con ello, ya que a estas personas les debemos agradecer en parte todo lo que somos. Toda una vida no bastaría para devolver todo lo bueno que he recibido, pero lo intento comenzando por MUCHAS GRACIAS.

Me gustaría mostrar mi gratitud a la ciencia y sus investigadores que con su notable ejemplo y desde tiempos inmemoriales luchan por resolver los problemas más acuciantes de la naturaleza y la sociedad. Un ejemplo claro es como hoy en día investigadores de todo el mundo colaboran para crear y aplicar cuanto antes la tan necesaria vacuna contra el Covid-19 y con esto obtenemos todos lo que Anatole F. Thibault (1844- 1924) escritor francés y Premio Nobel de Literatura expresará: *“Nunca se da tanto como cuando se dan esperanzas”*.

En primer lugar, gracias a mis directores de tesis, los doctores Jordi O., Jordi S. y Daniel G. Pons su apoyo ha sido inestimable para el desarrollo de este trabajo. Muchas gracias a Jordi S. y Dani sus experiencias y orientaciones han sido imprescindibles para poder avanzar en el desarrollo de esta tesis. A Jordi O. un agradecimiento especial por la confianza siempre depositada en mí y darme la oportunidad de poder realizar uno de los objetivos más importantes en mi vida, también por toda la ayuda recibida en cada momento que la he necesitado, sobre todo en esta última etapa de culminación, muchas gracias.

Gracias a Pilar por la ayuda ofrecida y por buscar activamente la mejor forma de presentación científica de los resultados encontrados, para que el valor de estos fuera verdaderamente reconocido; gracias también a los demás profesores del departamento, Magdalena, Paco, Bel, Ana y Adamo que recordaré siempre por la cordialidad y las buenas relaciones mostradas desde los primeros momentos.

Agradecer también a Maria M. Company y Javier M. Ibarra de la Rosa del servicio de Anatomía Patológica, Esther Falcó y Teresa Fernández del servicio de Oncología del Hospital Son Llátzer, por la ayuda recibida en los comienzos de esta tesis.

“No hay algo así como un hombre hecho a sí mismo. Alcanzarás tus metas con la ayuda de los demás” Geroge Shinn. Con esta frase quiero recordar y agradecerles a mis colegas de laboratorio Carla, Xavi, Bel, Marcos, Agustín y Melanie por el buen compañerismo y actitud cooperativa que siempre mostraron cada vez que los he necesitado, y por todos los buenos momentos que hemos compartido estos años. Muchas gracias a mis compañeras de laboratorio y de grupo de investigación, Mar y Lida por enseñarme lo necesario

para llevar a cabo una correcta práctica del trabajo y por la ayuda recibida en momentos difíciles. Gracias a Mar por el tiempo compartido y por su actitud metódica, que me ha demostrado lo fácil que puede ser poner en práctica los conocimientos teóricos. A Lida su visión práctica ha sido indispensable para poder solventar las diferentes situaciones adversas que se han presentado, su ayuda ha sido fundamental para poder avanzar en el día a día.

Un agradecimiento muy sentido a toda mi familia por todo el amor y apoyo incondicional que siempre tengo de tan perfecta creación. A mis suegros Tony y Alida que son como unos padres para mí, ya que siempre me han tratado como a un hijo, gracias por apoyarme en la lucha por este importante ideal. A mis padres por educarme en los valores de la entereza y la perseverancia, y por creer en mí, apoyándome en todas las decisiones que he tomado, estoy orgulloso de ellos, y son mi ejemplo para seguir. Durante el desarrollo de esta tesis, pude realizar mi gran sueño, convertirme en padre de Magnus y Alma, gracias a mis queridos hijos por haberme propiciado la más grande motivación para llevar este trabajo científico bajo impensables escenarios y encomiables esfuerzos a su final.

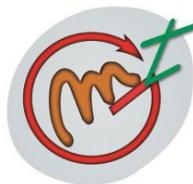
Por último, un agradecimiento infinito a mi esposa Loreidis, por esos dos maravillosos soles que me ha dado, y por haberme escogido como el compañero para su vida, por esa infinita ternura y capacidad de apoyo demostrada durante todos estos años que me ha permitido conquistar esta meta profesional.

Gracias a todos,
Reyniel

Esta tesis doctoral se ha llevado a cabo en el Grupo Multidisciplinar de Oncología Traslacional (GMOT) de la Universidad de las Illes Balears, que forma parte del Instituto Universitario de Investigación en Ciencias de la Salud (IUNICS) y del Instituto de Investigación Sanitaria de las Illes Balears (IdISBa). Este trabajo ha sido posible gracias al proyecto de investigación financiado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias del Instituto de Salud Carlos III del Gobierno de España (PI14/01434) y cofinanciación de fondos FEDER “Una manera de hacer Europa”. También se ha contado con financiación del Centro de Investigaciones Biomédicas en Red de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CiberOBN, CB06/03).



Universitat
de les Illes Balears



ÍNDICE

SIGLAS Y ACRÓNIMOS	I
RESUMEN	III
RESUM.....	IV
ABSTRACT.....	V
1. Introducción	1
1.1. Epidemiología del cáncer de colon	4
1.2. Etiología del cáncer de colon	5
1.3. Clasificación del cáncer de colon	6
1.4. Cáncer de colon metastásico	7
1.5. Función mitocondrial y metabolismo energético del cáncer	9
1.6. Biogénesis y funcionalidad mitocondrial	13
1.7. Estrés oxidativo y cáncer	14
1.8. El tumor y su ambiente	20
2. Objetivos y planteamiento experimental	25
3. Metodología	31
3.1. Selección de pacientes y muestras de tejidos.....	33
3.2. Preparación de muestras de tejidos	34
3.3. Cuantificación de proteínas.....	34
3.4. Caracterización genotípica en las muestras de tejido tumoral de los pacientes.....	36
3.5. Caracterización fenotípica de la inestabilidad de microsatélites en las muestras de tejido tumoral de los pacientes.	37
3.6. Análisis de los niveles proteicos por <i>Western blot</i>	37
3.6.1. Preparación de las muestras de tejidos	38
3.6.2. Electroforesis SDS-PAGE	38
3.6.3. Electrotransferencia semihúmeda.....	39
3.6.4. Inmunodetección	40
3.7. Determinación del daño oxidativo en proteínas y lípidos	41

3.8. Cuantificación de ADNmt	43
3.9. Determinación de niveles de glutatión	44
3.10. Análisis de las actividades enzimáticas	46
3.10.1. Determinación de la actividad IDH2	47
3.10.2. Determinación de la actividad COX	48
3.10.3. Determinación de la actividad ATPasa.....	49
3.10.4. Determinación de la actividad MnSOD	50
3.10.5. Determinación de la actividad catalasa	52
3.11. Representación de los resultados obtenidos y análisis estadístico	53
4. Resultados y Discusión.....	55
4.1. Estudio del metabolismo energético y la función mitocondrial en muestras tisulares de pacientes en estadios avanzados de cáncer de colon	57
4.1.1. Resultados.....	57
4.1.2. Discusión	67
4.2. Estudio del estrés oxidativo en muestras tisulares de pacientes en estadios avanzados de cáncer de colon.....	72
4.2.1. Resultados.....	73
4.2.2. Discusión	82
5. Recapitulación	87
6. Conclusiones.....	97
7. Bibliografía	101
8. Anexo	113

SIGLAS Y ACRÓNIMOS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNmt: ADN mitocondrial

ADP: Adenosina difosfato

AMPK: Proteína quinasa activada por monofosfato de adenosina

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ARNr: Ácido ribonucleico ribosómico

ATP: Adenosina trifosfato

ATPasa: ATP sintasa

CAFs: Fibroblastos asociados al cáncer

CCRm: Cáncer colorrectal metastásico

COX: Citocromo c oxidasa

EMT: Transición epitelio-mesénquima

FADH₂: Flavin adenin dinucleótido reducido

GPx: Glutación peroxidasa

GRd: Glutación reductasa

LDHA: Lactato deshidrogenasa

MDM2: Doble minuto murino 2

MSI: Inestabilidad de microsatélite

NADH: Nicotin adenin dinucleótido reducido

NADPH: Nicotin adenin dinucleótido fosfato reducido

NRF: Factor de respiración nuclear

OXPHOS: Fosforilación oxidativa

PDH: Piruvato deshidrogenasa

PGC1 α : Coactivador 1 α del receptor gamma activado por proliferadores **Prx**: Peroxirredoxina

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SIRT: Sirtuina

SOD: Superóxido dismutasa

TAM: Macrófagos asociados al tumor

TFAM: Factor de transcripción mitocondrial A

TrxR: Tiorredoxina reductasa

UCP: Proteína desacoplante



Universitat
de les Illes Balears

Estudio de la función mitocondrial y el estrés oxidativo en estadios avanzados de cáncer de colon

Tesis doctoral, Reyniel Hernández López

Grupo Multidisciplinar de Oncología Traslacional, Departamento de Biología Fundamental y Ciencias de la Salud

RESUMEN

El cáncer de colon representa una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, con una elevada mortalidad atribuible principalmente a la metástasis. El proceso metastásico implica varias etapas donde las células cancerosas modulan su metabolismo dependiendo de los requerimientos de cada estadio. En los últimos años, se ha incluido como característica distintiva del cáncer, los cambios en el metabolismo energético de la célula cancerosa, donde la disfunción mitocondrial puede provocar estrés oxidativo, el cual se ha asociado a la oncogénesis y la progresión metastásica.

Esta tesis ha tenido como objetivo general la identificación de posibles biomarcadores de pronóstico, relacionados con el metabolismo energético y el estrés oxidativo en el tejido tumoral y en el tejido adyacente no tumoral de pacientes en estadios avanzados III y IV de cáncer de colon. Para ello, se analizaron las adaptaciones relacionadas con la función mitocondrial y el estrés oxidativo en biopsias de pacientes en estadio pre-metastásico (III) y metastásico (IV) de cáncer de colon, comparando tejido tumoral y el tejido adyacente no tumoral del mismo paciente. Los resultados obtenidos muestran que el tejido tumoral pre-metastásico presenta un perfil metabólico oxidante similar al tejido adyacente no tumoral del mismo estadio, con tendencia a promover la función mitocondrial al alcanzar la metástasis. Además, la función mitocondrial presentó diferencias entre los estadios avanzados de cáncer de colon, siendo mayor en el estadio metastásico, aunque se observaron menores niveles proteicos de los complejos OXPHOS en el tejido tumoral del estadio IV. Por otra parte, los tejidos tumorales de ambos estadios presentaron unos niveles de estrés oxidativo muy similares. Sin embargo, en las muestras de tejido adyacente no tumoral de ambos estadios se encontraron las mayores diferencias relacionadas con el estrés oxidativo, mostrando el tejido adyacente no tumoral del estadio metastásico niveles proteicos y de actividades enzimáticas superiores de las proteínas antioxidantes analizadas, reflejando así la respuesta de este tejido frente a un elevado nivel de estrés oxidativo del tejido tumoral.

En conclusión, la presente tesis contribuye a profundizar en el conocimiento del metabolismo energético en estadios avanzados de cáncer de colon, permitiendo identificar, en el metabolismo oxidativo y la función mitocondrial del tejido tumoral, potenciales biomarcadores de pronóstico y evolución del cáncer de colon. Además, las características relacionadas con el estrés oxidativo del tejido adyacente no tumoral podrían también ser evaluadas como biomarcadores de pronóstico de utilidad clínica en pacientes de estadios avanzados de cáncer de colon.



Universitat
de les Illes Balears

Estudi de la funció mitocondrial i l'estrès oxidatiu en estadis avançats de càncer de còlon

Tesi doctoral, Reyniel Hernández López

Grup Multidisciplinari d'Oncologia Traslacional, Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut

RESUM

El càncer de còlon representa una de les principals causes de morbiditat i mortalitat a nivell mundial, amb una elevada mortalitat atribuïble principalment a la metàstasi. El procés metastàtic implica diverses etapes on les cèl·lules canceroses modulen el seu metabolisme depenent dels requeriments de cada estadi. En els últims anys, s'ha inclòs com a característica distintiva del càncer, els canvis en el metabolisme energètic de la cèl·lula cancerosa, on la disfunció mitocondrial pot provocar estrès oxidatiu, el qual s'ha associat a la oncogènesis i la progressió metastàtic.

Aquesta tesi ha tingut com a objectiu general la identificació de possibles biomarcadors pronòstic, relacionats amb el metabolisme energètic i l'estrès oxidatiu en el teixit tumoral i en el teixit adjacent no tumoral de pacients en estadis avançats III i IV de càncer de còlon. Per això, es varen analitzar les adaptacions relacionades amb la funció mitocondrial i l'estrès oxidatiu en biòpsies de pacients en estadi pre-metastàtic (III) i metastàtic (IV) de càncer de còlon, comparant teixit tumoral i teixit adjacent no tumoral del mateix pacient. Els resultats obtinguts mostren que el teixit tumoral pre-metastàtic presenta un perfil metabòlic oxidant similar al teixit adjacent no tumoral del mateix estadi, amb tendència a promoure la funció mitocondrial en aconseguir la metàstasi. A més, la funció mitocondrial va presentar diferències entre els estadis avançats de càncer de còlon, sent major en l'estadi metastàtic, encara que es varen observar menors nivells proteics dels complexos OXPHOS en el teixit tumoral de l'estadi IV. D'altra banda, els teixits tumorals de tots dos estadis varen presentar uns nivells d'estrès oxidatiu molt similars. No obstant això, en les mostres de teixit adjacent no tumoral de tots dos estadis es varem trobar les majors diferències relacionades amb l'estrès oxidatiu, mostrant el teixit adjacent no tumoral de l'estadi metastàtic nivells proteics i d'activitats enzimàtiques superiors de les proteïnes antioxidants analitzades, reflectint així la resposta d'aquest teixit enfront d'un elevat nivell d'estrès oxidatiu del teixit tumoral.

En conclusió, la present tesi contribueix a aprofundir en el coneixement del metabolisme energètic en estadis avançats de càncer de còlon, permetent identificar, en el metabolisme oxidatiu i la funció mitocondrial del teixit tumoral, potencials biomarcadors de pronòstic i evolució del càncer còlon. A més, les característiques relacionades amb l'estrès oxidatiu del teixit adjacent no tumoral podrien també ser avaluades com biomarcadors pronòstic d'utilitat clínica en pacients d'estadis avançats de càncer de còlon.



Universitat
de les Illes Balears

Study of mitochondrial function and oxidative stress in advanced stages of colon cancer.

Doctoral thesis, Reyniel Hernández López

Multidisciplinary Translational Oncology Group, Department of
Fundamental Biology and Health Sciences

ABSTRACT

Colon cancer represents one of the leading causes of morbidity and mortality worldwide, with high mortality mainly attributable to metastasis. The metastatic process involves several stages where the cancer cells modulate their metabolism depending on the requirements of each stage. In recent years, changes in the cancer cell's energy metabolism have been included as a distinctive feature of cancer, where mitochondrial dysfunction can cause oxidative stress, which has been associated with tumorigenesis and metastatic progression.

The general objective of this thesis has been to identify possible prognostic biomarkers related to energy metabolism and oxidative stress in tumor tissue and in adjacent non-tumor tissue of patients in advanced stages III and IV of colon cancer. To this end, adaptations related to mitochondrial function and oxidative stress in biopsies from patients in pre-metastatic (III) and metastatic (IV) stages of colon cancer were analyzed, comparing tumor tissue and adjacent non-tumor tissue from the same patient. The results obtained show that pre-metastatic tumor tissue presents an oxidant metabolic profile similar to the adjacent non-tumor tissue of the same stage, with a tendency to promote mitochondrial function when metastasis is reached. In addition, mitochondrial function showed differences between advanced stages of colon cancer, being higher in the metastatic stage, although lower protein levels of OXPHOS complexes were observed in stage IV tumor tissue. On the other hand, the tumor tissues of both stages showed very similar levels of oxidative stress. However, the greatest differences related to oxidative stress were found between the non-tumor adjacent tissue samples of both stages, with the adjacent non-tumor tissue of the metastatic stage showing higher protein levels and enzyme activities of the antioxidant proteins analyzed, thus reflecting the response of this tissue to a high level of oxidative stress in the tumor tissue.

In conclusion, the present thesis contributes to deepen the knowledge of energy metabolism in advanced stages of colon cancer, allowing the identification, in the oxidative metabolism and mitochondrial function of the tumor tissue, potential biomarkers of prognosis and evolution of colon cancer. In addition, characteristics related to oxidative stress of adjacent non-tumor tissue could also be evaluated as prognostic biomarkers of clinical utility in patients with advanced stages of colon cancer.

1. Introducción

El cáncer abarca un grupo de enfermedades caracterizadas por un crecimiento descontrolado de células anormales, con posibilidad de invadir el tejido circundante y/o diseminarse a puntos distantes del organismo, y que puede originarse prácticamente en cualquier parte del cuerpo. Son consideradas enfermedades genéticas, ya que están provocadas por mutaciones en genes claves implicados en la proliferación celular. Básicamente, mutaciones en oncogenes con ganancia dominante de función y en genes supresores tumorales con pérdida recesiva de función¹.

El cáncer se presenta con una serie de características distintivas las cuales se han observado comunes a las células cancerosas genéticamente alteradas. Estas características con carácter adaptativo que permiten a las células cancerosas sobrevivir y desarrollarse son las siguientes: mantenida activación de señales proliferativas, evasión de la respuesta a los supresores tumorales, resistencia a la muerte celular programada o apoptosis, inducción de la angiogénesis y la activación de la invasión y metástasis¹. A principios de la pasada década se identificaron dos nuevas características, la reprogramación del metabolismo energético, la cual les permite adaptarse a sus requerimientos proliferativos, y la evasión de la respuesta inmune, lo que les facilita blindarse frente a la acción del sistema inmune natural². Subyacentes a estas dos características se encuentran la inestabilidad genómica, lo que promueve la aparición de mutaciones facilitando la progresión tumoral, y la inflamación crónica, que contribuiría a evadir la respuesta inmune². Existen diversos tipos de cánceres, pero según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2018 los que presentaron una mayor incidencia fueron de pulmón, mama, colorrectal, próstata y estómago en ambos sexos³.

1.1. Epidemiología del cáncer de colon

El cáncer de colon se encuentra hoy en día entre los cinco tipos de cáncer más comúnmente diagnosticados, ocupando la tercera y segunda posición a nivel mundial en incidencia y mortalidad respectivamente⁴. Constituye el tercer tipo de cáncer más común entre los hombres y el segundo entre las mujeres de la población mundial; representando así una de las principales causas de muerte en el mundo⁵. Se presenta con elevada morbilidad y mortalidad principalmente en países desarrollados, donde tradicionalmente se ha considerado como una neoplasia maligna de adultos mayores. Sin embargo, se está observando en estos países un gran aumento de casos de cáncer colorrectal (CCR) en adultos jóvenes, muchos de los cuales se diagnostican en etapas avanzadas del tumor y con características agresivas⁶⁻⁸.

La última estadística presentada por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) indica que aproximadamente 2 millones de nuevos casos de CCR fueron detectados en 2018, lo que representa un 10% del total de cánceres diagnosticados en ese año⁴. A nivel geográfico, las mayores tasas de incidencia y mortalidad del CCR se encuentran en el continente de Oceanía, específicamente en Australia y Nueva Zelanda, seguido por el continente europeo, donde Europa del sur ocupa la segunda y tercera posición en incidencia y mortalidad de este continente⁴. Aunque el CCR se considera una enfermedad de países desarrollados donde ocupa el segundo lugar entre los cánceres más comunes, se ha observado un aumento de la frecuencia de nuevos casos diagnosticados en países en vías de desarrollo⁹, esperándose un mayor incremento en las próximas décadas a medida que aumenta la esperanza

de vida de la población y se establezcan estilos de vida sedentarios y patrones alimentarios occidentales^{10,11}.

1.2. Etiología del cáncer de colon

Las causas del cáncer de colon son muy heterogéneas y no están completamente esclarecidas, aunque numerosos estudios señalan al estilo de vida en aspectos nutricionales y actividad física como un factor muy determinante en el desarrollo de esta enfermedad. Estudios previos han observado que el consumo elevado de carne roja y/o preelaborada, alimentos ricos en grasas y/o azúcares, alcohol y dietas pobres en fibra/cereales integrales, sumado a una inactividad física incrementan considerablemente el riesgo de desarrollar esta enfermedad¹²⁻¹⁴. La predisposición genética, el síndrome de Lynch o cáncer de colon hereditario no asociado a poliposis (HNPCC), y/o un historial de pólipos adenomatosos contribuye también notablemente al riesgo de presentar esta enfermedad¹⁵.

Por otra parte, se han identificado alteraciones genéticas muy frecuentes en el cáncer de colon, como es la inestabilidad de microsatélite (MSI) responsable del síndrome de Lynch anteriormente mencionado, la activación de los oncogenes *KRAS/NRAS* y protooncogén *BRAF*, así como mutaciones en los genes de la vía *PI3K/AKT*, y la inactivación de los supresores tumorales como *P53* y *APC*¹⁶⁻¹⁸. Estas alteraciones genéticas presentan una crucial relevancia clínica para el pronóstico en pacientes con CCR, ya que numerosos estudios han demostrado la implicación de estas mutaciones en la respuesta a los tratamientos, llegando a convertirse así en biomarcadores moleculares predictivos para los

pacientes de CCR^{19,20}. Modificaciones epigenéticas relacionadas con la metilación del ADN también se han identificado en pacientes con CCR. Es tal la implicación de estas alteraciones genéticas, que se ha revelado la posibilidad de clasificar el CCR esporádico en distintos epigenotipos, es decir, teniendo en cuenta el patrón de modificaciones epigenéticas que presente el paciente; y su evaluación como biomarcadores predictivos del riesgo personal de padecer CCR^{21,22}.

1.3. Clasificación del cáncer de colon

En 1932, el patólogo británico Cuthbert Esquire Dukes ideó un sistema de clasificación para el cáncer de recto que también aplicó para los carcinomas intestinales²³, a partir del cual se desarrollaron varias formas diferentes de la clasificación de Dukes²⁴. Actualmente este sistema de clasificación ha sido reemplazado en gran medida por el sistema de estadificación TNM, el cual alcanza una descripción más detallada de los diferentes estadios del cáncer de colon.

El TNM es el sistema de clasificación por etapas o estadios del cáncer de colon que provee el Comité Conjunto Americano del Cáncer (AJCC)²⁵. Esta clasificación por etapas o estadios describe la extensión del cáncer de colon en el cuerpo humano en tres categorías: T, N y M. La T indica cuán lejos ha crecido el tumor primario hacia la pared del intestino, alcanzando o no estructuras cercanas; la N indica si este se ha propagado o no a los ganglios linfáticos regionales; y la M indica si se ha producido o no metástasis, crecimiento secundario del cáncer en órganos distantes desde donde se originó. Los órganos más comunes de propagación metastásica del cáncer de colon suelen ser el hígado y los pulmones. A su vez, después

de la T, N y M para hacer una descripción más detallada se utilizan números arábigos (desde el cero hasta el cuatro, lo que indica la gravedad en orden ascendente) y letras ya que provee características específicas de los estadios patológicos. Cuando aparece la letra X, significa que no puede ser evaluado esa categoría, ya que no se dispone de la información necesaria.

La información obtenida de las categorías T, N y M se agrupa para expresar el estadio o etapa del cáncer de colon, comenzando por un estadio inicial expresado con el cero y los siguientes en números romanos desde el I hasta IV (el estadio I es el menos avanzado y el IV es el más avanzado) (Figura 1).

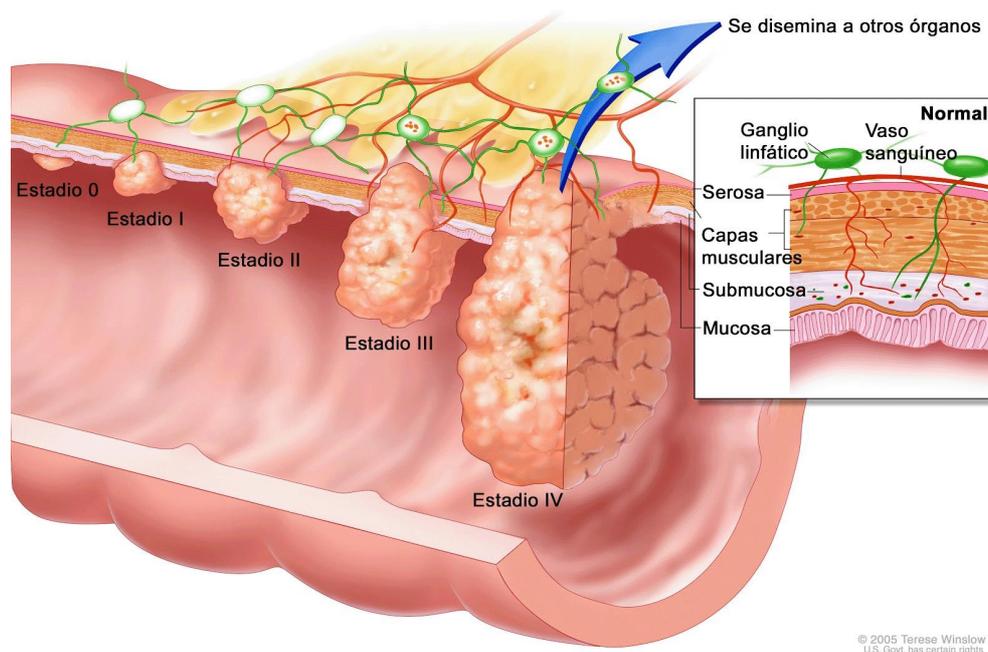


Figura 1. Representación esquemática de los diferentes estadios de cáncer de colon. Adaptado de Winslow T. (2005).

1.4. Cáncer de colon metastásico

La metástasis es un proceso complejo de múltiples pasos, por el cual, las células cancerosas de un tumor primario se propagan a un órgano

distinto del que se originó inicialmente. Para ello, dichas células comienzan un programa de transdiferenciación denominado transición epitelio-mesénquima (EMT), lo que las transforma en un fenotipo celular canceroso invasivo, caracterizado por la pérdida del anclaje y la adhesión celular, con la consiguiente degradación de la membrana basal²⁶. Este fenotipo invasivo accede por vía sanguínea o linfática a la circulación sistémica mayoritariamente, por donde inicia la diseminación metastásica. Generalmente, el cáncer de colon presenta un patrón de invasión primero al hígado y después a los pulmones, y menos frecuentemente a los huesos y al cerebro²⁷. Este patrón metastásico del CCR podría explicarse en parte por la conexión directa entre el intestino y el hígado a través del sistema circulatorio portal²⁸, y posteriormente por la fácil adherencia de las células colorrectales cancerosas a las paredes de los vasos sanguíneos de los órganos potencialmente diana, como los pulmones²⁹.

La progresión metastásica del cáncer se asocia a un mal pronóstico y desenlace para el paciente, por ello se relaciona a la metástasis tumoral con una mayor probabilidad de muerte por cáncer en los pacientes que la presentan. La mayoría de los pacientes con CCR mueren a consecuencia del crecimiento metastásico, representando así la metástasis tumoral, en muchos casos, un obstáculo para la resección curativa del CCR³⁰. Entre los pacientes con CCR aproximadamente el 25% presenta metástasis en el momento del diagnóstico y aproximadamente un 50% desarrollará metástasis durante el padecimiento de la enfermedad^{31,32}.

Los mecanismos moleculares que subyacen al proceso metastásico no están completamente elucidados. Estudios previos han revelado que alteraciones en la vía de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) promueven la colonización hepática. Esta

metástasis hepática a su vez facilita la metástasis pulmonar a través de la liberación de citoquinas que permeabilizan el endotelio de la microvasculatura pulmonar³³. Todo esto indica que en el CCR puede tener lugar un proceso de metástasis secundario a partir de una metástasis primaria. También, se ha observado en el CCR que la mutación en *KRAS* favorece la colonización pulmonar³³, detectándose una elevada incidencia de *KRAS* mutado en metástasis pulmonar de pacientes con CCR, así como, un patrón diferente de recaídas dependiente del estado mutacional de *KRAS*, después de una resección primaria curativa de CCR³⁴.

En las últimas décadas, los tratamientos para el CCR metastásico (CCRm) han tenido un éxito limitado, mejorando las tasas de supervivencia de los pacientes tratados desde aproximadamente 6 meses hasta 2 años, aunque logrando que pocos pacientes con CCRm se curen³⁵. De hecho, muchos pacientes con CCRm adquieren resistencia a los medicamentos durante el tratamiento, mientras que otros presentan quimioresistencia intrínseca^{36,37}.

1.5. Función mitocondrial y metabolismo energético del cáncer

Las mitocondrias son orgánulos de la célula eucariota que están formadas por una doble membrana, la membrana mitocondrial externa y la interna. Esta última separa dos espacios claramente diferenciados, la matriz mitocondrial y el espacio intermembrana. La mitocondria participa en diferentes procesos claves de la dinámica celular, como la biosíntesis de precursores anabólicos, la activación de las vías de apoptosis, la regulación de la proliferación celular y la homeostasis del calcio intracelular^{38,39}. Pero su principal función es satisfacer la demanda

energética de la célula, por ello son responsables de suministrar aproximadamente el 90% de los requerimientos de energía en forma de adenosina trifosfato (ATP), mediante un proceso que tiene lugar en el interior de la mitocondria, la fosforilación oxidativa (OXPHOS)⁴⁰.

OXPHOS es un sistema complejo y controlado, en el cual ocurre un proceso de degradación cíclica de sustratos y un consumo final de oxígeno. Básicamente, los combustibles metabólicos carbohidratos, lípidos y proteínas son dirigidos por la piruvato deshidrogenasa (PDH) hacia el ciclo de Krebs, donde serán oxidados. A partir de este ciclo en el que participan varias enzimas, entre ellas la isocitrato deshidrogenasa (IDH), que ha sido centro de estudio en varios tipos de cáncer por presentar mutaciones⁴¹; se generan las coenzimas reducidas NADH y FADH₂, las cuales liberan gran cantidad de energía tras su oxidación. Para ello, ceden sus electrones de una forma controlada a los complejos multienzimáticos (Figura 2) embebidos en la membrana mitocondrial interna, específicamente a los complejos I y II. Los electrones fluyen a través de los centros de oxidación-reducción de los diferentes complejos, a favor de su potencial redox, para finalmente en el complejo IV ser transferidos al oxígeno molecular y obtener agua.

A su vez, la energía liberada de este transporte de electrones es utilizada por los complejos I, III y IV para bombear protones al espacio intermembrana, creando así un gradiente electroquímico de protones. La energía conservada en el gradiente protónico es utilizada para la síntesis de ATP por el complejo V o ATP sintasa (ATPasa), mediante la fosforilación de ADP acoplada al retorno de los protones a la matriz mitocondrial o quimiosmosis.

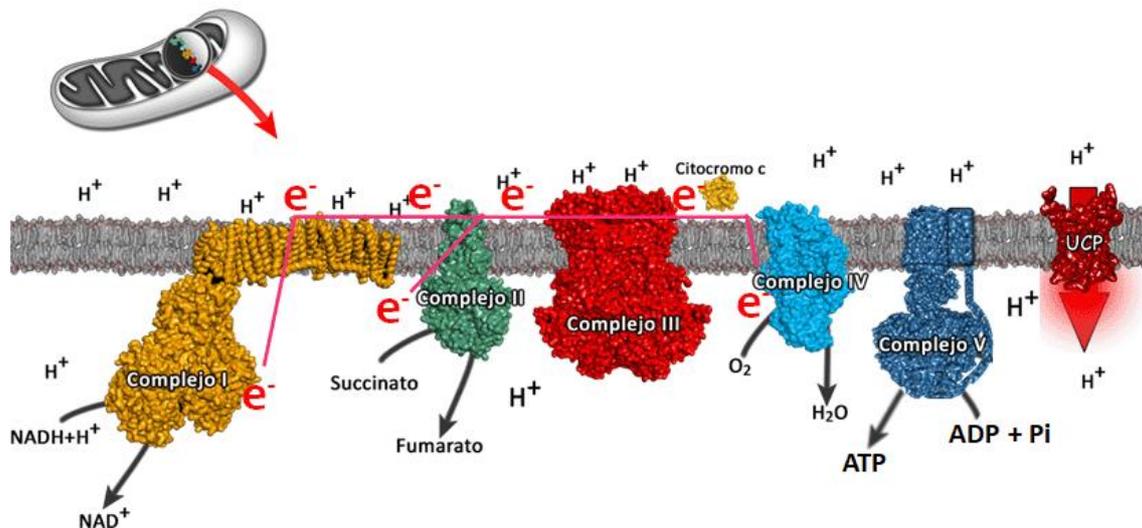


Figura 2. Representación esquemática de la cadena respiratoria mitocondrial (complejos OXPHOS) y de la proteína desacoplante (UCP) en la membrana mitocondrial interna.

El metabolismo energético es un proceso básico y necesario para asegurar el crecimiento y la proliferación celular. Las células cancerosas hacen frente a un desafío metabólico, debido a su rápido crecimiento e inmortalidad replicativa, que les obliga a ajustar su metabolismo energético para garantizar la gran demanda energética que conlleva su desarrollo potencialmente ilimitado⁴². En comparación con éstas últimas, las células no cancerosas dependen del sistema OXPHOS para generar la energía necesaria para los procesos celulares en forma de ATP, mientras que en la mayoría de las células cancerosas predomina un cambio en la ruta principal del metabolismo energético, pasando de ser el sistema OXPHOS a la glucólisis aeróbica. Este fenómeno es conocido como "Efecto Warburg"⁴³, en honor a su descubridor Otto Warburg, quien a mediados del siglo XX postuló que la célula tumoral basaba su metabolismo energético en la glucólisis aún en presencia de oxígeno. De esta forma, la glucosa se metaboliza hacia la producción de lactato, a través de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), en lugar de dirigirse hacia el ciclo de Krebs y

el sistema OXPHOS, debido probablemente a un mal funcionamiento de la mitocondria⁴⁴. La existencia de este cambio metabólico en las células cancerosas ha sido demostrada en las posteriores décadas a su descubrimiento⁴⁵, y basado en ello, el metabolismo energético alterado de la célula cancerosa ha emergido recientemente como una de las características distintiva del cáncer².

Aunque la glucólisis aeróbica es una manera ineficiente de generar ATP, esta le confiere cierta ventaja a la célula cancerosa, permitiéndole sobrevivir en un ambiente hostil y promoviendo su crecimiento, ya que hay intermediarios glucolíticos que son desviados de la glucólisis hacia rutas anabólicas; facilitando así la promoción de la biosíntesis de macromoléculas y orgánulos necesarios para el ensamblaje de nuevas células e incrementar la biomasa tumoral^{42,46}.

En varios tipos de cáncer la glucólisis es la principal fuente de producción de ATP, y en algunos casos la exclusiva. Sin embargo, en otros cánceres la glucólisis aeróbica intensa no está promovida, y estos dependen del sistema OXPHOS para la obtención de ATP⁴⁷. De esta manera se pueden clasificar los tumores en tumores glucolíticos o tumores oxidativos en dependencia de su tasa de proliferación, siendo los tumores oxidativos menos proliferativos y, por tanto, menos dependientes de la glucólisis, con una mayor expresión de los componentes de la respiración mitocondrial⁴⁵. La clasificación anteriormente mencionada no es completamente estricta o excluyente, ya que estudios anteriores han observado en varias líneas celulares de cánceres humanos una alternancia entre la glucólisis y el sistema OXPHOS modulada principalmente por el microambiente tumoral^{48,49}.

1.6. Biogénesis y funcionalidad mitocondrial

La biogénesis mitocondrial es el proceso mediante el cual tiene lugar la proliferación y la diferenciación de las mitocondrias⁵⁰. La proliferación consiste en incrementar el número de mitocondrias por célula, mientras que la diferenciación se alcanza adquiriendo características estructurales y funcionales específicas de las mitocondrias, en dependencia de las necesidades de las células que constituyen los distintos tejidos en el organismo.

La correcta estructura y función de las mitocondrias depende de la biogénesis mitocondrial. Para que esta última se lleve a cabo se requiere de una coordinación precisa entre los genomas nuclear y mitocondrial. Esta coordinación se realiza gracias a proteínas reguladoras codificadas por el genoma nuclear que activan la expresión génica de proteínas mitocondriales codificadas en ambos genomas.

Entre estas proteínas reguladoras encontramos el coactivador 1 α del receptor gamma activado por proliferadores (PGC1 α), expresado en tejidos con una elevada demanda energética y, por lo tanto, con un gran número de mitocondrias⁵¹. Este coactivador transcripcional representa el regulador por excelencia de la biogénesis mitocondrial y el metabolismo energético, ya que activa e integra la actividad de diversos factores de transcripción responsables de la expresión de las proteínas mitocondriales^{52,53}.

Otros factores claves son los factores de respiración nuclear 1 y 2 (NRF1 y NRF2 respectivamente), los cuales son activados transcripcionalmente por PGC1 α . NRF1 y NRF2 son reguladores de la función respiratoria mitocondrial, ya que controlan la transcripción nuclear de subunidades de componentes del sistema OXPHOS y de factores transcripcionales como

los factores de transcripción mitocondrial A, B1 y B2 (TFAM, TFB1M y TFB2M respectivamente) también codificados por el genoma nuclear⁵⁴. TFAM es el principal regulador de la replicación y transcripción del genoma mitocondrial, haciendo posible la coordinación entre el núcleo y la mitocondria durante la biogénesis mitocondrial^{50,55}.

La sirtuina 1 (SIRT1), es una enzima desacetilasa clave en el control de la expresión y la actividad de proteínas relacionadas con el metabolismo energético, debido a que tiene entre sus proteínas dianas el PGC1 α , anteriormente mencionado^{56,57}. Un ejemplo de la acción reguladora de la SIRT1 sobre el metabolismo energético es el que tiene lugar en la respuesta a una elevada demanda energética. La falta de energía está caracterizada por la disminución de la ratio ATP/AMP, que activa los sensores energéticos de la célula, como la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), lo que disminuye la ratio NADH/NAD⁺, activándose así la SIRT1 dependiente de NAD⁺, y ambas activan a PGC1 α a través de la fosforilación y desacetilación respectivamente^{56,58}. De esta manera se activan las rutas de obtención de energía para satisfacer la demanda energética, estableciéndose una conexión entre el estado energético celular, el estado redox y la biogénesis mitocondrial. Esto le confiere a la SIRT1 un papel importante en la oncogénesis. Asimismo, existen estudios donde se muestra que mayores niveles de expresión de SIRT1 promueven la progresión metastásica en adenocarcinoma pancreático⁵⁹.

1.7. Estrés oxidativo y cáncer

El estrés oxidativo es un fenómeno biomolecular que puede definirse como un desequilibrio entre agentes oxidantes y antioxidantes a favor de los primeros, por lo tanto, se pierde el control sobre la concentración

intracelular de especies oxidantes, bien por fallos en los sistemas antioxidantes que los eliminan o por aumento en los procesos que los generan. El estrés oxidativo se ha observado como denominador común en los mecanismos fisiopatológicos de muchas enfermedades, entre ellas el cáncer^{60,61}.

Durante la respiración celular en la mitocondria, aproximadamente el 95% del oxígeno consumido es reducido por completo a agua por el sistema OXPHOS, y cerca de un 5% es convertido en especies reducidas parcialmente, con orbitales desapareados, denominados radicales libres o especies reactivas de oxígeno (ROS). Se postula que cerca de un 2% de los electrones que son transferidos en el sistema OXPHOS escapan y reducen el oxígeno molecular a anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el cual presenta un elevado poder oxidante e inicia la cascada de formación de ROS⁶². Los ROS juegan un papel importante como segundos mensajeros en procesos claves como la proliferación celular y la apoptosis, también son utilizados por el sistema leucocitario como mecanismo de defensa contra elementos agresores como virus y bacterias⁶³.

Por otra parte, los ROS constituyen subproductos tóxicos del metabolismo oxidativo, altamente dañinos para la mitocondria y la célula en general⁶⁰. Esta situación da lugar a la gran paradoja del oxígeno, la molécula que permitió la vida aeróbica en la tierra también la limita; haciendo de esta forma que las mitocondrias sean la principal fuente de producción de ROS y diana de éstos (Figura 3)^{61,64}. Por ello una disfunción mitocondrial conllevaría a una producción desmedida de radicales libres lo que conduciría a un estrés oxidativo. El estrés oxidativo ha estado clásicamente relacionado con el cáncer, debido a los efectos nocivos provocados principalmente en el material genético por los radicales libres,

tanto en el inicio como en la evolución de esta patología⁶⁵.

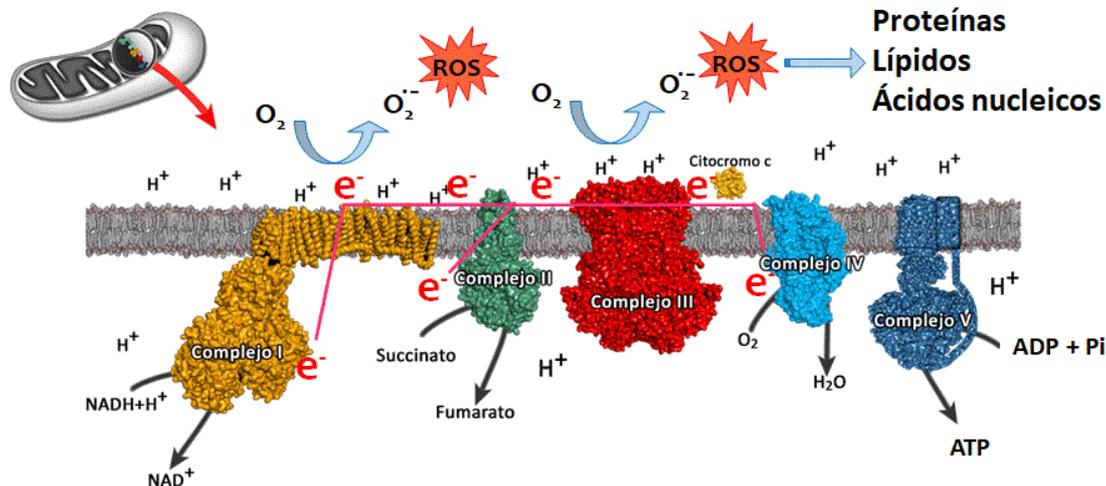


Figura 3. Esquema representativo de la producción mitocondrial de los ROS generados en la cadena respiratoria mitocondrial (complejos OXPHOS), y las posibles macromoléculas dianas de los ROS.

El principal daño causado por los ROS es la oxidación de las biomoléculas del interior celular. Una de las principales dianas de los ROS lo constituyen los lípidos que forman parte de las membranas celulares, donde el ataque por los ROS provoca la peroxidación lipídica⁶⁶, causando una reacción en cadena que irá dañando la integridad estructural y funcional de los lípidos que forman las membranas, originándose alteraciones irreversibles en la función de estas estructuras⁶⁷.

Otras biomoléculas que pueden ser dañadas por los ROS son las proteínas, las cuales al ser oxidadas pierden su función biológica, con consecuencias importantes para la fisiología celular. Entre las que podemos señalar la pérdida de la capacidad de reparar el ADN dañado lo que provoca alteraciones en la expresión génica⁶⁸.

Por otra parte, el daño oxidativo sobre el ADN tiene una relación causal en la oncogénesis, ya que provoca alteraciones en la estructura y

secuencia genética, ocasionando una acumulación de mutaciones génicas que alteran los procesos celulares con el consecuente desarrollo del cáncer⁶⁹.

Para hacer frente al estrés oxidativo, las células presentan diferentes mecanismos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Entre estos últimos podemos encontrar las vitaminas A, C y E que son incorporadas a través de la dieta, las cuales atenúan el efecto perjudicial de los ROS, al constituir dianas alternativas para estos⁷⁰. Los mecanismos antioxidantes enzimáticos (Figura 4) los constituyen el sistema de enzimas antioxidantes intrínsecas de la célula, entre las que podemos señalar las dos isoformas de la enzima superóxido dismutasa, una citoplasmática (Cu/ZnSOD) y otra mitocondrial (MnSOD), la catalasa, la glutatión peroxidasa (GPx) y la peroxirredoxina III (Prx), con estas dos últimas actúan la glutatión reductasa (GRd) y la tiorredoxina reductasa (TrxR), respectivamente. Estas enzimas son vitales para la regulación del estado redox dentro de la célula, ya que constituyen la primera línea de defensa antioxidante.

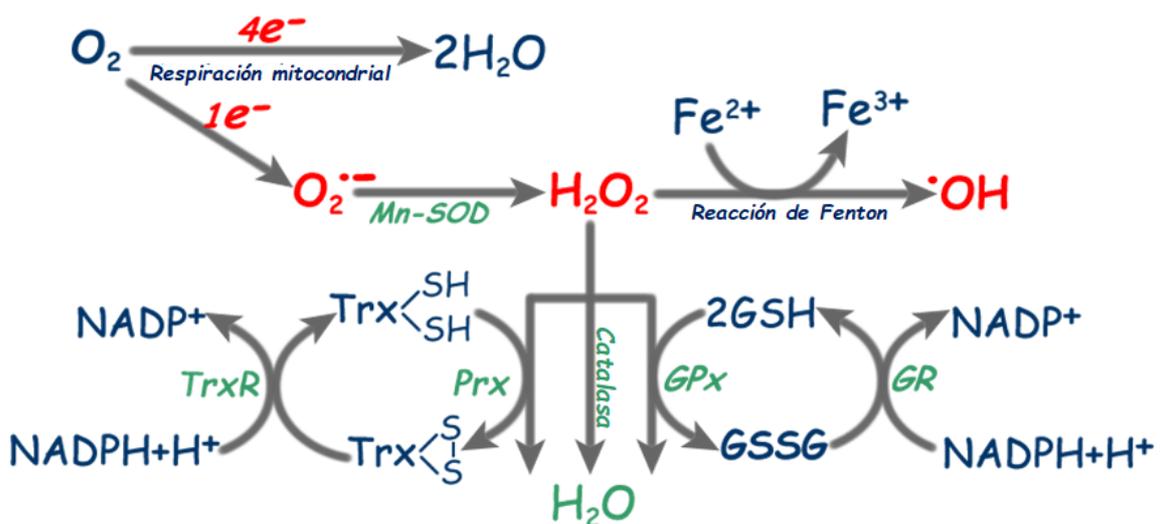


Figura 4. Mecanismo enzimático de detoxificación de las especies reactivas de oxígeno (ROS). SOD: Superóxido dismutasa, TrxR: tiorredoxina reductasa, Prx: peroxirredoxina, GPx: glutatión peroxidasa, GRd: glutatión reductasa, NADPH: nicotin adenin

dinucleótido fosfato reducido, Trx-(SH)₂: tiorredoxina reducida, Trx-S₂: tiorredoxina oxidada, GSH: glutatión reducido y GSSG glutatión oxidado.

Las enzimas superóxido dismutasa son un grupo de metaloenzimas asociadas a metales (en este caso a manganeso y a cobre y zinc) encargadas de la conversión del O₂^{•-} en peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y oxígeno molecular. Un importante promotor de ROS lo constituye el H₂O₂, a partir del cual se obtiene el radical hidroxilo ([•]OH) mediante las reacciones de Fenton y Haber-Weiss, en presencia de hierro y O₂^{•-} respectivamente.

El radical [•]OH presenta elevada reactividad, aunque con un tiempo de vida media muy corto es capaz de reaccionar con otra molécula cuando es generado en la proximidad de ésta, constituyendo así un radical libre muy perjudicial para las biomoléculas y la célula en general.

El H₂O₂ es el sustrato para la catalasa, GPx y Prx, las cuales neutralizan su toxicidad a elevadas concentraciones, descomponiéndolo en agua y oxígeno molecular. La GRd se encarga de regenerar el glutatión reducido que es utilizado en la reacción enzimática por la GPx como agente reductor. La TrxR presenta un mecanismo similar al de la GRd, pero en este caso regenerando la tiorredoxina reducida, la cual utiliza la Prx como poder reductor.

Otro mecanismo antioxidante lo representan las proteínas desacoplantes (UCPs). Estas constituyen una superfamilia de transportadores iónicos embebidos en la membrana mitocondrial interna, como se observa en la Figura 2. Su función es disipar el gradiente protónico mediante el retorno de los protones a la matriz mitocondrial asociado a la producción de calor (termogénesis). De esta forma se puede evitar la sobrecarga en la cadena de transporte de electrones,

desacoplándola, disminuyendo así el potencial de membrana y con ello la producción de ROS⁷¹. Se han identificado cinco isoformas de UCPs, las cuales presentan una distribución tisular específica⁷².

Entre estas isoformas destacan la UCP2 y la UCP5 como reguladores negativos del estrés oxidativo, donde la UCP2 actúa limitando la producción de ROS⁷³, influyendo en la oncogénesis y en la resistencia a la quimioterapia⁷⁴. Además, un estudio previo en nuestro grupo de investigación determinó que la UCP5 actúa como un mecanismo contra la producción de H₂O₂ causado por la disfunción mitocondrial en líneas celulares de cáncer de colon⁷⁵.

Las células cancerosas a menudo presentan una mayor generación de ROS, lo que conlleva a una mayor acumulación de estas moléculas, exponiéndose así a condiciones de alto estrés oxidativo⁷⁶. En consecuencia, se ha revelado que muchas células cancerosas exhiben cambios significativos en los perfiles de expresión de enzimas antioxidantes en comparación con las células normales, para hacer frente a los efectos dañinos de los ROS^{77,78}.

El factor de transcripción P53 juega un papel determinante en el control del estado redox celular, y la pérdida de su función contribuye positivamente al incremento del estrés oxidativo y la oncogénesis^{79,80}. Este supresor tumoral actúa sobre el ciclo celular y la apoptosis, evitando la proliferación de células con el ADN mutado^{81,82}. El principal regulado de P53 es la proteína doble minuto murino 2 (MDM2), esta proteína se asocia a P53 para inducir la degradación de este, y así, restablecer los niveles de P53 una vez se haya reparado el daño celular⁸³.

Por otra parte, la SIRT3 es una enzima desacetilasa que está emergiendo como un factor clave para mantener la integridad

mitocondrial en condiciones de estrés oxidativo⁸⁴. Asimismo, la SIRT3 actúa directamente sobre proteínas involucradas en el control de la homeostasis redox, como P53 y MnSOD^{85,86}. También, la SIRT3 juega un papel importante en el metabolismo energético activando proteínas responsables de la función mitocondrial⁸⁷.

Estudios recientes sugieren que los ROS juegan un papel dual en el desarrollo oncogénico dependiendo del estadio del cáncer. Por una parte, en un estado precanceroso los ROS favorecen la proliferación celular, provocando mutaciones en oncogenes como *RAS* y en supresores tumorales como *P53*⁸⁸. A medida que el cáncer progresa, un incremento en los niveles de ROS podría desencadenar la apoptosis⁸⁸. Para evitar este efecto apoptótico, las células cancerosas incrementan los niveles intracelulares de enzimas antioxidantes⁷⁸. Posteriormente, en estadios avanzados del cáncer, como los tumores metastásicos, los ROS favorecen la activación de mecanismos endógenos para la invasión de tejidos y la diseminación metastásica, la cual provoca más del 90% de las muertes por cáncer⁸⁹⁻⁹¹.

En resumen, de una manera u otra el estrés oxidativo es un denominador común en las distintas etapas del desarrollo del proceso carcinogénico, ya que promueve un ambiente que estimula la iniciación, promoción y progresión de la oncogénesis.

1.8. El tumor y su ambiente

El campo de investigación sobre el cáncer ha estado tradicionalmente guiado bajo un punto de vista reduccionista. Con un enfoque principalmente sobre las células cancerosas y su interior, el cual ha

generado un conocimiento extraordinario y de gran utilidad. En las últimas décadas ha ido cambiando esa perspectiva, y en el estudio del cáncer la atención también ha ido recayendo en el ambiente tumoral y su vecindad próxima.

En la actualidad, se sabe que los cambios genéticos que tienen lugar en la célula tumoral no son del todo suficientes para alcanzar la progresión maligna y la consecuente metástasis. Considerándose que los tumores sólidos son un tejido complejo, en cuyo interior podemos encontrar células no tumorales con características específicas, como son los fibroblastos asociados al cáncer (CAFs) y los macrófagos asociados al tumor (TAM), que se pueden comportar de manera cooperativa con el tumor, debido a las interacciones con las células cancerosas en el estroma tumoral^{92,93}. Estas interacciones que tienen lugar entre los componentes del estroma y las células cancerosas ocurren de manera recíproca, a través de moléculas de señalización celular que condicionan el microambiente influyendo en la progresión tumoral⁹⁴.

Algunos autores han descrito lo que han denominado efecto Warburg reverso, donde las células cancerosas inducen en los fibroblastos estromales vecinos una glucólisis aeróbica intensa, lo que produce sustratos energéticos que son secretados y captados por las células tumorales, proporcionando así un ambiente rico en energía que facilite el crecimiento tumoral y la angiogénesis^{94,95}. Además, estudios anteriores han observado una coevolución de los CAFs con las células cancerosas, lo cual altera la estructura y función del estroma circundante, influyendo en la progresión de la enfermedad^{96,97}.

Por otra parte, se ha observado la importancia del tejido no tumoral adyacente al tumor en el pronóstico y desarrollo del cáncer, debido en

parte al efecto ejercido por el tumor en su vecindad próxima para reclutar colaboración en su beneficio. La influencia del tumor da lugar al desarrollo alterado de las células estromales circundantes y epiteliales adyacentes al área del tumor, lo que se denomina cancerización de campo⁹⁸.

Esto indica en la zona tumoral, la presencia de señales carcinogénicas regionales, denominadas carcinógenos de campo⁹⁹. Donde con el tiempo y la exposición suficiente a estas señales, se provocarían cambios premalignos irreversibles en las células normales, conduciéndolas a la transformación oncogénica y la cancerización de campo¹⁰⁰. Dando como resultado, la formación de tumores regionales multifocales lo que aumenta la probabilidad de recurrencia del cáncer, aún después de una recepción curativa del tumor primario¹⁰⁰. De hecho, estudios anteriores han demostrado que las características del tejido adyacente no tumoral están constituyendo biomarcadores predictivos, así como de tasas de supervivencia o posible recurrencia en pacientes con CCR¹⁰¹⁻¹⁰³. Entre las señales con posible efecto carcinogénico de campo se han identificado biomoléculas como citoquinas y factores de crecimiento, entre las que se encuentran TGF- β , MCI1 y PDGF-A^{99,104}. Sin embargo, otras moléculas no biológicas como los ROS están generando atención como potenciales carcinógenos de campo. Teniendo en cuenta que los ROS son muy reactivos con las biomoléculas y pueden desencadenar múltiples procesos biológicos¹⁰⁵. Además, las células estromales alteradas y las cancerosas producen y secretan cantidades considerables de ROS, lo que provocaría un elevado estrés oxidativo en el ambiente extracelular para las células epiteliales normales adyacentes al tumor; facilitando de esta forma la cancerización de campo mediada por los ROS, donde estos últimos actuarían como señales paracrinas atípicas¹⁰⁶⁻¹⁰⁸.

De esta forma los ROS contribuyen a propagar y amplificar el estrés oxidativo en el ambiente tumoral, alcanzando unos niveles oxidativos que promuevan he inicien la metástasis¹⁰⁹. Además, estudios anteriores han establecido una conexión entre los ROS y la EMT uno de los primeros pasos en el proceso metastásico, ya que han observado que los ROS activan la inducción de TGF- β , y la vía de señalización Notch con el consecuente aumento de la EMT y la promoción de la metástasis^{89,110}.

Por otra parte, en un estudio reciente sobre el tejido adyacente no tumoral de varios tipos de cánceres humanos, se han identificado una serie de alteraciones genéticas de origen clonal compartido con el tumor correspondiente¹¹¹. Esto manifiesta la presencia de procesos oncogénicos adyacentes a las células cancerosas, señalando que la cancerización de campo subyace en el desarrollo del cáncer¹¹².

De una manera u otra, se está revelando el potencial de utilidad clínica que presenta el tejido adyacente no tumoral en las diferentes etapas de la evolución del cáncer. En consecuencia, las características de este tejido podrían contribuir al desarrollo de futuras terapias dirigidas contra estadios iniciales e incluso premalignos, así como más avanzados del proceso carcinogénico.

2. Objetivos y planteamiento experimental

La presente tesis doctoral se ha enmarcado dentro de los objetivos del proyecto de investigación desarrollado por el Grupo Multidisciplinar de Oncología Traslacional (GMOT) del Instituto Universitario de Investigación en Ciencias de la Salud (IUNICS) de la *Universitat de les Illes Balears* (UIB); titulado “*Hacia un diagnóstico personalizado en el cáncer colorrectal: influencia del metabolismo energético y estrés oxidativo en la respuesta al tratamiento* (PI14/01434)”. Este proyecto tenía entre sus objetivos determinar y evaluar parámetros claves del metabolismo energético y el estrés oxidativo como biomarcadores de pronóstico en pacientes con estadios avanzados de cáncer colorrectal.

Se ha descrito que en la célula cancerosa se produce una reprogramación de la ruta principal de su metabolismo energético, pasando del sistema OXPHOS a la glucólisis aeróbica, debido probablemente a la presencia de mitocondrias disfuncionales⁴⁴.

Estudios posteriores a este descubrimiento han observado que la bioenergética de la célula cancerosa, a pesar de una glucólisis incrementada, requiere de la participación de una mitocondria funcional, cuyas rutas anabólicas proporcionen una elevada síntesis de biomoléculas necesarias para su rápida proliferación⁴⁵. De hecho, algunos tipos de cánceres no presentan una glucólisis incrementada, y dependen en gran medida de la oxidación de sustratos energéticos para el anabolismo y la producción de energía^{47,113}. Sin embargo, se ha asociado la disfunción mitocondrial con la iniciación del cáncer y la progresión metastásica¹¹⁴.

Por otra parte, estudios recientes han revelado que las células cancerosas alteran el metabolismo energético y el comportamiento de las células estromales del microambiente tumoral^{115,116}. De esta forma se favorece un ambiente promotor para el desarrollo del tumor, lo cual

induce a la cancerización de campo en el tejido adyacente no tumoral⁹⁹. De hecho, las alteraciones del tejido adyacente no tumoral están constituyendo biomarcadores de pronóstico y de tasas de supervivencia de pacientes con CCR^{102,103}.

De una forma u otra, esta compleja situación metabólica le confiere a la mitocondria un papel crucial en el proceso canceroso avanzado. Asimismo, no están del todo esclarecidas las adaptaciones relacionadas con el metabolismo energético mitocondrial, que tienen lugar en el tumor y en el tejido adyacente no tumoral, las cuales facilitan el crecimiento tumoral y el desarrollo de la metástasis, uno de los obstáculos más difícil de vencer en la lucha contra el cáncer.

Teniendo en cuenta lo anterior, nos planteamos como primer objetivo identificar posibles biomarcadores pronóstico, relacionados con el metabolismo energético, en pacientes con cáncer de colon en estadios avanzados. Para ello, se procedió a determinar los niveles de enzimas claves y proteínas reguladoras del metabolismo energético y la función mitocondrial, comparando muestras de tejido tumoral y tejido adyacente no tumoral del mismo paciente. Las muestras proceden de pacientes con cáncer de colon en estadios avanzados, pre-metastásico estadio III y metastásico estadio IV. Las muestras fueron obtenidas mediante cirugía radical y los pacientes no recibieron tratamiento neoadyuvante. En las muestras tumorales de cada paciente se realizó la caracterización genotípica mediante PCR cuantitativa de marcadores diagnósticos *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PI3K* y *AKT1*; y fenotípica mediante inmunohistoquímica del MSI.

Para abordar el primer objetivo, se realizó mediante técnicas de *Western blot* un estudio de los niveles proteicos de las proteínas SIRT1,

PGC1 α , TFAM, IDH2 y OXPHOS implicadas en el metabolismo energético y la función mitocondrial. Igualmente, se analizaron los niveles proteicos de la PDH y LDHA, enzimas claves para evaluar el flujo hacia el ciclo de Krebs y la actividad glucolítica de los cambios establecidos por la teoría del efecto Warburg característico de las células cancerosas, respectivamente.

También, se realizó el análisis de la función mitocondrial determinando la actividad enzimática de enzimas mitocondriales claves como la COX y la ATPasa; así como de la IDH2 para evaluar la actividad del ciclo Krebs. Además, se cuantificó el ADNmt por PCR cuantitativa para estimar el contenido de mitocondrias.

Del primer estudio realizado en esta tesis doctoral se observó un cambio en el perfil metabólico entre los tejidos tumorales de ambos estadios de cáncer de colon. El tejido tumoral de cáncer de colon del estadio metastásico muestra menores niveles proteicos de los complejos OXPHOS, lo que contribuiría a incrementar el estrés oxidativo en el microambiente tumoral y su vecindad próxima.

La disfunción mitocondrial conlleva una producción intrínseca considerable de ROS, los cuales se han establecido como uno de los principales promotores de las diferentes etapas del cáncer. De hecho, el estrés oxidativo es un factor que subyace en diversas patologías entre ellas el cáncer, bien como origen o consecuencia, juega un papel determinante en el destino celular, el cual puede estar abocado a un proceso oncogénico producto de un continuo estrés oxidativo elevado^{65,117}. Estudios previos han demostrado que las células cancerosas están expuestas frecuentemente a condiciones de alto estrés oxidativo, debido a una elevada producción y/o acumulación de ROS⁷⁶. Aunque estos últimos juegan un papel importante en la proliferación y apoptosis celular

actuando como segundos mensajeros^{118,119}, el control sobre la homeostasis redox celular gracias a los sistemas antioxidantes es clave para prevenir la iniciación y progresión de un estado canceroso⁷⁷.

Por otra parte, los ROS contribuyen a propagar y amplificar el estrés oxidativo en el ambiente tumoral. Esto provoca alteraciones en el tejido adyacente no tumoral y lo condiciona a la transformación oncogénica y la cancerización de campo¹⁰⁸. En consecuencia, esto promueve la formación de tumores regionales, aumentando la probabilidad de la recurrencia del cáncer después de una recepción curativa de éste¹⁰⁰.

Basándonos en lo anterior y en los resultados obtenidos, nos planteamos como hipótesis que parámetros relacionados con el estrés oxidativo pueden ser indicadores de progresión metastásica en cáncer de colon. Por ello, se planteó como segundo objetivo proseguir con la detección de posibles biomarcadores de pronóstico, en este caso relacionados con el estrés oxidativo en el cáncer de colon. Para corroborar nuestra hipótesis, sobre las mismas muestras tisulares obtenidas de pacientes en estadios avanzados de cáncer de colon, se realizó un estudio de los niveles de proteínas relacionadas con el estrés oxidativo, concretamente proteínas de los sistemas antioxidantes enzimáticos celulares como la MnSOD, Cu/ZnSOD, catalasa, GPx y GRd. También se analizaron los niveles de daño oxidativo en lípidos y proteínas (contenido en aductos de 4-HNE y carbonilos respectivamente) y de la proteína UCP5, relacionados con el balance redox de la célula, así como de marcadores del estado mitocondrial SIRT3, P53 y MDM2. Además, se evaluó la actividad enzimática de las enzimas antioxidantes MnSOD y catalasa, y se determinaron los niveles de glutatión total y oxidado

3. Metodología

3.1. Selección de pacientes y muestras de tejidos

Para la presente tesis se ha llevado a cabo un estudio en un grupo de 23 pacientes, los cuales fueron seleccionados teniendo en cuenta los siguientes criterios: pacientes de ambos sexos, en un estadio avanzado (III y IV) de cáncer de colon y que no hayan sido tratados con radio o quimioterapia antes de la cirugía. Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado antes de la cirugía. El estudio se realizó de acuerdo con la "Declaración de la Asociación Médica Mundial de Helsinki" sobre los principios éticos para la investigación médica con humanos. El tiempo desde el diagnóstico del cáncer en el paciente hasta la cirugía varió entre un mínimo de 4 días a un máximo de 6 semanas. Las muestras de tejido son tumores primarios de cáncer de colon, histológicamente adenocarcinoma, distribuidos en 12 muestras de estadio III (4 hombres y 8 mujeres) y 11 muestras de estadio IV (5 hombres y 6 mujeres). Los pacientes tenían una edad media de 71,3 años para los hombres (SD: 8,7, rango: 56-84) y 71,0 años para las mujeres (SD: 8,8, rango: 55-81).

Las muestras proceden del Biobanco del Hospital Son Llàtzer y fueron tomadas mediante cirugía. Consistieron en un fragmento de tejido congelado después de la extracción. De cada paciente se tomaron muestras tumorales y de mucosa normal (tejido adyacente no tumoral). En ambos casos, el tejido fue examinado histológicamente a fin de verificar si se correspondía o no a tejido tumoral. El tejido tumoral fue clasificado por un patólogo experto según el sistema de estadificación TNM.

3.2. Preparación de muestras de tejidos

Aproximadamente 100 mg de cada muestra de tejido congelado fue homogenizado en 1 ml de tampón de homogenización a 4°C, que contenía: Tris 20 mM, pH 7,4; sacarosa 250 mM; EGTA 2 mM; KCl 40 mM; PMSF y Na₃VO₄ 1 mM cada uno, 10 µM de pepstatina y 10 µM de leupeptina. Se utilizó un Polytron (T10 basic, IKA-Werke GmbH) para la homogenización. Posteriormente, los homogenizados se sonicaron dos veces con 20 W de potencia y un intervalo de 85 segundos entre pulsos. Seguidamente, los homogenizados se centrifugaron a 600 g durante 10 minutos a 4°C; se descartó el precipitado y del sobrenadante se hicieron alícuotas de 100 µl que se congelaron a -80°C, las cuales se usaron posteriormente para llevar a cabo las determinaciones correspondientes.

Paralelo a la preparación de las muestras de los estadios III y IV de cáncer de colon, se homogenizó de la misma forma muestras de tejido tumoral congelado de estadio I y II de cáncer de colon. El homogenizado de estas últimas muestras se utilizó para preparar una muestra MIX, consistía en tejido tumoral de los estadios I, II, III y IV de cáncer de colon en las mismas proporciones. La muestra MIX se trató como una muestra más en las determinaciones correspondientes.

3.3. Cuantificación de proteínas

La concentración total de proteína se determinó a partir del sobrenadante que se obtuvo de la homogenización de cada muestra de tejido tumoral y tejido adyacente no tumoral de cada paciente. Para ello, se realizó un ensayo fundamentado en el método de Bradford¹²⁰. En este método, las proteínas presentes en la muestra interaccionan con el

colorante *Coomassie brilliant blue* G-250, dando lugar a un complejo que permite su cuantificación espectrofotométricamente, con absorción máxima a 595 nm de longitud de onda.

Reactivos:

- Etanol 96 %
- *Coomassie brilliant blue* G-250
- H₃PO₄ 85%
- Albúmina de suero bovino (BSA) 0,5 mg/ml

Procedimiento:

Se preparó el denominado reactivo de Bradford. Para ello, se mezclaron en el siguiente orden: 50 ml de etanol al 96 %, 100 mg de *Coomassie brilliant blue* G-250, 600 ml de agua bidestilada, 100 ml de H₃PO₄ 85% y se completó con agua bidestilada hasta el volumen de 1 L. Se preparó el patrón de BSA con el tampón de homogenización anteriormente mencionado, con concentraciones desde 0,1 hasta 0,5 µg BSA/µL.

Se realizó una dilución 1/30 de cada muestra para que entre en el rango del patrón. En placas de espectrofotometría de 96 pocillos se añadió a cada pocillo 10 µl de patrón o 10 µl de muestra, realizándose por duplicado, a los que se le añadió 290 µl del reactivo de Bradford para completar un volumen total de 300 µl en cada pocillo. Paralelamente, se realizó un control solo con el reactivo de Bradford. Se procedió a la lectura de la absorbancia cuyo incremento es proporcional a la concentración de proteína, la cual se calcula mediante el uso de la recta patrón y la absorbancia obtenida en cada muestra.

3.4. Caracterización genotípica en las muestras de tejido tumoral de los pacientes

Un fragmento de las muestras de tejido tumoral de cada paciente fue fijado en formaldehído y embebido en un bloque de parafina, a partir del cual se obtuvieron cortes en láminas de 10 μm de espesor. El ADN total de cada muestra fue aislado de dichas laminas utilizando un kit comercial (*QIAamp® FFPE tissue kit*, de *Qiagen*) siguiendo las instrucciones del fabricante. Con un espectrofotómetro (*BioSpec-nano*, de *Shimadzu Biotech*) se cuantificó la concentración de ADN total determinando la absorbancia a 260 nm.

Para la detección de mutaciones genéticas en los siguientes genes: *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PI3K* y *AKT1* se utilizó un kit de detección de mutaciones en CCR (*CRC-RT48* de *Entrogen*) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, 10 ng de ADN total de cada muestra fueron utilizados para amplificar por PCR cuantitativa los genes anteriormente mencionados, utilizando el termociclador *LightCycler® 480 System II* (*Roche Diagnostics*). El programa de amplificación se basa en una preincubación inicial para la desnaturalización del ADN a 95°C durante 12 minutos, seguido de 40 ciclos que consisten en: un paso de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos, un paso de unión de los cebadores al ADN molde y extensión a 60°C durante 40 segundos. Un control negativo sin muestra, así como un control positivo fueron amplificados en cada ensayo. El control positivo que incluyó el kit contenía cebadores para amplificar un gen específico presente en las muestras. Los valores de *crossing point* de la PCR cuantitativa se obtuvieron a través del *Light Cycler Software 3.5.3*, mediante el método de la segunda derivada

máxima. Estos valores se utilizaron para evaluar el estado mutacional de los genes analizados.

3.5. Caracterización fenotípica de la inestabilidad de microsatélites en las muestras de tejido tumoral de los pacientes.

La caracterización fenotípica de la inestabilidad de microsatélites (MSI) de todas las muestras de tejido tumoral de cada paciente fue analizada mediante la técnica de inmunohistoquímica, y se llevó a cabo en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Son Llàtzer. Para evaluar la MSI, se usaron anticuerpos contra MLH-1, MSH-2, MSH6 y PMS2 (06472966001; 05269270001; 05929911001; 06419216001 respectivamente) con el sistema de tinción de portaobjetos totalmente automatizado *BenchMark ULTRA*. Se usó el kit de detección *DAB OptiView* (06396500001). Los anticuerpos, así como el instrumental y el kit de detección utilizados en la técnica son de *Ventana Medical Systems*.

3.6. Análisis de los niveles proteicos por *Western blot*

Los niveles proteicos de las proteínas de interés se determinaron de forma semicuantitativa mediante la técnica de *Western blot*. Esta técnica comprende una serie de pasos que nos permiten identificar de manera individual las proteínas de interés presentes en las muestras, así como realizar su semicuantificación. Para ello, inicialmente tiene lugar una separación electroforética de las proteínas en un gel de poliacrilamida en dependencia de su peso molecular. Posteriormente, las proteínas son electrotransferidas del gel a una membrana de nitrocelulosa, para

finalmente mediante el uso de anticuerpos específicos identificar las proteínas de interés en dicha membrana.

3.6.1. Preparación de las muestras de tejidos

Partiendo del homogenizado obtenido de cada muestra, se determinó la concentración proteica mediante el método de Bradford anteriormente mencionado. Teniendo en cuenta la concentración proteica obtenida, se calculó el volumen para cada muestra de la cantidad de proteína deseada a cargar en el gel, con el objetivo que sea la misma para todas las muestras de ese gel. Considerando la proteína a determinar se cargó la siguiente cantidad de proteína: 20 µg para SIRT1 y IDH2; 30 µg para PGC1 α , LDHA, PDH, OXPHOS, MnSOD, Cu/ZnSOD, GRd, catalasa, UCP5, SIRT3, P53 y MDM2; 40 µg para TFAM y 50 µg para GPx.

Se prepararon las muestras con los volúmenes deseados y se ajustó con tampón de homogenización para cargar el mismo volumen de cada muestra en el gel. Posteriormente, 10% de β -mercaptoetanol se añadió al tampón de carga (Tris-HCl 0,25 M pH 6,8; SDS 10 % (p, v); glicerol 40 % (v/v); azul de bromofenol 0,1 % (p/v)); y dicha mezcla se añadió en una proporción 3:1 (volumen muestra: volumen tampón de carga). Finalmente, se hirvieron las muestras durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas y facilitar su unión al SDS.

3.6.2. Electroforesis SDS-PAGE

La separación electroforética de todas las proteínas analizadas se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 12 % prefabricados (*CriterionTM TGX Stain-FreeTM Precast Gel* de *Bio-Rad Laboratories*), siguiendo las

instrucciones del fabricante. Para ello, se cargó un volumen total de 16 μ l de cada muestra en dichos geles. Se utilizó de manera continua el voltaje a 200 V y se dejó transcurrir durante 45 minutos la electroforesis. Posteriormente, para confirmar que se haya cargado la misma cantidad de proteína en cada pocillo del gel, como control de carga se utilizó el sistema de los geles *Criterion™ TGX Stain-Free™ Precast Gel*. Este sistema se basa en la presencia de compuestos trihalo en el gel, los cuales son capaces de reaccionar con los residuos de triptófano presentes en las proteínas cuando son expuestos a luz UV y producir fluorescencia. De esta forma, se puede semicuantificar las bandas proteicas separadas en el gel. Para ello, se realizó una captura de imagen de la electroforesis en el gel, mediante el *ChemiDoc™ Imaging System* de *Bio-Rad Laboratories* siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.6.3. Electrotransferencia semihúmeda

La electrotransferencia consiste en transferir las proteínas que han sido separadas en el gel a una membrana, en este caso de nitrocelulosa, mediante la aplicación de una corriente eléctrica. Para ello, se utilizaron membranas del *Trans-Blot Turbo Midi 0.2 μ m Nitrocellulose Transfer Packs* y como equipo de electrotransferencia el *Trans-Blot® Turbo™ Transfer System*, ambos de *Bio-Rad Laboratories*, siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, para confirmar que se ha realizado una transferencia correcta de las proteínas, se realizó una captura de imagen del gel con el *ChemiDoc™ Imaging System*.

3.6.4. Inmunodetección

La inmunodetección consiste en detectar las proteínas de interés mediante el uso combinado de anticuerpos específicos. Para ello, primero se realizó un bloqueo de la membrana en la que se encuentran fijadas las proteínas, incubándola con leche en polvo sin grasa al 5% (p/v) en TBS-Tween (solución salina tamponada con Tris, pH 7,6 que contiene Tween-20 al 0,05% (v/v)) durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Transcurrido el tiempo del bloqueo se realizaron una serie de lavados a la membrana con TBS-Tween (tres veces, durante 5 segundos y dos veces durante 5 minutos cada vez), con el objetivo de eliminar los restos de leche. Seguidamente se incubó durante toda la noche en agitación a 4°C con un anticuerpo primario contra la proteína de interés. Las diluciones de los anticuerpos primarios utilizados contra las proteínas de interés fueron las siguientes: 1:1000 para SIRT1 (8469), TFAM (7495S), IDH2 (12652), SIRT3 (26275), P53 (2524s), MDM2 (86934) todos de *Cell Signaling Technology*, PGC1 α (ab54481) de *Abcam*, catalasa (219010) y GPx (st1000) ambas de *Calbiochem*; 1:500 para LDHA (2012) de *Cell Signaling Technology*, PDH (sc-37709), MnSOD (30080), GRd (133245), UCP5 (376172) todos de *Santa Cruz Biotechnology*, OXPHOS (MS601) de *MitoScience* y Cu/ZnSOD (574597) de *Calbiochem*.

Transcurrido el período de incubación con el anticuerpo primario se volvió a lavar la membrana con TBS-Tween (tres veces, durante 5 segundos y tres veces durante 5 minutos cada vez). Posteriormente, se procedió a la incubación de la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación con un anticuerpo secundario, el cual se unió al anticuerpo primario. Se utilizó una dilución 1:10000 para todos los

anticuerpos secundarios (*anti-rabbit* A9169, *anti-sheep* A3415 y *anti-mouse* A9044 todos de *Sigma-Aldrich*).

Trascurrido el tiempo de incubación con el anticuerpo secundario, se lavó la membrana dos veces con TBS-Tween durante 10 minutos cada vez, y una sola vez con TBS (sin Tween) durante 10 minutos, siempre en agitación. Las bandas proteicas se detectaron con el *ChemiDoc™ Imaging System* utilizando el kit comercial *Inmuno-Star Western C® Chemiluminescent Kit* ambos de *Bio-Rad Laboratories*, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los datos se obtuvieron utilizando el software *Quantity One* de *Bio-Rad Laboratories*. Los resultados se calcularon en tanto por ciento de expresión respecto de las muestras de tejido adyacente no tumoral del estadio III. La muestra MIX se incluyó en todas las electroforesis realizadas y se utilizó como control para comparar los geles entre sí.

3.7. Determinación del daño oxidativo en proteínas y lípidos

La oxidación proteica y lipídica da lugar a la formación de compuestos que son químicamente estables y sirven como marcadores de estrés oxidativo. Con el objetivo de evaluar el daño oxidativo a nivel proteico y lipídico, se realizó la semicuantificación de los grupos carbonilos (marcador de oxidación proteica) y aductos de 4-HNE (marcador de peroxidación lipídica) presentes en las muestras, mediante la técnica de *Western blot* anteriormente mencionada.

Las electroforesis se realizan en geles de poliacrilamida al 12 % prefabricado (*Criterion™ TGX Stain-Free™ Precast Gel* de *Bio-Rad Laboratories*), siguiendo las instrucciones del fabricante, se cargaron 20 µg

de proteína de cada muestra. Para confirmar que se haya cargado la misma cantidad de proteína en cada pocillo del gel, como control de carga se utilizó el sistema de los geles *Criterion™ TGX Stain-Free™ Precast Gel* anteriormente mencionado.

Posteriormente, se llevó a cabo la electrotransferencia semihúmeda a membranas de nitrocelulosa (*Trans-Blot Turbo Midi 0.2 μm Nitrocellulose Transfer Packs* con el *Trans-Blot® Turbo™ Transfer System* ambos de *Bio-Rad Laboratories*) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la determinación de los grupos carbonilos, antes de la inmunodetección se procedió al equilibrado de la membrana de nitrocelulosa con metanol al 20% en TBS 1X durante 5 minutos en agitación, transcurrido el tiempo de equilibrado se lavó la membrana con HCl 2N durante 5 minutos. Seguidamente, se incubó la membrana con 2,4 dinitrofenilhidrazina (DNPH) durante 5 minutos para derivatizar las proteínas carboniladas, y después se procedió a una serie de lavados de la membrana, primero diez veces con HCl al 2N, y después cinco veces con metanol al 50%, durante 5 minutos cada vez.

Para la inmunodetección, primero se realizó el bloqueo de la membrana, incubándola con leche en polvo sin grasa al 5% en TBS-Tween durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Transcurrido el tiempo de incubación se realizaron una serie de lavados (tres veces, durante 5 minutos cada vez) con TBS-Tween, con el objetivo de eliminar los restos de leche. Seguidamente, se incubó durante toda la noche a 4°C en agitación con el anticuerpo primario (diluido 1:2000 contra el grupo dinitrofenilo y diluido 1:200 contra el 4-HNE). Transcurrido el período de incubación se volvió a lavar (tres veces, durante 5 minutos cada vez) cada membrana con TBS-Tween. Posteriormente, se procedió a la incubación

durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente de la membrana con el anticuerpo secundario (diluido 1:2000 para el grupo dinitrofenilo y 1:10000 para el 4-HNE) contra su respectivo anticuerpo primario. Trascurrido el tiempo de incubación, se lavaron las membranas dos veces con TBS-Tween durante 5 minutos cada vez y una vez solo con TBS (sin Tween) durante 5 minutos, siempre en agitación. Las bandas proteicas se detectaron utilizando el kit comercial *Inmuno-Star Western C[®] Chemiluminescent Kit* y el *ChemiDoc™ Imaging System*.

Los datos se obtuvieron utilizando el software *Quantity One* de *Bio-Rad Laboratories*. Los resultados se calcularon en tanto por ciento de expresión respecto de las muestras de tejido adyacente no tumoral del estadio III.

3.8. Cuantificación de ADNmt

El ADN total de cada muestra de tejido fue aislado a partir de cortes en láminas de 10 µm de grosor del tejido embebido en parafina. Para ello se utilizó el kit comercial (*QIAamp[®] FFPE tissue kit*, de *Qiagen*) siguiendo las instrucciones del fabricante. Con un espectrofotómetro (*BioSpec-nano*, de *Shimadzu Biotech*) se cuantificó la concentración de ADN total detectando la absorbancia a 260 nm.

Una cantidad total de 5 ng de cada muestra de ADN total fue utilizado para amplificar por PCR cuantitativa el gen nuclear ARNr 18S con los cebadores (*forward* 5'-ggA CAC ggA CAg gATTgA CA-3' y *reverse* 5'-ACC CAC ggA ATC gAg AAA gA-3') y el gen mitocondrial de la subunidad 4 de la NADH deshidrogenasa con los cebadores (*forward* 5'-CgT gAC TCC TAC CCC TCA CA-3' y *reverse* 5'-ATC ggg TgA TgA TAg CCA Ag- 3'). Para ello, se mezclaron 0,5 µM de cada uno de los cebadores con 2,5 µl de agua libre

de ARNasas conteniendo los 5 ng de ADN de la muestra y 7,5 µl de *SYBR Green I Master* de *Roche Diagnostics* que contenía el resto de los componentes de la reacción para la amplificación de cada gen, utilizando el termociclador *LightCycler® 480 System II* de *Roche Diagnostics*. El programa de amplificación se basa en una preincubación inicial para la desnaturalización del ADN a 95°C durante 5 minutos, seguido de 45 ciclos que consistieron en: un paso de desnaturalización a 95°C durante 10 segundos, un paso de alineamiento o unión de los cebadores al ADN molde a 60°C durante 10 segundos, y un paso final de extensión a 72°C durante 12 segundos y captación de la fluorescencia. Un control negativo sin muestra fue amplificado en cada ensayo. Los valores de *crossing point* de la PCR cuantitativa se obtuvieron a través del *Light Cycler Software*.

3.5.3. Los valores de *crossing point* obtenidos se utilizaron para calcular la ratio (gen mitocondrial/ gen nuclear) y estimar la cantidad de ADNmt. Los resultados obtenidos se expresaron en tanto por ciento respecto a las muestras de tejido adyacente no tumoral de estadio III.

3.9. Determinación de niveles de glutatión

La concentración de glutatión total y oxidado fue determinada a partir del sobrenadante que se obtuvo de la homogenización de cada muestra de tejido tumoral y adyacente no tumoral de cada paciente. Para ello se realizó un ensayo cinético fundamentado en el método descrito por Akerboom y colaboradores¹²¹. En este método, el grupo sulfhidrilo del glutatión presente en la muestra reacciona con el 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico o DTNB) obteniéndose el compuesto TNB y glutatión oxidado, éste último es reducido por la enzima GRd en presencia de nicotin adenin dinucleótido fosfato reducido (NADPH). El TNB es un

compuesto de color amarillo, lo que permite su detección espectrofotométrica, por lo que a mayor formación de TNB mayor concentración de glutatión total en la muestra.

Para conocer la concentración de glutatión oxidado, cada muestra se trata con 2-vinilpiridina (2-VP), este compuesto derivatiza el glutatión reducido presente en la muestra y lo modifica, de esta manera no puede entrar en la dinámica de la reacción anteriormente mencionada. Por lo que, solo cuando el glutatión oxidado presente en la muestra es reducido por la enzima GRd, puede reducir al DTNB para obtener TNB y dar lugar a la formación de color.

Reactivos:

- Tampón de ensayo: KH_2PO_4 500 mM y EDTA (K^+ dihidrato) 5 mM, pH 7,0
- Ácido 5-sulfosalicílico (SSA) 0,05 g/ml
- DTNB 1,5 mg/ml en DMSO
- NADPH 40 mg/ml
- 2-VP 1 M en etanol
- GRd 400 unidades/ml

Procedimiento:

Partiendo de un volumen de 50 μl de cada muestra se le añadieron 150 μl de SSA y se centrifugó a 10000 g durante 10 minutos a 4 °C, de esta manera se hacen precipitar las proteínas y se recupera el sobrenadante para la determinación. A un volumen total de 55 μl se le añadió una cuarta parte de 2-VP (13,75 μl) para cada muestra y se incubó durante 1h a temperatura ambiente.

Se preparó un blanco con 55 μl de SSA para determinar el glutatión total y un blanco con 2-VP (41,25 μl de SSA y 13,75 μl de 2-VP) para determinar el glutatión oxidado. Con agua bidestilada se hizo una dilución

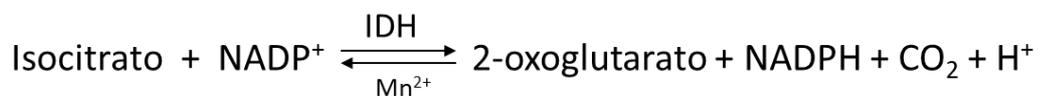
1/5 del tampón de ensayo, la cual se utilizó para las posteriores diluciones. Se prepararon las diluciones 1/66 de la enzima GRd para obtener una actividad de 6 unidades/ml y 1/250 de NADPH para obtenerlo a 0,16 mg/ml. Se preparó una solución de trabajo con tampón de ensayo que contenía una dilución 1/37 de la enzima GRd y de DTNB. Transcurrido el tiempo de incubación con 2-VP, en placas de espectrofotometría de 96 pocillos se añadieron 25 µl de blanco sin 2-VP, blanco con 2-VP y de cada muestra por duplicado. Posteriormente se añadió 135 µl de la solución de trabajo, se agitó la placa durante 1 minuto y se dejó reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Trascurrido el tiempo de reposo, se añadió 50 µl de NADPH y se procedió a la lectura de la absorbancia a 412 nm durante 30 minutos en el espectrofotómetro (PowerWave HT, Biotek). El incremento de absorbancia por la formación de TNB es proporcional a la concentración de glutatión total y oxidado presente en la muestra. Los resultados se obtienen analizando los datos de la pendiente de la curva cinética para cada muestra, y se expresaron en tanto por ciento respecto a las muestras de tejido adyacente no tumoral de estadio III.

3.10. Análisis de las actividades enzimáticas

Las actividades enzimáticas fueron determinadas usando ensayos espectrofotométricos, partiendo del sobrenadante que se obtuvo de la homogenización de cada muestra de tejido tumoral y tejido adyacente no tumoral de cada paciente. Para cada actividad enzimática se prepararon las muestras y el blanco por duplicado, en placas de espectrofotometría de 96 pocillos. Los valores de actividad obtenidos se corrigieron teniendo en cuenta la concentración proteica para cada muestra.

3.10.1. Determinación de la actividad IDH2

La enzima isocitrato deshidrogenasa (IDH; EC 1.1.1.42) es un importante componente del ciclo de Krebs. Cataliza la descarboxilación del isocitrato, obteniéndose como producto el α -cetoglutarato. La actividad se determinó siguiendo un incremento de absorbancia a medida que el NADP^+ es reducido a NADPH ¹²². La siguiente reacción fue iniciada por el isocitrato:



Reactivos:

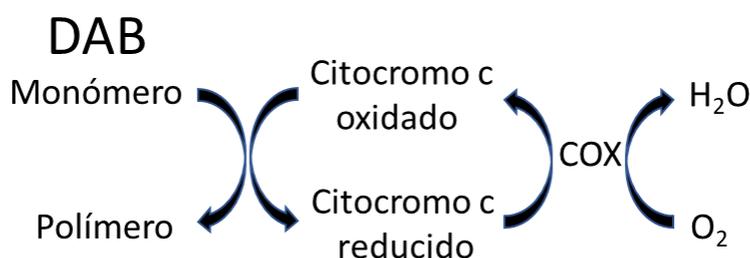
- Tampón de ensayo: TEA 0,1 M, pH 7,3
- MnCl_2 100 mM
- NADP^+ 13 mM
- DL-isocitrato 67 mM

Procedimiento:

Se añadieron los volúmenes totales para cada muestra en el siguiente orden: 235 μl de tampón TAE, 5 μl de MnCl_2 , 10 μl de NADP^+ y 5 μl de muestra. Paralelamente, se preparó un blanco añadiendo tampón de ensayo en lugar de la muestra. Se procedió a incubar a 37°C durante 20 min. Transcurrido el tiempo se añadió 30 μl de isocitrato, la lectura de la absorbancia se realizó durante 25 min a una longitud de onda de 339 nm a 37°C. El aumento de la absorbancia por la reducción del NADP^+ es directamente proporcional a la actividad de la IDH2. Los resultados de la actividad enzimática se calcularon a partir de los datos de la pendiente de la curva cinética de cada muestra.

3.10.2. Determinación de la actividad COX

El citocromo c oxidasa (COX, EC 1.9.3.1), es un complejo enzimático integral de la membrana mitocondrial interna. Representa el último complejo de la cadena respiratoria y cataliza la reducción del oxígeno molecular a agua a partir de los electrones que provienen del citocromo c reducido. La actividad de la COX se determina siguiendo el método descrito por Chrzanowska-Lightowlers y colaboradores¹²³. En este método, de forma cíclica, el citocromo c es oxidado por la COX y vuelve a ser reducido por el tetracloruro de 3,3-diaminobenzidina (DAB), para formar el polímero de DAB que es detectable a 450 nm de longitud de onda. La siguiente reacción fue iniciada por el citocromo c reducido:



Reactivos:

- Tampón de ensayo: NaPO₄H₂ 0,1 M, pH 7
- DAB 5 mM
- Catalasa 2 µg/ml
- Citocromo c reducido 100 µM

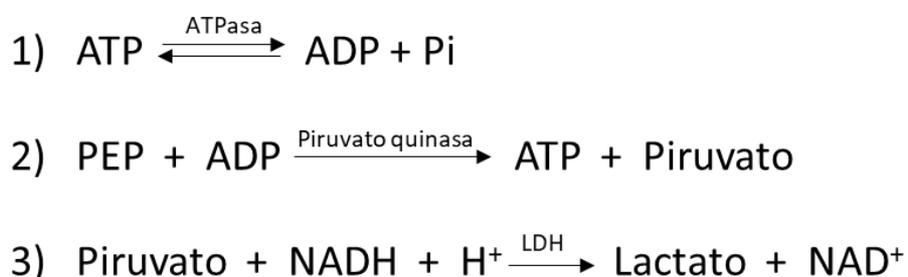
Procedimiento:

Se añadieron los volúmenes totales para cada muestra en el siguiente orden: 110 µl de tampón de ensayo, 10 µl de catalasa, 25 µl de muestra y

20 μl de DAB. Paralelamente, se preparó un blanco añadiendo tampón de ensayo en lugar de muestra. Se procedió a agitar durante 30 segundos y se añadió 30 μl de citocromo c reducido, y se volvió a agitar nuevamente. La lectura de la absorbancia se realizó durante 30 min a una longitud de onda de 450 nm a 37 °C. El aumento de la absorbancia por la formación del polímero DAB es directamente proporcional a la actividad de la COX. Los resultados de la actividad enzimática se calcularon a partir de los datos de la pendiente de la curva cinética de cada muestra.

3.10.3. Determinación de la actividad ATPasa

La ATPasa (EC 3.6.1.3) es una enzima mitocondrial que representa el último complejo de los OXPHOS. Es la encargada de la producción de ATP utilizando el gradiente protónico mitocondrial generado por la cadena respiratoria. La actividad de la ATPasa se determina mediante un ensayo cinético fundamentado en el método descrito por Ragan y colaboradores¹²⁴. En este método se acoplan varias reacciones enzimáticas para finalmente detectar a 340 nm la disminución de la absorbancia por la oxidación de NADH. El ATP inicia la siguiente cadena de reacciones:



Reactivos:

- Tampón de ensayo: sacarosa 0,333 M; MgSO₄ 6,3 mM; HEPES 6,3 mM, NADH 0,442 mM; pH 8
- Fosfoenolpiruvato (PEP) 0,1 M
- Piruvato quinasa (PK) 10 µg/ml
- Lactato deshidrogenasa (LDH) 10 µg/ml
- Antimicina 2 µg/ml
- Trifosfato de adenosina (ATP) 0.1 M

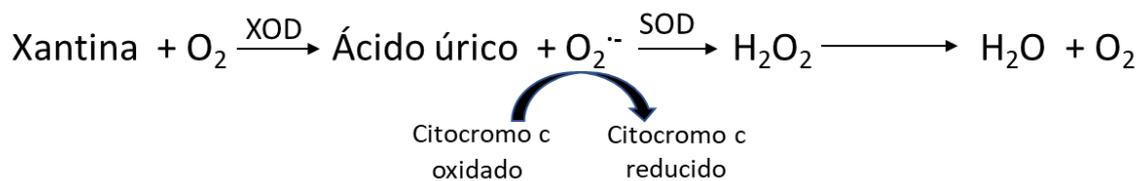
Procedimiento:

Se añadieron los volúmenes totales para cada muestra en el siguiente orden: 145 µl de tampón de ensayo, 5 µl de PEP, 10 µl de PK, 5 µl de LDH, 10 µl de antimicina y 5 µl de muestra. Paralelamente, se preparó un blanco añadiendo tampón de ensayo en lugar de muestra. Se procedió a agitar durante 1 min y después se dejó que el sistema se estabilice durante 5 min. Transcurrido el tiempo se añadió 10 µl de ATP para que se inicie la cadena de reacciones. Se agitó nuevamente durante 15 segundos, la lectura de la absorbancia se realizó durante 15 minutos a una longitud de onda de 340 nm a 37 °C. La disminución de la absorbancia por la oxidación del NADH es inversamente proporcional a la actividad de la ATPasa. Los resultados de la actividad enzimática se calcularon a partir de los datos de la pendiente de la curva cinética de cada muestra.

3.10.4. Determinación de la actividad MnSOD

La MnSOD (EC 1.15.1.1) es la principal enzima antioxidante mitocondrial que neutraliza el anión superóxido, formado principalmente a nivel de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial. La actividad de la MnSOD se determina siguiendo el método descrito por Quick y colaboradores¹²⁵. Este se fundamenta en que el anión superóxido

es una especie muy reactiva, y una vez formado por la xantina oxidasa (XOD) es capaz de reducir al citocromo c. En presencia de la enzima superóxido dismutasa (SOD), parte del anión superóxido es transformado en peróxido de hidrógeno, por lo tanto, la reducción del citocromo c se ve disminuida. El citocromo c reducido puede ser detectado a 550 nm, mediante la siguiente cadena de reacción:



Reactivos:

- Tampón de ensayo: PBS, pH7,4
- Citocromo c 1,95 mM
- Catalasa 6000 U/ml
- XOD 335 U/ml
- Xantina 10 mM
- KCN 1 mM

Procedimiento:

Se añadieron los volúmenes totales para preparar dos soluciones en el siguiente orden, solución A: 114 μl de PBS, 2,5 μl de xantina, 2,5 μl de catalasa, 6 μl de citocromo c y 1 μl de KCN para inhibir la actividad de la isoforma de SOD citoplasmática; solución B: 111 μl de PBS, 9 μl de XOD y 5 μl para cada muestra. Ambas soluciones suman un volumen total de reacción de 250 μl por muestra. Paralelamente, se preparó un blanco con 250 μl de tampón de homogenización y un control con 229 μl de PBS; 9 μl de XOD; 2,5 μl de xantina; 2,5 μl de catalasa; 6 μl de citocromo c y 1 μl de KCN, este control nos permite obtener la máxima reducción del citocromo c debido a la ausencia de actividad SOD. Posteriormente, se agitó la placa

durante unos 10 segundos, y rápidamente se procedió a la lectura de la absorbancia a 550 nm durante 2 minutos a 37 °C; donde el aumento de esta es inversamente proporcional a la actividad de la MnSOD. Los cálculos de la actividad enzimática se realizaron a partir de los datos de la pendiente neta de la curva cinética para cada muestra, dicha pendiente se obtuvo de la diferencia entre la pendiente del control y la pendiente de la muestra.

3.10.5. Determinación de la actividad catalasa

La catalasa (EC 1.11.1.6) es una enzima oxidoreductasa responsable de la eliminación del H₂O₂ generado en el metabolismo celular. Presenta dos tipos de actividades, la catalítica y la peroxidativa. La reacción general implica la reducción del H₂O₂ a través de la aceptación de los átomos de hidrógeno del donador (H₂R):



La actividad peroxidativa de la catalasa se determina siguiendo el método descrito por Góth¹²⁶, Hadwan y Abed¹²⁷. Este se fundamenta en una reacción rápida entre el metanol (CH₃OH) y una concentración de H₂O₂ óptima; donde se añade molibdato de amónico para detener la reacción, ya que éste último forma un complejo de color amarillo con el H₂O₂, el cual es detectable colorimétricamente a 540 nm.

Reactivos:

- Tampón de ensayo: K₂HPO₄/ KH₂PO₄ 100 mM, pH 7,0
- H₂O₂ 650 mM
- Molibdato amónico 140,72 mM

Procedimiento:

Se añadieron los volúmenes totales para cada muestra en el siguiente orden: 175 μl de tampón de ensayo y 5 μl de muestra. Paralelamente se preparó un blanco con tampón de ensayo, un blanco estándar (3 o más pocillos de la placa) con tampón de ensayo y H_2O_2 que nos dará la máxima coloración, y un control para cada muestra que contenga tampón de ensayo y muestra, este nos dará la actividad de la catalasa producto al H_2O_2 intrínseco de la muestra. Se procedió a añadir 20 μl de H_2O_2 al blanco estándar y a las muestras, se incubó durante 1 minuto a 37 °C en agitación, para detener la reacción rápidamente se añadieron 20 μl de molibdato amónico en todos los pocillos. Se agitó durante unos segundos y se realizó una lectura puntual a 374 nm de la formación de color, la intensidad de este último es inversamente proporcional a la actividad de la catalasa. Los resultados de la actividad enzimática se calcularon a partir de los datos de la pendiente de la curva cinética de cada muestra.

3.11. Representación de los resultados obtenidos y análisis estadístico

Los resultados de expresión proteica para cada proteína y la cuantificación del ADNmt se representan mediante diagrama de caja, el cual muestra la distribución de los datos de cada grupo experimental. La caja representa el rango de valores distribuidos entre el valor que marca el percentil 25 hasta el valor del percentil 75 de cada grupo experimental, la X en su interior indica la media de los valores de cada grupo de datos y la línea horizontal representa la mediana. El contenido de glutatión y las actividades enzimáticas se expresan como la media \pm la desviación estándar. Para el análisis estadístico se utilizó el Programa Estadístico para

las Ciencias Sociales para *Windows* (SPSS versión 21.0; Inc., Chicago, IL). Las diferencias entre los grupos experimentales se evaluaron mediante análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores, se indica que hay efecto estadio (S, en las gráficas) cuando hay diferencias entre tejido de estadio III vs. tejido de estadio IV, se indica que hay efecto tejido (T, en las gráficas) cuando hay diferencias entre tejido tumoral vs tejido adyacente no tumoral. Como análisis post-hoc se utilizó la prueba t de *Student*. En todos los casos, se ha considerado que las diferencias son significativas cuando $p < 0,05$.

4. Resultados y Discusión

4.1. Estudio del metabolismo energético y la función mitocondrial en muestras tisulares de pacientes en estadios avanzados de cáncer de colon

Los resultados que se muestran a continuación y la discusión de estos derivaron del estudio del metabolismo energético y la función mitocondrial, en muestras tisulares de pacientes en estadios avanzados de cáncer de colon. El objetivo de este estudio fue la determinación de posibles biomarcadores de pronóstico y evolución, relacionados con el metabolismo energético y la función mitocondrial en dichos pacientes. Para ello, se determinaron los niveles de expresión proteica de la SIRT1, PGC1 α , TFAM, LDHA, PDH, IDH2, y los complejos OXPHOS en muestras de tejido tumoral y tejido adyacente no tumoral de pacientes en estadios III y IV de cáncer de colon mediante *Western blot*. Por otra parte, se cuantificaron las actividades enzimáticas de la IDH2, COX y ATPasa, y los niveles de ADNmt sobre dichas muestras de tejidos. Adicionalmente, previo al análisis de los parámetros de interés se realizó la caracterización genotípica de biomarcadores establecido para cáncer de colon, así como la caracterización fenotípica de la inestabilidad de microsatélites sobre las muestras de tejido tumoral de pacientes en estadios III y IV de cáncer de colon.

4.1.1. Resultados

Caracterización genotípica de KRAS, NRAS, BRAF, PI3K y AKT1, y fenotípica del MSI en las muestras de tejido tumoral de los pacientes en estadios avanzados de cáncer de colon.

Las muestras evaluadas presentaron uniformidad para los biomarcadores analizados (Tabla 1), exceptuando para KRAS, ya que se encontró mutado en el 50% de las muestras tumorales de estadio III. Estos

resultados fueron correlacionados con las características clínicas de los pacientes, pero no se encontraron evidencias de que KRAS mutado influyera en los resultados obtenidos.

Tabla 1. Características clínico-patológicas de los pacientes con cáncer de colon de estadios III y IV analizados. Caracterización genotípica del tejido tumoral por PCR de los biomarcadores pronóstico: *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS)*, *neuroblastoma RAS viral oncogene homolog (NRAS)*, *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B (BRAF)*, *phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)* y *serine/threonine-protein kinase 1 (AKT1)*; y caracterización fenotípica del biomarcador: inestabilidad de microsatélite (MSI), por inmunohistoquímica. Wt: no mutado, -: no determinado.

Género	Edad	Estadio	Localización del tumor	Sistema de estadificación TNM	Grado histológico	Localización de metástasis	KRAS	NRAS	BRAF	PI3K	AKT1	MSI
Hombre	76	IIIB	Distal	T3N2M0	2	-	Mutado	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
Hombre	80	IIIB	Proximal	T3N1M0	2	-	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
Hombre	77	IIIB	Distal	T2N2M0	1	-	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
Hombre	61	IIIC	Distal	T4N2M0	3	-	Mutado	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
Mujer	66	IIIB	Distal	T4N1M0	2	-	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
Mujer	75	IIIB	Proximal	T3N1M0	2	-	Mutado	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
Mujer	63	IIIB	Distal	T3N2M0	3	-	Mutado	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
Mujer	77	IIIB	Distal	T3N2aM0	3	-	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
Mujer	81	IIIB	Distal	T3N2M0	3	-	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
Mujer	55	IIIC	Distal	T4bN1M0	2	-	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
Mujer	78	IIIC	Proximal	T4aN1bM0	3	-	Mutado	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
Mujer	63	IIIC	Distal	T4N2M0	2	-	Mutado	Wt	Wt	Wt	Wt	-
Hombre	56	IVA-B	Distal	T4N2M1	-	Hígado	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
Hombre	78	IVB	Distal	T3bN2M1b	2	Hígado y pulmón	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
Hombre	72	IVB	Distal	T4bN0M1b	2	Hígado y peritoneo	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
Hombre	65	IV	Distal	T4N2M1	2	Hígado	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
Hombre	84	IV	Distal	T3N2M1	2	Pulmón	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
Mujer	70	IVB	Proximal	T4bN2M1b	2	Hígado y peritoneo	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
Mujer	70	IVB	Proximal	T4N2M1b	3	Pulmón y peritoneo	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
Mujer	76	IVB	Proximal	T3N1M1b	-	Hígado y pulmón	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
Mujer	58	IVB	Distal	T3N0M1b	2	Hígado y pulmón	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
Mujer	77	IVB	Distal	T3N1M1b	2	Hígado y pulmón	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	-

Niveles de expresión proteica de los complejos OXPHOS

En la Figura 5 se representan los niveles de expresión proteica de los complejos OXPHOS en tejidos tumorales y tejidos adyacentes no tumorales de estadios avanzados de cáncer de colon.

Como se observa en la Figura 5A, 5B y 5C, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión proteica de los complejos I, II y III entre los grupos experimentales. En general, todas las muestras de tejidos de cada grupo experimental presentaron una mayor dispersión de los datos de la expresión proteica de los complejos I, II, III.

Por otra parte, los niveles de expresión proteica del complejo IV (Figura 5D) mostraron diferencias entre el estadio III y IV, mostrando un claro efecto estadio, debido a que el tejido tumoral y tejido adyacente no tumoral del estadio IV presentaron los menores niveles proteicos de este complejo. Esto refleja que la disponibilidad proteica del complejo IV se encuentra comprometida en el estadio metastásico de cáncer de colon; pauta estadísticamente significativa en el tejido tumoral, ya que el tejido tumoral IV presentó niveles muy inferiores respecto al tejido tumoral del estadio III. Por otra parte, se observaron diferencias respecto de tejido tumoral vs tejido adyacente no tumoral (efecto tejido) en los niveles de expresión proteica del complejo V (Figura 5E). Esto fue debido ya que los tejidos tumorales de ambos estadios mostraron menores niveles de expresión proteica de dicho complejo respecto del tejido adyacente no tumoral, diferencias que son estadísticamente significativas en ambos estadios. Las bandas representativas del *Western blot* de estas determinaciones se muestran en la Figura 8.

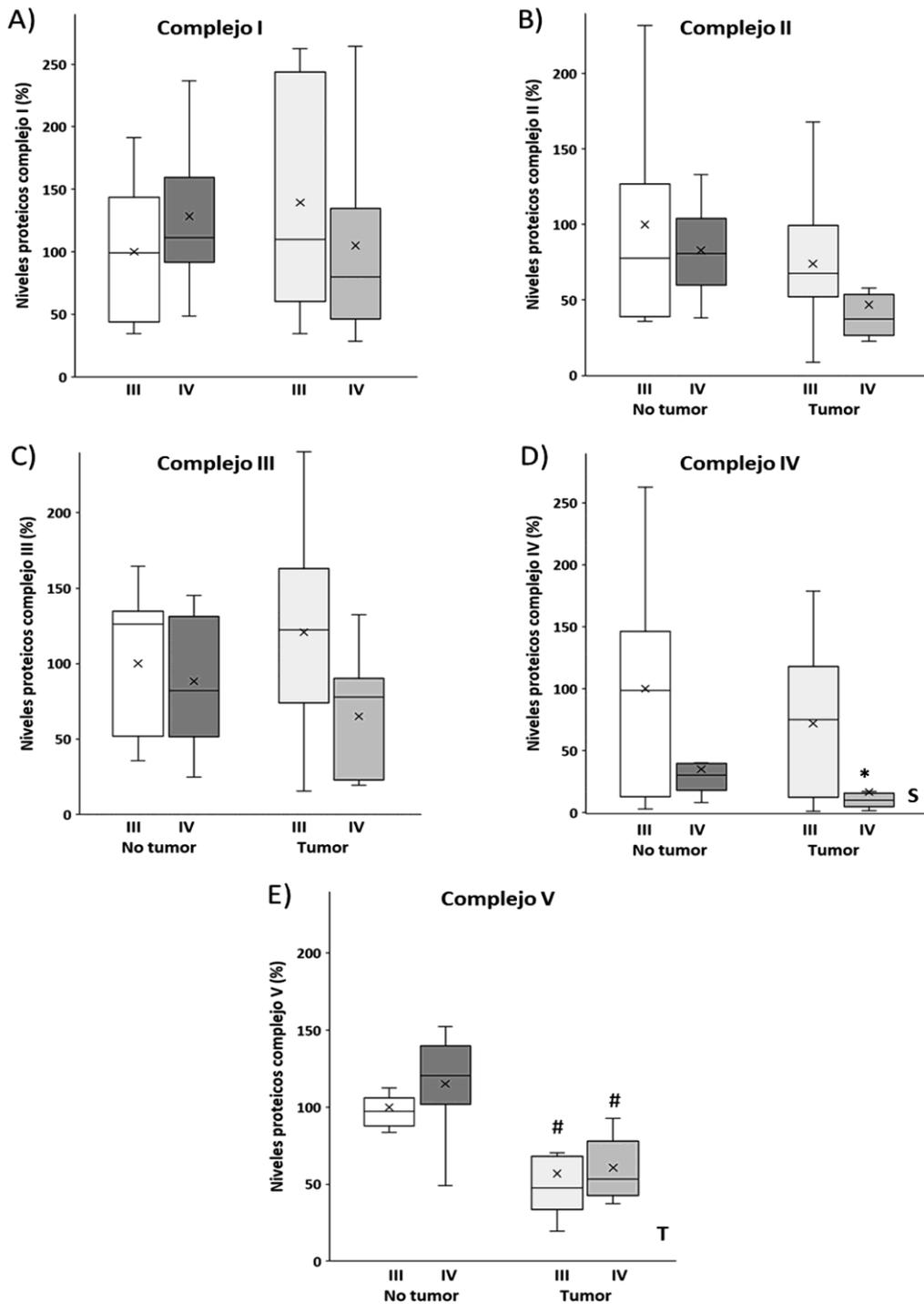


Figura 5. Diagrama de cajas de los niveles de expresión proteica obtenidos por *Western blot* de los complejos OXPHOS: complejo I (A), complejo II (B), complejo III (C), complejo IV (D) y complejo V (E), en el tejido adyacente no tumoral y tejido tumoral de pacientes en estadios III y IV de cáncer de colon. Los datos (n = 10-12, según grupo experimental) están expresados en porcentaje respecto al tejido adyacente no tumoral del estadio III, considerándolo el 100%. No tumor: tejido adyacente no tumoral; Tumor: tejido tumoral. Estadística: ANOVA de dos factores ($p < 0,05$): S efecto estadio, T efecto tejido; *t-Student* ($p < 0,05$): * diferencias estadio III vs. estadio IV, # diferencias tejido adyacente no tumoral vs. tejido tumoral.

Niveles de expresión proteica de LDHA, PDH y IDH2

En la Figura 6 se representan los niveles de expresión proteica de la LDHA, PDH y IDH2 en tejidos tumorales y tejidos adyacentes no tumorales de estadios avanzados, III y IV, de cáncer de colon.

En la Figura 6A se observa un efecto tejido en los niveles de expresión proteica de la LDHA, debido a que los tejidos tumorales de ambos estadios avanzados de colon presentaron los mayores niveles proteicos de dicha enzima, pauta estadísticamente significativa en el tejido tumoral del estadio IV. Los niveles de expresión proteica de la PDH (Figura 6B) fueron muy similares en las muestras de tejidos tumorales y tejidos adyacente no tumorales de ambos estadios. Los niveles de expresión proteica de la IDH2 (Figura 6C) presentaron un efecto tejido debido a que los tejidos tumorales de ambos estadios mostraron mayores niveles proteicos de esta enzima, comparado con su tejido adyacente no tumoral correspondiente. Además, este efecto es más marcado y estadísticamente significativo en el tejido tumoral del estadio IV, respecto a su tejido adyacente no tumoral. Las bandas representativas del *Western blot* de estas determinaciones se muestran en la Figura 8.

Niveles de expresión proteica de SIRT1, PGC1 α y TFAM

En la Figura 7 se representan los niveles de expresión proteica de la SIRT1, PGC1 α y TFAM en los tejidos tumorales y tejidos adyacentes no tumorales de estadios avanzados, III y IV, de cáncer de colon.

Como se observa en la Figura 7A los niveles proteicos de la SIRT1 mostraron un efecto tejido, pauta que es estadísticamente significativa en el tejido tumoral del estadio IV, debido a que este tejido presenta

mayores niveles proteicos de SIRT1 respecto al tejido no tumoral del estadio IV.

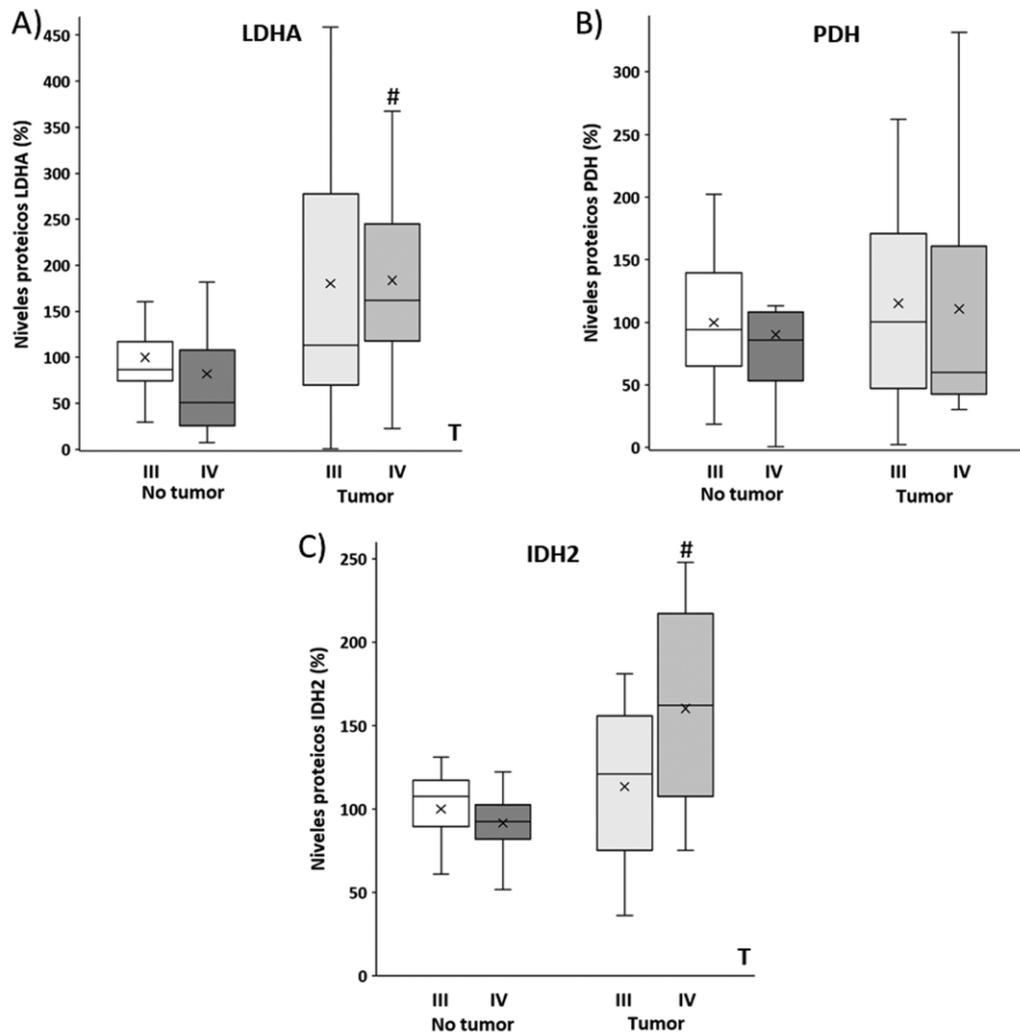


Figura 6. Diagrama de cajas de los niveles de expresión proteica obtenidos por *Western blot* de la LDHA (A), PDH (B) y IDH2 (C), en el tejido adyacente no tumoral y tejido tumoral de pacientes en estadios III y IV de cáncer de colon. Los datos (n = 10-12, según grupo experimental) están expresados en porcentaje respecto al tejido adyacente no tumoral del estadio III, considerándolo el 100%. No tumor: tejido adyacente no tumoral; Tumor: tejido tumoral. Estadística: ANOVA de dos factores ($p < 0,05$): T efecto tejido; *t Student* ($p < 0,05$): # diferencias tejido adyacente no tumoral vs. tejido tumoral.

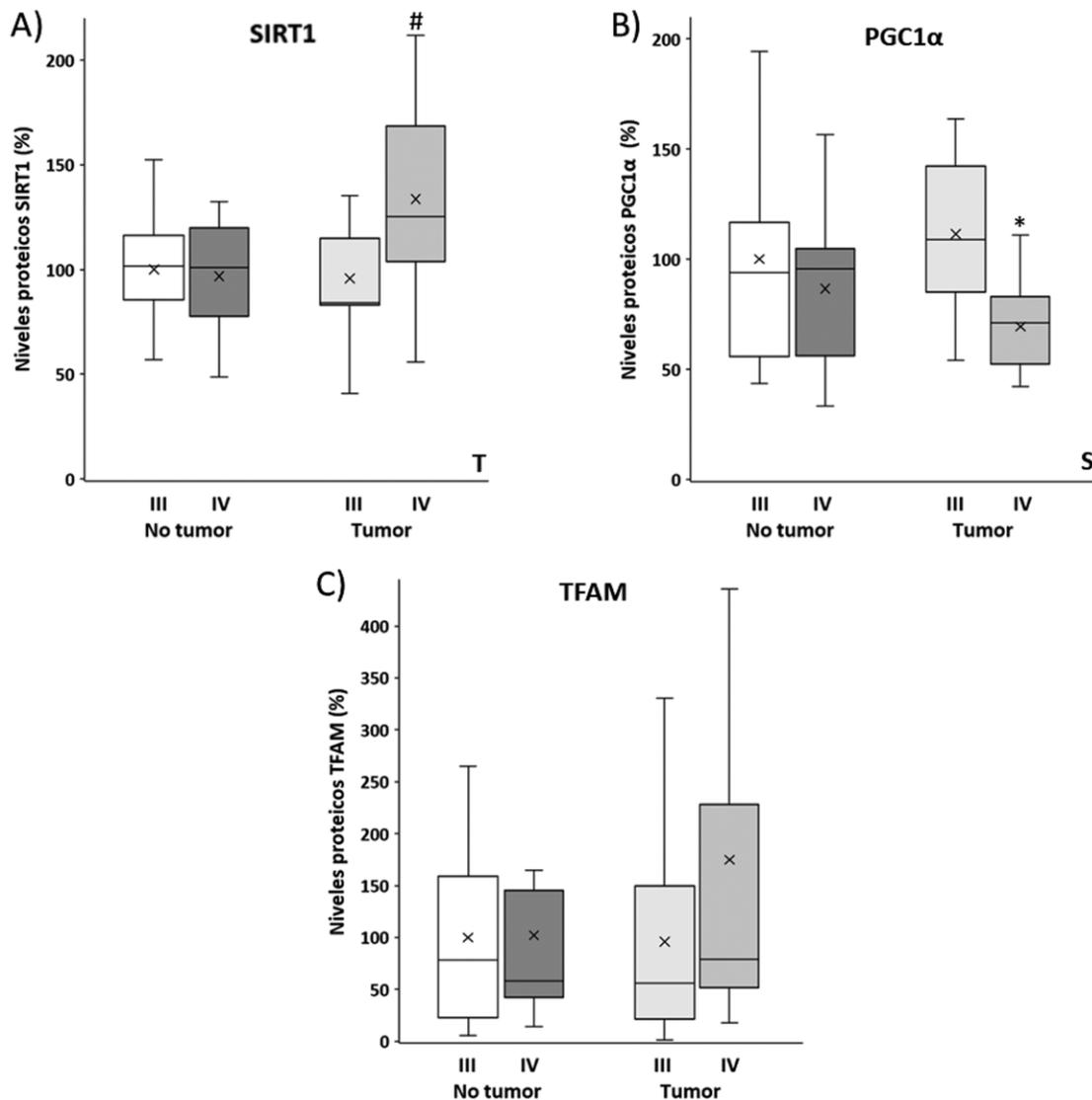


Figura 7. Diagrama de cajas de los niveles de expresión proteica obtenidos por *Western blot* de la SIRT1 (A), PGC1 α (B) y TFAM (C), en el tejido adyacente no tumoral y tejido tumoral de pacientes en estadios III y IV de cáncer de colon. Los datos (n = 10-12, según grupo experimental) están expresados en porcentaje respecto al tejido adyacente no tumoral del estadio III, considerándolo el 100%. No tumor: tejido adyacente no tumoral; Tumor: tejido tumoral. Estadística: ANOVA de dos factores ($p < 0,05$): S efecto estadio, T efecto tejido; *t-Student* ($p < 0,05$): * diferencias estadio III vs. estadio IV, # diferencias tejido adyacente no tumoral vs. tejido tumoral.

Por otra parte, en los niveles proteicos de PGC1 α (Figura 7B) se observó un efecto estadio, ya que las muestras de tejidos del estadio IV presentaron menores niveles proteicos de PGC1 α , pauta estadísticamente significativa en el tejido tumoral. Los niveles de expresión proteica de TFAM (Figura 7C) fueron muy similares entre los tejidos adyacentes no

tumorales y los tejidos tumorales del estadio III. Sin embargo, el tejido tumoral de estadio IV presentó los mayores niveles de expresión de TFAM entre todas las muestras de tejido analizadas, aunque no fueron significativos y con una mayor dispersión de los datos. Las bandas representativas del *Western blot* de estas determinaciones se muestran en la Figura 8.

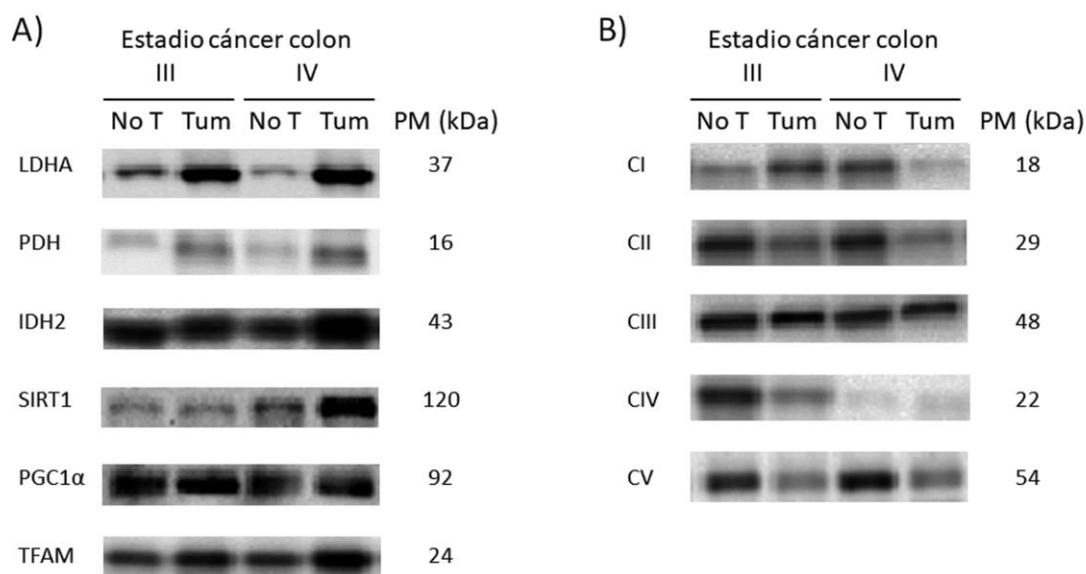


Figura 8. Bandas representativas del *Western blot* de las determinaciones de los niveles de expresión de la LDHA, PDH, IDH2, SIRT1, PGC1α y TFAM (A); y de los complejos OXPHOS (B) (complejos del I al V), en el tejido adyacente no tumoral (No T) y tejido tumoral (Tum) de pacientes en estadios III y IV de cáncer de colon; PM peso molecular.

Cuantificación de ADN mitocondrial

Los niveles de ADNmt fueron evaluados en tejido tumoral y tejido adyacente no tumoral de pacientes en estadios III y IV de colon, los resultados obtenidos se muestran en la Figura 9. Se observó un efecto tejido estadísticamente significativo, el cual es reflejado por una mayor cantidad de ADNmt en las muestras de tejidos tumorales de ambos estadios, respecto a sus tejidos adyacente no tumorales correspondiente.

Además, ambas muestras de tejido tumoral mostraron cantidades muy similares de ADNmt.

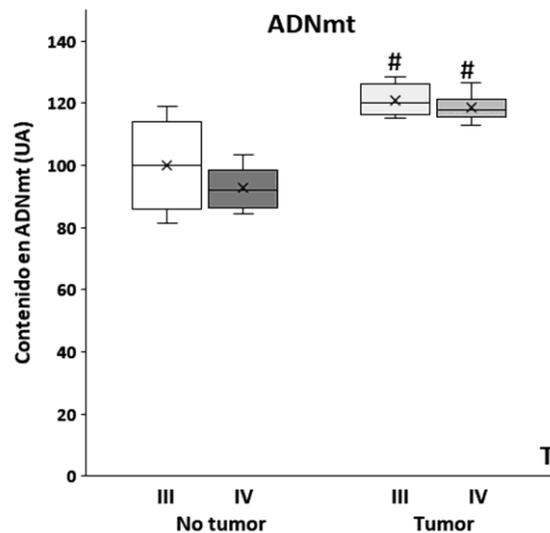


Figura 9. Diagrama de cajas del contenido en ADNmt obtenidos por *PCR* cuantitativa, en el tejido adyacente no tumoral y tejido tumoral de pacientes en estadios III y IV de cáncer de colon. Los datos ($n = 10-12$, según grupo experimental) están expresados en porcentaje respecto al tejido adyacente no tumoral del estadio III, considerándolo el 100%. No tumor: tejido adyacente no tumoral; Tumor: tejido tumoral. Estadística: ANOVA de dos factores ($p < 0,05$): T efecto tejido; *t-Student* ($p < 0,05$): # diferencias tejido adyacente no tumoral vs. tejido tumoral.

Análisis de las actividades enzimáticas de IDH2, COX y ATPasa

En la Figura 10 se muestran las actividades enzimáticas de la IDH2, COX y ATPasa. Los valores de actividad de la IDH2 (Figura 10A) presentaron un efecto interactivo entre tejido y estadio (ANOVA, $p=0,054$), debido a los mayores valores de actividad obtenidos en el tejido adyacente no tumoral de estadio IV respecto al tejido adyacente no tumoral del estadio III. En cambio, el tejido tumoral de estadio IV presenta menores valores de actividad respecto al tejido tumoral de estadio III. Los valores de actividad enzimática de la COX (Figura 10B) no fueron diferentes entre los grupos experimentales analizados. De hecho, los tejidos tumorales de ambos

estadios de cáncer de colon mostraron niveles de actividad COX muy similares.

Se observó un efecto estadio en los valores de actividad de la ATPasa (Figura 10C), debido a mayores valores de actividad de esta enzima en el tejido tumoral y tejido adyacente no tumoral del estadio IV. Además, el tejido tumoral del estadio IV presentó una mayor actividad de la ATPasa respecto al tejido tumoral del estadio III de forma estadísticamente significativa.

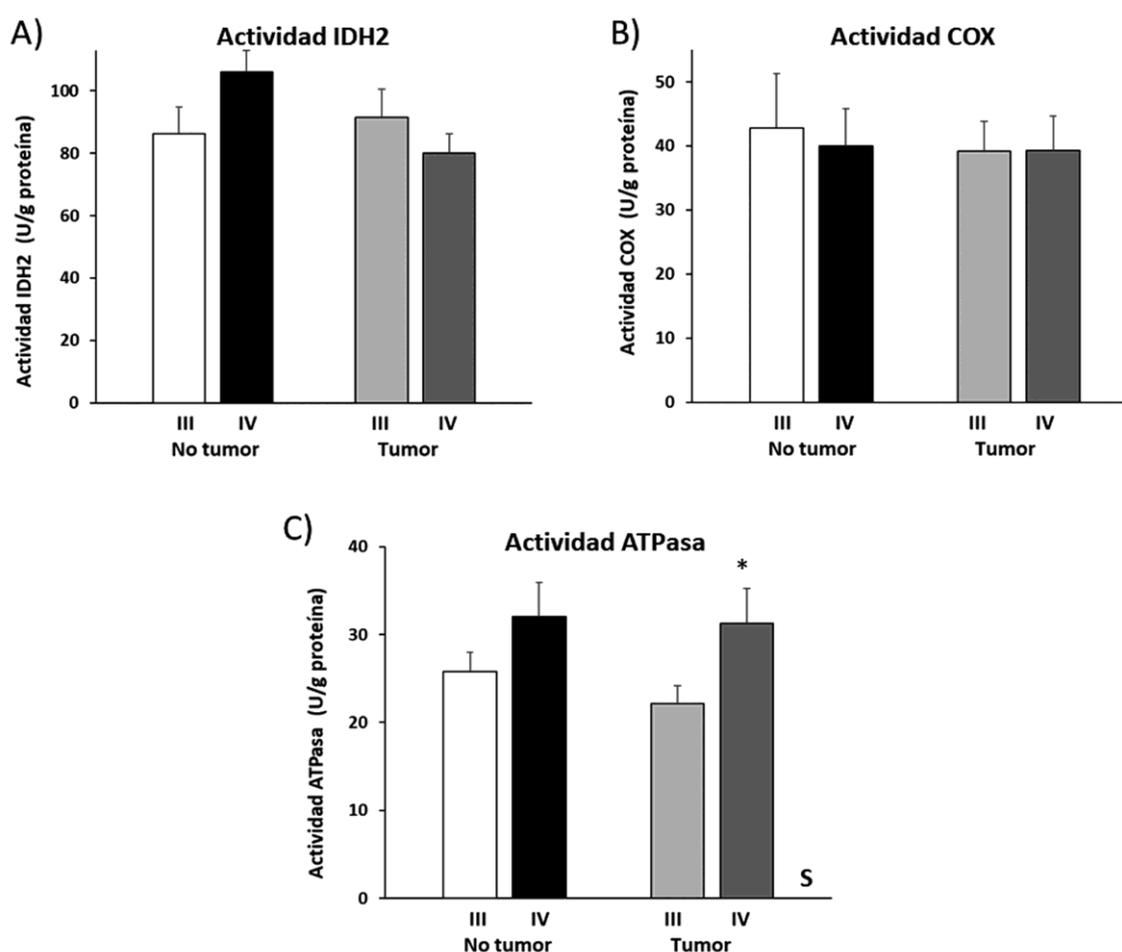


Figura 10. Actividades enzimáticas de la IDH2 (A), COX (B) y ATPasa (C), en el tejido adyacente no tumoral y tejido tumoral de pacientes en estadios III y IV de cáncer de colon. Los datos están expresados como la media \pm la desviación estándar (n = 10-12, según grupo experimental). No tumor: tejido adyacente no tumoral; Tumor: tejido tumoral. Estadística: ANOVA de dos factores ($p < 0,05$): S efecto estadio; *t Student* ($p < 0,05$): * diferencias estadio III vs estadio IV.

4.1.2. Discusión

La oncogénesis, así como la progresión metastásica, dependen de la reprogramación del metabolismo celular¹²⁸. Nuestro estudio indica que el tejido tumoral del estadio pre-metastásico III de cáncer de colon presenta un perfil metabólico similar al de su tejido adyacente no tumoral. Sin embargo, en el estadio IV los cambios en el metabolismo oxidativo podrían estar encaminados a mantener el fenotipo metastásico, aunque se observa menores niveles proteicos de los complejos OXPHOS en el tejido tumoral del estadio IV.

La principal función de la mitocondria es la producción de energía, mediante la formación de ATP, a través del ciclo de Krebs y los complejos OXPHOS. En este sentido, el correcto mantenimiento de la estructura y función de las mitocondrias depende de la biogénesis mitocondrial, la cual implica la proliferación y diferenciación de las mitocondrias y constituye un mecanismo adaptativo en respuesta a los cambios en la demanda energética⁵³.

Los tejidos tumorales de los estadios avanzados, pre-metastásico estadio III y metastásico estadio IV de cáncer de colon, muestran un perfil diferente en los niveles de expresión proteica de los complejos OXPHOS, excepto para la ATPasa, lo que sugiere una capacidad metabólica oxidativa dependiente del estadio. Un estudio proteómico anterior en líneas celulares de CCR metastásico, reveló una desregulación en la expresión proteica y localización subcelular de los complejos OXPHOS, lo cual refleja una alteración del metabolismo oxidativo en el CCR metastásico¹²⁹. Los resultados obtenidos indican que la desregulación en los niveles proteicos de los complejos OXPHOS principalmente complejo IV y V, no afectan la principal función de la mitocondria en el tejido tumoral del estadio IV,

sugiriendo un incremento en la eficiencia de la actividad COX y ATPasa, cuando sus niveles proteicos están comprometidos. Por lo tanto, la mitocondria podría suministrar los requerimientos energéticos en forma de ATP para la célula tumoral, y así contribuir a mantener el fenotipo metastásico del cáncer de colon, teniendo en cuenta los niveles preservados de actividad enzimática para la COX y ATPasa observados en el tejido tumoral del estadio IV. De acuerdo con lo anterior, un estudio reportó que tanto el tejido tumoral como el tejido adyacente no tumoral de muestras humanas de CCR presentaron una capacidad funcional similar del sistema OXPHOS, aunque sin especificar los estadios de las muestras de CCR¹³⁰. Además, el flujo en la entrada de sustrato a la mitocondria dirigido hacia el metabolismo oxidativo podría estar garantizado, teniendo en cuenta los niveles proteicos de la enzima PDH observados en los tejidos tumorales del estadio IV de cáncer de colon.

Por otra parte, los elevados niveles proteicos de LDHA observados en los tejidos tumorales de ambos estadios de cáncer de colon indican un claro efecto Warburg, lo que sugiere que la glucólisis aeróbica juega un papel determinante en la promoción y mantenimiento del estadio metastásico en el cáncer de colon. De acuerdo con lo anterior, una elevada expresión de genes glucolíticos, entre ellos de la LDHA, se asoció con un mal pronóstico en pacientes de CCRm, ya que favorece la migración de las células cancerosas y la angiogénesis^{131,132}.

En consecuencia, la expresión proteica de los complejos IV y V, así como de la LDHA, merece ser evaluada para su uso como biomarcadores de pronóstico en estadios avanzados de cáncer de colon.

En varios tipos de cánceres humanos, incluido el CCR, han sido reportadas mutaciones en la IDH2⁴¹, las cuales se asocian a la pérdida de

la actividad enzimática nativa de la IDH2¹³³. Basándonos en nuestros resultados, suponemos que los elevados niveles proteicos de dicha enzima en el tejido tumoral IV, pueden ser un intento de incrementar la producción de NADPH, requerido por células en proliferación¹²⁸. Por lo que podemos asumir que la disponibilidad de α -cetoglutarato estaría disminuida, limitando así al ciclo de Krebs en el tejido tumoral del estadio metastásico. Lo anteriormente mencionado, sumado a la desregulación en los niveles proteicos de los complejos OXPHOS, causaría una sobrecarga en la cadena de transporte electrónico, lo que conllevaría a un aumento en la producción mitocondrial de los ROS, contribuyendo así al estrés oxidativo en el tejido tumoral y su entorno circundante en el estadio IV de cáncer de colon. En consecuencia, este incremento en el estrés oxidativo podría favorecer la capacidad metastásica de las células cancerosas^{89,134}.

La SIRT1 actúa a través de la desacetilación directa, lo que puede provocar la activación de sus sustratos, como el coactivador transcripcional PGC1 α , el regulador clave de la biogénesis mitocondrial y el metabolismo energético^{52,135}. En este estudio observamos señales de activación mitocondrial en el estadio pre-metastásico III, debido a los elevados niveles proteicos de PGC1 α encontrados en el tejido tumoral de estadio III comparado con el tejido tumoral del estadio IV. En un estudio anterior realizado con estadios tempranos de CCR se han reportado menores niveles de ARNm para PGC1 α en el tejido tumoral comparado con el tejido adyacente no tumoral¹³⁶. Nuestros resultados revelan una variación en los niveles de expresión proteica de PGC1 α dependiente del estadio en el cáncer de colon, debido probablemente a una mayor demanda energética requerida en el estadio III para progresar hacia el estadio metastásico.

SIRT1 y PGC1 α presentaron un patrón de expresión diferencial en los tejidos tumorales del estadio IV. En un estudio previo observamos en una línea celular de CCR metastásico un patrón de expresión proteica similar para SIRT1 y PGC1 α ¹³⁷. Una posible explicación para estos resultados podría ser debido a un intento de promover el metabolismo oxidativo, manteniendo una mayor señal de activación de PGC1 α , en respuesta a la desregulación en los niveles proteicos de los complejos OXPHOS, observado en el tejido tumoral del estadio IV. Fundamentando lo anterior, un estudio reportó un aumento en los niveles proteicos de los complejos OXPHOS dependiente del eje SIRT1/PGC1 α en cultivos a partir de muestras de tejidos de pacientes con CCR metastásico¹³⁸. Por lo tanto, se subraya el valor potencial de estas proteínas reguladoras, para su posible evaluación como biomarcadores pronóstico en estadios avanzados de cáncer de colon.

Hoy en día está bien establecido que TFAM es el activador más importante del genoma mitocondrial, regulando su replicación y transcripción, además de jugar un papel clave en mantener la estructura y el número de copias de dicho genoma^{139,140}. TFAM es activado por PGC1 α a través de los NRF1 y NRF2 para promover la función mitocondrial en respuesta a estímulos externos diferentes¹⁴¹.

TFAM y PGC1 α presentaron una expresión diferente y dependiente del estadio avanzado de cáncer de colon. En consecuencia, las células tumorales del estadio IV podrían tener en cierta forma una biogénesis activada, para mantener las mitocondrias funcionalmente activas. Una explicación alternativa a los elevados niveles de TFAM encontrados en el tejido tumoral IV, podría ser debido a la falta de regulación postranscripcional negativa de TFAM. Fundamentando lo anterior, se

observó una sobreexpresión de TFAM concomitante con la pérdida de su regulación postranscripcional negativa, en muestras de tejido de pacientes con CCR¹⁴².

Las alteraciones en el número de copias del ADNmt están siendo consideradas un importante denominador común en varios tipos de cánceres humanos, incluyendo el CCR¹⁴³. En este sentido, estudios anteriores están evaluando su uso como potencial biomarcador del riesgo y pronóstico del CCR humano^{144,145}. Los resultados de la cantidad de ADNmt obtenidos en las muestras tumorales indica que los tejidos tumorales de ambos estadios presentan un mayor contenido en mitocondrias, en respuesta a una biogénesis mitocondrial promovida por una elevada demanda energética para alcanzar y mantener la metástasis. Resultados similares al anterior se describieron en muestras tumorales de estadios III y IV de CCR¹⁴⁶.

En su conjunto, los resultados obtenidos muestran la promoción de la biogénesis mitocondrial y/o la función mitocondrial en el tejido tumoral del estadio III. Una vez alcanzado el estadio metastásico se incrementa la funcionalidad mitocondrial, y de esta forma, el metabolismo oxidativo abastece energéticamente los requerimientos para la progresión y mantenimiento de la metástasis en el cáncer de colon. Adicionalmente, el efecto Warburg contribuiría positivamente a promover y mantener el fenotipo metastásico en el cáncer de colon.

En resumen, nuestro estudio ha puesto de manifiesto diferencias en aspectos claves del metabolismo energético en muestras tisulares de estadios avanzados de cáncer de colon. Nuestros resultados indican que parámetros fundamentales de la función mitocondrial como SIRT1, PGC1 α , LDHA, IDH2, los complejos OXPHOS (complejos IV y V), y el

contenido en ADNmt juegan un papel importante en la progresión hacia un estadio metastásico en el cáncer de colon. Así pues, estos parámetros podrían ser considerados para su evaluación como biomarcadores de pronóstico en pacientes de estadios avanzados de cáncer de colon.

4.2. Estudio del estrés oxidativo en muestras tisulares de pacientes en estadios avanzados de cáncer de colon

Los resultados que se muestran a continuación y la discusión de estos, derivaron del estudio del estrés oxidativo en muestras tisulares de pacientes en estadios avanzados de cáncer de colon. El objetivo de este estudio fue proseguir con la detección de posibles biomarcadores de pronóstico y evolución, en este caso, relacionados con el estrés oxidativo en dichos pacientes. Para ello, se determinaron los niveles de expresión proteica de la SIRT3, P53, MDM2, MnSOD, Cu/ZnSOD, catalasa, UCP5, GPx y GRd en las muestras de tejido tumoral y tejido adyacente no tumoral de pacientes en estadios III y IV de cáncer de colon mediante *Western blot*. También se analizó la ratio entre los niveles proteicos de la GPx y la GRd. Por otra parte, se analizaron las actividades enzimáticas de la MnSOD y la catalasa, y se cuantificaron los niveles de glutatión total y oxidado, así como la evaluación de los daños oxidativos en lípidos y proteínas, sobre las mismas muestras de tejidos anteriormente mencionadas.

4.2.1. Resultados

Niveles de expresión de proteínas antioxidantes MnSOD, Cu/ZnSOD, catalasa, UCP5, GPx y GRd

Los resultados obtenidos muestran mayores niveles de expresión proteica estadísticamente significativos de la MnSOD (Figura 11A) en las muestras de tejido tumoral comparado con su tejido adyacente no tumoral en ambos estadios de cáncer de colon, lo cual refleja un efecto tejido. Por otra parte, el tejido adyacente no tumoral del estadio IV mostró unos niveles superiores estadísticamente significativos comparado con el mismo tipo de tejido, pero del estadio III. El tejido tumoral del estadio III mostró mayores niveles de expresión proteica de la Cu/ZnSOD (Figura 11B), respecto a su tejido adyacente no tumoral, aunque no fueron significativos. Asimismo, el tejido adyacente no tumoral del estadio IV presentó mayores niveles estadísticamente significativos de Cu/ZnSOD respecto al mismo tipo de tejido del estadio III.

Los niveles de expresión proteica de la catalasa (Figura 11C) fueron similares entre los tejidos tumorales de ambos estadios, III y IV, y con el tejido adyacente no tumoral del estadio IV. En cambio, mayores niveles de expresión proteica en el tejido tumoral del estadio III fueron estadísticamente significativos respecto a su tejido adyacente no tumoral. El tejido adyacente no tumoral del estadio IV presentó mayores niveles de expresión proteica de la catalasa estadísticamente significativos respecto al tejido adyacente no tumoral del estadio III. Por todo ello, se observó un efecto interactivo dependiente del tejido y del estadio.

Los niveles de expresión proteica de la UCP5 (Figura 11D) siguieron un patrón similar a la expresión de la catalasa; aunque solo fueron estadísticamente significativos los mayores niveles de expresión

observados en el tejido adyacente no tumoral del estadio IV respecto al mismo tejido, pero del estadio III.

Por lo tanto, se observan unos mayores niveles de proteínas antioxidantes en el tejido adyacente no tumoral del estadio IV respecto al del estadio III.

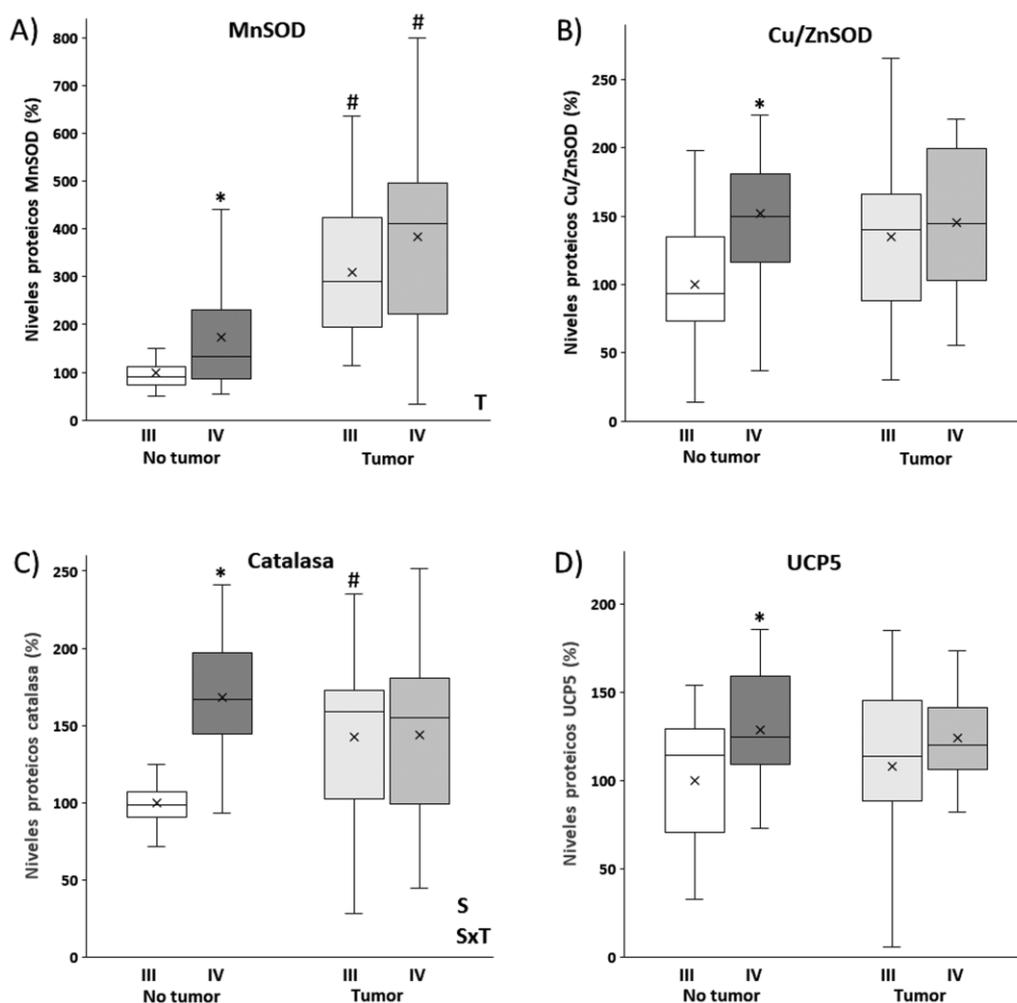


Figura 11. Diagrama de cajas de los niveles de expresión proteica obtenidos por *Western blot* de la MnSOD (A), Cu/ZnSOD (B), catalasa (C) y UCP5 (D), en el tejido adyacente no tumoral y tejido tumoral de pacientes en estadios III y IV de cáncer de colon. Los datos (n = 10-12, según grupo experimental) están expresados en porcentaje respecto al tejido adyacente no tumoral del estadio III, considerándolo el 100%. No tumor: tejido adyacente no tumoral; Tumor: tejido tumoral. Estadística: ANOVA de dos factores ($p < 0,05$): S efecto estadio, T efecto tejido y SxT efecto interactivo; *t-Student* ($p < 0,05$): * diferencias estadio III vs. estadio IV, # diferencias tejido adyacente no tumoral vs. tejido tumoral.

Los niveles de expresión proteica de la GPx (Figura 12A) obtenidos en ambas muestras de tejidos del estadio III fueron similares. En cambio, el tejido adyacente no tumoral del estadio IV mostró los mayores niveles de expresión de esta enzima, presentando significancia estadística respecto al tejido adyacente no tumoral del estadio III. Los tejidos tumorales de ambos estadios mostraron niveles similares de expresión proteica de la GRd (Figura 12B); presentando un efecto tejido ya que dichos niveles fueron inferiores estadísticamente significativos comparado con el tejido adyacente no tumoral correspondiente en cada estadio.

Se observó una menor ratio GRd/GPx (Figura 12C) en el estadio IV respecto del estadio III, tanto en tejido tumoral como en el tejido adyacente no tumoral, aunque no se alcanzó la significancia estadística. El tejido tumoral del estadio IV presentó la menor ratio GRd/GPx entre todos los grupos experimentales, la cual fue estadísticamente significativa respecto a su tejido adyacente no tumoral. Las bandas representativas del *Western blot* de estas determinaciones se muestran en la Figura 13.

Niveles de expresión proteica de SIRT3, P53 y MDM2

En la Figura 14 se representan los niveles de expresión proteica de la SIRT3, P53 y MDM2 en los tejidos tumorales y tejidos adyacentes no tumorales de estadios avanzados, III y IV, de cáncer de colon.

Las muestras de tejido tumoral y adyacente no tumoral del estadio III presentaron similares niveles de expresión proteica de la SIRT3 (Figura 14A). En cambio, el tejido tumoral del estadio IV mostró menores niveles estadísticamente significativos de expresión de la SIRT3 respecto a su tejido adyacente no tumoral. Los mayores niveles de expresión de SIRT3 se observaron en el tejido adyacente no tumoral del estadio IV, siendo

estos estadísticamente significativos respecto al tejido adyacente no tumoral del estadio III.

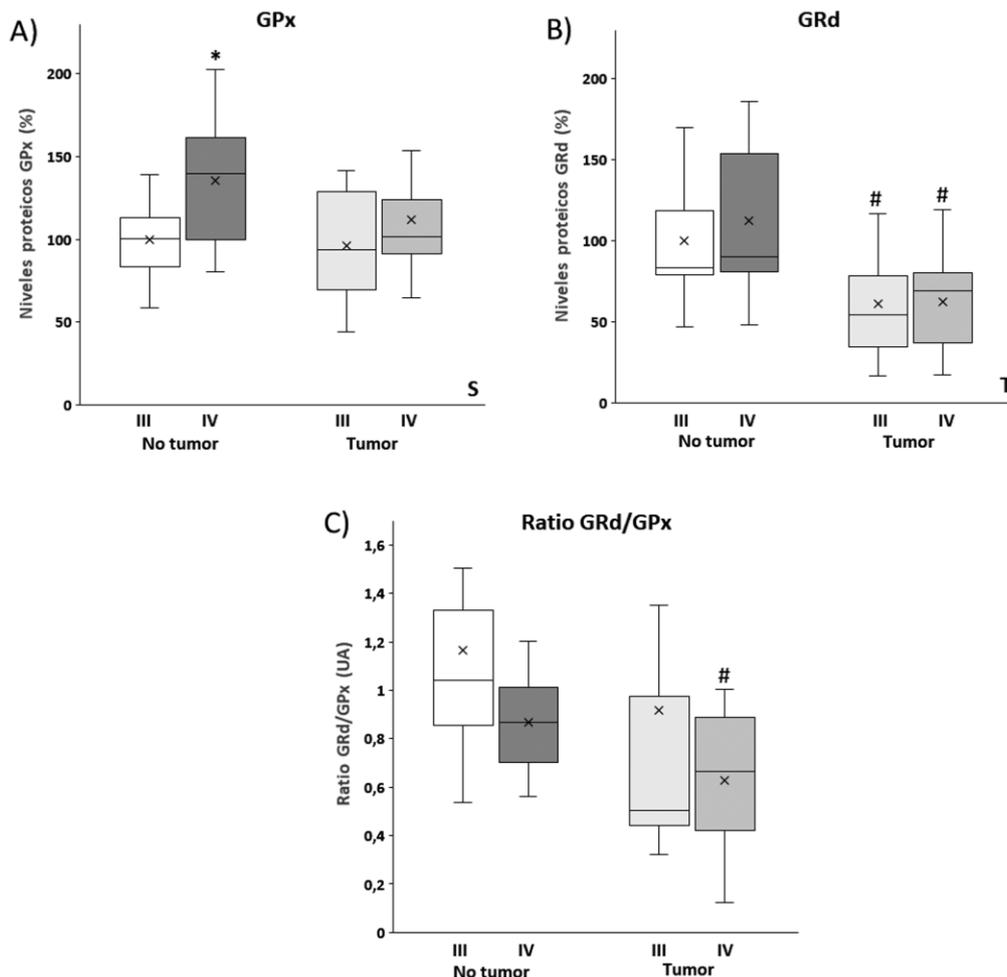


Figura 12. Diagrama de cajas de los niveles de expresión proteica obtenidos por *Western blot* de la GPx (A) y GRd (B), en el tejido adyacente no tumoral y tejido tumoral de pacientes en estadios III y IV de cáncer de colon, y de la ratio GRd/GPx. Los datos (n = 10-12, según grupo experimental) están expresados en porcentaje respecto al tejido adyacente no tumoral del estadio III, considerándolo el 100%. No tumor: tejido adyacente no tumoral; Tumor: tejido tumoral. Estadística: ANOVA de dos factores ($p < 0,05$): S efecto estadio, T efecto tejido; *t-Student* ($p < 0,05$): * diferencias estadio III vs. estadio IV, # diferencias tejido adyacente no tumoral vs. tejido tumoral.

Los tejidos tumorales de ambos estadios mostraron unos niveles de expresión proteica de P53 (Figura 14B) muy bajos, prácticamente inexistente, reflejando un efecto tejido muy significativo, comparado con su tejido adyacente correspondiente, pauta estadísticamente significativa

en los tejidos tumorales de ambos estadios. Por otra parte, se observó un efecto estadio, debido a mayores niveles proteicos de P53 en el estadio IV, pauta estadísticamente significativa en el tejido adyacente no tumoral del estadio IV. Por otra parte, se observó un efecto interactivo significativo en la comparación de todos los grupos experimentales.

Los niveles de expresión proteica de MDM2 (Figura 14C) en las muestras de tejidos tumorales de ambos estadios fueron muy similares. En cambio, en el tejido adyacente no tumoral del estadio IV se observaron menores niveles de expresión proteica de MDM2, respecto al tejido adyacente no tumoral del estadio III, aunque no fueron estadísticamente significativos y este último tejido mostró una mayor dispersión de los datos. Las bandas representativas del *Western blot* de estas determinaciones se muestran en la Figura 13.

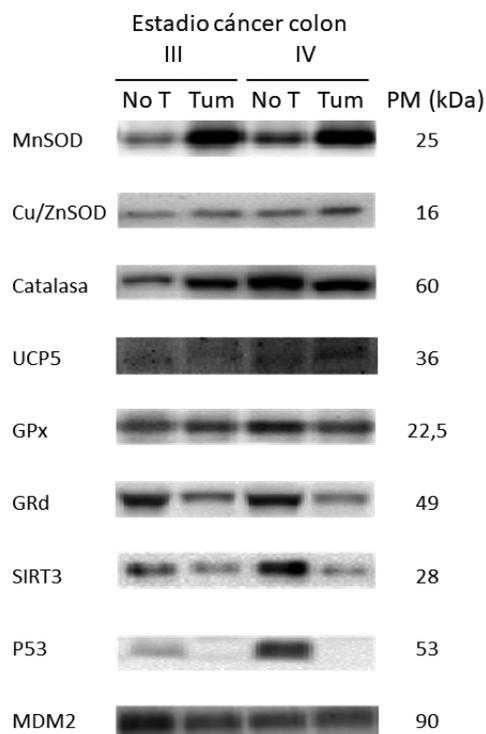


Figura 13. Bandas representativas del *Western blot* de las determinaciones de los niveles de expresión de la MnSOD, Cu/ZnSOD, catalasa, UCP5, GPx, GRd, SIRT3, P53 y MDM2, en el tejido adyacente no tumoral (No T) y tejido tumoral (Tum) de pacientes en estadios III y IV de cáncer de colon; PM peso molecular.

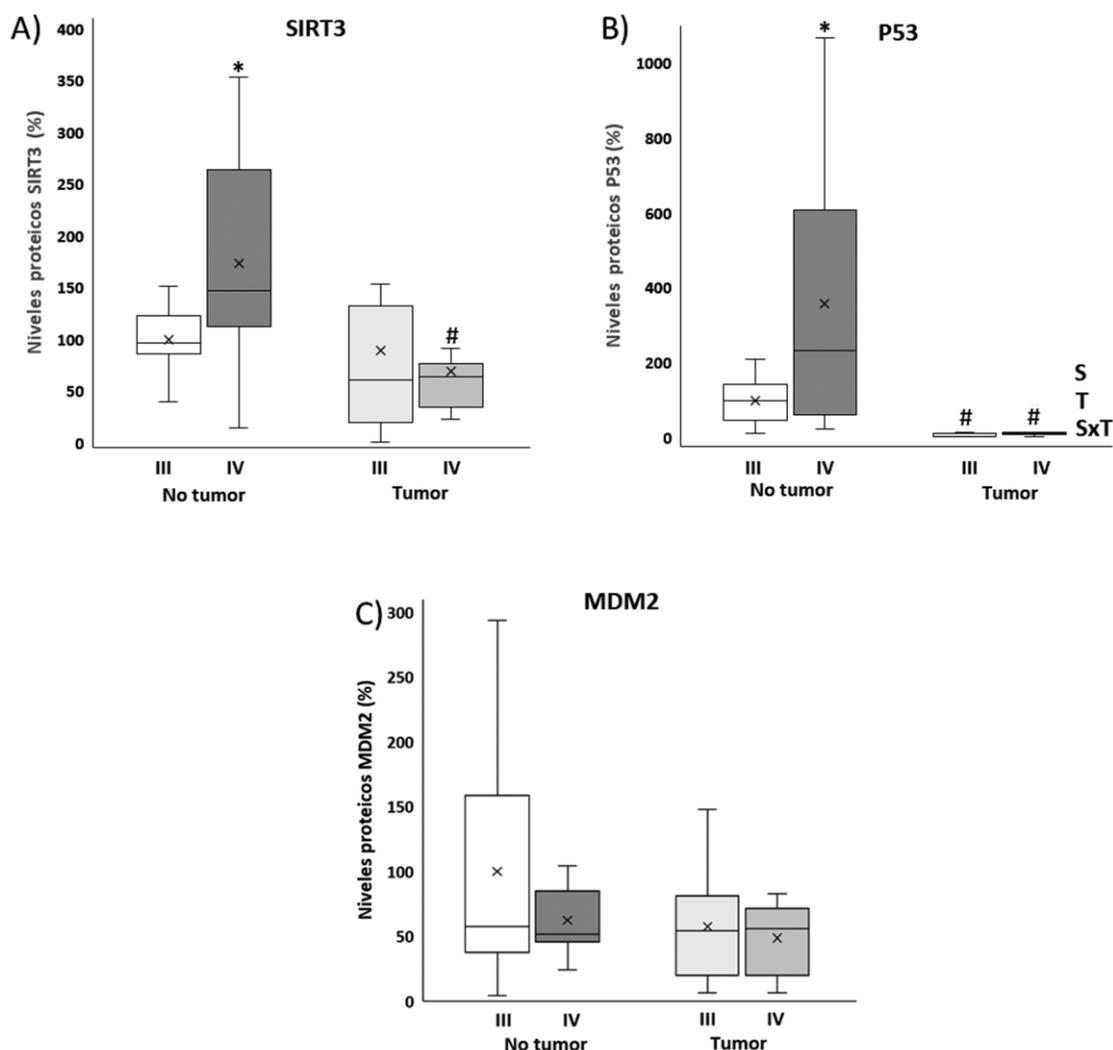


Figura 14. Diagrama de cajas de los niveles de expresión proteica obtenidos por *Western blot* de la SIRT3 (A), P53 (B) y MDM2 (C), en el tejido adyacente no tumoral y tejido tumoral de pacientes en estadios III y IV de cáncer de colon. Los datos (n = 10-12, según grupo experimental) están expresados en porcentaje respecto al tejido adyacente no tumoral del estadio III, considerándolo el 100%. No tumor: tejido adyacente no tumoral; Tumor: tejido tumoral. Estadística: ANOVA de dos factores (p < 0,05): S efecto estadio, T efecto tejido y SxT efecto interactivo; *t-Student* (p < 0,05): * diferencias estadio III vs. estadio IV, # diferencias tejido adyacente no tumoral vs. tejido tumoral.

Determinación de los niveles de glutatión total y oxidado

Los niveles de glutatión total y oxidado fueron determinados en las muestras de tejido tumoral y tejido adyacente no tumoral de ambos estadios avanzados de cáncer de colon (Tabla 2). El tejido adyacente no tumoral del estadio III mostró el menor nivel de glutatión total comparado

con el tejido tumoral del mismo estadio y con ambas muestras de tejidos del estadio IV. En cambio, en ambas muestras de tejidos del estadio IV se observaron similares niveles de glutatión total. Por otra parte, en el tejido tumoral y tejido adyacente no tumoral del estadio III, se observaron similares niveles de glutatión oxidado. Sin embargo, el tejido tumoral del estadio IV mostró los mayores niveles de glutatión oxidado entre todos los tejidos analizados. A pesar de las diferencias encontradas, no se alcanzó la significancia estadística al comparar los grupos experimentales.

Tabla 2. Contenido de glutatión total y oxidado en muestras de tejidos tumorales y tejidos adyacentes no tumorales de estadios III y IV de cáncer de colon. Los datos representan la media \pm desviación estándar.

Cáncer de colon	Estadio III		Estadio IV	
	Tejido adyacente no tumoral	Tejido tumoral	Tejido adyacente no tumoral	Tejido tumoral
Glutatión total (nmol/mg proteína)	12,6 \pm 4,6	16,5 \pm 5,6	29,1 \pm 7,3	28,9 \pm 9,4
Glutatión oxidado (nmol/mg proteína)	3,93 \pm 1,04	3,79 \pm 1,41	6,20 \pm 2,06	8,68 \pm 4,41

Determinación del daño oxidativo en proteínas y lípidos

El contenido en grupos carbonilos y aductos de 4-HNE fue determinado como indicador de daño oxidativo en proteínas y lípidos, respectivamente, en las muestras de tejido tumoral y tejido adyacente no tumoral en estadios III y IV de cáncer de colon. No se encontraron diferencias entre los grupos experimentales respecto al daño oxidativo en las proteínas (Figura 15A). En cambio, se observaron diferencias significativas entre las muestras de diferentes estadios y tejidos para el daño oxidativo en lípidos (Figura 15B). En los resultados obtenidos se observó un efecto estadio y efecto tejido, debido a mayores niveles de daño lipídico en ambas

muestras del estadio IV y en el tejido tumoral IV, respectivamente. Además, el tejido tumoral del estadio IV mostró los mayores niveles de daño por la oxidación lipídica estadísticamente significativos, respecto al tejido tumoral del estadio III y al tejido adyacente no tumoral del estadio IV.

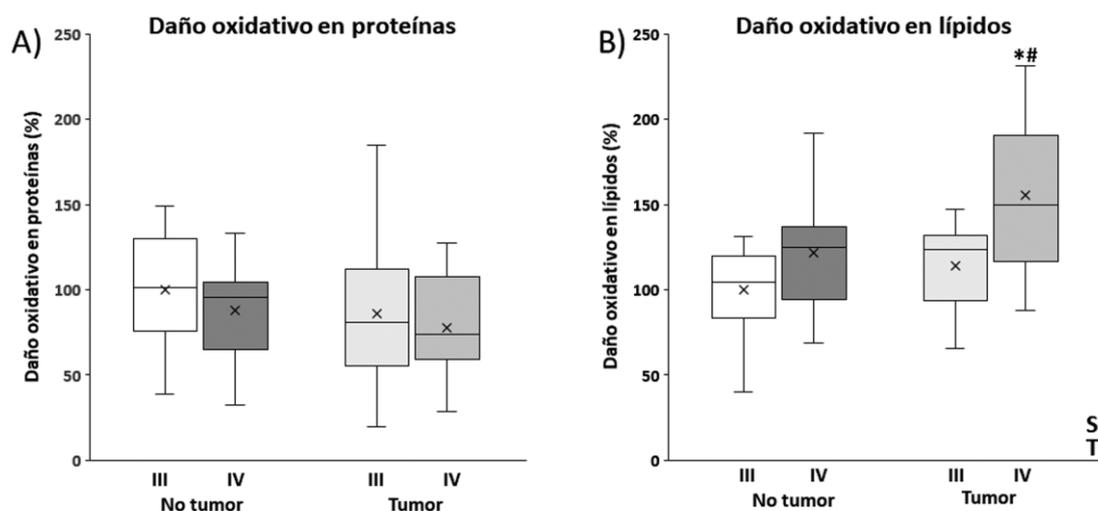


Figura 15. Diagrama de cajas de los niveles de daño oxidativo obtenidos por *Western blot* en proteínas (A) y lípidos (B) en el tejido adyacente no tumoral y tejido tumoral de pacientes en estadios III y IV de cáncer de colon. Los datos ($n = 10-12$, según grupo experimental) están expresados en porcentaje respecto al tejido adyacente no tumoral del estadio III, considerándolo el 100%. No tumor: tejido adyacente no tumoral; Tumor: tejido tumoral. Estadística: ANOVA de dos factores ($p < 0,05$): S efecto estadio, T efecto tejido; *t-Student* ($p < 0,05$): * diferencias estadio III vs. estadio IV, # diferencias tejido adyacente no tumoral vs. tejido tumoral.

Análisis de las actividades enzimáticas de MnSOD y catalasa

En la Figura 16 se representan las actividades enzimáticas de la MnSOD y la catalasa en los tejidos tumorales y tejidos adyacentes no tumorales de estadios avanzados, III y IV, de cáncer de colon.

La actividad enzimática de la MnSOD (Figura 16A) mostró un efecto tejido y efecto estadio, además de efecto interactivo. Esto fue debido al mayor nivel de actividad enzimática, observado en el tejido adyacente no tumoral del estadio IV tanto respecto del tejido adyacente no tumoral de

estadio III como del tejido tumoral del estadio IV. De hecho, la actividad MnSOD observada en el tejido adyacente no tumoral del estadio IV prácticamente duplica la actividad obtenida en cada uno de los demás grupos experimentales.

Los valores de actividad enzimática de la catalasa (Figura 16B) mostraron un efecto estadio, debido a mayores niveles de actividad de esta enzima en el estadio IV, pauta estadísticamente significativa en el tejido adyacente no tumoral del estudio IV, respecto al mismo tejido del estadio III. La actividad de la catalasa mostró una pauta similar a la actividad MnSOD si bien de manera no tan marcada, hecho que se refleja en presentar también efecto interactivo debido al estadio y al tipo de tejido.

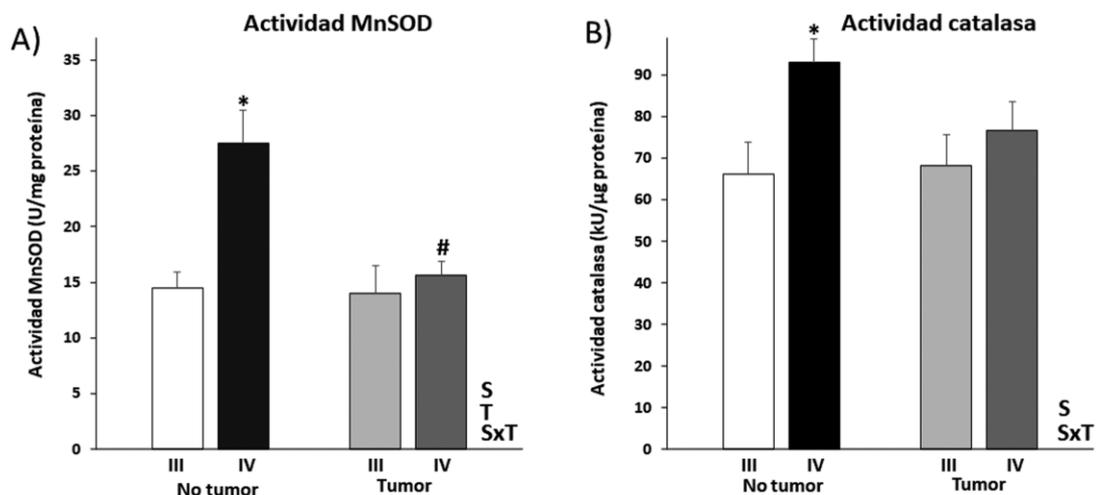


Figura 16. Actividades enzimáticas de la MnSOD (A) y catalasa (B), en el tejido adyacente no tumoral y tejido tumoral de pacientes en estadios III y IV de cáncer de colon. Los datos están expresados como la media \pm la desviación estándar ($n = 10-12$, según grupo experimental). No tumor: tejido adyacente no tumoral; Tumor: tejido tumoral. Estadística: ANOVA de dos factores ($p < 0,05$): S efecto estadio, T efecto tejido y SxT efecto interactivo; *t Student* ($p < 0,05$): * diferencias estadio III vs. estadio IV, # diferencias tejido adyacente no tumoral vs. tejido tumoral.

4.2.2. Discusión

El estrés oxidativo contribuye notablemente al desarrollo del proceso carcinogénico, tanto en el inicio como en la progresión⁶⁰. Los resultados obtenidos muestran que los tejidos tumorales de ambos estadios avanzados de cáncer de colon presentan un estrés oxidativo elevado, debido a los mayores niveles proteicos de enzimas antioxidantes (MnSOD, Cu/ZnSOD y catalasa) y de UCP5 observados en dichos tejidos. Similares cambios en los niveles de expresión proteica de la SOD fueron reportados en estadios avanzados de carcinoma colorrectal¹⁴⁷, de pulmón¹⁴⁸, laríngeo¹⁴⁹ y gástrico¹⁵⁰. En un estudio *in vitro* previo realizado en nuestro laboratorio, se observó un aumento en los niveles de UCP5 en líneas celulares de cáncer de colon, debido a una mayor producción de H₂O₂⁷⁵. Sin embargo, otros autores han encontrado bajos niveles proteicos de la SOD y la catalasa en carcinoma oral de células escamosas¹⁵¹, y bajos niveles solo para la catalasa en carcinoma laríngeo¹⁴⁹. En general, estos contradictorios hallazgos en los niveles proteicos de enzimas antioxidantes en los tejidos tumorales parecen depender del estadio y la localización del cáncer.

Por otra parte, hemos observado que los niveles de glutatión parecen estar influidos por el estadio tumoral, ya que en estadio IV de cáncer de colon la producción total de glutatión está promovida, tanto en el tejido tumoral como en el tejido adyacente no tumoral, comparado con el estadio III. Skrzydlewska y sus colaboradores reportaron similares resultados en tejidos tumorales comparado con sus tejidos adyacentes no tumorales, los cuales pueden ser explicados en parte por el estadio del tumor^{152,153}. Basándonos en nuestros resultados, los tejidos tumorales de ambos estadios muestran la tendencia a una baja disponibilidad de

glutatión reducido, debido a la menor ratio GRd/GPx que presentan. En cambio, el tejido adyacente no tumoral del estadio IV muestra un mejor mecanismo de recuperación del glutatión, teniendo en cuenta los niveles de expresión proteica de la GRd y GPx observados en dicho tejido.

Los niveles de expresión proteica para la MnSOD y la catalasa muestran un perfil divergente entre ambos tejidos del estadio IV, lo cual podría deberse a una mayor acumulación de H₂O₂ principalmente en el tejido adyacente no tumoral del estadio IV. Un patrón de expresión proteica similar al anterior fue reportado por Chung-man Ho y colaboradores en cáncer de pulmón, donde los niveles de mensajero y proteína fueron mayores para la MnSOD y menores para la catalasa en el tejido tumoral, comparado con su tejido adyacente no tumoral¹⁴⁸. Las actividades enzimáticas de la MnSOD y la catalasa muestran un patrón paralelo en las muestras de tejidos analizadas de ambos estadios, lo que refleja que las actividades de estas enzimas están fuertemente asociadas. Sin embargo, en el tejido adyacente no tumoral del estadio IV se han encontrado aproximadamente el doble de niveles de actividad de la MnSOD respecto al tejido tumoral del mismo estadio, lo que puede deberse a una mayor concentración de anión superóxido en el ambiente tumoral, el cual puede difundir relativamente hacia el tejido adyacente no tumoral.

Estudios independientes han reportado niveles incrementados de expresión proteica y actividad enzimática de la MnSOD en diferentes tumores con estadios avanzados comparado con sus controles normales^{147,154}. Existe evidencia epidemiológica y experimental de que el aumento en los niveles de MnSOD en muchos tipos de tumores está acompañado de un incremento en la agresividad del tumor¹⁵⁵⁻¹⁵⁷. Todo lo anterior remarca el papel clave de la MnSOD en la progresión del cáncer

hacia un estadio metastásico^{147,158}. Como ya se ha indicado, mutaciones en el gen *P53* se han reportado en el CCR y en más del 50% de los cánceres humanos⁸⁰. De acuerdo con lo anterior, los resultados obtenidos muestran una expresión proteica prácticamente nula de P53 en los tejidos tumorales de ambos estadios. Lo cual indica con elevada probabilidad de que el gen *P53* estaría mutado en dichos tejidos, lo que inexorablemente contribuye al estrés oxidativo.

Un estudio previo en nuestro laboratorio mostró que el silenciamiento de la SIRT3 en células de cáncer de mama aumentó la sensibilidad a los tratamientos citotóxicos, dirigidos a incrementar la producción de ROS¹⁵⁹. Teniendo en cuenta lo anterior, los menores niveles proteicos de SIRT3 también se encontraron en las muestras tumorales de ambos estadios, lo que adicionalmente incrementaría el estrés oxidativo en estos tejidos.

Los niveles proteicos de P53 están fuertemente controlados y mantenidos por su regulador negativo MDM2, que, a su vez, es un gen diana de P53, lo cual crea un bucle de autorregulación negativa⁸³. A pesar de ello, se han encontrado bajos niveles de expresión proteica de MDM2 en el tejido adyacente no tumoral del estadio IV, indicando que P53 está promovido en dicho tejido. Por otra parte, Zhang y colaboradores han reportado que la sobreexpresión de SIRT3 incrementa los niveles proteicos de P53 a través de la regulación negativa de MDM2, y de esta manera se ralentiza la degradación de P53¹⁶⁰. De acuerdo con lo anterior, los mayores niveles proteicos de SIRT3 observados en el tejido adyacente no tumoral de estadio IV podrían ser, en parte, responsables de promover la expresión proteica de P53 en respuesta al estrés oxidativo en el tejido adyacente no tumoral de estadio IV. Los datos obtenidos sobre las defensas antioxidantes en los tejidos tumorales de ambos estadios

avanzados de cáncer de colon mostraron que los sistemas de detoxificación de los ROS están en niveles bajos. Los resultados obtenidos sugieren que el tejido tumoral del estadio IV no puede contrarrestar los efectos dañinos de los ROS, hecho que es reflejado por los altos niveles de peroxidación lipídica, debido al mayor contenido de aductos 4-HNE encontrados en este tejido. Skrzydlewska y colaboradores reportaron resultados similares, mostrando una mayor peroxidación lipídica en tejido tumoral del cáncer de colon respecto a su tejido normal¹⁵². Por otra parte, otro estudio describió en estadios avanzados de CCR una reducción en el contenido de ácidos grasos poliinsaturados, los cuales representan el sustrato natural de la peroxidación lipídica y se consideran la mayor fuente para la producción de 4-HNE¹⁶¹. No obstante, se ha revelado un nuevo mecanismo mediante el cual la oxidación de la cardiolipina, un fosfolípido abundante en la membrana mitocondrial interna también conduce a la formación de una cantidad significativa de 4-HNE¹⁶², por lo que los resultados obtenidos relacionados con el daño lipídico podrían ser debidos a este último mecanismo.

A pesar de las diferencias encontradas entre los tejidos tumorales y sus tejidos adyacentes no tumorales correspondientes, las mayores diferencias se observaron entre los tejidos adyacentes no tumorales de ambos estadios de cáncer de colon. El tejido adyacente no tumoral del estadio IV ya se encuentra en un estado de estrés oxidativo patológico, y muestra diferencias respecto al tejido adyacente no tumoral del estadio III y a los tejidos tumorales del estadio III y IV. La mayor diferencia encontrada en el tejido adyacente no tumoral del estadio IV fue la actividad enzimática de la MnSOD, la cual caracteriza a dicho tejido. Este estudio es el primero en describir la mayor actividad de la MnSOD en el

tejido adyacente no tumoral del estadio IV de cáncer de colon, respecto al mismo tipo de tejido, pero de estadio III y a los tejidos tumorales de ambos estadios. Los mayores niveles de expresión proteica de la MnSOD no se asociaron con sus mayores valores de actividad enzimática. Estos mayores niveles proteicos de la MnSOD pueden ser un intento de compensar la falta de actividad de dicha enzima en el tejido tumoral del estadio IV. Similares resultados fueron descritos por Miar y colaboradores en cáncer de próstata, donde los mayores niveles proteicos de la MnSOD no coincidieron con sus mayores niveles de actividad enzimática¹⁶³.

Por otra parte, se puede asumir que en el tejido adyacente no tumoral del estadio IV hay un mecanismo específico de regulación para promover la activación de esta enzima, y que este mecanismo no se encuentra activo en los tejidos tumorales o en el tejido adyacente no tumoral del estadio III. Teniendo en cuenta que los mayores niveles proteicos de P53 y SIRT3 se encontraron en el tejido adyacente no tumoral del estadio IV, se podría considerar que son los responsables del patrón que se muestra en los resultados, ya que P53 y SIRT3 promueven la expresión y activación de la MnSOD respectivamente^{79,164}.

Interesantemente, el tejido adyacente no tumoral de pacientes en estadio IV mostró una respuesta antioxidante activada para hacer frente al estrés oxidativo. Por lo tanto, en dicho tejido se detectaron elevados niveles proteicos de la MnSOD, Cu/ZnSOD, catalasa, GPx, GRd, UCP5, SIRT3 y P53, así como una mayor actividad de MnSOD y catalasa, lo que revela la influencia de estos parámetros en el estadio metastásico de cáncer de colon y su posible evaluación como potenciales biomarcadores de pronóstico.

5. Recapitulación

En la presente tesis se ha profundizado en el estudio de la función mitocondrial y el estrés oxidativo, en tejido tumoral y tejido adyacente no tumoral de estadios avanzados de cáncer de colon (estadios III y IV) con el objetivo de identificar potenciales biomarcadores pronóstico para esta enfermedad. Los resultados obtenidos muestran que en el tejido tumoral del estadio III la función mitocondrial podría contribuir a promover la progresión hacia el fenotipo metastásico, y una vez alcanzado el estadio metastásico contribuiría a mantenerlo, a pesar de la desregulación en los niveles proteicos de los complejos OXPHOS del tejido tumoral en el estadio metastásico. Adicionalmente, el estudio del tejido adyacente no tumoral del estadio IV nos indica que este se encuentra en una situación de mayor estrés oxidativo, manifestando una respuesta antioxidante activada (Figura 17).

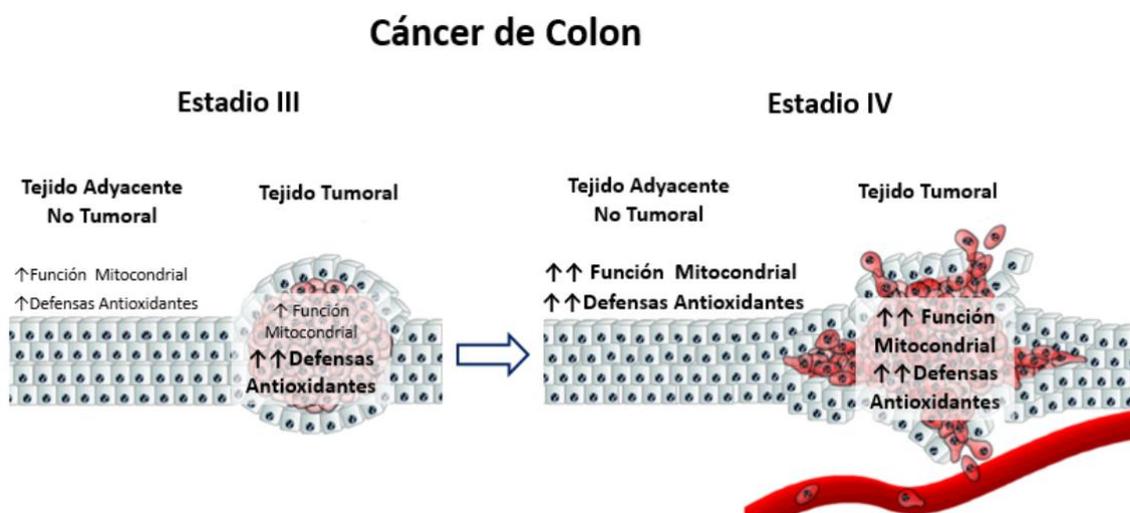


Figura 17. Esquema resumen del estado de la función mitocondrial y el estrés oxidativo en tejido tumoral y tejido adyacente no tumoral, de los estadios avanzados, pre-metastásico III y metastásico IV de cáncer de colon.

Más del 90% de las muertes por cáncer son causadas por la diseminación metastásica de las células tumorales, desde el tumor primario a otros sitios distantes⁹¹. La metástasis es un proceso que implica varias etapas. Por ello, una mejor comprensión de los mecanismos

subyacentes a su desarrollo es esencial para diseñar nuevas estrategias terapéuticas.

Las células cancerosas presentan un metabolismo energético particular, cuya mayor característica radica en el denominado “Efecto Warburg”, el cual representa un cambio en la ruta principal para la obtención de energía en forma de ATP, pasando del sistema oxidativo OXPHOS a la descomposición secuencial de la glucosa hasta lactato en presencia de oxígeno, la glucólisis aeróbica^{44,128}. Basado en ello, la alteración del metabolismo energético de la célula cancerosa ha sido uno de los últimos rasgos añadidos a la lista de características distintivas del cáncer². De acuerdo con lo anterior, nuestros resultados muestran mayores niveles proteicos de LDHA en los tejidos tumorales de ambos estadios de cáncer de colon, lo que remarca la presencia del efecto Warburg en las células cancerosas, reflejando su influencia en el proceso metastásico¹³¹

En un principio, el descubrimiento de este cambio en el metabolismo energético fue atribuido a mitocondrias disfuncionales⁴⁴. Sin embargo, estudios en décadas posteriores han revelado la necesidad de mitocondrias funcionales en la dinámica de las células cancerosas, teniendo en cuenta los procesos claves de la fisiología celular, tales como la apoptosis y la proliferación celular en los que está implicada la mitocondria^{38,39}.

A medida que el proceso oncogénico avanza, las células cancerosas van modulando sus requerimientos para adaptarse a las nuevas condiciones y garantizar su proliferación y progresión⁴². De acuerdo con lo anterior, los requerimientos energéticos se ven incrementados en un estadio metastásico, por lo que podemos asumir que en un estadio III (pre-

metastásico) la función mitocondrial estaría promovida, para alcanzar la progresión metastásica.

Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que todos los complejos OXPHOS presentan menores niveles proteicos en los tejidos tumorales del estadio metastásico, comprometiendo el metabolismo energético en estos tejidos, lo cual favorece una mayor producción de ROS, con el consecuente incremento del estrés oxidativo. Por lo tanto, esto coincide con lo observado en los tejidos tumorales del estadio metastásico, ya que en su conjunto presenta elevados niveles proteicos de las proteínas antioxidantes analizadas. De esta manera, se revela un daño en la función mitocondrial, que puede aumentar debido a una respuesta antioxidante insuficiente que conduciría gradualmente a un aumento en la producción de ROS, dañando al ADNmt y otras macromoléculas, lo que a su vez conduce a una disfunción mitocondrial, estableciéndose así un círculo vicioso de daño en la mitocondria y la célula en general¹⁶⁵.

Por otra parte, podemos asumir que en el tejido tumoral del estadio IV no sería necesario incrementar los niveles proteicos de los complejos OXPHOS, teniendo en cuenta los valores de actividad ATPasa obtenidos en dicho tejido, ya que la función mitocondrial suministraría la energía necesaria para mantener el tumor en el estadio metastásico. Adicionalmente, los menores niveles proteicos de los complejos OXPHOS contribuirían a aumentar la producción de ROS y con ello el elevado estrés oxidativo característico de un estadio metastásico¹¹⁴. Los resultados obtenidos muestran señales de promoción de la biogénesis mitocondrial en los tejidos tumorales del estadio pre-metastásico, pero no en el estadio metastásico. PGC1 α promueve la biogénesis mitocondrial en respuesta a mitocondrias dañadas por los ROS, y de esta manera garantizan una

funcionalidad mitocondrial¹⁶⁶. Algunos estudios han asociado el incremento en el contenido de ADNmt con el pronóstico en pacientes con CCR^{167,168}. Sin embargo, un estudio muy reciente demostró falta de asociación entre el contenido de ADNmt de leucocitos y la supervivencia de pacientes de CCR¹⁶⁹. Así pues, nuestros resultados estarían de acuerdo con el papel influyente del contenido de ADNmt en la progresión de cáncer de colon, ya que los tejidos tumorales de ambos estadios avanzados presentaron una mayor cantidad de ADNmt con respecto al tejido adyacente no tumoral.

La producción de ROS es una consecuencia inevitable del metabolismo celular aeróbico, que puede incrementarse considerablemente debido a una disfunción mitocondrial. En este sentido, la biogénesis mitocondrial es clave para mantener una correcta función de las mitocondrias y, por lo tanto, reducir la producción de ROS^{50,54}. En los resultados obtenidos observamos una funcionalidad mitocondrial dependiente del estadio de cáncer de colon, teniendo en cuenta los diferentes valores de actividad ATPasa obtenidos en ambos tejidos de los estadios avanzados de cáncer de colon. Basándonos en lo anterior, podemos asumir que en un estadio IV el metabolismo oxidativo contribuye a mantener el fenotipo metastásico con evidencias de disfunción mitocondrial en el tejido tumoral.

El estado redox celular se ha señalado como determinante clave en el proceso metastásico, debido a que los ROS constituyen señales de activación en diferentes etapas de la metástasis. Estudios anteriores han demostrado que los ROS podrían promover la transición epitelio-mesenquimal, una etapa necesaria e imprescindible para que la célula

cancerosa abandone el tumor primario y adquiera un fenotipo metastásico^{89,110}.

El estrés oxidativo provocado por un incremento de los niveles de ROS tanto en las células cancerosas como en las células estromales se ha observado como un mecanismo desencadenante para promover la metástasis^{109,170}. En cambio, niveles excesivos de ROS tienen un efecto anti-oncogénico, ya que promueven la apoptosis, deteniendo el ciclo celular e induciendo la senescencia. Sin embargo, las células cancerosas evaden estas consecuencias, en parte, mediante un incremento de los sistemas antioxidantes¹⁷¹. De esta forma, las células cancerosas mantienen un delicado balance en los niveles de ROS, que les garantice su supervivencia y proliferación^{171,172}. Se ha descrito en los tejidos tumorales una desregulación en los niveles de expresión de las enzimas antioxidantes, entre la que destaca un incremento en los niveles de la MnSOD principalmente en cánceres agresivos¹³⁴. De acuerdo con lo anterior, los resultados obtenidos muestran elevados niveles proteicos de enzimas antioxidantes en los tejidos tumorales de ambos estadios avanzados de cáncer de colon, lo que remarca la situación del balance redox en la que se encuentran las células cancerosas. Por otra parte, un aumento en la producción de ROS en las células cancerosas conduce a una expresión elevada de SOD, así como a la inactivación de las enzimas que descomponen el H₂O₂, lo que produce niveles anormalmente altos de H₂O₂¹⁷³. Estudios anteriores *in vitro* e *in vivo* han observado la promoción de la metástasis a través de la producción de H₂O₂ mediada por la MnSOD, ya que provoca una desregulación de las enzimas encargadas de la remodelación/degradación de la matriz extracelular^{90,174}, la cual representaría una barrera para alcanzar la vía por la que las células

cancerosas se diseminan para colonizar sitios distantes. Por ello, podemos asumir que una mayor producción de H_2O_2 promueve la formación del radical hidroxilo, responsable de iniciar la peroxidación lipídica y promover mutaciones en el ADN, creando la inestabilidad genómica característica de las células cancerosas^{175,176}. De acuerdo con lo anterior, los resultados obtenidos muestran un daño oxidativo lipídico mayor en el tejido tumoral metastásico, reflejando una vez más las condiciones oxidantes que presenta dicho tejido.

Resulta interesante lo observado en nuestros resultados, donde el tejido adyacente no tumoral del estadio IV muestra una respuesta antioxidante activada, con mayores niveles proteicos de SIRT3 y P53, ambos reguladores claves del control redox celular⁸⁵, y la mayor actividad enzimática de la MnSOD en todos los tejidos analizados. Podemos especular que el tejido adyacente no tumoral puede ser vulnerable a sufrir la influencia del elevado estrés oxidativo que presenta un tumor primario metastásico, con la consecuente alteración de su fisiología. Se ha descrito que las células cancerosas presentan una elevada producción de ROS asociada a la membrana plasmática, principalmente de anión superóxido, lo cual contribuye a incrementar los niveles de estrés oxidativo en el ambiente tumoral^{177,178}. Además, el alcance intracelular de los ROS puede verse favorecido, considerando su relativa permeabilidad e incorporación por las células en la vecindad del tumor¹⁷⁹. Adicionalmente, las células del estroma asociadas al tumor contribuyen a propagar el estrés oxidativo entre las células vecinas¹⁰⁸, de esta forma se va creando un ambiente prooxidante que facilite las posteriores etapas de la progresión tumoral y del proceso metastásico.

Un estudio reciente *in vivo* ha revelado que los tumores en estadios avanzados de CCR, liberan vesículas extracelulares destinadas a preparar el nicho para un crecimiento metastásico¹⁸⁰. Basándonos en todo lo anterior, podemos asumir que de una manera u otra el tumor en estadios avanzados de cáncer de colon provoca alteraciones en los tejidos tanto adyacente como distantes mediante diferentes mecanismos, con el fin de promover su crecimiento y propagación^{99,180}.

En este sentido, el estrés oxidativo en el ambiente tumoral mediado por los ROS propicia el nicho para el crecimiento y la progresión metastásica, donde los ROS difundirían, teniendo en cuenta su relativa permeabilidad, y actuarían como señales paracrinas carcinogénicas¹⁰⁸, alcanzando así un área del tejido sano en las proximidades del tumor. De esta manera se provocan diferentes alteraciones en el tejido adyacente no tumoral, las cuales pueden influir en la evolución de la enfermedad. Por lo tanto, en el diseño de futuras estrategias terapéuticas se podría considerar, además del tejido tumoral, las características del tejido adyacente no tumoral. De hecho, las características del tejido adyacente no tumoral ya están siendo reportadas como biomarcadores de pronóstico y posible recurrencia en pacientes de CCR¹⁰³.

En conjunto, los resultados obtenidos en esta tesis han permitido profundizar en el conocimiento del metabolismo energético y la función mitocondrial, así como del estrés oxidativo en estadios avanzados de cáncer de colon humano. Este estudio nos ha permitido identificar biomarcadores candidatos (SIRT1, PGC1 α , LDHA, IDH2, COX, ATPasa, MnSOD, Cu/ZnSOD, catalasa, UCP5, SIRT3 y ADNmt) de evolución en pacientes con estadios avanzados de cáncer de colon. En futuros proyectos nos plantearíamos un estudio a mayor escala incluyendo

pacientes en estadios tempranos de cáncer de colon, donde se evaluarían los biomarcadores candidatos mediante el estudio de curvas de supervivencias en pacientes de cáncer de colon, evaluándolos de manera individual o agrupándolos para obtener índices con un valor pronóstico de la evolución.

6. Conclusiones

1. El tejido tumoral del estadio metastásico IV presenta una mayor función mitocondrial que el tejido tumoral del estadio pre-metastásico III, debido a unos mayores niveles de actividad ATPasa, aunque el sistema OXPHOS muestre una disminución de sus niveles proteicos.
2. El estudio del estrés oxidativo muestra que los tejidos tumorales de ambos estadios avanzados, III y IV, de cáncer de colon presentan un patrón similar de expresión proteica y actividad enzimática de proteínas antioxidantes, debido posiblemente a niveles de estrés oxidativo similares.
3. El tejido adyacente no tumoral del estadio metastásico IV de cáncer de colon muestra una respuesta antioxidante activada, detectándose en este tejido grandes diferencias en los niveles proteicos y actividades enzimáticas de las proteínas antioxidantes MnSOD, catalasa, SIRT3 y P53, en comparación con el tejido adyacente no tumoral del estadio pre-metastásico III.
4. Las proteínas SIRT1, PGC1 α , LDHA, IDH2, COX, ATPasa y el contenido en ADNmt, parámetros relacionados con la función mitocondrial, en el tejido tumoral, podrían ser evaluados como biomarcadores del pronóstico de la evolución del cáncer de colon.
5. Las proteínas relacionadas con el estrés oxidativo, MnSOD, Cu/ZnSOD, catalasa, UCP5, GPx y SIRT3 en el tejido adyacente no tumoral, podrían ser evaluadas como biomarcadores del pronóstico del desarrollo y la evolución del cáncer de colon.

7.Bibliografía

1. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
2. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
3. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **68**, 394–424 (2018).
4. Ferlay, J. *et al.* Cancer Today, GLOBOCAN 2018. *IARC Cancer Base* **15**, (2018).
5. Arnold, M. *et al.* Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut* **66**, 683–691 (2017).
6. Vuik, F. E. R. *et al.* Increasing incidence of colorectal cancer in young adults in Europe over the last 25 years. *Gut* **68**, (2019).
7. Siegel, R. L. *et al.* Increase in incidence of colorectal cancer among young men and women in the United States. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **18**, 1695–1698 (2009).
8. Siegel, R. L. *et al.* Colorectal Cancer Incidence Patterns in the United States, 1974-2013. *Journal of the National Cancer Institute* **109**, (2017).
9. Center, M. M. *et al.* International trends in colorectal cancer incidence rates. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **18**, 1688–1694 (2009).
10. Tsoi, K. K. F. *et al.* Predicted Increases in Incidence of Colorectal Cancer in Developed and Developing Regions, in Association With Ageing Populations. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **15**, 892-900 (2017).
11. Siegel, R. L. *et al.* Colorectal cancer statistics, 2017. *CA. Cancer J. Clin.* **67**, 177–193 (2017).
12. Francescangeli, F. *et al.* Dietary factors in the control of gut homeostasis, intestinal stem cells, and colorectal cancer. *Nutrients* **11**, (2019).
13. Zheng, K. *et al.* Ethanol promotes alcohol-related colorectal cancer metastasis via the TGF- β /RUNX3/Snail axis by inducing TGF- β 1 upregulation and RUNX3 cytoplasmic mislocalization. *E. BioMedicine* **50**, 224–237 (2019).
14. Booth, F. W. *et al.* Lack of exercise is a major cause of chronic diseases. *Compr. Physiol.* **2**, 1143–211 (2012).
15. Sinicrope, F. A. Lynch syndrome-associated colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* **379**, 764–773 (2018).
16. Grady, W. M. & Carethers, J. M. Genomic and Epigenetic Instability in Colorectal Cancer Pathogenesis. *Gastroenterology* **135**, 1079–1099 (2008).
17. Nishisho, I. *et al.* Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science* **253**, 665–669 (1991).
18. Vogelstein, B. *et al.* Genetic Alterations during Colorectal-Tumor Development. *N. Engl. J. Med.* **319**, 525–532 (1988).
19. Berg, M. & Soreide, K. EGFR and downstream genetic alterations in KRAS/BRAF and PI3K/AKT pathways in colorectal cancer: implications for targeted therapy. *Discovery medicine* **14**, 207–214 (2012).
20. Kawakami, H. *et al.* Microsatellite Instability Testing and Its Role in the Management of Colorectal Cancer. *Current Treatment Options in Oncology* **16**, 30 (2015).
21. Sakai, E. *et al.* Accumulation of aberrant DNA methylation during colorectal cancer development. *World J. Gastroenterol.* **20**, 978–987 (2014).
22. Zamani, M. *et al.* Epigenetic biomarkers in colorectal cancer: premises and

- prospects. *Biomarkers* **23**, 105–114 (2018).
23. Dukes, C. E. The classification of cancer of the rectum. *J. Pathol. Bacteriol.* **35**, 323–332 (1932).
 24. Astler, V. B. & Collier, F. A. The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the Colon and Rectum. *Ann. Surg.* **139**, 846–852 (1954).
 25. Amin, M. B. *et al.* The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA. Cancer J. Clin.* **67**, 93–99 (2017).
 26. Lamouille, S. *et al.* Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **15**, 178–196 (2014).
 27. Amin, M. B. *et al.* AJCC Cancer Staging Manual. Springer **8**, (2017).
 28. Nguyen, D. X. *et al.* Metastasis: From dissemination to organ-specific colonization. *Nature Reviews Cancer* **9**, 274–284 (2009).
 29. Schlüter, K. *et al.* Organ-specific metastatic tumor cell adhesion and extravasation of colon carcinoma cells with different metastatic potential. *Am. J. Pathol.* **169**, 1064–1073 (2006).
 30. Wanebo, H. J. *et al.* Meeting the biologic challenge of colorectal metastases. in *Clinical and Experimental Metastasis* **29**, 821–839 (2012).
 31. Benson. Al B. Epidemiology, disease progression, and economic burden of colorectal cancer. *J. Manag. Care Pharm.* **13**, S5-18 (2007).
 32. Van Cutsem, E., Oliveira, J. & ESMO Guidelines Working Group. Advanced colorectal cancer: ESMO Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* **20**, 61–63 (2009).
 33. Urosevic, J. *et al.* Colon cancer cells colonize the lung from established liver metastases through p38 MAPK signalling and PTHLH. *Nat. Cell Biol.* **16**, 685–694 (2014).
 34. Tie, J. *et al.* KRAS mutation is associated with lung metastasis in patients with curatively resected colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* **17**, 1122–1130 (2011).
 35. Yoo, P. S. *et al.* Liver resection for metastatic colorectal cancer in the age of neoadjuvant chemotherapy and bevacizumab. *Clinical Colorectal Cancer* **6**, 202–207 (2006).
 36. Lucas, A. S. *et al.* A Decade of Advances in Cytotoxic Chemotherapy for Metastatic Colorectal Cancer. *Clin. Colorectal Cancer* **10**, 238–244 (2011).
 37. Sanoff, H. K. *et al.* Five-year data and prognostic factor analysis of oxaliplatin and irinotecan combinations for advanced colorectal cancer: N9741. *J. Clin. Oncol.* **26**, 5721–5727 (2008).
 38. Douglas R. Green, J. C. R. Mitochondria and apoptosis. *Acta Biochim. Biophys.* **31**, 118 (1999).
 39. Chen, J. Q. *et al.* Mechanisms of hormone carcinogenesis: Evolution of views, role of mitochondria. *Adv. Exp. Med. Biol.* **630**, 1–18 (2008).
 40. Mitchell, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* **191**, 144–148 (1961).
 41. Sjoblom, T. *et al.* The Consensus Coding Sequences of Human Breast and Colorectal Cancers. *Science* **314**, 268–274 (2006).
 42. Vander Heiden, M. G. *et al.* Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* **324**, 1029–33 (2009).
 43. Koppenol, W. H. *et al.* Otto Warburg’s contributions to current concepts of

- cancer metabolism. *Nature Reviews Cancer* **11**, 325–337 (2011).
44. Warburg, O. On the origin of cancer cells. *Scienc* **123**, 309–314 (1956).
 45. Moreno-Sánchez, R. *et al.* Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J.* **274**, 1393–1418 (2007).
 46. Potter, V. R. The biochemical approach to the cancer problem. *Fed. Proc.* **17**, 691–697 (1958).
 47. Jose, C. & Bellance, N. Choosing between glycolysis and oxidative phosphorylation: A tumor's dilemma? *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1807**, 552–561 (2011).
 48. Rossignol, R. *et al.* Energy Substrate Modulates Mitochondrial Structure and Oxidative Capacity in Cancer Cells. *Cancer Res.* **64**, 985–993 (2004).
 49. Plecítá-Hlavatá, L. *et al.* Mitochondrial oxidative phosphorylation and energetic status are reflected by morphology of mitochondrial network in INS-1E and HEP-G2 cells viewed by 4Pi microscopy. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1777**, 834–846 (2008).
 50. Fernández-Silva, P. *et al.* Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Experimental Physiology* **88**, 41–56 (2003).
 51. Puigserver, P. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α (PGC-1 α): Transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocrine Reviews* **24**, 78–90 (2003).
 52. Wu, Z. *et al.* Mechanisms Controlling Mitochondrial Biogenesis and Respiration through the Thermogenic Coactivator PGC-1. *Cell* **98**, 115–124 (1999).
 53. Jones, A. W. E. *et al.* PGC-1 family coactivators and cell fate: Roles in cancer, neurodegeneration, cardiovascular disease and retrograde mitochondria-nucleus signalling. *Mitochondrion* **12**, 86–99 (2012).
 54. Scarpulla, R. C. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiological Reviews* **88**, 611–638 (2008).
 55. Campbell, C. T. *et al.* Mitochondrial transcription factor A regulates mitochondrial transcription initiation, DNA packaging, and genome copy number. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* **1819**, 921–929 (2012).
 56. Jeninga, E. H. *et al.* Reversible acetylation of PGC-1: Connecting energy sensors and effectors to guarantee metabolic flexibility. *Oncogene* **29**, 4617–24 (2010).
 57. Rodgers, J. T. *et al.* Metabolic adaptations through the PGC-1 α and SIRT1 pathways. *FEBS Letters* **582**, 46–53 (2008).
 58. Nemoto, S. *et al.* SIRT1 functionally interacts with the metabolic regulator and transcriptional coactivator PGC-1 α . *J. Biol. Chem.* **280**, 16456–16460 (2005).
 59. Li, S. *et al.* SIRT 1 overexpression is associated with metastasis of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) and promotes migration and growth of PDAC Cells. *Med. Sci. Monit.* **22**, 1593–1600 (2016).
 60. Lenaz, G. The mitochondrial production of reactive oxygen species: Mechanisms and implications in human pathology. *IUBMB Life* **52**, 159–164 (2001).
 61. Chen, Q. *et al.* Production of reactive oxygen species by mitochondria: Central role of complex III. *J. Biol. Chem.* **278**, 36027–36031 (2003).
 62. Chance, B. *et al.* Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* **59**, 527–605 (1979).
 63. Li, Y. R. & Trush, M. Defining ROS in Biology and Medicine. *React. Oxyg. Species*

- 1, 9 (2016).
64. Fariss, M. W. *et al.* Role of mitochondria in toxic oxidative stress. *Molecular Interventions* **5**, 94–111 (2005).
 65. Pizzino, G. *et al.* Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, 1–13 (2017).
 66. Skrzydlewska, E. *et al.* Lipid peroxidation and antioxidant status in colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* **11**, 403–6 (2005).
 67. Panov, A. Peroxyl Radical (HO₂[•]) as Inducer of the Isoprostane Lipid Peroxidation in Mitochondria. *Molekuliarnaia biologii* **52**, 347–359 (2018).
 68. Srinivas, U. S. *et al.* ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biology* **25**, (2019).
 69. Hahn, A. & Zuryn, S. Mitochondrial genome (mtDNA) mutations that generate reactive oxygen species. *Antioxidants* **8**, (2019).
 70. Miyazawa, T. *et al.* Vitamin E: Regulatory Redox Interactions. *IUBMB Life* **71**, 430–441 (2019).
 71. Valle, A., Oliver, J. & Roca, P. Role of uncoupling proteins in cancer. *Cancers* **2**, 567–591 (2010).
 72. Echtay, K. S. Mitochondrial uncoupling proteins-What is their physiological role? *Free Radical Biology and Medicine* **43**, 1351–1371 (2007).
 73. Arsenijevic, D. *et al.* Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat. Genet.* **26**, 435–439 (2000).
 74. Robbins, D. & Zhao, Y. New aspects of mitochondrial uncoupling proteins (UCPs) and their roles in tumorigenesis. *International Journal of Molecular Sciences* **12**, 5285–5293 (2011).
 75. Santandreu, F. M. *et al.* Hydrogen Peroxide Regulates the Mitochondrial Content of Uncoupling Protein 5 in Colon Cancer Cells. *Cell. Physiol. Biochem.* **24**, 379–390 (2009).
 76. Trachootham, D. *et al.* Redox regulation of cell survival. *Antioxid. Redox Signal.* **10**, 1343–74 (2008).
 77. Khan, M. A. *et al.* Antioxidant Enzymes and Cancer. *Chin J Cancer Res* **22**, 87–92 (2010).
 78. Oberley, T. D. & Oberley, L. W. Antioxidant enzyme levels in cancer. *Histol. Histopathol.* **12**, 525–35 (1997).
 79. Pani, G. *et al.* Deregulated manganese superoxide dismutase expression and resistance to oxidative injury in p53-deficient cells. *Cancer Res.* **60**, 4654–60 (2000).
 80. Hollstein, M. *et al.* p53 mutations in human cancers. *Science* **253**, 49–53 (1991).
 81. Gottlieb, T. M. & Oren, M. p53 and apoptosis. *Semin. Cancer Biol.* **8**, 359–368 (1998).
 82. Li, S. De *et al.* p53-Induced growth arrest is regulated by the Mitochondrial SirT3 deacetylase. *PLoS One* **5**, (2010).
 83. Hock, A. & Vousden, K. H. Regulation of the p53 pathway by ubiquitin and related proteins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **42**, 1618–1621 (2010).
 84. Park, S.-H. *et al.* Sirt3, mitochondrial ROS, ageing, and carcinogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **12**, 6226–39 (2011).
 85. Chen, J. *et al.* SirT3 and p53 Deacetylation in Aging and Cancer. *Journal of*

- Cellular Physiology* **232**, 2308–2311 (2017).
86. Tao, R. *et al.* Sirt3-Mediated Deacetylation of Evolutionarily Conserved Lysine 122 Regulates MnSOD Activity in Response to Stress. *Mol. Cell* **40**, 893–904 (2010).
 87. Zhong, L. & Mostoslavsky, R. Fine tuning our cellular factories: Sirtuins in mitochondrial biology. *Cell Metabolism* **13**, 621–626 (2011).
 88. Assi, M. The differential role of reactive oxygen species in early and late stages of cancer. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **313**, 646–653 (2017).
 89. Giannoni, E. *et al.* EMT and Oxidative Stress: A Bidirectional Interplay Affecting Tumor Malignancy. *Antioxid. Redox Signal.* **16**, 1248–1263 (2012).
 90. Nelson, K. K. *et al.* Elevated sod2 activity augments matrix metalloproteinase expression: evidence for the involvement of endogenous hydrogen peroxide in regulating metastasis. *Clin. Cancer Res.* **9**, 424–32 (2003).
 91. Seyfried, T. N. & Huysentruyt, L. C. On the origin of cancer metastasis. *Crit. Rev. Oncog.* **18**, 43–73 (2013).
 92. Cirri, P. & Chiarugi, P. Cancer-associated-fibroblasts and tumour cells: A diabolic liaison driving cancer progression. *Cancer and Metastasis Reviews* **31**, 195–208 (2012).
 93. Qian, B. Z. & Pollard, J. W. Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. *Cell* **141**, 39–51 (2010).
 94. Pavlides, S. *et al.* The reverse Warburg effect: Aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell Cycle* **8**, 3984–4001 (2009).
 95. Wilde, L. *et al.* Metabolic coupling and the Reverse Warburg Effect in cancer: Implications for novel biomarker and anticancer agent development. *Seminars in Oncology* **44**, 198–203 (2017).
 96. Santi, A. *et al.* Cancer Associated Fibroblasts: The Architects of Stroma Remodeling. *Proteomics* **18**, e1700167 (2018).
 97. Sazeides, C. & Le, A. Metabolic relationship between cancer-associated fibroblasts and cancer cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **1063**, 149–165 (2018).
 98. Slaughter, D. P. *et al.* “Field cancerization” in oral stratified squamous epithelium. Clinical implications of multicentric origin. *Cancer* **6**, 963–968 (1953).
 99. Jones, A. C. *et al.* Prostate field cancerization: Deregulated expression of macrophage inhibitory cytokine 1 (MIC-1) and platelet derived growth factor a (PDGF-A) in tumor adjacent tissue. *PLoS One* **10**, (2015).
 100. Dotto, G. P. Multifocal epithelial tumors and field cancerization: Stroma as a primary determinant. *Journal of Clinical Investigation* **124**, 1446–1453 (2014).
 101. Ji, E. Comparison of N-glycans expressed in tumor tissues with those expressed in adjacent non-tumor tissues of colorectal cancer patients. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **57**, 349–358 (2019).
 102. Morales-Gutiérrez, C. *et al.* Tumour VEGF/Non Tumour VEGF protein expression ratio as a biomarker for survival in colorectal cancer patients. *Eur. J. Surg. Oncol.* **37**, 526–531 (2011).
 103. Öztürk, T. *et al.* Co-existence of BRAF V600E Gene Mutation in Tumor and Non-tumoral Surrounding Tissues in Colorectal Cancer. *In Vivo* **29**, 577–84 (2015).

104. Saito, A. *et al.* The role of TGF- β signaling in lung cancer associated with idiopathic pulmonary fibrosis. *International Journal of Molecular Sciences* **19**, (2018).
105. Murphy, M. P. *et al.* Unraveling the biological roles of reactive oxygen species. *Cell Metabolism* **13**, 361–6 (2011).
106. Karin, M. NF-kappaB as a critical link between inflammation and cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **1**, (2009).
107. A, A. *et al.* Cancer: An Oxidative Crosstalk Between Solid Tumor Cells and Cancer Associated Fibroblasts. *Biomed Res. Int.* **2016**, (2016).
108. Chan, J. S. K. *et al.* Cancer-associated fibroblasts enact field cancerization by promoting extratumoral oxidative stress. *Cell Death Dis.* **8**, (2017).
109. Taddei, M. L. *et al.* Microenvironment and tumor cell plasticity: An easy way out. *Cancer Lett.* **341**, 80–96 (2013).
110. Matsuyama, M. *et al.* ROS-Nrf2 Pathway Mediates the Development of TGF-b1-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition Through the Interaction with Notch Signaling. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **197**, A3805 (2018).
111. Jakubek, Y. A. *et al.* Large-scale analysis of acquired chromosomal alterations in non-tumor samples from patients with cancer. *Nat. Biotechnol.* **38**, 90–96 (2020).
112. Curtius, K. *et al.* An evolutionary perspective on field cancerization. *Nature Reviews Cancer* **18**, 19–32 (2017).
113. Zu, X. L. *et al.* Cancer metabolism: Facts, fantasy, and fiction. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **313**, 459–465 (2004).
114. Porporato, P. E. *et al.* A mitochondrial switch promotes tumor metastasis. *Cell Rep.* **8**, (2014).
115. Chiarugi, P. & Cirri, P. Metabolic exchanges within tumor microenvironment. *Cancer Letters* **380**, 272–280 (2016).
116. Pavlides, S. *et al.* Warburg meets autophagy: cancer-associated fibroblasts accelerate tumor growth and metastasis via oxidative stress, mitophagy, and aerobic glycolysis. *Antioxid. Redox Signal.* **16**, 1264–84 (2012).
117. Fruehauf, J. P. *et al.* Reactive oxygen species: A breath of life or death? *Clinical Cancer Research* **13**, 789–794 (2007).
118. Leslie, N. R. *et al.* Redox regulation of PI 3-kinase signalling via inactivation of PTEN. *EMBO J.* **22**, 5501–5510 (2003).
119. Wang, X. *et al.* Epidermal growth factor receptor-dependent Akt activation by oxidative stress enhances cell survival. *J. Biol. Chem.* **275**, 14624–14631 (2000).
120. Bradford, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
121. Akerboom, T. P. M. *et al.* Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.* **77**, 373–382 (1981).
122. Bergmeyer H. *et al.* *Methods of Enzymatic Analysis. Vol. 3: Enzymes 1. Oxidoreductases, Transferases.* **3**, (1983).
123. Chrzanowska-Lightowlers, Z. M. *et al.* A Microtiter Plate Assay for Cytochrome c Oxidase in Permeabilized Whole Cells. *Anal. Biochem.* **214**, 45–49 (1993).

124. Ragan CI, *et al.* Subfractionation of mitochondria and isolation of the proteins of oxidative phosphorylation. *Mitochondria A Pract. approach* 79–112. (1987).
125. Quick, K. L. *et al.* Rapid microplate assay for superoxide scavenging efficiency. *J. Neurosci. Methods* **97**, 139–144 (2000).
126. Góth, L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin. Chim. Acta.* **196**, 143–51 (1991).
127. Hadwan, M. H. *et al.* Data supporting the spectrophotometric method for the estimation of catalase activity. *Data Br.* **6**, 194–9 (2016).
128. Pavlova, N. N. *et al.* The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metabolism* **23**, (2016).
129. Mendes, M. *et al.* Mapping the Spatial Proteome of Metastatic Cells in Colorectal Cancer. *Proteomics* **17**, 1700094 (2017).
130. Chekulayev, V. *et al.* Metabolic remodeling in human colorectal cancer and surrounding tissues: alterations in regulation of mitochondrial respiration and metabolic fluxes. *Biochem. Biophys. Reports* **4**, 111–125 (2015).
131. Graziano, F. *et al.* Glycolysis gene expression analysis and selective metabolic advantage in the clinical progression of colorectal cancer. *Pharmacogenomics J.* **17**, 258–264 (2017).
132. Augoff, K. *et al.* Lactate dehydrogenase 5: An old friend and a new hope in the war on cancer. *Cancer Letters* **358**, 1–7 (2015).
133. Xu, W. *et al.* Oncometabolite 2-Hydroxyglutarate Is a Competitive Inhibitor of α -Ketoglutarate-Dependent Dioxygenases. *Cancer Cell* **19**, 17–30 (2011).
134. Hempel, N. *et al.* Manganese superoxide dismutase (Sod2) and redox-control of signaling events that drive metastasis. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* **11**, (2011).
135. Puigserver, P. *et al.* A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* **92**, 829–39 (1998).
136. Feilchenfeldt, J. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and associated transcription factors in colon cancer: reduced expression of PPARgamma-coactivator 1 (PGC-1). *Cancer Lett.* **203**, 25–33 (2004).
137. Blanquer-Rosselló, M. del M., Hernández-López, R., Roca, P., Oliver, J. & Valle, A. Resveratrol induces mitochondrial respiration and apoptosis in SW620 colon cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1861**, 431–440 (2017).
138. Vellinga, T. T. *et al.* SIRT1/PGC1 α -Dependent Increase in Oxidative Phosphorylation Supports Chemotherapy Resistance of Colon Cancer. *Clin. Cancer Res.* **21**, 2870–9 (2015).
139. Kanki, T. *et al.* Architectural Role of Mitochondrial Transcription Factor A in Maintenance of Human Mitochondrial DNA. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 9823–34 (2004).
140. Kaufman, B. A. *et al.* The mitochondrial transcription factor TFAM coordinates the assembly of multiple DNA molecules into nucleoid-like structures. *Mol. Biol. Cell* **18**, 3225–36 (2007).
141. Cannino, G. *et al.* Nuclear–mitochondrial interaction. *Mitochondrion* **7**, 359–366 (2007).
142. Wu, K. *et al.* Down-Regulation of MicroRNA-214 Contributed to the Enhanced Mitochondrial Transcription Factor A and Inhibited Proliferation of Colorectal Cancer Cells. *Cell. Physiol. Biochem.* **49**, 545–554 (2018).
143. Lee, H. C. *et al.* Mitochondrial Genome Instability and mtDNA Depletion in

- Human Cancers. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1042**, 109–122 (2005).
144. Shuwen, H. *et al.* Can Mitochondria DNA Provide a Novel Biomarker for Evaluating the Risk and Prognosis of Colorectal Cancer? *Dis. Markers* **2017**, 1–9 (2017).
 145. Wang, Y. *et al.* High Copy Number of Mitochondrial DNA Predicts Poor Prognosis in Patients with Advanced Stage Colon Cancer. *Int. J. Biol. Markers* **31**, 382–8 (2016).
 146. Feng, S. *et al.* Correlation between increased copy number of mitochondrial DNA and clinicopathological stage in colorectal cancer. *Oncol. Lett.* **2**, 899 (2011).
 147. Nozoe, T. *et al.* Significance of immunohistochemical expression of manganese superoxide dismutase as a marker of malignant potential in colorectal carcinoma. *Oncol. Rep.* **10**, 39–43 (2003).
 148. Chung-man Ho, J. *et al.* Differential expression of manganese superoxide dismutase and catalase in lung cancer. *Cancer Res.* **61**, 8578–85 (2001).
 149. Kacakci, A. *et al.* Significance of the counteracting oxidative and antioxidative systems in the pathogenesis of laryngeal carcinoma. *J. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **38**, 172–7 (2009).
 150. Malafa, M. *et al.* MnSOD expression is increased in metastatic gastric cancer. *J. Surg. Res.* **88**, 130–4 (2000).
 151. Gokul, S. *et al.* Oxidant-antioxidant status in blood and tumor tissue of oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Dis.* **16**, 29–33 (2010).
 152. Skrzydlewska, E. *et al.* Antioxidant status and lipid peroxidation in colorectal cancer. *J. Toxicol. Environ. Health* **64**, 213–222 (2001).
 153. Skrzydlewska, E. *et al.* Antioxidant potential in esophageal, stomach and colorectal cancers. *Hepatogastroenterology* **50**, 126–31 (2003)
 154. Salzman, R. *et al.* Increased activity of superoxide dismutase in advanced stages of head and neck squamous cell carcinoma with locoregional metastases. *Neoplasia* **54**, 321–5 (2007).
 155. Piecuch, A. *et al.* Immunohistochemical assessment of mitochondrial superoxide dismutase (MnSOD) in colorectal premalignant and malignant lesions. *Prz. Gastroenterol.* **11**, 239–246 (2016).
 156. Tsanou, E. *et al.* Immunohistochemical expression of superoxide dismutase (MnSOD) anti-oxidant enzyme in invasive breast carcinoma. *Histol. Histopathol.* **19**, 807–13 (2004).
 157. Shwetha, S. D. *et al.* Manganese superoxide dismutase (MnSOD) is a malignant astrocytoma specific biomarker and associated with adverse prognosis in p53 expressing glioblastoma. *Pathol. - Res. Pract.* **212**, 17–23 (2016).
 158. Gulubova, M. *et al.* Expression of the xenobiotic- and reactive oxygen species-detoxifying enzymes, GST-pi, Cu/Zn-SOD, and Mn-SOD in the endocrine cells of colorectal cancer. *Int. J. Colorectal Dis.* **25**, 1397–1405 (2010).
 159. Torrens-Mas, M. *et al.* SIRT3 Silencing Sensitizes Breast Cancer Cells to Cytotoxic Treatments Through an Increment in ROS Production. *J. Cell. Biochem.* **118**, 397–406 (2017).
 160. Zhang, Y.-Y. *et al.* Sirt3 inhibits hepatocellular carcinoma cell growth through reducing Mdm2-mediated p53 degradation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **423**, 26–31 (2012).

161. Oraldi, M. *et al.* Decreased polyunsaturated Fatty Acid content contributes to increased survival in human colon cancer. *J. Oncol.* **2009**, 9 (2009).
162. Zhong, H. *et al.* Role of lipid peroxidation derived 4-hydroxynonenal (4-HNE) in cancer: Focusing on mitochondria. *Redox Biol.* **4**, 193–199 (2015).
163. Miar, A. *et al.* Manganese superoxide dismutase (SOD2/MnSOD)/catalase and SOD2/GPx1 ratios as biomarkers for tumor progression and metastasis in prostate, colon, and lung cancer. *Free Radic. Biol. Med.* **85**, 45–55 (2015).
164. Tao, R. *et al.* Regulation of MnSOD enzymatic activity by Sirt3 connects the mitochondrial acetylome signaling networks to aging and carcinogenesis. *Antioxid. Redox Signal.* **20**, 1646–54 (2014).
165. Fariss, M. W. *et al.* Role of mitochondria in toxic oxidative stress. *Molecular Interventions* **5**, 94–111 (2005).
166. Lee, H. C. *et al.* Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress. *Int. J. B. Cell Biol.* **37**, 822–834 (2005).
167. Qu, F. *et al.* Leukocyte mitochondrial DNA content: a novel biomarker associated with prognosis and therapeutic outcome in colorectal cancer. *Carcinogenesis* **36**, 543–552 (2015).
168. Van Osch, F. H. M. *et al.* Mitochondrial DNA copy number in colorectal cancer: between tissue comparisons, clinicopathological characteristics and survival. *Carcinogenesis* **36**, 1502–1510 (2015).
169. Yang, K. *et al.* Association between pre-diagnostic leukocyte mitochondrial DNA copy number and survival among colorectal cancer patients. *Cancer Epidemiol.* **68**, 101778 (2020).
170. Pani, G. *et al.* Metastasis: cancer cell's escape from oxidative stress. *Cancer Metastasis Rev.* **29**, 351–378, (2010)
171. Schumacker, P. T. Reactive oxygen species in cancer cells: Live by the sword, die by the sword. *Cancer Cell* **10**, 175–176 (2006).
172. Galadari, S. *et al.* Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress? *Free Radical Biology and Medicine* **104**, 144–164 (2017).
173. Moloney, J. N. *et al.* ROS signalling in the biology of cancer. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **80**, 50–64 (2018).
174. Connor, K. M. *et al.* Manganese Superoxide Dismutase Enhances the Invasive and Migratory Activity of Tumor Cells. *Cancer Res.* **67**, 10260–67 (2007).
175. Barrera, G. Oxidative Stress and Lipid Peroxidation Products in Cancer Progression and Therapy. *Int. Sch. Res. Netw. ISRN Oncol.* **2012**, (2012).
176. Gurer-Orhan, H. *et al.* The Role of Oxidative Stress Modulators in Breast Cancer. *Curr. Med. Chem.* **25**, 4084–4101 (2017).
177. Prasad, S. *et al.* Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer Letters* **387**, 95–105 (2017).
178. Bauer, G. Targeting extracellular ROS signaling of tumor cells - PubMed. *Anticancer Res* **34**, 1467–82 (2014).
179. Nordzike, D. E. *et al.* The plasma membrane: A platform for intra-and intercellular redox signaling. *Antioxidants* **7**, (2018).
180. Ji, Q. *et al.* Primary tumors release ITGBL1-rich extracellular vesicles to promote distal metastatic tumor growth through fibroblast-niche formation. *Nat. Commun.* **11**, 1–18 (2020).

8. Anexo

Durante la realización de esta tesis el doctorando ha colaborado en la realización de otros estudios relacionados con el proyecto de tesis, que han dado lugar a las siguientes publicaciones:

Blanquer-Rosselló MD, Hernández-López R, Roca P, Oliver J, Valle A. **Resveratrol induces mitochondrial respiration and apoptosis in SW620 colon cancer cells.** *Biochim BiophysActa Gen Subj.* 2017;1861(2):431-440.doi:10.1016/j.bbagen.2016.10.009

Torrens-Mas M, Hernández-López R, Oliver J, Roca P, Sastre-Serra J. **Sirtuin 3 silencing improves oxaliplatin efficacy through acetylation of MnSOD in colon cancer.** *J Cell Physiol.* 2018;233(8):6067-6076. doi:10.1002/jcp.26443

Hernández-López R, Torrens-Mas M, Pons DG, et al. **Non-tumor adjacent tissue of advanced stage from CRC shows activated antioxidant response.** *Free Radic Biol Med.* 2018;126:249-258. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.08.021

Torrens-Mas M, Hernández-López R, Pons DG, Roca P, Oliver J, Sastre-Serra J. **Sirtuin 3 silencing impairs mitochondrial biogenesis and metabolism in colon cancer cells.** *Am J Physiol Cell Physiol.* 2019;317(2):C398-C404.doi:10.1152/ajpcell.00112.2019

Gaya-Bover A, Hernández-López R, Alorda-Clara M, et al. **Antioxidant enzymes change in different non-metastatic stages in tumoral and peritumoral tissues of colorectal cancer.** *Int J Biochem Cell Biol.* 2020;120:105698. doi:10.1016/j.biocel.2020.105698

