



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

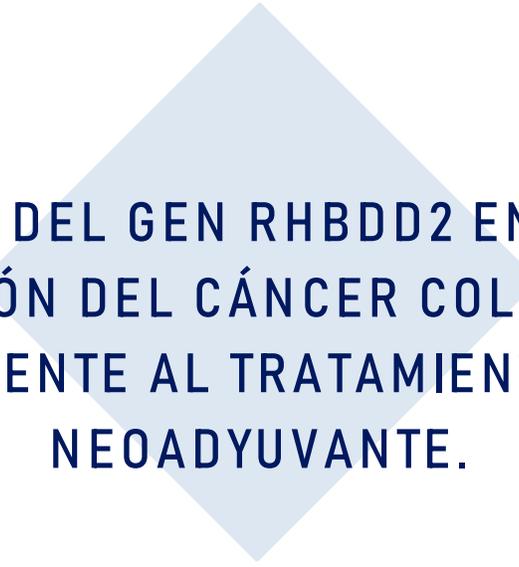
Rol del gen RHBDD2 en la progresión del cáncer colorrectal frente al tratamiento neoadyuvante.

Tesista: Lic. Sabina Palma

Director/a: Dr. Ezequiel Lacunza

Codirector/a: Dr. Martín C. Abba

Año: 2020



**ROL DEL GEN RHBDD2 EN LA
PROGRESIÓN DEL CÁNCER COLORRECTAL
FRENTE AL TRATAMIENTO
NEOADYUVANTE.**

Tesista: Lic. Sabina Palma

Director: Dr. Ezequiel Lacunza

Co-Director: Dr. Martín C. Abba

2020

Agradecimientos

Agradezco en primer lugar a todo el grupo de trabajo del Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas, por hacer posible el desarrollo de la presente tesis.

Fundamentalmente al Dr. Ezequiel Lacunza por su dirección, su compromiso y el aprendizaje que me ha brindado.

Al Dr. Martín C. Abba por su co-dirección, su colaboración y su acompañamiento.

A mis compañeras de trabajo Romina, Valeria, Agustina y Marina, por recorrer cotidianamente estos años conmigo, hacer más amenos los desafíos y llenar de buenos recuerdos este camino.

A la Facultad de Ciencias Médicas y a la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata por permitirme desarrollar este trabajo.

Al Dr. Zwenger y al Dr. Raffa por proveer las muestras analizadas durante la tesis y a las instituciones de las forman parte: el Hospital Provincial Neuquén “Dr. Castro Rendon” y el Instituto de Oncología “Dr. Ángel Roffo” de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, respectivamente.

Al CONICET por la posibilidad de dedicar estos años a la investigación y a la Universidad Nacional del San Antonio de Areco por abrirme las puertas como docente durante el transcurso de la tesis doctoral.

Quiero agradecer especialmente a algunas personas que hicieron posible el comienzo, el desarrollo y la culminación del presente trabajo de tesis:

A mi mamá y a mi papá, por acompañarme durante el doctorado pero fundamentalmente por darme la vida y mostrarme sus desafíos.

A mi hermano Maxi, por acompañarme en el comienzo de este camino y hacerlo posible y a mi hermana Mora, por recordarme la inocencia y demostrarme que siempre pasa el tiempo.

A Helena, por poner todo en perspectiva y devolverme a la verdadera humanidad.

A Felipe, por acompañarme amorosamente, una vez más.

A Ada, por tu sensatez y por recordarme quién era, de donde venía y por qué.

A Manu, por disfrutar conmigo esta etapa y porque el camino juntas se sienta siempre infinito.

A Euge, por su sencillez, su sensatez y su compañía.

A Liliana, a Sandra, a Sandrina y a Santiago por permitirme llegar hasta aquí y ayudarme a recorrer el camino.

A María, por su incondicionalidad y por la historia que compartimos.

A Francina, por su compañía y por permitirnos transformarnos juntas en el camino.

A Emilia, por su alegría.

A Gaby y a Nadia, por mostrarme un modo hermoso de trabajar juntas.

INDICE	Página
ABSTRACT	12
RESUMEN	13
INTRODUCCIÓN	14
1. El tracto gastrointestinal.	14
1.1 Estructura, histología y función del tracto gastrointestinal.	14
1.2 El intestino.	15
1.3 El intestino grueso.	16
2. El cáncer colorrectal	17
2.1 Cáncer.	17
2.2 Cáncer Colorrectal.	18
2.3 Epidemiología.	18
2.4 Carcinogénesis colorrectal.	19
2.5 Factores de Riesgo.	23
2.6 Clasificación y estadificación tumoral.	24
2.7 Clasificación molecular.	24
2.8 Tratamiento.	27
2.8.1 Generalidades del tratamiento del CCR.	27
2.8.2 Tipos de tratamientos en CCR.	28
3. Microambiente tumoral y estrés celular.	31
3.1 Estrés de Retículo Endoplasmático.	31
3.2 La vía UPR.	31
3.3 UPR y cáncer.	33
3.3.1 Ejes del UPR y cáncer.	34
4. El gen RHBDD2.	35
4.1 Familia Romboide.	35
4.2 Los Romboide y el estrés de RE.	36
4.3 El gen RHBDD2.	36
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	39
1. Objetivo General I.	39
1.1 Objetivos específicos I.	39

	Página
2. Objetivo General II.	39
2.1 Objetivos específicos II.	39
MATERIALES Y MÉTODOS	41
1. Aproximación <i>in silico</i> al rol de <i>RHBDD2</i> en el CCR.	41
1.1 Análisis de coexpresión e identificación de bioprocesos asociados a <i>RHBDD2</i> en el contexto del CCR.	41
1.2 Identificación de sitios de unión al promotor del gen <i>RHBDD2</i> .	42
1.3 Análisis de la topología y la secuencia de la proteína <i>RHBDD2</i> .	42
1.4 Perfil de expresión de <i>RHBDD2</i> en líneas celulares de cáncer de colon.	43
2. Efectos de las variaciones de expresión de <i>RHBDD2</i> en líneas celulares de CCR.	43
2.1 Cultivo celular.	43
2.2 Desarrollo de constructos para la sobreexpresión y el silenciamiento <i>in vitro</i> de <i>RHBDD2</i> en líneas celulares de CCR.	44
2.3 Tratamiento con 5Fu.	45
2.3.1 Efecto del tratamiento con 5Fu sobre la expresión de <i>RHBDD2</i> y genes del UPR en líneas celulares de CCR.	45
2.3.2 Sensibilidad de las líneas celulares al 5Fu.	46
2.3.3 Efecto de las variaciones de la expresión de <i>RHBDD2</i> sobre la sensibilidad celular al tratamiento con 5Fu.	46
2.4 Análisis de la expresión de <i>RHBDD2</i> , genes del UPR y moléculas de adhesión a nivel del ARNm mediante RT-qPCR.	46
2.5 Análisis de la expresión proteica de <i>RHBDD2</i> y genes del UPR en las líneas celulares CACO2 y HCT116.	48
2.5.1 Western Blot.	48
2.5.2 Inmunocitoquímica.	48
2.6 Análisis de la interacción <i>RHBDD2</i> -BiP mediante ensayo de inmunoprecipitación.	49
2.7 Efecto de las variaciones de la expresión de <i>RHBDD2</i> sobre el fenotipo de las líneas celulares CACO2 y HCT116.	50
2.7.1 Hemocitometría, análisis de viabilidad celular.	50
2.7.2 Citometría de flujo, análisis de las fases del ciclo celular.	50
2.7.3 Ensayo de cierre de herida.	50
2.7.4 Ensayo de formación de colonias en agar.	51

	Página
3. Análisis de la expresión de RHBDD2 en tumores de recto frente al tratamiento neoadyuvante.	51
3.1 Muestras y pacientes.	51
3.2 Inmunohistoquímica.	52
4. Análisis estadístico.	54
RESULTADOS	55
1. Aproximación al rol funcional de <i>RHBDD2</i> en el contexto del CCR.	55
1.1 El análisis de enriquecimiento funcional de genes que coexpresan con <i>RHBDD2</i> en el CCR identifica procesos biológicos relacionados al tráfico de membrana, las adhesiones focales y vías asociadas al estrés de RE.	55
1.2 La estructura y topología de RHBDD2 revela dominios asociados a la unión de ligandos específicos.	57
2. Expresión de RHBDD2 en células de cáncer de colon.	57
2.1 Análisis de la expresión de <i>RHBDD2</i> en líneas celulares de cáncer de colon.	57
2.2 Expresión de <i>RHBDD2</i> frente al 5Fu en las líneas celulares CACO2 y HCT116.	59
3. La sobreexpresión y el silenciamiento de <i>RHBDD2</i> poseen efectos opuestos sobre la adhesión, la migración, la proliferación y la resistencia al tratamiento con 5Fu.	62
3.1 Desarrollo de constructos para la sobreexpresión y silenciamiento de <i>RHBDD2</i> en líneas celulares de cáncer de colon.	62
3.2 Efecto de las variaciones de la expresión de <i>RHBDD2</i> sobre la migración celular.	62
3.3 Efecto de las variaciones de la expresión de <i>RHBDD2</i> sobre el crecimiento libre de anclaje.	62
3.4 Efecto de las variaciones de la expresión de <i>RHBDD2</i> sobre la proliferación y el ciclo celular.	65
3.5 Efecto de la sobreexpresión y el silenciamiento de <i>RHBDD2</i> sobre la respuesta al tratamiento con 5Fu.	66
4. <i>RHBDD2</i> modula la expresión de genes del UPR.	66
4.1 Análisis de la expresión de genes del UPR ante las variaciones en la expresión de <i>RHBDD2</i> .	66

	Página
4.2 Estudio de la expresión de genes del UPR frente a las variaciones en la expresión de <i>RHBDD2</i> ante el tratamiento con 5Fu.	67
4.3 Expresión de las proteínas BiP, PERK y CHOP frente a las variaciones en la expresión de <i>RHBDD2</i> en presencia y ausencia del tratamiento con 5Fu.	68
4.4 Asociación entre <i>RHBDD2</i> y BiP en células de CCR.	69
4.5 Identificación de sitios de unión de CHOP/DDIT3 en la secuencia promotora de <i>RHBDD2</i> .	69
5. Variaciones de la expresión de <i>RHBDD2</i> afectan a la vía de adhesión focal.	70
6. Análisis de muestras tumorales de recto frente al tratamiento neoadyuvante.	71
6.1 Una elevada expresión de <i>RHBDD2</i> luego del tratamiento neoadyuvante en CR se asocia a mal pronóstico.	71
6.2 Análisis de la expresión de BiP, PERK y CHOP en muestras de recto frente el tratamiento neoadyuvante.	73
DISCUSIÓN	77
1. <i>RHBDD2</i> se asocia a las vías biosintética secretora, de adhesión y de estrés de RE en el CCR.	77
2. Las variaciones de la expresión de <i>RHBDD2</i> afectan la proliferación, la adhesión, la migración y la resistencia al tratamiento con 5Fu.	78
3. <i>RHBDD2</i> actúa como un intermediario en la vía del UPR.	80
4. Las variaciones en la expresión de <i>RHBDD2</i> afectan la vía de adhesiones focales.	82
5. La sobreexpresión de <i>RHBDD2</i> promueve un fenotipo invasor y quimiorresistente en tumores de cáncer de recto.	83
CONCLUSIONES	85
REFERENCIAS	87
ANEXO	100
GLOSARIO	116

INDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1. Estructura del tracto digestivo.	15
Figura 2. Regiones del intestino grueso.	16
Figura 3. Diagrama de la pared del intestino grueso.	17
Figura 4. Características distintivas de las células tumorales.	18
Figura 5. Estadística epidemiológica del CCR en 2018.	19
Figura 6. Cambios morfológicos y moleculares en la secuencia adenoma-carcinoma.	21
Figura 7. Vías moleculares alteradas en cáncer colorrectal.	22
Figura 8. Progreso tumoral del CCR y su tratamiento.	28
Figura 9. Principales vías del UPR.	33
Figura 10. Genes de la familia romboide.	35
Figura 11. Línea del tiempo de los hallazgos más relevantes sobre el estudio de <i>RHBDD2</i> asociado al cáncer.	37
Figura 12. Flujo de trabajo realizado para el enriquecimiento funcional de genes y FT que coexpresan con <i>RHBDD2</i> .	42
Figura 13. Esquema de los vectores utilizados en la sobreexpresión y el silenciamiento de <i>RHBDD2</i> .	45
Figura 14. Intensidad de la inmunotinción en muestras tumorales.	54
Figura 15. Enriquecimiento funcional de genes que coexpresan con <i>RHBDD2</i> en CCR.	56
Figura 16. Enriquecimiento funcional de los factores de transcripción asociados a <i>RHBDD2</i> en CCR.	57
Figura 17. Secuencia y topología de la proteína RHBDD2.	58
Figura 18. Expresión de <i>RHBDD2</i> en 151 líneas celulares de cáncer de colon.	59
Figura 19. Expresión de <i>RHBDD2</i> en las líneas celulares CACO2 y HCT116.	59
Figura 20. Expresión de <i>RHBDD2</i> frente al tratamiento con 5Fu en células de CCR.	60
Figura 21. Expresión de RHBDD2 frente al 5Fu en las CACO2 y HCT116 evaluada mediante ICQ.	61
Figura 22. Validación del modelo de sobreexpresión y silenciamiento de <i>RHBDD2</i> .	63
Figura 23. Efecto de la sobreexpresión y el silenciamiento de <i>RHBDD2</i> sobre la migración en células de cáncer de colon.	64

	Página
Figura 24. Efecto de la sobreexpresión y el silenciamiento de <i>RHBDD2</i> sobre el crecimiento libre de anclaje.	64
Figura 25. Efecto de la sobreexpresión y el silenciamiento de <i>RHBDD2</i> sobre la tasa de proliferación celular en CCR.	65
Figura 26. Análisis de las fases del ciclo celular ante la sobreexpresión y el silenciamiento de <i>RHBDD2</i> en líneas celulares de CCR.	65
Figura 27. La sobreexpresión de <i>RHBDD2</i> aumentó la resistencia al tratamiento con 5Fu en las CACO2.	66
Figura 28. Expresión de genes del UPR ante las variaciones de expresión de <i>RHBDD2</i> .	67
Figura 29. Expresión de genes del UPR ante las variaciones de la expresión de <i>RHBDD2</i> y el tratamiento con 5Fu.	67
Figura 30. Expresión de las proteínas BIP, PERK y CHOP, ante las variaciones de expresión de <i>RHBDD2</i> y el tratamiento con 5Fu.	68
Figura 31. Co-inmunoprecipitación de <i>RHBDD2</i> y BiP.	69
Figura 32. Análisis in silico del promotor de <i>RHBDD2</i> .	70
Figura 33. Expresión de genes de la vía de adhesión focal ante las variaciones de <i>RHBDD2</i> en presencia y ausencia del tratamiento con 5Fu.	71
Figura 34. Expresión de <i>RHBDD2</i> ante el tratamiento neoadyuvante en tumores de recto.	72
Figura 35. Variación de la expresión de <i>RHBDD2</i> ante el tratamiento neoadyuvante y su asociación al desarrollo de metástasis.	73
Figura 36. Expresión intratumoral de <i>RHBDD2</i> .	74
Figura 37. Expresión de PERK ante el tratamiento neoadyuvante en tumores de recto.	75
Figura 38. Expresión de BiP ante el tratamiento neoadyuvante en tumores de recto.	76
Figura 39. Resumen de los resultados más relevantes de la expresión de <i>RHBDD2</i> en el CCR y su respuesta al tratamiento neoadyuvante.	86

INDICE DE TABLAS

Página

Tabla 1. Incidencia y mortalidad del cáncer en Argentina, 2018.	20
Tabla 2. Clasificación TNM.	25
Tabla 3. Estadios tumorales según la clasificación TNM.	26
Tabla 4. Taxonomía propuesta para el CCR.	27
Tabla 5. Tipos de terapias aprobadas en CCR.	30
Tabla 6. Características de las líneas celulares utilizadas.	44
Tabla 7. Secuencia de los cebadores utilizados en RT-qPCR.	47
Tabla 8. Descripción del muestreo.	52
Tabla 9. Datos clínico-patológicos de los pacientes.	53
Tabla 10. Resultados de IHQ para RHBDD2 en tumores de recto antes y después del tratamiento neoadyuvante.	72
Tabla 11. Resultados de IHQ para PERK y BiP en tumores de recto antes y después del tratamiento neoadyuvante.	75

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is a frequently lethal disease with heterogeneous outcomes and drug responses. These differences reside in the intrinsic molecular features of the tumors. The current standard of care for locally advanced rectal cancer (RC) is neoadjuvant radio-chemotherapy (NRC) with 5-Fluorouracil (5Fu) as the main drug, followed by surgery and adjuvant chemotherapy. While a group of patients will achieve a pathological complete response, a significant percentage will not respond to the treatment. The Unfolding Protein Response (UPR) pathway is generally activated in tumors and results in resistance to radio-chemotherapy. Previous data from our group showed that *RHBDD2* gene is overexpressed in the advanced stages of CRC and that it could modulate the UPR pathway. Moreover, *RHBDD2* expression is induced by 5Fu. We thus hypothesized that the overexpression of *RHBDD2* in the advanced stages of CRC could impact the regulation of the UPR pathway providing tumor cells with a stress-resistant phenotype. In the present study, we demonstrate that the overexpression of *RHBDD2* in CACO2 cell line confers resistance to 5Fu, favors cell migration, adhesion and proliferation and has a profound impact on the expression of both, the UPR genes *BiP*, *PERK* and *CHOP*, and the cell adhesion genes *FAK* and *PXN*. We also determined that *RHBDD2* binds to BiP protein, the master UPR regulator. Finally, we confirmed that a high expression of *RHBDD2* in RC tumors after NRC treatment is associated with the development of local or distant metastases. The collected evidence positions *RHBDD2* as a promising prognostic biomarker to predict the response to NRC in patients with RC.

RESUMEN

El cáncer colorrectal (CCR) es una enfermedad frecuentemente letal con pronóstico y respuesta al tratamiento heterogéneos. Estas diferencias residen en las características moleculares intrínsecas de los tumores. Los pacientes con cáncer de recto (CR) avanzado reciben radio-quimioterapia (RQT) neoadyuvante con 5-Fluorouracilo (5Fu) como principal droga utilizada, seguida de cirugía y quimioterapia adyuvante. Un grupo de pacientes presenta una respuesta patológica completa al tratamiento neoadyuvante, mientras que un significativo grupo no obtiene una respuesta favorable. La vía del UPR se encuentra activa en tumores colorrectales y se ha demostrado que su activación confiere quimiorresistencia a células tumorales. En estudios previos de nuestro grupo, se demostró que *RHBDD2* se sobreexpresa en estadios avanzados del CCR, se induce frente al tratamiento con 5Fu y se asocia a la vía del UPR. Por lo tanto, se planteó la hipótesis de que la sobreexpresión de *RHBDD2* en los estadios avanzados del CCR podría afectar la regulación de la vía del UPR dando lugar a un fenotipo celular quimiorresistente. En la presente tesis, demostramos que la sobreexpresión de *RHBDD2* en la línea celular CACO2 confiere resistencia al tratamiento con 5Fu, favorece la migración, la adhesión y la proliferación celular. Además, tiene un profundo impacto en la expresión de los genes del UPR: *BiP*, *PERK* y *CHOP*, y en los genes de adhesión *FAK* y *PXN*. Mediante inmunoprecipitación, observamos que *RHBDD2* se une a BiP, la chaperona principal del UPR. En tumores de recto, se determinó que aquellos que mantienen alta expresión de *RHBDD2* luego del tratamiento neoadyuvante se asocian al desarrollo de metástasis local o a distancia. Estos resultados en conjunto posicionan a *RHBDD2* como un biomarcador pronóstico prometedor para predecir la respuesta a la RQT en pacientes con CR.



1 El tracto gastrointestinal

“Toda enfermedad comienza en el intestino”

Hipócrates (460-370 a.C.)

Hace aproximadamente 2500 años, Hipócrates, quién ha sido considerado “el padre de la medicina” le atribuía al intestino un rol central en la salud humana. En la actualidad, se ha demostrado que la integridad de la pared intestinal es fundamental para la correcta nutrición y función de todos los sistemas de órganos que componen el cuerpo humano. En la presente introducción abordaremos las principales funciones del intestino y nos centraremos en el intestino grueso, puntualmente en el carcinoma colorrectal (CCR).

1.1 Estructura, histología y función del tracto gastrointestinal.

El sistema digestivo consiste en el tracto digestivo –cavidad oral, esófago, estómago, intestino delgado y grueso, y ano- y sus glándulas asociadas –glándulas salivales, hígado y páncreas-. También denominado tracto gastrointestinal (GI) o canal alimentario, su función es obtener, del alimento ingerido, la materia y la energía necesaria para el crecimiento, funcionamiento y mantenimiento del cuerpo¹.

Todas las regiones del tracto GI poseen características estructurales en común. El tracto GI es un tubo hueco con un lumen de diámetro variable y una pared constituida por cuatro capas principales: mucosa, submucosa, *muscularis* y serosa¹ (Figura 1).

La mucosa consiste en un epitelio de revestimiento, una capa subyacente de tejido conectivo laxo, rico en vasos sanguíneos y linfáticos, linfocitos y células de músculo liso, denominada lámina propia, y una delgada capa de músculo liso denominada *muscularis mucosae*, que separa la mucosa de la submucosa. La mucosa intestinal se caracteriza por la presencia de microvellosidades que le permiten aumentar la superficie de absorción (Figura 1).

La submucosa contiene tejido conectivo denso, con vasos más grandes y un plexo submucoso (Meissner) de nervios autónomos (Figura 1).

La capa *muscularis* está compuesta por células de músculo liso organizadas en dos o más subcapas; la interna generalmente circular y la externa longitudinal. El tejido conectivo entre ambas subcapas contiene vasos sanguíneos, linfáticos y un plexo mientérico (Auerbach) de nervios autónomos, este y el de Meissner comprenden el sistema nervioso entérico (Figura 1).

La serosa es una delgada capa de tejido conectivo laxo, rico en vasos sanguíneos, linfáticos y tejido adiposo, recubierta por un epitelio simple escamoso, denominado mesotelio (Figura 1).

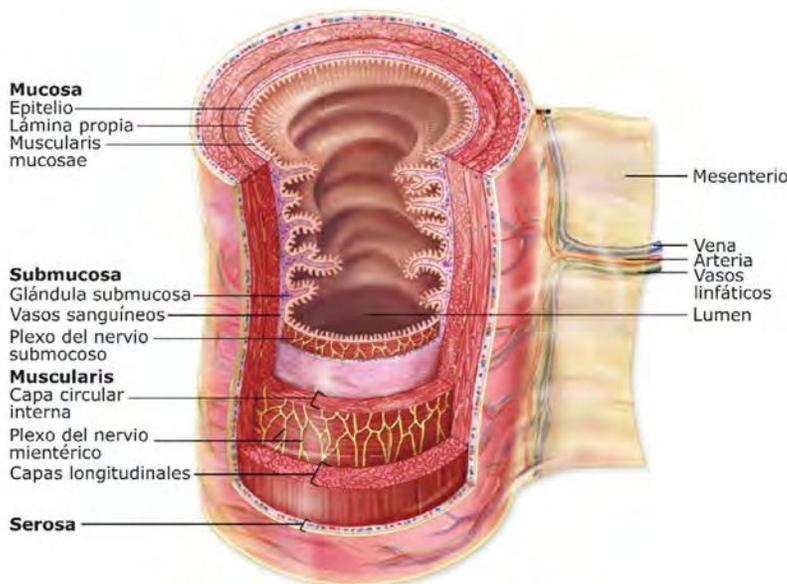


Figura 1. Estructura del tracto digestivo. Se esquematiza la estructura general del tracto GI y se especifican sus cuatro capas principales: mucosa, submucosa, *muscularis* y serosa. Tomado y adaptado de: *Junqueira's, Basic Histology, Text and Atlas, 13th edition.*

1.2 El intestino

El intestino, precedido por la cavidad oral, el esófago y el estómago, se encarga de la absorción de nutrientes, agua y electrolitos. La absorción de nutrientes se lleva a cabo en el intestino delgado, mientras que la absorción agua, electrolitos y la transformación del material indigerible en heces se realiza en el intestino grueso¹.

La pared intestinal se encuentra vinculada al sistema nervioso central (SNC) a través del sistema nervioso entérico (SNE) que permite regular las secreciones glandulares y el peristaltismo, entre otros procesos¹.

El intestino, además, es el órgano con mayor asociación al sistema inmune. Se estima que aloja el 50% de los linfocitos humanos. Allí, el sistema inmune interactúa con una gran diversidad de antígenos presentes en el alimento y en la microbiota². La

microbiota intestinal se compone de un conjunto de más de diez billones de microorganismos comensales, simbióticos y patógenos que viven en el intestino. Posee funciones nutricionales, regula el pH y la peristaltis intestinal y contribuye a la maduración y modulación del sistema inmune³. El 80% de la microbiota intestinal se aloja en el intestino grueso. Actualmente desbalances en la microbiota se han asociado a diversas patologías, entre ellas, desórdenes metabólicos, como diabetes u obesidad, enfermedades cardiovasculares, neurológicas y de salud mental^{4,5,6}. Además, estudios recientes indican que el microbioma (el genoma de la totalidad de los microorganismos presentes en el tejido) se encuentra implicado en el desarrollo de neoplasias y en la respuesta de los tumores al tratamiento^{7,8}.

1.3 El intestino grueso.

El intestino grueso, presenta las siguientes regiones: un ciego, con una válvula ileocecal y un apéndice; un colon ascendente (derecho), transversal, descendente (izquierdo) y sigmoideo; y un recto, donde se almacenan las heces hasta su evacuación¹ (Figura 2).

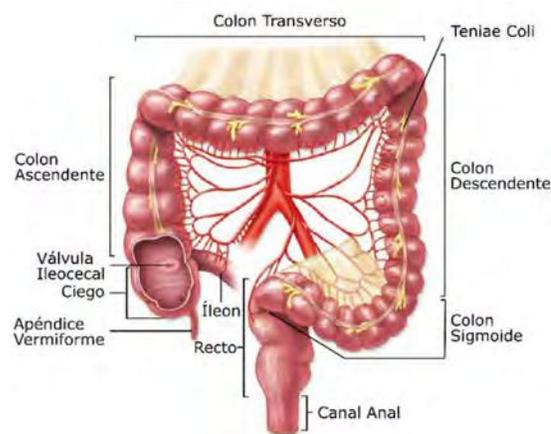


Figura 2. Regiones del intestino grueso. El intestino grueso consiste en el ciego; el colon, con cuatro regiones: ascendente, transversal, descendente y sigmoidea; y el recto. Tomado y adaptado de: Junqueira's, *Basic Histology, Text and Atlas, 13th edition*.

La mucosa del intestino grueso está penetrada en toda su longitud por glándulas intestinales tubulares. Estas y el lumen intestinal están revestidas por una capa epitelial de células absortivas y caliciformes y un pequeño número de células enteroendócrinas (Figura 3). Las células columnares absortivas presentan *microvilli*. Las células caliciformes producen el moco y se van haciendo numerosas hacia el recto. Las células madre epiteliales (progenitoras) se ubican en el tercio inferior de cada glándula¹.

La lámina propia es rica en células y nódulos linfoides que se extienden dentro de la submucosa.

La *muscularis* del colon posee una capa circular y una longitudinal característica que se organiza en tres bandas longitudinales separadas, denominada *teniae coli*¹ (Figura 3).

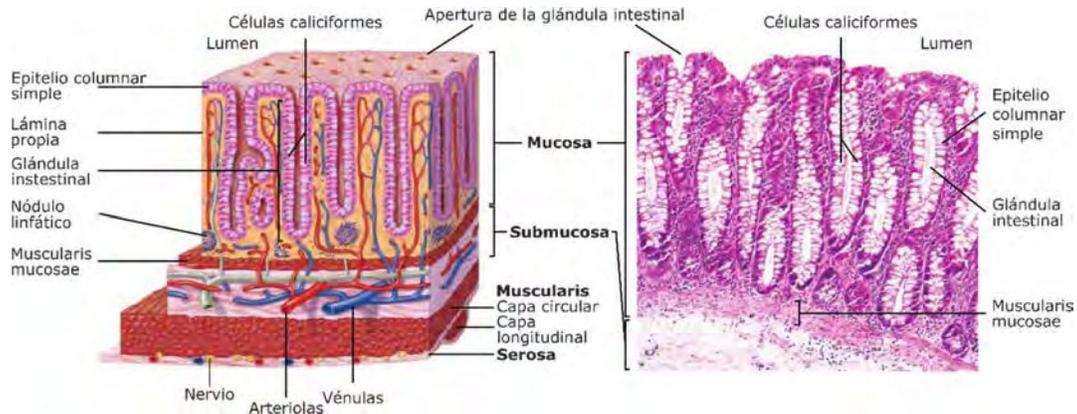


Figura 3. Diagrama de la pared del intestino grueso. Se muestra la pared del intestino grueso compuesta de las cuatro capas típicas. **a)** La submucosa está bien vascularizada. La *muscularis* presenta una capa circular interna típica, pero la externa longitudinal está sólo presente en tres bandas igualmente espaciadas, la *teniae coli*. **b)** La mucosa está ocupada principalmente por las glándulas intestinales que se extienden en profundidad hasta la *muscularis* (HyE, 10X). Tomado y adaptado de: *Junqueira's, Basic Histology, Text and Atlas, 13th edition*.

2 El cáncer colorrectal

2.1 Cáncer

El cáncer es una enfermedad heterogénea caracterizada por la acumulación de mutaciones en una célula que la conducen a un estado neoplásico que culmina en la formación de un tumor⁹. Los tumores malignos son capaces de invadir estructuras adyacentes y diseminarse a otros tejidos u órganos. La diseminación del tumor a otros tejidos u órganos, se denomina metástasis. Eventualmente las metástasis producen daño sistémico, y dan lugar a la muerte del individuo². Los tumores malignos presentan características distintivas: señales permanentes de promoción del crecimiento celular, evasión de la supresión del crecimiento, inmortalidad replicativa, invasión y metástasis, inestabilidad genómica y mutación, inducción de angiogénesis, resistencia a la apoptosis, desregulación del metabolismo energético, evasión de la respuesta inmune y promoción de la inflamación¹⁰ (Figura 4).

La inestabilidad genómica y la promoción de la inflamación son características cruciales para la adquisición de los otros rasgos tumorales, ya que promueven la transformación celular y la consecuente progresión tumoral. Además, en la adquisición de muchas de estas características participan las células normales del estroma que

rodean al tumor, las cuales contribuyen al desarrollo de las capacidades tumorales y conjuntamente dan lugar al microambiente tumoral¹⁰.



Figura 4. Características distintivas de las células tumorales. Se esquematizan las diez características distintivas que adquieren las células somáticas al transformarse en células tumorales. Tomado y adaptado de: Hanahan & Weinberg, 2011.

2.2 Cáncer colorrectal

Cualquier masa de lesión neoplásica del tracto GI puede generar una protrusión de la mucosa denominada pólipo. La neoplasia poliposa más común y con mayor relevancia clínica es el adenoma de colon: pólipos benignos que originan a la mayoría de los adenocarcinomas colorrectales. Un gran número de adenomas, sin embargo, no progresa a carcinoma. Los adenomas colorrectales se caracterizan por la presencia de displasia epitelial².

2.3 Epidemiología

El adenocarcinoma colorrectal o CCR constituye la mayor causa de mortalidad y morbilidad por neoplasias del tracto digestivo en todo el mundo¹¹. En el 2018 se detectaron aproximadamente un millón de casos nuevos y alrededor de 550.000 personas murieron por CCR¹².

La incidencia del CCR en Argentina es equiparable a la de otros países del continente americano como Estados Unidos, Brasil y Chile (Figura 5). Sin embargo, la tasa de mortalidad en Argentina es significativamente mayor a la de estos países (Figura 5), evidenciando la necesidad de mejorar la atención y el tratamiento de los pacientes con CCR a fin de reducir la tasa de mortalidad. La prevalencia a 5 años del CCR en la

Argentina es equivalente a la de sus países limítrofes Chile y Brasil, siendo todas menores a la de Estados Unidos (Figura 5).

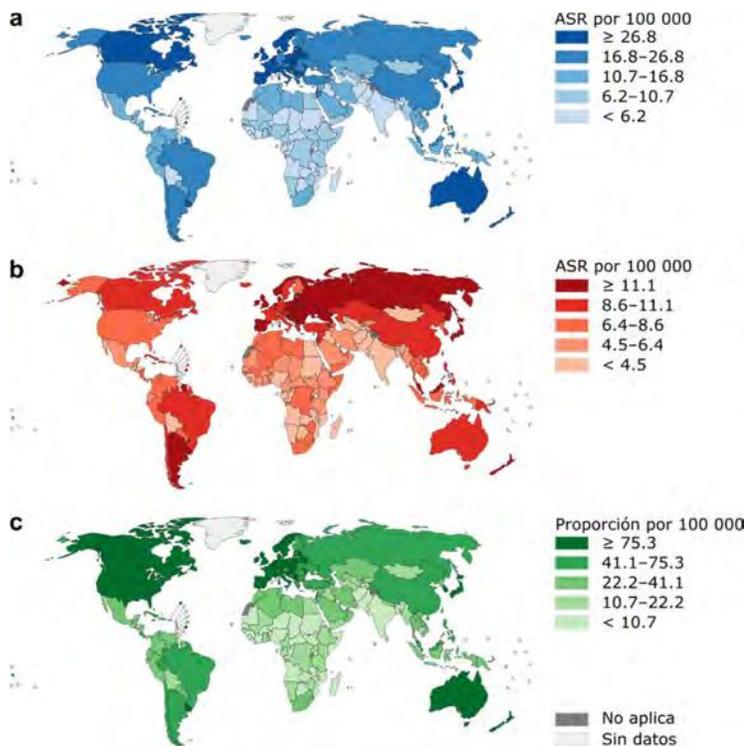


Figura 5. Estadística epidemiológica del CCR en 2018. Incidencia (a), mortalidad (b) y prevalencia (c) del CCR a nivel mundial en 2018 para ambos sexos y todas las edades. Las variables se esquematizan en escala de colores creciente. Tomado y modificado de: *Globocan 2018, Cancer Today Organización Mundial de la salud* (<http://gco.iarc.fr/today/>)

En la Argentina, constituye el segundo tipo de neoplasia más frecuente, luego del cáncer de mama. Según estimaciones de la IARC (Agencia Internacional de Investigación del cáncer de la Organización Mundial de la Salud), en nuestro país se produjeron 15.692 nuevos casos en 2018 de los cuales 8.527 fueron hombres afectados y 7165 mujeres (Tabla 1).

El CCR causó en 2018 en Argentina 8.721 muertes, ubicándose en el segundo lugar luego del cáncer de pulmón con 10.662 muertes y precediendo al cáncer de mama que produjo 6.380 defunciones. La tasa de mortalidad ajustada en ambos sexos para el 2017 fue de 12 x 100.000 habitantes¹³.

2.4 Carcinogénesis colorrectal.

La combinación de eventos moleculares que conducen al CCR es heterogénea e involucra alteraciones genéticas y epigenéticas¹⁴. En términos generales existen al menos dos vías moleculares de carcinogénesis bien caracterizadas.

Tabla 1. Incidencia y mortalidad del cáncer en Argentina, 2018

LOCALIZACIÓN	INCIDENCIA	MUJERES	HOMBRES	MORTALIDAD
Mama	21.558	21.558	-	6.380
Colorrectal	15.692	7.165	8.527	8.721
Próstata	11.600	-	11.600	3.974
Pulmón	11.595	4.484	7.111	10.662
Riñón	4.889	1.724	3.165	2.314
Páncreas	4.878	2.576	2.302	4.683
Cervix	4.484	4.484	-	2.231
Estómago	3.980	1.444	2.536	3.202
Vejiga	3.631	842	2.789	1.599
Tiroides	3.482	3.015	467	265
Linfoma No-Hodgkin	3.405	1.467	1.938	1.620
Encéfalo y otros SNC	3.001	1.414	1.587	1.616
Leucemias	2.934	1.365	1.569	2.098
Cuerpo de útero	2.412	2.412	-	895
Hígado	2.343	979	1.364	2.113
Ovario	2.330	2.330	-	1.321
Esófago	2.299	794	1.505	1.891
Otros	12.224	4.121	8.103	13.193
Total	125.014	66.131	58.883	68.778

Tomado y modificado de: <https://www.argentina.gob.ar/salud/instituto-nacional-del-cancer/estadisticas/incidencia>

La secuencia clásica adenoma-carcinoma es la que siguen los tumores con inestabilidad cromosómica (CIN, del inglés *Chromosome Instability*), los cuales constituyen el 80% de los tumores de colon esporádicos (Figura 6). El proceso neoplásico comienza con la inactivación del gen supresor de tumores APC, ya sea por delección del brazo largo del cromosoma 5 (5q) o mutación inactivante. APC es un regulador negativo clave en la vía de señalización Wnt y uno de los responsables de retener a β -catenina en el citoplasma e inducir su degradación en el proteosoma, evitando que esta se transloque al núcleo y active la transcripción génica^{14,15}. Dentro de los genes activados por β -catenina se encuentra MYC, un importante promotor de la progresión del ciclo celular (Figura 7). El 94% de los tumores de colon poseen alterada la vía Wnt demostrando el rol relevante que cumple esta vía en el control de la proliferación y en el comienzo del proceso carcinogénico¹⁶.

Posteriormente a la alteración de la vía Wnt, se acumulan mutaciones adicionales, como la mutación en KRAS, que se encuentra en el 35% de los tumores colorrectales y que promueve el crecimiento y previene la apoptosis (Figuras 6 y 7).

La progresión neoplásica está también asociada a la pérdida de otros genes supresores de tumores como SMAD2 y SMAD4, causada por la delección del cromosoma 18q^{14,17}. Las proteínas SMAD son efectores de la vía TGF- β (del inglés: *Transforming growth factor beta*) e inhiben la progresión del ciclo celular (Figura 7).

La secuencia continúa con la inactivación del gen supresor de tumores TP53, el cual se encuentra mutado en el 70-80% de los tumores de colon^{14,16}. Su inactivación raramente se presenta en adenomas, sugiriendo que la mutación en TP53 es un evento tardío dentro de la carcinogénesis colorrectal (Figura 6). La pérdida de función de TP53 es a menudo causada por la delección del brazo corto del cromosoma 17 (17p).

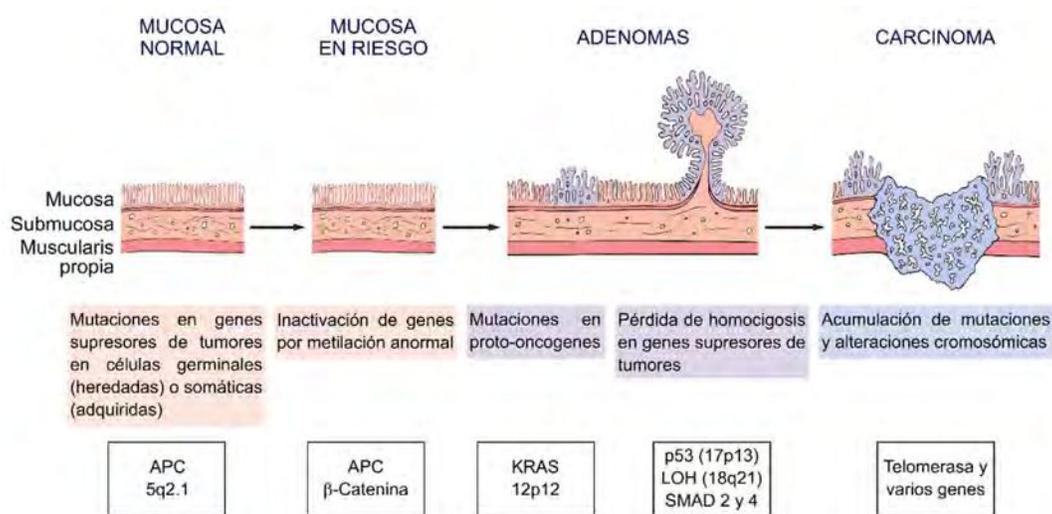


Figura 6. Cambios morfológicos y moleculares en la secuencia adenoma-carcinoma. La pérdida de una copia normal del gen supresor de tumores APC ocurre tempranamente. Las personas pueden nacer con un alelo mutado, haciéndolas extremadamente susceptibles al desarrollo del cáncer de colon, o bien la inactivación de APC puede ocurrir a edad avanzada. A la pérdida de APC le siguen alteraciones en la metilación normal de secuencias promotoras (modificación epigenética) inactivando genes relevantes en el control del ciclo celular. Otras mutaciones y delecciones suceden en genes como KRAS, p53, SMAD2 y SMAD4, conducentes a la aparición del carcinoma, en el cual ocurren otras mutaciones. Si bien existe una sucesión temporal en estos cambios, es el efecto agregado de las mutaciones, más que su orden de ocurrencia, lo que pareciera ser determinante. Tomado y modificado de: *Robbins, Basic Pathology, 9th Edition*.

La otra vía, es la que atraviesan los tumores con mutaciones en las enzimas de reparación del ADN. En ellos el tejido acumula mutaciones en secuencias microsatélites (secuencias cortas repetitivas) dando lugar al fenotipo con inestabilidad de microsatélites (MSI, por sus siglas en inglés: *Microsatellite Instability*)¹⁸. Algunas secuencias microsatélites se encuentran localizadas en regiones promotoras de genes involucrados en la regulación del ciclo celular, como por ejemplo el promotor de

TGF β R2, receptor del TGF- β y activador de las proteínas SMAD^{19,20}. La inactivación de TGF β R2 impide que se traduzca una señal inhibitoria de la proliferación (Figura 7).

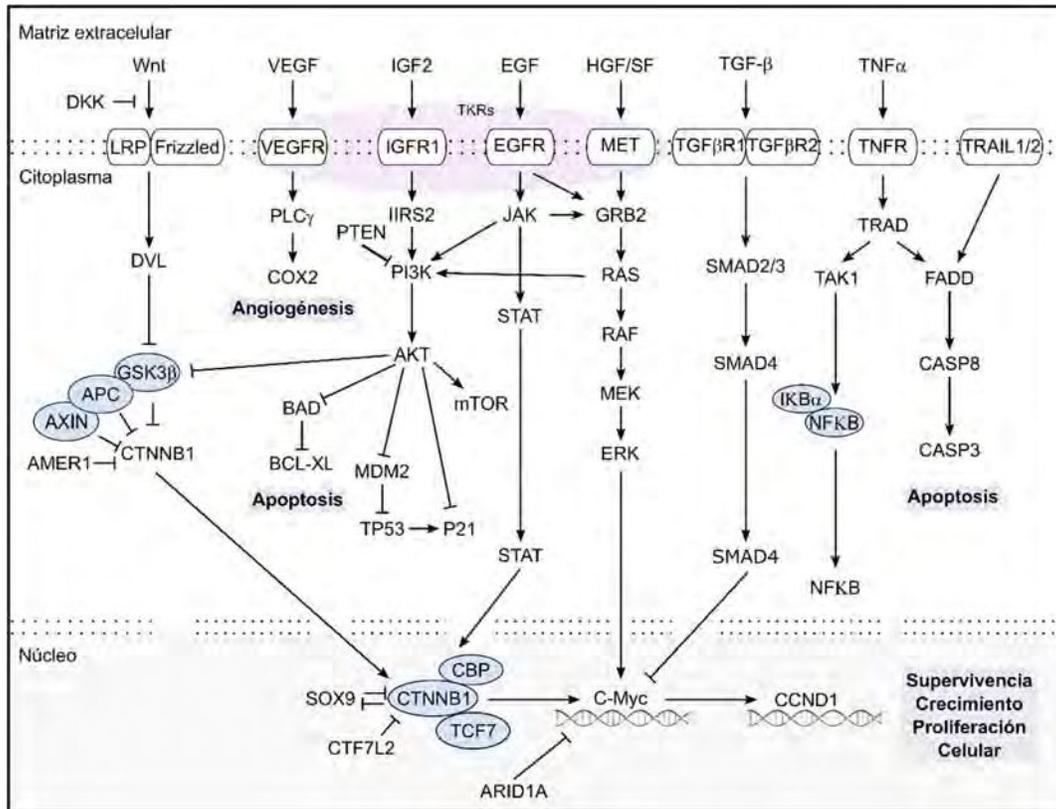


Figura 7. Vías moleculares alteradas en el CCR. Se esquematizan las vías moleculares mayormente alteradas durante la carcinogénesis colorrectal: Wnt, VEGF, PI3K, TP53, EGFR, TGF- β , TNF- α . La vía Wnt, las vías de receptores tirosina kinasa (RTKs) que regulan a las proteínas JAK-STAT y la vía de las MAPs Kinasas promueven la progresión del ciclo celular. La vía de PI3K inhibe la apoptosis celular, promoviendo indirectamente la supervivencia celular. Los intermediarios del conjunto de vías de señalización que favorecen la supervivencia y la progresión del ciclo celular, sufren mutaciones activantes, amplificaciones, sobreexpresión y/o up-regulación de sus moléculas activadoras. Además, presentan mutaciones inactivantes, deleción y/o down-regulación sobre los inhibidores de la vía. La vía de TGF- β , a través de la activación de las proteínas SMAD, inhibe la progresión del ciclo celular. En CCR, son frecuentes las deleciones en SMAD2/3/4.

La secuencia del gen pro-apoptótico BAX también se ha detectado alterada en tumores de colon con MSI²¹. La reducción en la expresión de BAX permite aumentar la supervivencia de clones con anomalías genéticas.

La inestabilidad de microsatélites y la deficiencia en la reparación del ADN han sido asociadas a los adenomas serrados sésiles, así como también a los carcinomas que se generan a partir de ellos.

Un tercer grupo, que algunos autores consideran dentro y otros fuera de los MSI, incluye a tumores con fenotipo metilador de islas CpG (CIMP, del inglés *CpG Island Methylator Phenotype*)²². Algunos de estos tumores poseen MSI debido a que se

encuentran metilados aquellos genes encargados de la reparación del ADN, lo cual genera dicha inestabilidad. Por ejemplo, la hipermetilación del promotor de la enzima MLH1, reduce la expresión de la misma y por lo tanto su función reparadora. Además, estos tumores generalmente portan mutaciones activantes en el oncogén BRAF, pero no en KRAS ni en TP53 (Figura 7). La combinación de MSI con metilación del promotor de MLH1 y mutación en BRAF, es una característica distintiva de esta secuencia carcinogénica².

Un pequeño grupo de tumores de colon tiene un aumento en la metilación de las islas CpG en ausencia de MSI. Muchos de estos tumores tienen mutaciones en KRAS, pero no en BRAF y TP53. Las mutaciones en TP53 no son frecuentes en tumores de colon con fenotipo metilador¹⁶.

2.5 Factores de Riesgo.

Factores genéticos y ambientales impactan en el desarrollo del CCR. Dentro de los factores genéticos, la incidencia familiar contribuye al riesgo de padecer CCR. Los pacientes que heredan una copia mutada del gen APC, desarrollan poliposis adenomatosa familiar; un desorden autosómico dominante por el que se desarrollan numerosos adenomas colorrectales durante la adolescencia².

El CCR Hereditario No Polipósico (HNPCC por sus siglas en inglés *Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer*) es causado por mutaciones heredadas en genes que codifican enzimas responsables de la detección y reparación del ADN^{23,24}.

La inflamación crónica es una de las patologías previas con mayor riesgo de desencadenar CCR. Los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal, incluyendo colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn poseen un riesgo muy alto de desarrollar colitis asociada al CCR^{25,26}.

Los factores ambientales que impactan en el desarrollo del CCR se encuentran fuertemente asociados a la dieta. El consumo de granos enteros, frutas y fibra vegetal reducen el riesgo de desarrollar CCR mientras que el alto consumo de carbohidratos refinados, grasas, carnes rojas y alimentos ultra procesados confieren un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad^{27,28}. El consumo de alcohol y tabaco también aumentan el riesgo de desarrollar CCR de una manera dosis dependiente^{29,30}.

La microbiota intestinal ha demostrado tener un fuerte impacto en el desarrollo del CCR. Algunos microorganismos tienen propiedades pro-carcinogénicas como la liberación de compuestos que dañan el ADN, la inducción de la proliferación celular, la permeabilización de la pared intestinal y la inducción de inflamación crónica³¹. Los

pacientes con CCR poseen una microbiota menos abundante, con una reducción significativa de los microorganismos benéficos³². Los alimentos incluidos en la dieta afectan la composición de la microbiota intestinal sustentando el impacto que la conducta alimentaria posee sobre el riesgo de desarrollar la enfermedad³³.

El nivel socioeconómico también guarda relevancia en el desarrollo de estos tumores, siendo las personas de mayor vulnerabilidad económica las mayormente afectadas por CCR³⁴.

2.6 Clasificación y estadificación tumoral.

La clasificación tumoral es una herramienta que permite codificar la extensión y la diseminación del tumor en el paciente. El grado tumoral refiere al estado de diferenciación de las células tumorales. Mientras que, el estadio indica el tamaño de la lesión primaria, la presencia o ausencia de ganglios linfáticos afectados y el desarrollo de metástasis².

Dukes y Kirklin construyeron un sistema de clasificación, llamado TNM (tumor-nódulo-metástasis), que refleja el estadio tumoral ([Tabla 2](#)), y que sentó la bases para la construcción del sistema de estadificación del *American Joint Commite of Cancer* (AJCC)² ([Tabla 3](#)).

En CCR, las características de pobremente diferenciado y/o mucinoso están asociadas con mal pronóstico. Sin embargo, los dos factores pronósticos más importantes son la profundidad de invasión y la presencia o ausencia de metástasis en nódulos linfáticos, también llamada metástasis ganglionar². La invasión por parte del tumor de la *muscularis propria* significa una reducción en la supervivencia que decrece aún más en presencia de metástasis ganglionar.

El sitio metastásico más frecuente en cáncer de colon es el hígado, debido a la presencia del drenaje portal. No obstante, también puede aparecer metástasis en nódulos linfáticos regionales, pulmones y huesos². El recto no posee drenaje portal y por ello, el pulmón es el sitio metastasico primario más frecuente en los pacientes con cáncer de recto (CR)³⁵.

2.7 Clasificación molecular.

La clasificación molecular basada en perfiles de expresión génica está ampliamente aceptada como un recurso relevante para la estratificación o sub-tipificación del CCR³⁶. La variabilidad de las plataformas de expresión génica, de los métodos de preparación de las muestras, de los métodos de procesamiento de los datos y la aplicación de

diferentes algoritmos a diversas cohortes de pacientes han dado lugar a un conjunto de clasificaciones^{16,37,38,39,40,41,42,43}. Con el objetivo de unificar la clasificación molecular del CCR y para facilitar la traslación clínica, se formó recientemente un consorcio internacional entre los distintos grupos de expertos, dedicado al intercambio de datos y análisis a gran escala⁴⁴. El Consorcio de Sub-tipificación del Cáncer Colorrectal (CRCSC, *Colorectal Cancer Subtyping Consortium*) fue formado entonces para determinar la presencia o ausencia de subtipos moleculares bien definidos entre las distintas clasificaciones del CCR⁴⁴. De este modo, el CRCSC definió cuatro subtipos moleculares con características distinguibles (CMS 1-4), siendo hasta el momento la clasificación más robusta del CCR (Tabla 4).

Tabla 2. Clasificación TNM. ¹

TUMOR	Tis	Displasia <i>in situ</i>
	T1	Tumor que invade la submucosa
	T2	Tumor que invade <i>muscularis propria</i>
	T3	Tumor invade a través de <i>muscularis propria</i>
	T4	Tumor invade órganos adyacentes
	T4a	Penetra en el peritoneo
	T4b	Invade otros órganos o estructuras
GANGLIOS LINFÁTICOS	N0	Ausencia de afectación ganglionar Presencia tumoral en 1 a 3 ganglios linfáticos perirectales.
	N1	Presencia tumoral en 1 ganglio regional
	N1a	Presencia tumoral en 1 ganglio regional
	N1b	Presencia tumoral en 2 a 3 ganglios regionales Invade tejidos perirectales sin afectar ganglios regionales
	N1c	Invade tejidos perirectales sin afectar ganglios regionales
	N2	Afectación de 4 o más ganglios linfáticos
	N2a	Afectación de 4 a 6 ganglios linfáticos
N2b	Afectación de más de 7 ganglios linfáticos	
METÁSTASIS	M0	Ausencia de metástasis
	M1	Presencia de metástasis a distancia
	M1a	Metástasis en un órgano
	M1b	Metástasis en más de un órgano o partes distantes del peritoneo

¹ T indica el grado del tumor incluyendo desde la displasia de alto grado (*in situ*) hasta el tumor metastásico. N hace referencia a la invasión de los ganglios por las células tumorales, que puede ser nula (N0) o bien llegar a afectar más de 7 ganglios (N2b). M hace referencia a la presencia o ausencia de metástasis, M0 indica que el tumor no invadió otros órganos y M1 indica que las células tumorales se encuentran afectando otros órganos.

Tabla 3. Estadios tumorales según la clasificación TNM.¹

ESTADIO	TNM		
I	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1-T2	N1/N1c	M0
	T1	N2a	M0
IIIB	T3, T4a	N1	M0
	T2, T3	N2a	M0
	T1, T2	N2b	M0
IIIC	T4a	N2a	M0
	T3, T4a	N2b	M0
	T4b	N1, N2	M0
IVA	Todos los T	Todos los N	M1a
IVB	Todos los T	Todos los N	M1b

¹ Los estadios tumorales I, II, III y IV se homologaron según sus características con las clasificaciones Dukes y TNM. Tomado y adaptado de *Robbins and Cotran, Pathologic Basis of Disease, 9th Edition, 2015*.

El grupo CMS1 comprende a la mayoría de los tumores con MSI, con expresión alterada de las proteínas involucradas en la reparación de daño en el ADN, con hipermetilación extendida, mutaciones en el gen BRAF, sobreexpresión de genes asociados a infiltración inmune y fuerte activación de las vías de evasión del sistema inmunológico. Este grupo recibe el nombre de *CMS1-MSI immune*⁴⁴ (Tabla 4). Los grupos CMS2-CMS4 son los que presentan mayor inestabilidad cromosómica. CMS2 con el mayor número de ganancias en oncogenes y pérdidas en genes supresores de tumores, con diferenciación epitelial y una fuerte activación de intermediarios de las vías WNT y MYC, ambas vinculadas a la carcinogénesis CR. Este grupo fue denominado en consecuencia *CMS2-Canonical*⁴⁴ (Tabla 4). El grupo CMS3 incluye tumores enriquecidos en genes estrechamente asociados a múltiples vías metabólicas, en línea con una alta tasa de mutación del gen KRAS, descrito como un inductor potente de la adaptación metabólica⁴⁵. Por estas razones el grupo recibe el nombre de *CMS3-Metabolic*. Finalmente, los tumores *CMS4-Mesenchymal* muestran una clara sobre-

regulación de genes implicados en la transición de epitelial a mesenquimal y vinculados con: la activación de la vía de señalización del TGF- β , la angiogénesis, la remodelación de matriz extracelular y el complemento de la respuesta inflamatoria. A su vez, este grupo presenta el peor pronóstico⁴⁴.

Esta nueva taxonomía ha sido propuesta para una estratificación molecular más apropiada del CCR con una mejor perspectiva para las futuras investigaciones en esta enfermedad, que traslacionalmente permitan el desarrollo de terapias cada vez más eficientes⁴⁴.

Tabla 4. Taxonomía propuesta para el CCR.¹

CMS1 MSI Immune	CMS2 Canonical	CMS3 Metabolic	CMS4 Mesenchymal
14%	37%	13%	23%
MSI, CIMP alta, Hipermutación	SCNA alto	MSI y MSS mezclados, SCNA bajo, CIMP bajo	SCNA alto
Mutaciones en BRAF		Mutaciones KRAS	
Infiltración y activación inmune	Activación WNT y MYC	Desregulación metabólica	Infiltración estromal, activación TGF- β , angiogénesis
Peor supervivencia después de una recaída			Peor tiempo libre de recaída y de supervivencia

¹ Se reflejan las diferencias más significativas entre los subtipos moleculares basados en perfiles de expresión génica. CIMP, fenotipo metilador de islas CpG; MSI, inestabilidad de microsatélites; SCNA, alteración en el número de copias somáticas.

2.8 Tratamiento

2.8.1 Generalidades del tratamiento del CCR

El tratamiento contra el CCR se basa fundamentalmente en cirugía y terapia adyuvante (después de la cirugía), que puede consistir en quimioterapia, radioterapia y terapia dirigida. En pacientes con CR, se administra terapia neoadyuvante, como primer paso para reducir el tamaño del tumor antes del tratamiento principal que generalmente consiste en cirugía. El tratamiento neoadyuvante consta principalmente de radioquimioterapia (RQT).

Los tumores que se encuentran en el primer estadio son removidos mediante cirugía. Los pacientes que poseen tumores de colon en estadios II o III son tratados mediante la remoción quirúrgica del tumor y terapia adyuvante (Figura 8). En los pacientes que

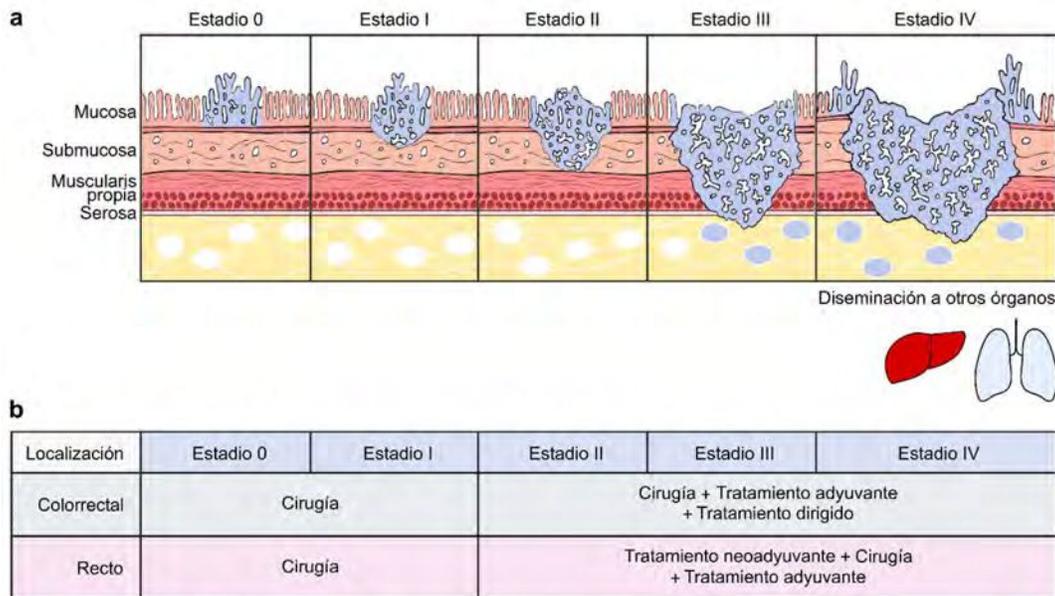


Figura 8. Progreso tumoral del CCR y su tratamiento. a) Esquema que representa el progreso del desarrollo de un tumor colorrectal. El grado de profundidad que alcanza la masa tumoral y su capacidad de invadir los nódulos linfáticos de la submucosa u órganos más distantes a través del proceso de metástasis, determinan el estadio tumoral, importante para establecer el tratamiento de la enfermedad. **b)** Tratamiento del CCR. En los estadios más tempranos de la enfermedad, cuando el tumor no se extiende más allá de la mucosa el mismo se extirpa mediante cirugía. A partir del Estadio II, el paciente recibe quimioterapia luego de la cirugía (adyuvante). Por su ubicación anatómica, los tumores en el recto pueden ser expuestos a radiación y a quimioterapia antes de la cirugía (neoadyuvancia), lo que favorece una reducción en su tamaño y en su capacidad proliferativa.

En los pacientes con CR que se encuentran en los estadios II, III o IV se puede administrar tratamiento neoadyuvante como primer paso para reducir el tamaño del tumor (Figura 8). Se han reportado subgrupos de pacientes con CR que mostraron respuesta clínica y patológica completa al tratamiento neoadyuvante⁴⁷. Para estos pacientes, la estrategia denominada *watch and wait* que consiste en el control clínico estricto sin operación, salvo en el caso de que el tumor recidive, se propone con el potencial de evitar la cirugía mayor y en consecuencia preservar el órgano⁴⁸ (Recuadro 1).

2.8.2 Tipos de tratamientos en CCR

Entre las terapias que pueden ser dispensadas a los pacientes con CCR podemos diferenciar dos grandes grupos: la quimioterapia sistémica y las terapias dirigidas (Tabla 5).

Dentro de la quimioterapia sistémica se encuentra el tratamiento con 5-Fluorouracilo (5Fu), una molécula que inhibe la síntesis de nucleótidos, por inhibición de la Timidilato Sintasa (TS). La TS es la enzima que provee el único recurso *de novo* de timidina,

necesario para la síntesis y reparación de ADN⁶⁰. Además, el 5Fu, se incorpora en el ADN y el ARN interrumpiendo su procesamiento y normal funcionamiento⁵⁹.

Recuadro 1: Protocolo *Watch and wait*.

La estrategia clínica denominada *watch and wait* apareció luego de que se reportaran subgrupos de pacientes con CR que mostraron respuesta clínica y patológica completa al tratamiento de RQT neoadyuvante⁴⁷. El método se basa en control clínico estricto sin operar a los pacientes, salvo en el caso de que el tumor recidive, y se propuso como una alternativa que permita evitar la cirugía mayor y, en consecuencia, preservar el órgano⁴⁹. Habr-Gama y colegas, han reportado estudios pioneros con un 26% y hasta un 38% de pacientes con respuesta clínica completa; de los cuales un 6% mostró recurrencia local en el lumen del recto^{48,50,51,52}. Estudios posteriores, mostraron respuesta completa aproximadamente en el 15% de los pacientes, con subsiguiente reaparición local de entre el 5 y el 60%^{53,54,55,56}.

Se han postulado diversas hipótesis que podrían explicar las diferencias entre los distintos estudios respecto a la respuesta neoadyuvante de los tumores, que van desde variaciones en el tiempo transcurrido desde el inicio de la RQT hasta la toma de decisión multidisciplinaria del seguimiento *watch and wait*, la dosis de radioterapia y/o causas moleculares intrínsecas del tumor que definen subtipos moleculares con grados de respuesta diferencial^{57,58}. Hasta el momento continúan siendo hipótesis, por lo que es necesario profundizar a fin de que la estrategia *watch and wait* pueda ser incorporada de manera segura y confiable en la práctica clínica estándar, como alternativa a la cirugía mayor en pacientes con CR.

El 5Fu es el principal carcinostático utilizado en el CCR⁶¹. Además, se ha utilizado con buenos resultados en diversas localizaciones tumorales, entre ellas, cáncer de mama, pulmón, cabeza y cuello, esófago, estómago, páncreas, hígado, colon, recto y ano⁴⁶. La tasa de respuesta al 5Fu en CCR avanzado se restringe, sin embargo, al 10-15% de los pacientes^{61,62}. Por esta razón, se han desarrollado otras drogas como la capecitabina, una fluoropirimidina oral que se absorbe a través del tracto GI, se metaboliza en el hígado y se convierte en 5Fu en las células tumorales. Su conversión en 5Fu la realizan las enzimas encargadas del metabolismo de nucleótidos, las cuales se encuentran altamente expresadas en las células tumorales debido a la elevada tasa replicativa⁶³. Por su efecto selectivo sobre el tumor se ha reportado un menor nivel de toxicidad que el 5Fu, con menores efectos adversos asociados al tratamiento y un menor número de pacientes hospitalizados⁶⁴.

Otros compuestos quimioterápicos son también ampliamente utilizados, como el oxaliplatino, un análogo del platino que se une covalentemente al ADN⁴⁶, o el irinotecán que inhibe la acción de las topoisomerasas⁶⁵.

El 5Fu se comenzó a administrar junto a la leucovorina, un análogo del ácido fólico, debido a que requiere del ácido fólico para ejercer su acción inhibitoria sobre la TS⁶⁴. Por ello, su dispensación junto con leucovorina mejora su efectividad. Posteriormente

se diseñaron y probaron un conjunto de regímenes que combinan a las drogas quimioterápicas antes mencionadas: FOLFOX, se compone de 5Fu, leucovorina y oxaliplatino; FOLFIRI, compuesto por 5Fu, leucovorina e irinotecan; y FOLFOXIRI compuesto por 5Fu, leucovorina, oxaliplatino e irinotecan ([Tabla 5](#)).

Tabla 5. Tipos de terapias aprobadas en CCR.

Tipos de terapias		
Droga	Regímenes	Anticuerpos (Antígenos)
5Fu	FOLFOX	Bevacizumab (VEGF)
Capecitabina	FOLFIRI	Cetuximab (EGFR)
Irinotecan	FOLFOXIRI	Panitumumab (EGFR)
Oxaliplatino	5Fu+Leucovorina	
Leucovorina		

La heterogeneidad a nivel molecular de los tumores colorrectales y la resistencia que suelen presentar a la quimioterapia sistémica, condujo al desarrollo de terapias dirigidas. Las terapias dirigidas se basan en drogas que inhiben la acción de una molécula en específico y en consecuencia una vía de señalización en particular. Así, se desarrollaron y aprobaron para su utilización en el CCR los anticuerpos Bevacizumab, Cetuximab y Panitumumab (terapia mediada por anticuerpos). Bevacizumab actúa inhibiendo la acción del VEGF, mientras que Cetuximab y Panitumumab se unen y bloquean la señalización del EGFR (del inglés: *Epidermal Growth Factor Receptor*) ([Tabla 5](#)).

A pesar de la combinación de terapias sistémicas y dirigidas, sigue existiendo un alto porcentaje de pacientes que muestran resistencia a la terapia. Por ejemplo, se ha demostrado que pacientes que presentan mutaciones en el gen KRAS son resistentes a anticuerpos dirigidos contra el EGFR⁶⁶. Este tipo de hallazgos, en conjunto con el avance en la clasificación de los subtipos moleculares, dio lugar al inicio de un nuevo enfoque en el tratamiento contra el CCR: la terapia personalizada. Esta consiste en la correcta estratificación de pacientes según alteraciones genéticas específicas en genes relevantes para la carcinogénesis colorrectal, lo cual permite una mejor selección de las drogas y los protocolos de tratamiento. Con objetivo de evitar el sobretreatmento y la exposición innecesaria de los pacientes a los efectos adversos de la terapia, la

determinación molecular de las mutaciones presentes en el tumor y en los sitios metastásicos ha tomado un rol clínico preponderante. Aún queda mucho por investigar sobre qué drogas específicas pueden favorecer a pacientes de un tipo molecular u otro.

3 Microambiente tumoral y estrés celular

3.1 Estrés de Retículo Endoplasmático.

Una vez iniciada la malignización tumoral, el rápido crecimiento del tumor con la consecuente acumulación de células y una inadecuada vascularización conducen a un ambiente estresante para las células tumorales, en el que predomina la hipoxia, una limitada disponibilidad de nutrientes y la presencia hostil del sistema inmune a través de procesos inflamatorios^{67,68}. Este escenario activa o desencadena una serie de respuestas de estrés celular en las que el retículo endoplasmático (RE) cumple un rol central⁶⁹.

El RE consiste de una red membranosa que rodea al núcleo y se extiende hacia el citosol; aquí las proteínas que formarán parte del sistema de endomembranas o aquellas que se exportarán al exterior celular son sintetizadas, modificadas post-transcripcionalmente y plegadas en su conformación correcta.

El RE contiene sistemas de control de calidad rigurosos que selectivamente exportan proteínas correctamente plegadas y envían las mal plegadas a degradación proteolítica dependiente de ubiquitina, en un proceso denominado degradación de proteínas asociada al RE (ERAD, de su acrónimo en inglés)⁷⁰.

Diversos factores de estrés afectan la función del RE promoviendo la acumulación de proteínas no plegadas o mal-plegadas, condición denominada estrés de RE. Las células se adaptan al estrés del RE mediante la activación de una vía de transducción de señales llamada UPR (del inglés: *Unfolded Protein Response*). El UPR representa una respuesta de supervivencia a fin de restaurar la función del RE y conservar la homeostasis celular. Si el estrés en el RE persiste las células activan mecanismos que resultan en su muerte programada⁷¹.

3.2 La vía del UPR.

Múltiples perturbaciones pueden causar la acumulación de proteínas mal plegadas en el RE y activar la vía del UPR. Estas condiciones incluyen la hipoxia, la privación de glucosa, el estrés oxidativo, la infección viral, elevados niveles de grasa o colesterol, inflamación y mutaciones en proteínas específicas^{72,73}. La vía del UPR regula la

transcripción y traducción de genes en un intento de restablecer la homeostasis y restaurar las funciones del RE. Estos genes están involucrados en la carga de proteínas al RE, en los controles de calidad del RE, en la autofagia, en la biogénesis de lípidos y en el tráfico vesicular⁷¹. De este modo, el UPR alivia el estrés del RE induciendo genes, como las chaperonas, para aumentar la capacidad de plegamiento de proteínas, sobreexpresando componentes del ERAD para incrementar la degradación de proteínas mal plegadas e inhibiendo la traducción general de proteínas, específicamente la de aquellas que se sintetizan en el RE⁷².

La vía del UPR se conforma de 3 ejes de señalización que parten del RE. Cada eje comienza con la activación de un sensor ubicado en la membrana del RE. Los sensores son tres proteínas integrales de membrana del RE: ATF6 (activador del factor de transcripción 6), PERK (PKR-quinasa como ER) e IRE-1 (proteína que requiere inositol-1) (Figura 9).

La activación de los sensores se produce cuando la chaperona BiP se disocia de ellos. En ausencia de estrés, BiP, se encuentra unida a los sensores inhibiendo la dimerización de los mismos y su activación. Cuando se acumulan proteínas mal plegadas en el lumen del RE, estas se unen a BiP, lo que hace que ésta se disocie de los sensores, los cuales se oligomerizan activando la señal de respuesta⁷³ (Figura 9). La activación del sensor ATF6, activa el transporte del receptor al aparato de Golgi, donde sufre proteólisis para liberar su dominio extracelular. El dominio extracelular, se transloca al núcleo para activar la transcripción de genes asociados a estrés de RE. (Figura 9). IRE1 y PERK se activan por homodimerización y fosforilación. La oligomerización de IRE1 conduce a la activación de su dominio RNAsa que selectivamente procesa el ARNm de Xbp1. La variante generada de Xbp1 modula la expresión de genes asociados al plegamiento, la secreción y la degradación de proteínas (Figura 9). La activación de PERK conduce a la fosforilación del factor iniciador de la traducción eIF2 α , reduciendo la síntesis global de proteínas, y promoviendo la traducción diferencial de ATF4. La acumulación de ATF4 conduce a la activación de CHOP (Figura 9). Ambos factores de transcripción regulan la expresión de un conjunto complejo de genes que determinarán el destino celular. El resultado de la activación del UPR tiene dos efectos bien definidos: supervivencia celular o muerte. Sin embargo, el mecanismo que determina cuál es el destino celular durante el estrés de RE aún no ha sido del todo determinado^{71,72,73,74}.

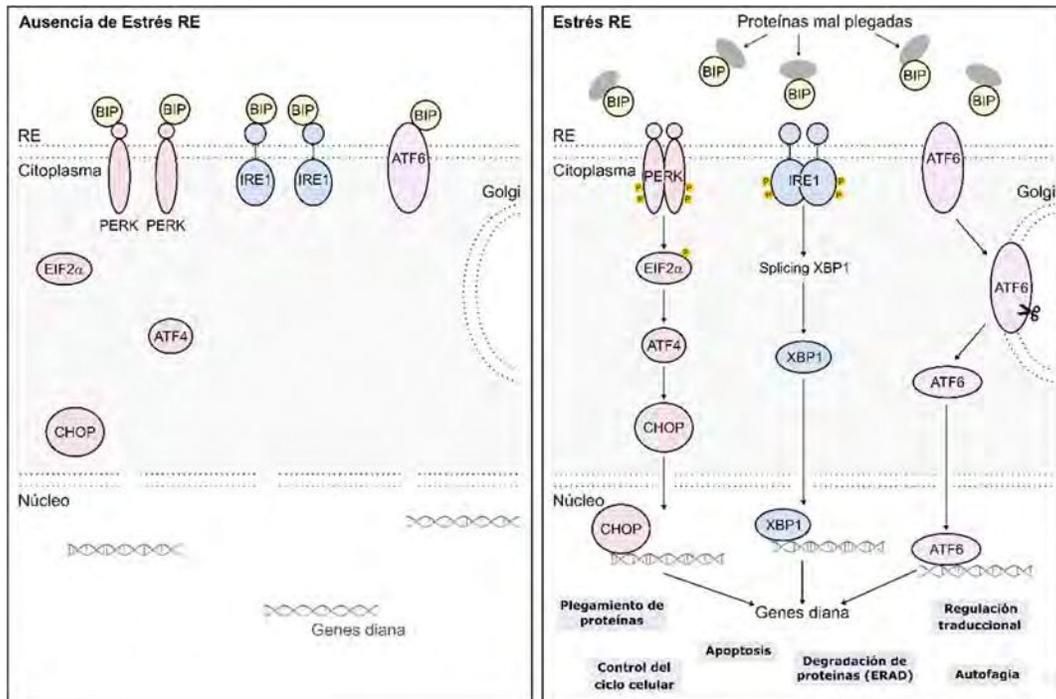


Figura 9. Principales vías del UPR. Ante la presencia de proteínas mal plegadas dentro del RE, BIP se libera de su unión a PERK, IRE1a y ATF6 e induce una serie de eventos que culminan en la activación de la transcripción de diversos genes diana del UPR.

3.3 UPR y cáncer

Las células tumorales están expuestas a condiciones intrínsecas y ambientales, que desencadenan una variedad de mecanismos adaptativos para favorecer la transformación celular y promover la adquisición de características tumorales necesarias para la progresión del cáncer⁷⁵.

Los factores intrínsecos a los que están expuestos los tumores sólidos, como la activación oncogénica, la alteración del número de cromosomas y la capacidad secretora exacerbada, generan una gran demanda en la producción de proteínas provocando estrés de RE⁷⁵. Además, factores extrínsecos como la hipoxia, la privación de nutrientes y la acidosis alteran la función normal del RE, activando también la vía del UPR⁷⁶.

En los tumores, se observa un aumento en la expresión de las moléculas del UPR, que permiten a las células tumorales adquirir un fenotipo resistente al estrés⁷⁵. La sobreexpresión de BiP promueve proliferación, supervivencia, y metástasis⁷⁷. En CCR, de mama, pulmón, vejiga y estómago, su sobreexpresión se asocia a un peor pronóstico y confiere resistencia a un amplio conjunto de agentes terapéuticos⁷⁸. Además, se ha demostrado que la reducción de su expresión sensibiliza a las células tumorales al tratamiento quimioterápico⁷⁹.

3.3.1 Ejes del UPR y cáncer

◆ Eje ATF6

ATF6 se ha asociado a la condición de dormancia celular, proceso por el cual las células detienen el ciclo celular en fase G0/G1 hasta que el microambiente sea óptimo para reactivar su metabolismo y reanudar el ciclo^{80,81}. En un modelo de carcinoma escamoso humano se observó que ATF6 se encuentra constitutivamente activo en células en estado de dormancia y que su silenciamiento reduce la supervivencia celular y el crecimiento tumoral^{75,82}.

◆ Eje IRE1-Xbp1

El eje IRE1-Xbp1 es fundamental para que las células tumorales puedan atravesar condiciones de hipoxia y de privación de glucosa⁸³. En glioblastoma, se ha demostrado que IRE1 promueve el crecimiento, la angiogénesis y la invasión tumoral⁸⁴. En este sentido, conduce la formación de nuevos vasos sanguíneos a través de vías dependientes e independientes del VEGF⁸⁵ (del inglés: *Vascular Endothelial Growth Factor*). La expresión elevada de *Xbp1* en gliomas, tumores de mama triple negativos y leucemia linfoblástica aguda correlaciona con mal pronóstico^{86,87}.

◆ Eje PERK-ATF4-CHOP

El sensor PERK, al activarse, puede desencadenar tanto supervivencia como apoptosis celular⁷⁴. Esta complejidad, da lugar a que su rol en la tumorigénesis sea dependiente de su expresión, el tipo de célula tumoral, el estado de proliferación celular, el microambiente tumoral y el modelo de estudio⁸⁸.

El factor de transcripción ATF4, se encuentra frecuentemente aumentado en células tumorales⁸⁹. En CCR, se ha asociado con la resistencia al tratamiento con 5Fu en condiciones de privación de glucosa⁹⁰. Se demostró que la reducción de la expresión de *ATF4* en células de CCR, produjo la resensibilización a la droga⁹⁰. Además, en tumores de próstata se estableció como un factor esencial para el crecimiento y la supervivencia celular⁹¹.

CHOP es un factor de transcripción que, en condiciones de estrés de RE, puede desencadenar apoptosis celular⁹². En células de CCR, CHOP induce apoptosis ante el tratamiento quimioterápico con drogas análogas a la Rapamicina⁹³. Por otra parte, en cáncer gástrico, la reducción de la expresión de *CHOP* en el tumor correlaciona con un peor pronóstico⁹⁴.

4 El gen RHBDD2

4.1 Familia Romboide

Los genes de la familia romboide constituyen un grupo heterogéneo de proteasas de membrana filogenéticamente conservadas⁹⁵. Rhomboid 1 (Rho1), de *Drosophila melanogaster*, fue el primer miembro descrito de la familia, caracterizado como una proteína de membrana multipaso con actividad proteolítica que posee un rol regulador clave en la vía del EGFR⁹⁶. Desde entonces, y a partir de análisis basados en similitud de secuencias aminoacídicas, han sido identificados numerosos genes romboide⁹⁵ (Figura 10). Muchos de ellos, carecen del dominio catalítico propio de los miembros con actividad proteasa, definiéndose así dos grupos: las proteasas que poseen actividad catalítica, y las pseudoproteasas que carecen del sitio activo proteolítico^{95,96} (Figura 10a).

En humanos, hasta el momento han sido descritos 14 miembros dentro de la familia romboide: cinco proteasas (RHBDL1/2/3/4 y PARL) y nueve pseudoproteasas (iRhom 1/2, Derlin1/2/3, RHBDD2/3, UBAC2 and TMEM115), localizados en su mayoría en membranas del RE, aparato de Golgi o membrana celular⁹⁵ (Figura 10b).

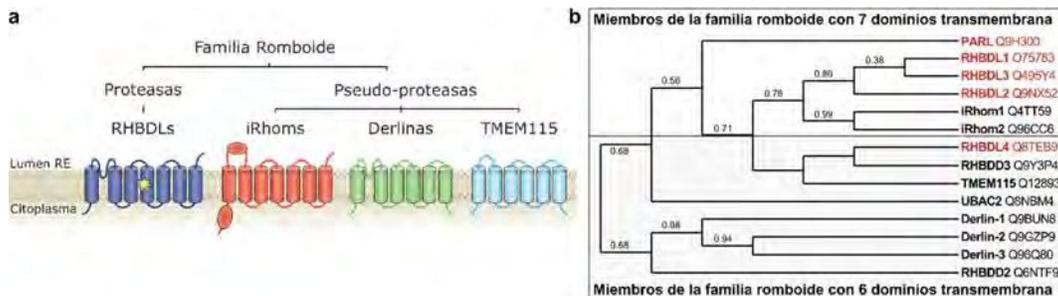


Figura 10. Genes de la familia romboide. a) Topología general de los grupos de proteínas dentro de la familia romboide. Las proteasas, nombradas como RHBDL's, poseen siete dominios transmembrana. Dentro de las pseudoproteasas se encuentran las proteínas iRhoms con siete dominios transmembrana y una cola citoplasmática; las Derlinas, que poseen seis dominios transmembrana con un motivo característico de las proteasas entre el primer y el segundo dominio transmembrana y por último, TMEM115 que posee únicamente los seis dominios transmembrana. b) Filogenia de la familia de proteínas romboide humanas. Se muestra la relación filogenética entre las proteasas (rojo) y pseudoproteasas (negro). En el recuadro superior se encuentran los miembros de la familia que poseen siete dominios transmembrana y en el recuadro inferior quienes poseen seis dominios. Tomado y adaptado de: Adrain C & Freeman M, 2012 y Bergbold et al., 2013.

Ha sido demostrado que los genes de la familia romboide se encuentran involucrados en numerosos procesos biológicos, que van desde señalización celular a través del

EGFR o del TNF (del inglés: *Tumor Necrosis Factor*), hasta respuesta a estrés del RE y apoptosis. También han sido asociados a enfermedades neurodegenerativas y cáncer^{97,98,99,100,101,102}. Sin embargo, aún se desconoce el mecanismo funcional de muchos de ellos, principalmente los pertenecientes a las pseudoproteasas.

No sólo por su relevancia en la biología celular sino también por su implicancia clínica, en los últimos años se ha puesto énfasis en la búsqueda y determinación del rol funcional de los genes romboide.

4.2 Los Romboide y el estrés de RE.

Como se mencionara, los genes romboide han sido asociados a numerosas y diversas funciones moleculares, sin embargo, el hecho de ser proteínas multipaso de membrana y estar principalmente localizadas en RE, el aparato de Golgi o la membrana celular hace que las proteínas romboide compartan en cierto modo funciones asociadas a la vía biosintética secretora. En este sentido, RHBDL4, una romboide proteasa, que se localiza en el RE, ha sido descrita como un componente esencial del ERAD, a través del proceso de ubiquitinización, como así también se lo ha vinculado con la biosíntesis de exosomas y la regulación de apoptosis. De las pseudoproteasas, grupo al que pertenece RHBDD2, se ha demostrado que las iRhom juegan un papel central en la regulación del EGFR promoviendo su degradación a través del ERAD, y alteraciones en su expresión afectarían el desarrollo y crecimiento tumoral.

Las derlinas 1, 2 y 3 han sido también asociadas con el ERAD, aunque el mecanismo molecular aún no ha sido determinado. Por otro lado, se ha demostrado que UBAC2, miembro reciente dentro de las romboide pseudoproteasas, se sobreexpresa bajo estrés de RE, lo que le asigna un rol vital en la homeostasis de las proteínas del RE.

4.3 El gen *RHBDD2*.

En los últimos años se han desarrollado una serie de estudios que permitieron caracterizar por primera vez la relevancia del gen *RHBDD2* (*Rhomboid domain containing 2*) en el cáncer^{103,104,105,106,107,108,109}. Se determinó que *RHBDD2* se haya sobreexpresado en estadios avanzados del cáncer de mama y en metástasis ganglionares (Figura 11a). Mediante análisis *in silico* de perfiles de expresión génica se demostró que la sobreexpresión de *RHBDD2* se correlaciona fuertemente con reducción en la supervivencia, en la supervivencia libre de enfermedad y en el tiempo libre de metástasis en pacientes triple negativos (subtipo molecular con mal pronóstico)¹⁰⁴.

En CCR, se demostró que *RHBDD2* se encuentra sobreexpresado en tumores de estadios avanzados, y que su expresión se ve incrementada al tratar células de cáncer de colon con 5Fu¹⁰⁵ (Figura 11b, c). En el mismo estudio, mediante análisis *in silico* de microarreglos de otros estudios en líneas celulares de cáncer de colon tratadas con 5Fu^{110,111}, se determinó que *RHBDD2* se encuentra entre los genes significativamente desregulados frente al tratamiento con la droga. Esto permitió proponer a *RHBDD2* como un gen sensible al estrés celular causado por el 5Fu.

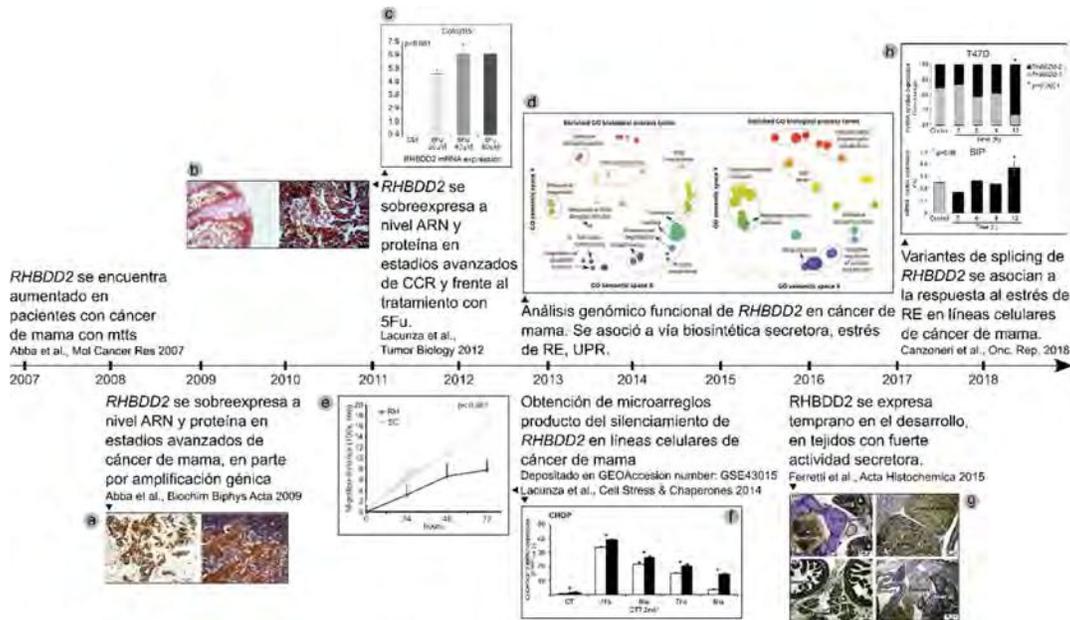


Figura 11. Línea de tiempo de los hallazgos más relevantes sobre el estudio de *RHBDD2* asociado al cáncer. En 2007 se identificó por primera vez al gen *RHBDD2* desregulado en el cáncer de mama, en un grupo de pacientes con metástasis (mtts) ganglionares. En 2009 se demostró que *RHBDD2* se sobreexpresa en estadios avanzados del cáncer de mama (a, izq) y en células metastásicas ganglionares (a, der). En el 2010 se obtuvieron los microarreglos del silenciamiento de *RHBDD2* en células de cáncer de mama. En el 2012 se demostró que *RHBDD2* también se sobreexpresa en estadios avanzados del CCR (b) y que su expresión se induce *in vitro* frente al tratamiento con 5Fu (c). Posteriormente, se determinó que *RHBDD2* estaría asociado a estrés de RE (d). Además se observó que el silenciamiento estable de *RHBDD2* disminuye la migración (e) y aumenta la expresión de genes del UPR, en este caso se muestra *CHOP* (f). *Rhbdd2* fue detectado en etapas tempranas del desarrollo de la rata en tejidos con importante actividad secretora (g). Por último, se estudiaron las variantes de empalme de *RHBDD2* y se observó que su expresión responde al estrés de RE generado por privación de glucosa (h).

Posteriormente, en un análisis de genómica funcional sobre datos de microarreglos en líneas celulares de cáncer de mama silenciadas para la expresión de *RHBDD2*, se estableció que el gen se encuentra asociado a un conjunto de bioprocesos entre los que se destaca la respuesta al estrés del RE y en particular la vía del UPR¹⁰⁶ (Figura 11d). A las células de mama establemente silenciadas para la expresión de *RHBDD2*, se la sometió a estrés de RE con el agente reductor Dithiotreitol (DTT) y se observó que la expresión de genes del UPR (*BIP*, *ATF6*, *IRE1*, *PERK*, *ATF4*, *CHOP* y *CRT*) fue significativamente mayor en comparación con las células control. De este modo, se

demonstró, que la reducción de la expresión de *RHBDD2* en células de cáncer de mama tiene un efecto directo sobre la vía del UPR¹⁰⁶ (Figura 11e, f). *CHOP*, uno de los últimos efectores en la vía del UPR y quien determina el *switch* entre supervivencia y apoptosis¹¹², fue el gen que mostró el mayor incremento en las células silenciadas. Esto indicaría que bajo determinadas condiciones estresantes y en ausencia de *RHBDD2*, la inducción de *CHOP* tendría un efecto pro-apoptótico.

Recientemente, se demostró que *Rhbdd2* se expresa en estadios tempranos del desarrollo embrionario de la rata y que su expresión es alta en tejidos con fuerte actividad secretora¹⁰⁸ (Figura 11g).

Por último, se estudiaron las variantes de empalme de *RHBDD2* y se demostró que una de ellas (la variante 2 del gen) se asocia a un peor pronóstico en tumores de mama. Además, se observó que la expresión de las variantes de *RHBDD2* responden a estímulos de estrés de RE, como la privación de glucosa, y se propuso que el balance de los niveles de expresión de dichas variantes podría promover un fenotipo adaptativo en un microambiente tumoral restrictivo¹⁰⁹ (Figura 11h).



Hipótesis

La sobreexpresión de *RHBDD2* en el CCR proporciona a las células tumorales un fenotipo favorable para su supervivencia y proliferación. En este sentido, su sobreexpresión frente al tratamiento con 5Fu podría proveer a las células un mecanismo de resistencia al tratamiento quimioterápico.

Objetivos

1. Objetivo General I

Establecer un modelo de expresión diferencial de *RHBDD2* para evaluar las consecuencias fenotípicas de la sobreexpresión y el silenciamiento del gen.

1.1 Objetivos específicos:

- ◆ Evaluar el efecto de la sobreexpresión y el silenciamiento de *RHBDD2* sobre los procesos de migración, crecimiento libre de anclaje y proliferación en líneas celulares de cáncer de colon.
- ◆ Evaluar el efecto de la expresión diferencial de *RHBDD2* frente al tratamiento con 5Fu.
- ◆ Analizar la expresión de genes del UPR ante las variaciones de expresión de *RHBDD2*.

2. Objetivo General II

Analizar las variaciones de la expresión de *RHBDD2* en tumores de recto antes y después del tratamiento neoadyuvante.

2.1 Objetivos específicos:

- ◆ Evaluar mediante inmunohistoquímica (IHQ) la expresión de *RHBDD2* en muestras de CR antes y después del tratamiento neoadyuvante.

- ◆ Correlacionar los niveles de expresión de RHBDD2 con el tratamiento, la progresión libre de enfermedad y otras variables clínico-patológicas (estadio, grado de diferenciación, etc.).



1 Aproximación *in silico* al rol de *RHBDD2* en el CCR

1.1 Análisis de coexpresión e identificación de bioprocesos asociados a *RHBDD2* en el contexto del CCR.

Con el objetivo de identificar los procesos biológicos asociados a *RHBDD2* en el contexto del CCR se empleó el principio de asociación por culpabilidad¹¹³ (Recuadro 3). Se empleó la herramienta “Multiexperiment Matrix” (MEM) (<https://biit.cs.ut.ee/mem/>) para obtener datos provenientes de 34 microarreglos asociados a CCR y se identificaron los genes que poseen un patrón de expresión similar al de *RHBDD2* ($R > 0.5$, $p < 0.001$). El análisis involucró un total de 3806 muestras que incluyen tumores colorrectales, tejido normal adyacente al tumor y líneas celulares de CCR (Anexo 1a).

Del listado de genes que coexpresan con *RHBDD2* en CCR, se seleccionaron los primeros 200 genes y se realizó un análisis de enriquecimiento funcional (Figura 12; Anexo 1b). Para ello, se utilizó la aplicación ClueGo v2.5.7 del software Cytoscape v3.8.0^{114,115} y se obtuvieron los procesos biológicos asociados a *RHBDD2*. Los términos ontológicos y las vías de señalización provenientes de *KEGG*, *Reactome* y *Wikipathways* producto del enriquecimiento se organizaron en una red gráfica que interconecta los procesos asociados.

Por otro lado, se determinaron los factores de transcripción (FT) asociados a los 200 genes que coexpresan con *RHBDD2*. Se empleó la herramienta bioinformática DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>), que utiliza la base de datos TFBS de la UCSC, y arroja los factores de transcripción que regulan a los 200 genes incluidos. Se obtuvieron 82 FT, los cuales fueron filtrados para seleccionar exclusivamente aquellos asociados a *RHBDD2*, resultando en un conjunto final de 25 FT (Figura 12). A partir de los 25 FT asociados a *RHBDD2* se realizó un enriquecimiento funcional utilizando, nuevamente, la herramienta ClueGo del software Cytoscape¹¹⁵.

Recuadro 3: Principio de asociación por culpabilidad (*guilt by association*).

Cuando analizamos un conjunto de genes que interaccionan directa o indirectamente entre sí, asumimos que en sus conexiones hay información funcional codificada. Asimismo, entendemos que, para comprender la función de un gen en su totalidad, debemos estudiarlo en el contexto de su red de interacción. El “principio de asociación por culpabilidad” establece que los genes que están asociados o que interactúan tienen más probabilidades de compartir funciones¹¹⁶. Según este principio, los genes que poseen funciones relacionadas, tienden a interactuar con un mismo grupo de proteínas, o bien comparten características como su perfil de expresión génica¹¹⁷. Estudios genómicos a nivel posicional también indican que los genes que comparten patrones de expresión se encuentran asociados¹¹³.

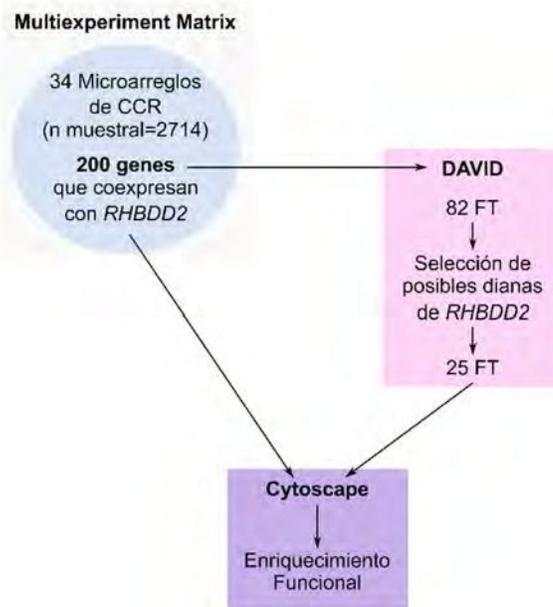


Figura 12. Flujo de trabajo realizado para el enriquecimiento funcional de genes y FT que coexpresan con *RHBDD2*. A partir de los datos provenientes de 34 microarreglos de CCR se seleccionaron 200 genes que coexpresan con *RHBDD2* y se realizó un enriquecimiento funcional. Por otra parte, se obtuvieron los FT asociados a los 200 genes coexpresados y se seleccionaron aquellos que podrían regular la expresión de *RHBDD2*. A partir de los FT se realizó un enriquecimiento funcional.

1.2 Identificación de sitios de unión al promotor del gen *RHBDD2*.

En el análisis *in silico* previo, se detectó que los genes del UPR, *ATF4* y *CHOP*, podrían regular la expresión de *RHBDD2*. Con el objetivo de determinar si estos factores poseen sitios de unión en la secuencia promotora del gen *RHBDD2*, se empleó el software INSECT (<https://bioinformatics.ibioba-mpsp-conicet.gov.ar/INSECT2/>). La herramienta permite predecir la aparición de módulos reguladores Cis y realiza un análisis completo de los FT y los sitios de unión a los FT.

1.3 Análisis de la topología y la secuencia de la proteína *RHBDD2*.

Según modelos de predicción basados en la secuencia aminoacídica los miembros de la familia romboide poseen entre 5 y 7 dominios transmembrana⁹⁵.

A fin de determinar la topología de la proteína RHBDD2 se empleó la herramienta Protter (<http://wlab.ethz.ch/protter/start/>). Asimismo, se analizó la secuencia de aminoácidos para inferir su estructura, identificar motivos de unión, sitios potenciales de fosforilación, etc.

1.4 Perfil de expresión de *RHBDD2* en líneas celulares de cáncer de colon.

Los datos crudos de expresión de ARNseq de los estudios GSE36864 y GSE59857 fueron bajados del repositorio público de datos GEO (www.ncbi.nlm.nih.gov/gds). Se preprocesaron, normalizaron y anotaron a través del empleo y ejecución del script del paquete edgeR¹¹⁸, disponible en Bioconductor¹¹⁹, empleando el lenguaje y entorno estadístico R¹²⁰. Obtenida la matriz de expresión, se identificó la sonda correspondiente al gen *RHBDD2* y se estableció su perfil de expresión a lo largo de las 151 líneas celulares. Según los valores de expresión las líneas fueron ordenadas de menor a mayor y la distribución fue dividida en cuatro grupos mediante el empleo de cuartiles, los que en términos estadísticos constituyen tres puntos que dividen a un set de datos ranqueado en cuatro partes iguales, donde cada grupo constituye un cuarto de los datos. De este modo, a fines comparativos y contrastantes, consideramos sólo las líneas del grupo 1 (expresión Q3, n=37), es decir las líneas celulares de cáncer de colon con menor y mayor expresión de *RHBDD2* a nivel de ARNm, quedando excluidas aquellas con valores medios.

2 Efectos de las variaciones de expresión de *RHBDD2* en células de CCR

2.1 Cultivo celular.

El consorcio del TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) ha demostrado que no existen diferencias genómicas significativas entre el CR y el cáncer de colon de tumores no hipermutados, que constituyen más del 85% de los tumores de colon; a nivel de expresión génica, variaciones en el número de copias, mutaciones y modificaciones epigenéticas¹⁶. Por tal razón, y por cuestiones de disponibilidad, empleamos como modelo celular dos líneas de cáncer de colon: HCT116 y CACO2. Sus principales características se detallan en la [Tabla 6](#).

La línea celular HCT116 fue cultivada en medio DMEM (SIGMA, EEUU) suplementado con 10% de SFB (Bioser, Argentina), 10 U/ml penicilina G, y 10 mg/ml de estreptomycin. La línea celular CACO2 fue cultivada en medio DMEM (SIGMA, EEUU)

suplementado con 20% de SFB (Bioser, Argentina), 10 U/ml penicilina G, y 10 mg/ml de estreptomycin. Ambas líneas celulares fueron mantenidas en estufa de cultivo gaseada a 37°C, en atmósfera húmeda y 5% CO₂.

Tabla 6. Características de las líneas celulares utilizadas.

Línea Celular Características	HCT116	CACO2
Organismo	Homo sapiens	Homo sapiens
Tejido	Colon	Colon
Patología	Carcinoma Colorrectal	Adenocarcinoma Colorrectal
Estadío (Dukes)	D	B
Cultivo	Adherente	Adherente
Mutaciones	KRAS, PI3KCA	-
MSI	Si	No
Expresión RHBDD2	Alta	Baja

Información obtenida de *American Type Culture Collection* (ATCC): <https://www.atcc.org>.

2.2 Desarrollo de constructos para la sobreexpresión y el silenciamiento *in vitro* de *RHBDD2* en líneas celulares de CCR.

La línea celular CACO2 fue utilizada para sobreexpresar *RHBDD2* debido a que posee baja expresión endógena del gen (Figura 19, sección Resultados). Para la sobreexpresión se utilizó un vector pcDNA3.1-TOPO™ conteniendo el ADNc de *RHBDD2* (Figura 13a) (GeneArt, Thermo Fisher Scientific, USA). El vector vacío fue utilizado como control. La transfección se realizó utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen, USA) de acuerdo con las especificaciones del protocolo. Las células transfectadas fueron seleccionadas con 800ug/ml de Geneticina (Thermo Fisher Scientific, USA). A la línea celular CACO2 que sobreexpresa establemente *RHBDD2* se la denominó TOPO-RHBDD2, y será identificada con ese nombre en el resto de la tesis.

Para el silenciamiento de *RHBDD2* se utilizó la línea celular HCT116, con alta expresión endógena del gen (Figura 19, sección Resultados). Las células fueron infectadas utilizando el vector lentiviral pLKO.1-TRC *Cloning Vector* (AddGene, USA) que contiene un inserto de *shRNA* (*small harping RNA*) con la secuencia complementaria al ARN mensajero de *RHBDD2* (Figura 13b). La expresión del vector

produce un *sh-RNA* que dirige la degradación del ARNm de *RHBDD2*. Para el control las células fueron infectadas con el vector conteniendo una secuencia *scramble*. El vector lentiviral fue ensamblado en la línea celular HEK293T, las partículas lentivirales fueron colectadas, tituladas y la dosis infectiva fue calculada. Las células infectadas fueron seleccionadas con Puromicina 1µg/mL (Thermo Fisher Scientific, USA). Las HCT116 silenciadas establemente para la expresión de *RHBDD2* serán nombradas como SH-RHBDD2.

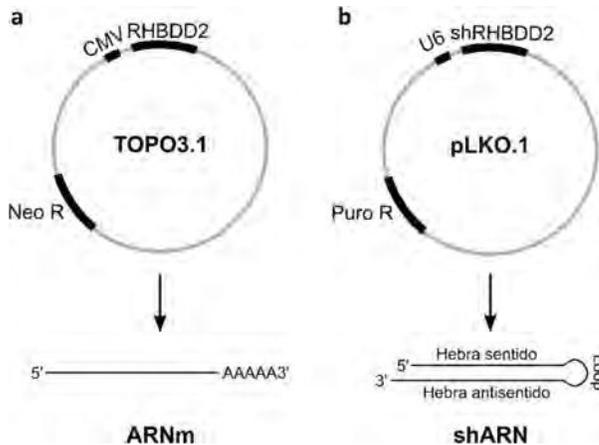


Figura 13. Esquema de los vectores utilizados en la sobreexpresión y el silenciamiento de *RHBDD2*. a) El vector TOPO3.1 con la secuencia del ADNc de *RHBDD2* antecedida por el promotor del citomegalovirus fue utilizado para la sobreexpresión del gen. b) El plásmido pLKO.1, ensamblado en partículas lentivirales, fue utilizado para el silenciamiento de *RHBDD2*.

2.3 Tratamiento con 5Fu.

Se empleó la droga 5Fu (SIGMA, EEUU) utilizando una solución de trabajo de concentración 100µM. Las concentraciones de tratamiento con 5Fu en los ensayos realizados fueron 5, 10 y 20µM. Los tiempos de tratamiento se extendieron entre 6 y 96hs dependiendo de los distintos ensayos.

2.3.1 Efecto del tratamiento con 5Fu sobre la expresión de *RHBDD2* y genes del UPR en líneas celulares de CCR.

Para evaluar el efecto del tratamiento con 5Fu en las líneas celulares CACO2 y HCT116, sobre la expresión de *RHBDD2* y genes del UPR, las células fueron cultivadas en medio completo durante 24hs. Pasadas las 24hs se realizó un cambio de medio y se agregó 5Fu. Las concentraciones utilizadas en los ensayos fueron 5, 10 y 20µM y los tiempos de exposición fueron 6 y 12hs. Luego del tratamiento, las células fueron fijadas en PBS/Formol 4% para analizar mediante inmunocitoquímica (ICQ) o fueron colectadas con TRIZOL (Invitrogen, USA) para el aislamiento del ARN y las proteínas y el posterior análisis mediante real time PCR (RT-qPCR) o Western blot (WB). Cada ensayo se realizó por triplicado.

2.3.2 Sensibilidad de las líneas celulares al 5Fu.

Se evaluó la proliferación de las líneas celulares a las 24, 48 y 72hs posteriores al tratamiento con 5Fu. El tratamiento consistió en la exposición de las células durante 6hs a concentraciones de 5 μ M y 10 μ M de la droga. Transcurridas las 6hs de tratamiento, las células fueron lavadas y cultivadas en medio completo durante 24, 48 o 72hs. Para analizar la proliferación celular, se empleó MTT (Thermo Fisher Scientific, USA), un método colorimétrico y metabólico que determina el número de células viables en proliferación. Las células fueron incubadas durante 3hs con MTT en oscuridad. Luego se retiró el MTT y se colocó una solución de Isopropanol-HCL 0.04M. Se midió la absorbancia a 560-640nm. El ensayo se realizó por triplicado.

2.3.3 Efecto de las variaciones de la expresión de *RHBDD2* sobre la sensibilidad celular al tratamiento con 5Fu.

Para evaluar el impacto de la sobreexpresión y el silenciamiento de *RHBDD2* sobre la sensibilidad celular al 5Fu las líneas TOPO-*RHBDD2*, SH-*RHBDD2* y sus respectivos controles, fueron sembradas en placas de 48 *wells* y cultivadas hasta el 70% de confluencia. Alcanzada la confluencia, las células fueron tratadas con 5 μ M o 10 μ M de 5Fu durante 24, 48, 72 y 96hs. Cumplido el tiempo de tratamiento correspondiente, las células fueron lavadas, incubadas con Tripsina-EDTA (SIGMA, EEUU), centrifugadas y resuspendidas en PBS. Las células viables fueron detectadas por coloración con Azul Tripán y cuantificadas mediante hemocitometría, utilizando la cámara de Neubauer. El ensayo se realizó por triplicado, se calculó la media y el desvío estándar para cada tratamiento.

2.4 Análisis de la expresión de *RHBDD2*, genes del UPR y moléculas de Adhesión a nivel del ARNm mediante RT-qPCR

De cada ensayo celular se extrajo el ARN total y las proteínas mediante el uso de TRIZOL (Invitrogen, USA). Se utilizó 1 μ g del ARN total en la reacción de transcripción reversa. La síntesis de la cadena complementaria de ADNc se realizó mediante el empleo del Kit MLV *Reverse Transcriptase* (Invitrogen, USA). Para la medición de las concentraciones de ARN y ADNc se empleó un espectrofotómetro (Nanodrop, Thermo Scientific, USA).

Mediante RT-qPCR se evaluó la expresión de *RHBDD2*, de los genes de la vía del UPR: *BiP*, *PERK*, *ATF4*, *CHOP*, *ATF6* e *IRE1* y de las moléculas de adhesión *Talin-1*

(*TLN*), *Paxilina* (*PXN*) y *FAK*. Los cebadores fueron diseñados para unificar las condiciones de ciclado en un rango de temperatura de *annealing*: 55-57 °C. La secuencia de los cebadores utilizados se especifica en la [Tabla 7](#).

Tabla 7. Secuencia de los cebadores utilizados en RT-PCR.

Gen	Secuencia del cebador	
RHBDD2	Directa	GGTGTTTGGCATGTTGTG
	Reversa	CGATGGAATAGCAGTAGGTGAG
BiP	Directa	CACAGTGGTGCCTACCAAGA
	Reversa	TGTCTTTTGTGAGGGGTCTTT
PERK	Directa	TCATCCAGCCTTAGCAAACC
	Reversa	ATGCTTTCACGGTCTTGGTC
ATF4	Directa	GTCCCTCCAACAACAGCAAG
	Reversa	CTATACCCAACAGGGCATCC
CHOP	Directa	AGCCAAAATCAGAGCTGGAA
	Reversa	TGGATCAGTCTGGAAAAGCA
ATF6	Directa	TTGACATTTTGGTCTTGTGG
	Reversa	GCAGAAGGGGAGACACATTT
IRE1	Directa	CTCTGTCCGTACCGCCC
	Reversa	GAAGCGTCACTGTGCTGGT
TLN	Directa	AACTAGTGGCCCAAGGGAAG
	Reversa	GCCTTGTACAGCTGCATTGG
PXL	Directa	TGGCATCCTGAGTGCTTTGT
	Reversa	CTCCTTGAAGGTGCCCTTGT
FAK	Directa	AGTAAAATCCAGCCAGCCCC
	Reversa	GACATACTGCTGGGCCAGTT
18S	Directa	GTAACCCGTTGAACCCATT
	Reversa	CCATCCAATCGGTAGTAGCG

Las reacciones de amplificación se realizaron incluyendo 10ng/ul del ADNc, 12.5pmol de los cebadores y *PowerUp SYBR Green Master Mix* (Thermo Scientific, USA) en un volumen final de 20µl. Las condiciones para las reacciones de amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo a 95°C durante 3' y 40 ciclos de 40" a 95°C, 30" a 55°C y 30" a 72°C. Los datos fueron capturados y analizados utilizando el *software AriaMx Real Time PCR* (Agilent). Los experimentos fueron realizados por triplicado y se empleó el gen *18S* como transcripto control y normalizador de la expresión endógena.

2.5 Análisis de la expresión proteica de RHBDD2 y genes del UPR en las líneas celulares CACO2 y HCT116.

2.5.1 Western blot.

De cada ensayo celular, las proteínas fueron extraídas utilizando TRIZOL (Invitrogen, USA) según las especificaciones estándares del reactivo. Se resolvieron en geles de poliacrilamida al 10% y se corrieron mediante electroforesis a 150 Voltios. Posteriormente, fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa Protran®BA (Whatman GmbH, Alemania). Para el bloqueo de los sitios inespecíficos la membrana se incubó con una solución de leche descremada al 5% durante 2hs. Los lavados se realizaron utilizando una solución de PBS-Tween 0.1%. Para la detección de RHBDD2 se utilizó el anticuerpo primario policlonal anti-RHBDD2 (TA306891, Origene, USA; concentración stock: 2µg/µl) en una dilución 1:1000 en PBS 1%. Para la detección de proteínas de la vía del UPR se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales: anti-BiP GRP78 (A-10, Santa Cruz Biotechnology, USA; concentración stock: 4µg/µl) en dilución 1:200 en PBS 1%, anti-PERK (B-5, Santa Cruz Biotechnology, USA; concentración stock: 4µg/µl) en dilución 1:100 en PBS 1% y anti-CHOP GAD153 (B-3, Santa Cruz Biotechnology, USA; concentración stock: 4µg/µl) en dilución 1:1000 en PBS 1%. Como normalizador se empleó ACTINA (ab8227, Abcam, United Kingdom; concentración stock: 1µg/µl) dilución 1:10000 en PBS 1%. Las incubaciones con anticuerpos los primarios se realizaron durante toda la noche a 4°C. Para la detección de RHBDD2 se utilizó un anticuerpo secundario anti-IgG conejo (DAKO, EEUU) diluido 1:2000 en PBS 1% y para la detección de BiP, PERK, CHOP y ACTINA se utilizó un anticuerpo secundario anti-IgA, IgM, e IgG ratón (DAKO, EEUU) diluido 1:1000 en PBS 1%. La visualización de las bandas se realizó en placas radiográficas por revelado en cuarto oscuro (a luz roja) mediante quimioluminiscencia utilizando los reactivos *EasySee Western Blot* (Trans, USA).

2.5.2 Inmunocitoquímica.

Las células fueron sembradas sobre vidrios de 20mm x 20mm, cultivadas durante 24hs con medio completo y luego tratadas con 5Fu. Concluido el período de tratamiento correspondiente fueron fijadas en PBS/Formol 4%. Los vidrios se montaron en portaobjetos para realizar la ICQ.

La actividad de la peroxidasa endógena fue inhibida incubando los cortes en una solución de metanol/H₂O₂ 3%. Los lavados se realizaron con una solución de PBS-Tris 1% durante 5 minutos. Los sitios de unión inespecíficos fueron bloqueados con suero equino diluido 1/10 en PBS/albúmina sérica bovina (BSA) 1%. Para la recuperación

antigénica se incubaron las muestras en buffer citrato de sodio 10mM a 100° C durante 5 minutos. Para la detección de RHBDD2 se incubaron las muestras con un anticuerpo policlonal primario anti-RHBDD2 (Origene, USA; concentración stock: 2µg/µl) en dilución 1:200, durante toda la noche a 4°C. Se incubó con anticuerpo secundario unido a biotina (DAKO, EEUU) durante 30 minutos. Posteriormente se adicionó la estreptavidina unida a peroxidasa (DAKO, EEUU) y finalmente, para la visualización de la inmunotinción se utilizó diaminobencidina como sustrato (DAKO, EEUU). Las células fueron teñidas con hematoxilina (BIOPUR, Argentina). Los controles negativos fueron incubados con PBS en lugar del anticuerpo primario.

Dos observadores independientes evaluaron cada una de las muestras. Las intensidades de tinción del anticuerpo fueron graduadas como ausente (-), leve (+), moderada (++) y fuerte (+++). El porcentaje de expresión fue codificado en los siguientes rangos <5% (0); 5-30% (1); 30-60% (2); 60-100% (3). El patrón de expresión a nivel celular fue clasificado como membrana, citoplásmico, nuclear y mixto en caso de haber combinación entre algunas de las categorías.

2.6 Análisis de la interacción RHBDD2-BiP mediante ensayo de inmunoprecipitación.

La línea celular HCT116 fue utilizada para evaluar la interacción entre RHBDD2 y BiP, debido a que posee elevada expresión endógena de RHBDD2. Las células fueron colectadas con buffer de lisis conteniendo 50nM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 2mM PMSF y 1% NP-40. Para la inmunoprecipitación de RHBDD2 se tomaron 500µl de lisado celular y se incubó durante toda la noche con 5µl del anticuerpo primario policlonal anti-RHBDD2 (TA306891, Origene, USA; concentración stock: 2µg/µl) a 4°C. Para la inmunoprecipitación de BiP se utilizó 5µl del anticuerpo monoclonal GRP78 (A-10, Santa Cruz Biotechnology, USA; concentración stock: 4µg/µl), seguido de un anticuerpo secundario anti IgM (SIGMA, EEUU) que fue incubado toda la noche a 4°C para conjugarse a proteína A Sepharosa-CL-4B (DAKO, EEUU). El aislamiento de los complejos inmunes se realizó utilizando proteína A Sepharosa-CL-4B (DAKO, EEUU). Los 500µl de lisado celular, conteniendo ahora los complejos inmunes, fueron incubados con 50µl de proteína A Sepharosa-CL-4B en agitación durante 1 hora a 4°C. Luego, se centrifugó a 10000g por 30 segundos a 4°C. El pellet resultante fue lavado 3 veces con 500µl de buffer de lisis. Para liberar los complejos inmunes el pellet fue resuspendido en Buffer Laemmli 1X y calentado a 100°C durante 10 minutos. Posteriormente se centrifugó a 10000g durante 5 minutos. Los sobrenadantes conteniendo el inmunoprecipitado fueron analizados mediante SDS-PAGE seguido de WB.

2.7 Efecto de las variaciones de la expresión de *RHBDD2* sobre el fenotipo de las líneas celulares CACO2 y HCT116.

2.7.1 Hemocitometría, análisis de viabilidad celular.

Para evaluar el efecto de la sobreexpresión y el silenciamiento de *RHBDD2* en las líneas celulares CACO2 y HCT116, respectivamente, sobre el crecimiento celular, se realizó un ensayo de viabilidad utilizando la cámara de Neubauer y discriminando las células viables mediante la coloración con Azul Tripán. Se sembraron 50000 células por *well* en placas de 24 *wells* y transcurridos los tiempos 24, 48, 72 y 96hs se realizó el conteo celular utilizando la técnica estándar. El ensayo se realizó por triplicado. Se calculó la media y el desvío estándar para cada tiempo.

2.7.2 Citometría de flujo, análisis de las fases del ciclo celular.

Con el objetivo de evaluar si la sobreexpresión y el silenciamiento de *RHBDD2* afectan el ciclo celular, se analizó el porcentaje de células en cada fase del ciclo mediante citometría de flujo. Las líneas celulares se cultivaron en los medios correspondientes. Alcanzado el 70% de confluencia, las células fueron lavadas, incubadas con Tripsina-EDTA (SIGMA, EEUU), centrifugadas y resuspendidas en medio completo. Se realizó el conteo celular en cámara de Neubauer y un millón de células de cada línea se incubó con 2µl de Vibrant DyeCycle Green (Thermo Fisher Scientific, USA), un colorante de ADN permeable en células vivas. La incubación se llevó a cabo a 37°C durante 30 minutos. El análisis fue realizado utilizando un citómetro de flujo Becton and Dickinson FACSCalibur. Los resultados fueron analizados utilizando el software FlowJo 10.0.

2.7.3 Ensayo de cierre de herida.

Como modo de evaluar los efectos de la expresión de *RHBDD2* sobre la migración celular y las interacciones célula-célula y célula-sustrato, se realizó un ensayo de cicatrización de herida. El mismo consiste en realizar una estría sobre la monocapa confluyente y monitorear la capacidad de las células para cubrir el área libre. Las líneas celulares fueron sembradas en placas de 6 *wells* y cultivadas 24hs hasta alcanzar confluencia. Se realizaron dos estrías por *well* utilizando un tip de 200µl. Se lavó con PBS para remover las células desprendidas en el proceso y se incubó con el medio de cultivo correspondiente. El área de la herida fue capturada tomando imágenes en los

tiempos 0, 6, 24, 30 y 48hs utilizando un microscopio invertido (Olympus, IX71) equipado con una cámara fotográfica (Olympus). Para cuantificar la tasa de migración celular se midió el ancho de la herida tomando los valores de diez puntos a lo largo de la misma. El ensayo se realizó por triplicado. Para cada tiempo se calculó la media y el desvío estándar.

2.7.4 Ensayo de formación de colonias en agar.

Para evaluar la capacidad de crecimiento libre de anclaje de las células se realizó un ensayo de formación de colonias en agar. Sobre placas de 3.5cm se colocó una capa base de 1.5ml de agarosa 0.5% con medio de cultivo. Una vez que la base solidificó, 15000 células fueron resuspendidas en 1.5ml de medio con 0.35% de agarosa y agregadas a la base sólida. Se adicionó 0.5ml del medio completo correspondiente. Las células fueron cultivadas a 37°C en incubadora húmeda durante 20 días y el medio de cultivo fue reemplazado en forma periódica. Las colonias formadas fueron teñidas con Cristal Violeta 0.005% y contadas utilizando un microscopio invertido.

3 Análisis de la expresión de RHBDD2 en tumores de recto frente al tratamiento neoadyuvante

3.1 Muestras y pacientes.

Las muestras fueron obtenidas del Instituto de Oncología “Dr. Ángel Roffo” de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y del Hospital Provincial Neuquén “Dr. Castro Rendon” (Tabla 8). Los protocolos procedimentales y el consentimiento informado de los pacientes fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina (COBIMED) de la Universidad Nacional de La Plata, el Comité de Bioética del Instituto Dr. Ángel Roffo y el Comité de Bioética del Hospital Provincial de Neuquén Dr. Castro Rendon. De cada paciente involucrado en el estudio se dispuso de una biopsia pretratamiento y una muestra post-quirúrgica, obtenida a las 4 -8 semanas post-tratamiento. Las muestras fueron fijadas en PBS/formol 1%, incluidas luego en parafina para la obtención de los tacos y eventual cortes histológicos.

El tratamiento neoadyuvante consistió en: radiación (48-60 Gy) más Capecitabina (Xeloda, metabolizado a 5Fu en el tumor), radiación más 5Fu con Leucovorina, o bien radiación más 5Fu con Leucovorina y Oxaliplatino, según corresponda.

De cada muestra se obtuvieron los datos del informe histopatológico y de progresión de la enfermedad (Tabla 9).

Tabla 8. Descripción del muestreo.

Población de estudio	Pacientes con CCR derivados al Instituto de Oncología "Ángel Roffo" o al Hospital Provincial Neuquén "Dr. Castro Rendon".
Condición	Pacientes con CR con indicación de tratamiento neoadyuvante con RQT.
Intervención	Biopsia/s prequirúrgicas - Cirugía
Inicio del reclutamiento	Abril 2017
Criterio de elegibilidad	<p><i>Criterios de inclusión</i></p> <p>Personas mayores de 18 años de edad. Diagnóstico de adenocarcinomas de recto certificado con biopsia. Disponibilidad del bloque de parafina de la biopsia del tumor primario. Firma del consentimiento informado. Apto para tratamiento de radioterapia. Apto para indicación de quimioterapia base de 5Fu o análogos. Que reciba tratamiento neoadyuvante.</p> <p><i>Criterios de exclusión</i></p> <p>Pacientes con evidencia de diseminación metastásica. Pacientes con contraindicaciones al tratamiento de RQT estándar para CR. Pacientes con contraindicaciones al tratamiento radiante estándar para CR. Embarazo Incapacidad mental</p> <p><i>Criterios de retirada</i></p> <p>No cumplir el tratamiento en su totalidad. Voluntad del paciente</p>
Fecha de finalización	Diciembre 2019
Pacientes reclutados	19
Número de muestras	38

3.2 Inmunohistoquímica.

Con el objetivo de evaluar la expresión de RHBDD2, BiP, PERK y CHOP frente al tratamiento neoadyuvante en CR, los cortes de tejido fueron analizados mediante IHQ. Las muestras fueron desparafinizadas con xilol, rehidratadas con etanol y lavadas con PBS. La actividad de la peroxidasa endógena fue eliminada incubando los cortes en una solución de metanol/H₂O₂ 3%, luego los sitios de unión inespecíficos fueron bloqueados con suero equino diluido 1/10 en PBS/albúmina sérica bovina (BSA) 1%. Para la recuperación antigénica se incubaron las muestras en buffer citrato de sodio 10mM a

100° C durante 5 minutos. Para la detección de RHBDD2 los cortes de tejido se incubaron con un anticuerpo policlonal primario anti-RHBDD2 (Origene, USA; concentración stock: 2µg/µl) en dilución 1:200, durante toda la noche a 4°C. Para la detección de BiP se utilizó el anticuerpo monoclonal primario anti-GRP78 (A-10; Santa Cruz Biotechnology, USA; concentración stock: 4µg/µl) en dilución 1:200, incubado durante toda la noche a 4°C. Para la detección de PERK las muestras se incubaron con un anticuerpo monoclonal primario anti-PERK (B-5; Santa Cruz Biotechnology, USA; concentración stock: 4µg/µl) en dilución 1:200, incubado durante toda la noche a 4°C. Para la detección de CHOP se utilizó el anticuerpo monoclonal primario anti-GAD153 (B-3, Santa Cruz Biotechnology, USA; concentración stock: 4µg/µl) en dilución 1:100, incubado durante toda la noche a 4°C. Se incubó con anticuerpo secundario unido a biotina (DAKO, EEUU) durante 30 minutos. Posteriormente se adicionó la estreptavidina unida a peroxidasa (DAKO, EEUU) y finalmente, para la visualización de la inmunotinción se utilizó diaminobencidina como sustrato (DAKO, EEUU). Los cortes histológicos fueron teñidos con hematoxilina (BIOPUR, Argentina). Los controles negativos fueron incubados con PBS en lugar del anticuerpo primario. Dos observadores independientes evaluaron cada una de las muestras sin conocer a priori a qué tipo corresponde cada espécimen. Las intensidades de tinción del anticuerpo fueron graduadas como ausente (-), leve (+), moderada (++) y alta (+++) (Figura 14). El porcentaje de expresión fue codificado en los siguientes rangos 0-10% (0); 10-40% (1); 40-70% (2); 70-100% (3). El patrón de expresión a nivel celular fue clasificado como membrana, citoplásmico y nuclear, y mixto cuando hubo combinación entre dos de las categorías mencionadas.

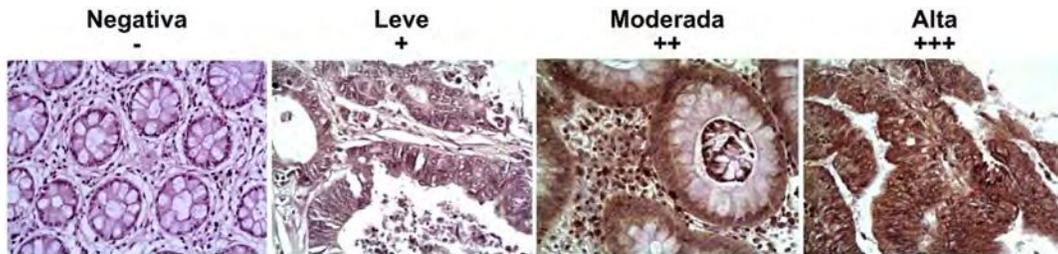


Figura 14. Intensidad de la inmunotinción en muestras tumorales. Basados en la intensidad de la inmunomarcación las muestras fueron codificadas como negativas, leves, moderadas o altas.

Tabla 9. Datos clínico-patológicos de los pacientes.

	n	Media +/- DS
Edad		56.9+/-10.7
Género		
F	4	
M	15	
Grado histológico		
I	5	
II	12	
III	1	
Estadio		
T1	1	
T2	5	
T3	9	
T4	4	

4 Análisis estadístico

En los ensayos celulares, para la determinación de asociación entre las variables cualitativas se emplearon Tablas de Contingencia y se analizaron con el test de Chi cuadrado. La significancia estadística ($p < 0.05$) se estimó mediante la prueba exacta de Fisher. El grado de asociación entre las variables se evaluó mediante los coeficientes de Pearson y Tau b *de Kendall*. Para la comparación de variables cuantitativas se empleó el T Test para muestras independientes y el test de ANOVA. El nivel de significancia se estableció para un $p < 0.05$.

Para el análisis de muestras de tejido de tumores de recto, los datos de IHQ se evaluaron empleando el test de McNemar para datos nominales pareados¹²¹. La asociación entre los valores de expresión proteica y los datos clínicos de progresión fue estimada con el método de Kruskal-Wallis¹²².

La determinación de la significancia estadística se realizó utilizando el entorno informático R¹²⁰ con la utilización de paquetes obtenidos de Bioconductor¹¹⁹.



1 Aproximación al rol funcional de *RHBDD2* en el contexto del CCR

1.1 El análisis de enriquecimiento funcional de genes que coexpresan con *RHBDD2* en el CCR identifica procesos biológicos relacionados al tráfico de membrana, las adhesiones focales y vías asociadas al estrés de RE.

En un estudio previo basado en el análisis de datos de microarreglos en líneas celulares de cáncer de mama demostramos que *RHBDD2* estaría vinculado a la vía del UPR y otros procesos asociados a estrés de RE. Con el objetivo de investigar si esta asociación se mantiene en el CCR se realizó un análisis de coexpresión. Para ello se empleó la herramienta MEM. El análisis involucró 34 estudios de microarreglos, que comprenden un total de 2714 muestras, que incluyen tumores colorrectales, tejido normal y líneas celulares de CCR ([Anexo 1.1](#)). Se estableció como criterio de inclusión, los 200 genes más fuertemente coexpresados con *RHBDD2*, a lo largo de todos los estudios ($R > 0.5$, $p < 0.001$, [Anexo 1.2](#)). El análisis de enriquecimiento funcional del listado de genes coexpresados, determinó una red de 12 grupos funcionales ($p < 0.0001$, [Figura 15](#)), representados por términos provenientes de las bases de datos de ontología génica: *The Gene Ontology Resource (GO)*, *Uniprot-GOA-EBI*, *KEGG*, *Reactome* y *Wikipathways*. Los principales términos incluyeron Tráfico de Membrana ($p = 1.9 \times 10^{-13}$), Transporte Mediado por Vesículas ($p = 1.3 \times 10^{-7}$), Adhesión Focal ($p = 2.1 \times 10^{-5}$), Unión a Cadherinas ($p = 2.2 \times 10^{-4}$), Retención de proteínas en lumen del RE ($p = 4.6 \times 10^{-4}$) y Autofagia ($p = 4.5 \times 10^{-5}$), entre otros ([Figura 15](#)).

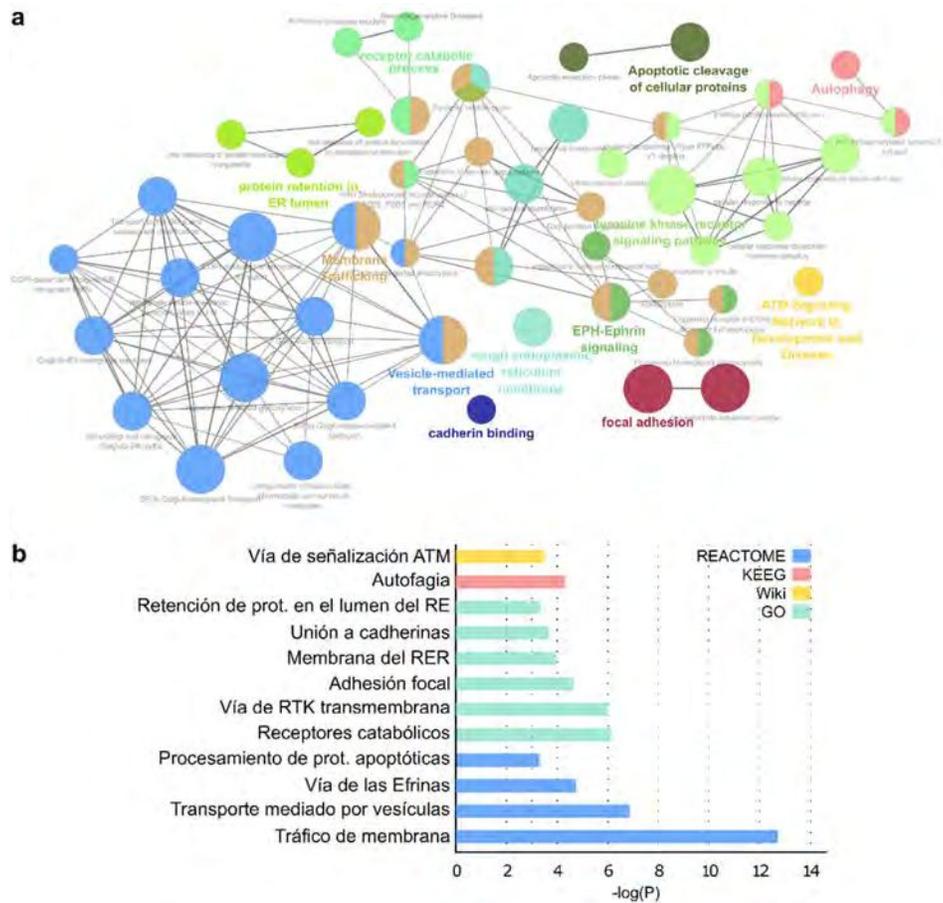


Figura 15: Enriquecimiento funcional de genes que coexpresan con *RHBDD2* en CCR. Se seleccionaron los top 200 genes que correlacionan con el perfil de expresión de *RHBDD2* en 34 microarreglos de CCR y se analizaron para capturar los procesos biológicos asociados a *RHBDD2*. **a)** Los términos ontológicos (GO) sobrerrepresentados y las vías de señalización provenientes de KEGG, Reactome y Wikipathways se muestran representados en un esquema de red de nodos (círculos) y aristas (líneas o enlaces de asociación entre nodos). Los términos que denominan cada nodo se encuentran en idioma inglés. Los términos que asignan a cada *cluster* o grupo (n=12) se hallan resaltados en el color correspondiente. **b)** Grafico de barras en el que se indican los términos biológicos más significativos según el recurso ontológico, indicado en colores, al que pertenecen ($p < 0.001$).

De un modo similar, se evaluaron los FT que estuvieran asociados a los 200 genes seleccionados, según TFBS-UCSC. Se identificó un total de 82 FT ($p < 0.05$, Anexo 2.1), de los cuales se seleccionaron aquellos para los que *RHBDD2* fuera un gen diana, obteniéndose un total de 25 FT (Anexo 2.2). El enriquecimiento funcional de estos 25 genes mostró 8 grupos funcionales ($p < 0.001$), entre los que se destaca la vía del UPR ($p = 2.5 \times 10^{-5}$), Mitofagia (Autofagia; $p = 1.3 \times 10^{-5}$) y Adipogénesis ($p = 4.2 \times 10^{-12}$), entre otros (Figura 16).

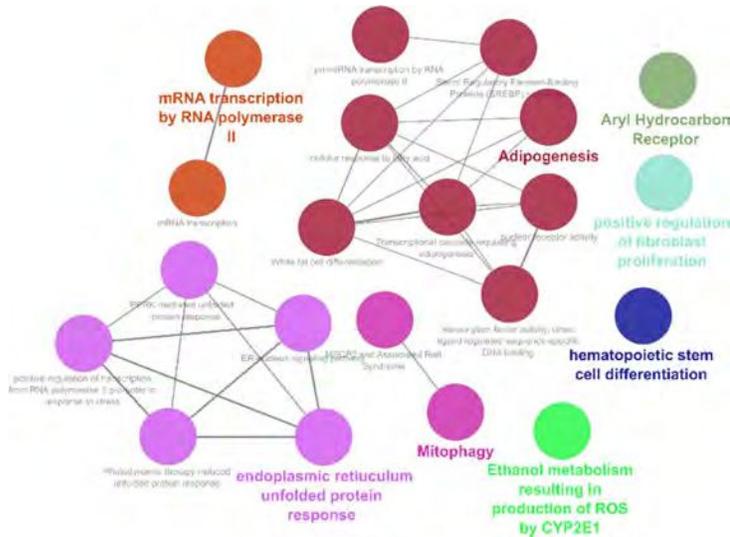


Figura 16: Enriquecimiento funcional de los factores de transcripción asociados a *RHBDD2* en CCR. Se identificaron ocho grupos en el enriquecimiento funcional de los factores de transcripción que coexpresan con *RHBDD2* en CCR ($p < 0.001$). Los términos asociados fueron: Respuesta a las Proteínas Mal Plegadas en el RE, Adipogénesis, Mitofagia, Transcripción Mediada por la ARN Polimerasa II, Regulación de la Proliferación de Fibroblastos, entre otros.

1.2 La estructura y topología de *RHBDD2* revela dominios asociados a la unión de ligandos específicos.

Los miembros de la familia romboide constituyen proteínas de membrana multipaso, con 5 a 7 dominios transmembrana. El análisis bioinformático de la topología y secuencia de aminoácidos de *RHBDD2* predijo 5 dominios transmembrana y un largo dominio o cola citoplasmática rica en prolinas en el extremo C-terminal (Figura 17). En la misma se identificó la presencia de motivos de unión *Src-homology 3* (SH3), no canónicos de Clase I (PXXP) y Clase II (PXXPXXXP), los cuales reconocen tramos cortos de péptidos (denominados motivos lineales) con afinidad y especificidad moderadas, y varios sitios putativos de fosforilación, lo que sugiere que esta región cumpliría un rol dinámico en la unión de ligandos específicos, ya sea para favorecer su transporte o su retención en el orgánulo.

En conjunto, estos resultados indican que *RHBDD2* estaría asociado a la respuesta a estrés de RE y según sus características estructurales podría actuar como un clasificador de proteínas durante el transporte de las mismas, contribuyendo con la configuración del fenotipo final de respuesta al estrés.

2 Expresión de *RHBDD2* en células de cáncer de colon

2.1 Análisis de la expresión de *RHBDD2* en líneas celulares de cáncer de colon.

Con el objetivo de determinar el nivel de expresión de *RHBDD2* en las líneas celulares de cáncer de colon, se analizaron datos de ARNseq de dos estudios

preexistentes (GSE36864 y GSE59857) que involucran un total de 151 líneas celulares de cáncer de colon. Los datos crudos fueron pre-procesados, normalizados y anotados. Obtenida la matriz de expresión, se identificó la sonda correspondiente al gen *RHBDD2* y se estableció su perfil de expresión a lo largo de las 151 líneas celulares. Según los valores de expresión las líneas fueron ordenadas de menor a mayor y la distribución fue dividida en cuatro grupos mediante el empleo de cuartiles, los que en términos estadísticos constituyen tres puntos que dividen a un set de datos ranqueado en cuatro partes iguales, donde cada grupo constituye un cuarto de los datos. A fines comparativos y contrastantes, consideramos sólo las líneas del grupo 1 (expresión Q_1, $n=37$) y las del grupo cuatro (expresión >math>Q_3</math>, $n=37$), es decir las líneas celulares de cáncer de colon con menor y mayor expresión de *RHBDD2* respectivamente, quedando excluidas aquellas con valores medios (Figura 18).

De acuerdo a los resultados de este análisis se seleccionaron como modelo de estudio las líneas celulares CACO2 y HCT116. Las CACO2 se ubican entre las líneas con menor expresión de *RHBDD2*, mientras que las HCT116 se encuentran en el grupo de las líneas con mayor expresión del gen (Figura 18).

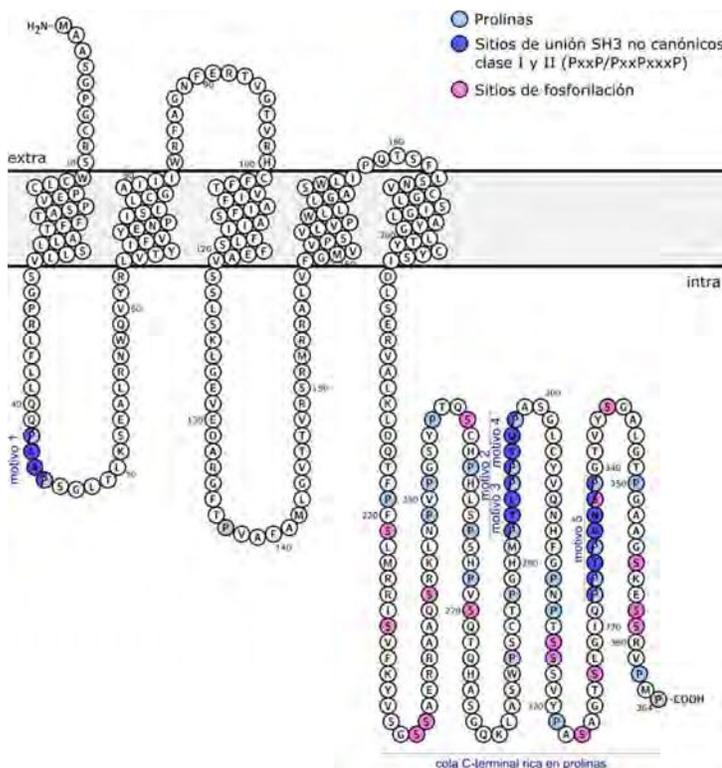


Figura 17: Secuencia y topología de la proteína RHBDD2. Se observa la presencia de 5 dominios transmembrana y una larga cola citoplasmática rica en prolinas. Se detectaron, además, cinco motivos de unión SH3 característicos de interacciones proteína-proteína.

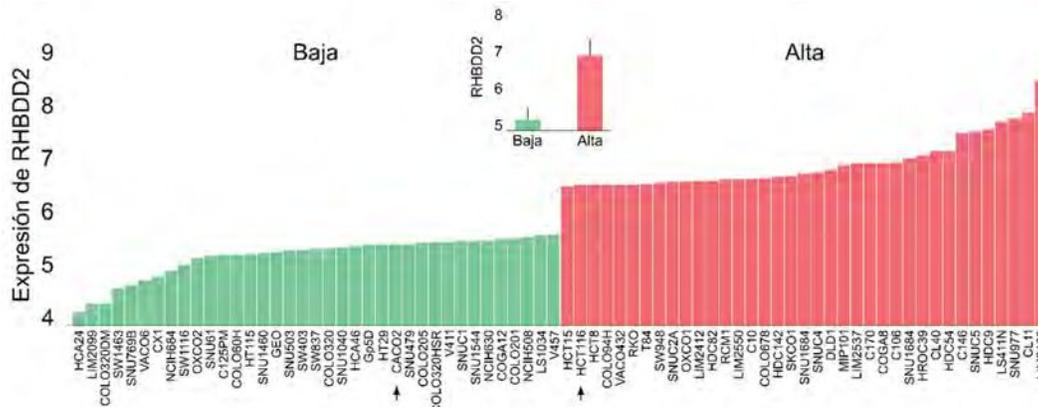


Figura 18: Expresión de *RHBDD2* en 151 líneas celulares de cáncer de colon. Se graficó el nivel de expresión de *RHBDD2* en los cuartiles extremos de la distribución de las 151 líneas celulares analizadas. En verde se observan las líneas celulares con baja expresión de *RHBDD2* y en rojo las que poseen mayor expresión del gen. Las CACO2 y las HCT116 se indican con flechas en la parte inferior de la imagen.

Coincidente con el análisis *in silico* se determinó que la expresión endógena del gen varía significativamente ($p < 0.05$) entre ambas líneas, mostrando mayor expresión en las HCT116 respecto de las CACO2 (Figura 19).

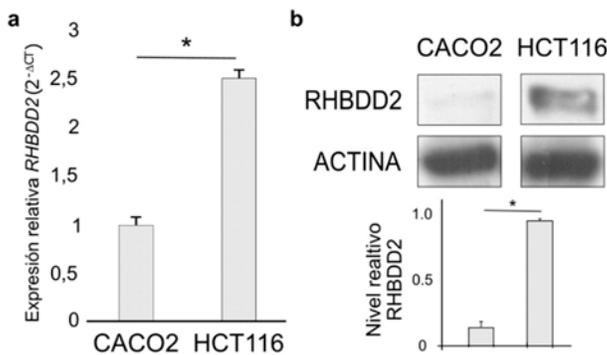


Figura 19: Expresión de *RHBDD2* en las líneas celulares CACO2 y HCT116. a) Expresión transcripcional de *RHBDD2*. Se observa mayor expresión del gen en las HCT116 respecto de las CACO2. b) Niveles de expresión proteica de *RHBDD2* detectados mediante WB. La expresión de la proteína en las HCT116 fue significativamente mayor que la expresión en las CACO2. * $p < 0.05$.

2.2 Expresión de *RHBDD2* frente al 5Fu en las líneas celulares CACO2 y HCT116.

Resultados previos de nuestro grupo demostraron que *RHBDD2* se induce frente al 5Fu en las células COLO205¹⁰⁶. En la presente tesis se evaluó su respuesta en las líneas celulares CACO2 y HCT116, seleccionadas como modelos de estudio.

Los resultados a nivel transcripcional indicaron una inducción transitoria de *RHBDD2* en ambas líneas, con un pico de expresión a las 6hs-10 μ M y 12hs-5 μ M en las CACO2 y HCT116, respectivamente (Figura 20a). El aumento de *RHBDD2* fue evidenciado también a nivel de proteína en ambas líneas celulares, a una dosis de 5 μ M-12hs (Figura 20b).

Al evaluar la sensibilidad de ambas líneas celulares al 5Fu, los resultados indicaron una asociación negativa con la tasa de proliferación: las HCT116, más proliferativas que las CACO2, mostraron mayor sensibilidad al tratamiento con 5Fu ($p < 0.01$; Figura 20c).

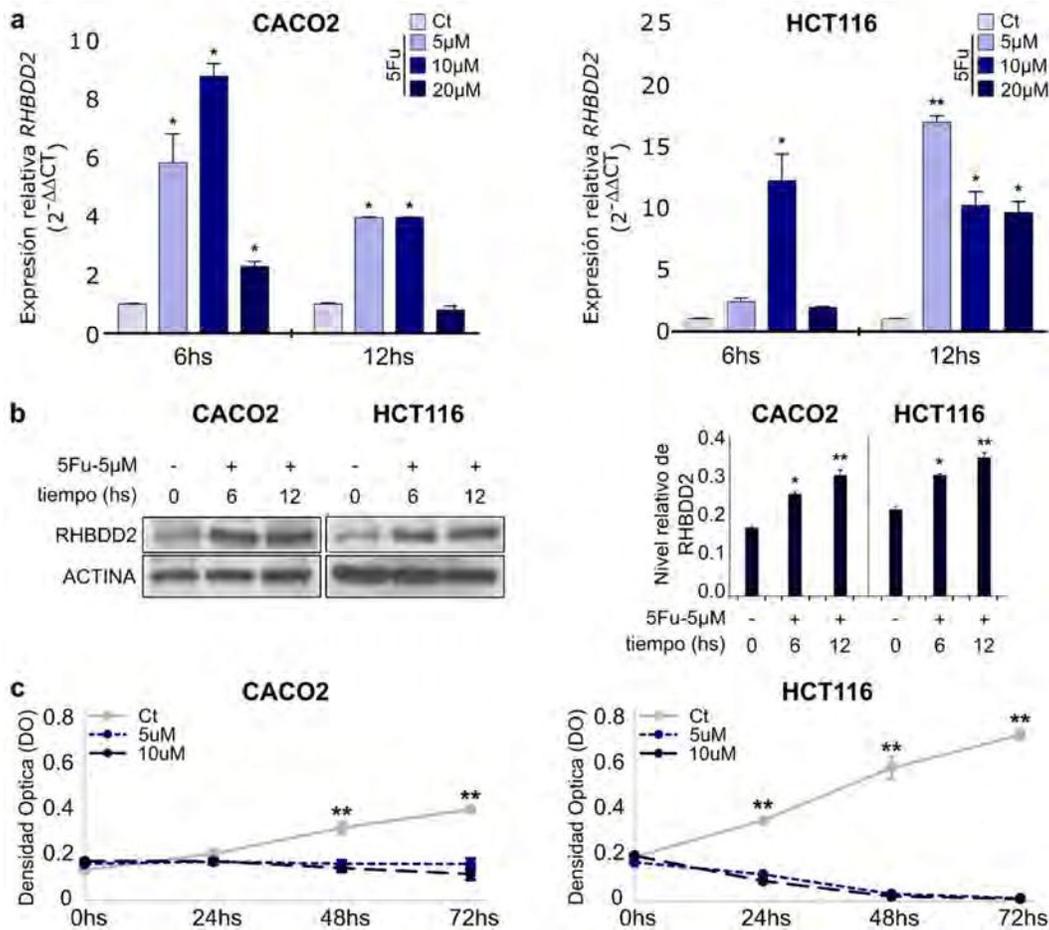


Figura 20: Expresión de RHBDD2 frente al tratamiento con 5Fu en células de CCR. a) Resultados obtenidos mediante RT-qPCR. Se observa un aumento significativo de RHBDD2 en ambas líneas celulares frente al 5Fu. En las CACO2 se evidencia una inducción temprana que alcanza su máximo con 10μM-6hs de 5Fu y decae a tiempos y dosis mayores. En las HCT116, se observa una respuesta más tardía, con un pico de expresión en 5μM-12hs de tratamiento. b) Resultados obtenidos mediante WB. Se observa un aumento significativo de la proteína a las 6 y 12hs de tratamiento con 5Fu 5μM en ambas líneas celulares. c) Las células fueron tratadas durante 6hs con 5Fu, transcurrido el tratamiento se evaluó la viabilidad celular. La línea celular HCT116 mostró una mayor sensibilidad al tratamiento con 5Fu que las CACO2. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$.

Mediante ICQ se evaluó el patrón de expresión de RHBDD2 (Figura 21). En ambas líneas se evidencia el aumento de la proteína frente a dosis y tiempos crecientes de 5Fu. Este incremento se vio acompañado de cambios notables en la forma y el tamaño de las células, posiblemente como resultado de las condiciones estresantes generadas por la droga (Figura 21). En las células control la expresión de RHBDD2 se restringió a la periferia del núcleo, pero en las tratadas, su expresión se extendió centrifugamente

hacia todo el citoplasma, alcanzando incluso las proyecciones citoplasmáticas emitidas por estas células (Figura 21). El patrón característicamente granular y su distribución recuerdan a un transporte vesicular (Figura 21).

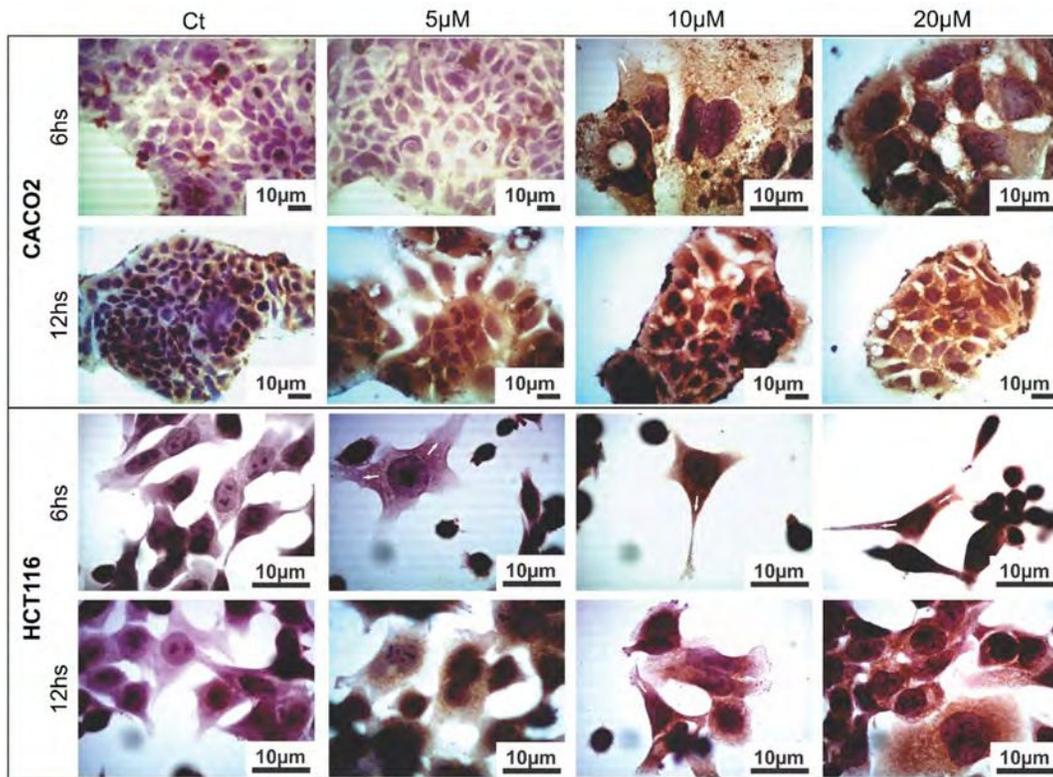


Figura 21: Expresión de RHBDD2 frente al 5Fu en las CACO2 y HCT116 evaluada mediante ICQ. Las líneas celulares CACO2 y HCT116 fueron tratadas con 5, 10 y 20 μ M de 5Fu durante 6 y 12hs. Se observa un aumento de la expresión de RHBDD2 acompañado de cambios morfológicos significativos en las células. La distribución de la proteína se extiende desde la periferia del núcleo hasta las proyecciones citoplasmáticas de las células estresadas, con un patrón granular (flechas blancas).

En conjunto, estos resultados demuestran la asociación de la expresión de *RHBDD2* y el tratamiento con 5Fu en líneas celulares de cáncer de colon. Además, se pudo observar que los cambios morfológicos de las células provocados por el agente estresante están acompañados por un aumento en la expresión de *RHBDD2*, lo que sugiere que, junto con la inducción de su expresión, varios procesos se ven afectados, impactando en la dinámica del citoesqueleto y en las propiedades de adhesión de las células.

3 La sobreexpresión y el silenciamiento de *RHBDD2* poseen efectos opuestos sobre la adhesión, la migración, la proliferación y la resistencia al tratamiento con 5Fu

3.1 Desarrollo de constructos para la sobreexpresión y silenciamiento de *RHBDD2* en líneas celulares de cáncer de colon.

Con el objetivo de evaluar las consecuencias fenotípicas y moleculares de la sobreexpresión y el silenciamiento de *RHBDD2*, se desarrollaron dos modelos *in vitro* contrastantes. Por un lado, se generó la línea celular CACO2 con sobreexpresión estable de *RHBDD2* respecto a su control (Ct), y por otro, la línea HCT116 con silenciamiento estable de la expresión de *RHBDD2* respecto a su Ct. Los modelos fueron validados mediante RT-qPCR, WB, e ICQ (Figura 22).

3.2 Efecto de las variaciones de la expresión de *RHBDD2* sobre la migración celular.

Para evaluar los efectos de la sobreexpresión y el silenciamiento de *RHBDD2* sobre la migración celular en células de cáncer de colon, se realizó un ensayo de cierre de herida. Las células TOPO-*RHBDD2* mostraron una mayor velocidad de cierre de la herida que las Ct ($p < 0.01$; Figura 23). El fenómeno opuesto se observó en las SH-*RHBDD2* que mostraron una menor capacidad migratoria que sus respectivos Ct ($p < 0.01$; Figura 23). Las diferencias fueron significativas en todos los tiempos evaluados (Figura 23). En consecuencia, la sobreexpresión de *RHBDD2* provocó un aumento en la capacidad migratoria de las células de cáncer de colon, mientras que su silenciamiento la redujo.

3.3 Efecto de las variaciones de la expresión de *RHBDD2* sobre el crecimiento libre de anclaje.

La capacidad de exhibir un crecimiento celular independiente del anclaje (capacidad de formación de colonias en medios semisólidos), es considerada una característica fundamental en la carcinogénesis, debido a que se relaciona con la agresividad de las células tumorales *in vivo*, y su potencial tumorigénico y metastásico, y a que se la utiliza como un marcador para la transformación *in vitro*. Para evaluar si las variaciones en la expresión de *RHBDD2* afectan el crecimiento libre de anclaje se realizó un ensayo de formación de colonias en agar.

La sobreexpresión de *RHBDD2* dio como resultado un mayor crecimiento independiente del anclaje ($p < 0.01$; [Figura 24](#)). Se observó un aumento en el número y en el tamaño de las colonias formadas, incluso considerando la baja capacidad clonogénica mostrada por las CACO2 en el periodo de tiempo evaluado. Por el contrario, al silenciar *RHBDD2* en las HCT116, que tienen una alta capacidad para formar colonias, se observó una reducción dramática en el crecimiento independiente del anclaje ($p < 0.001$; [Figura 24](#)).

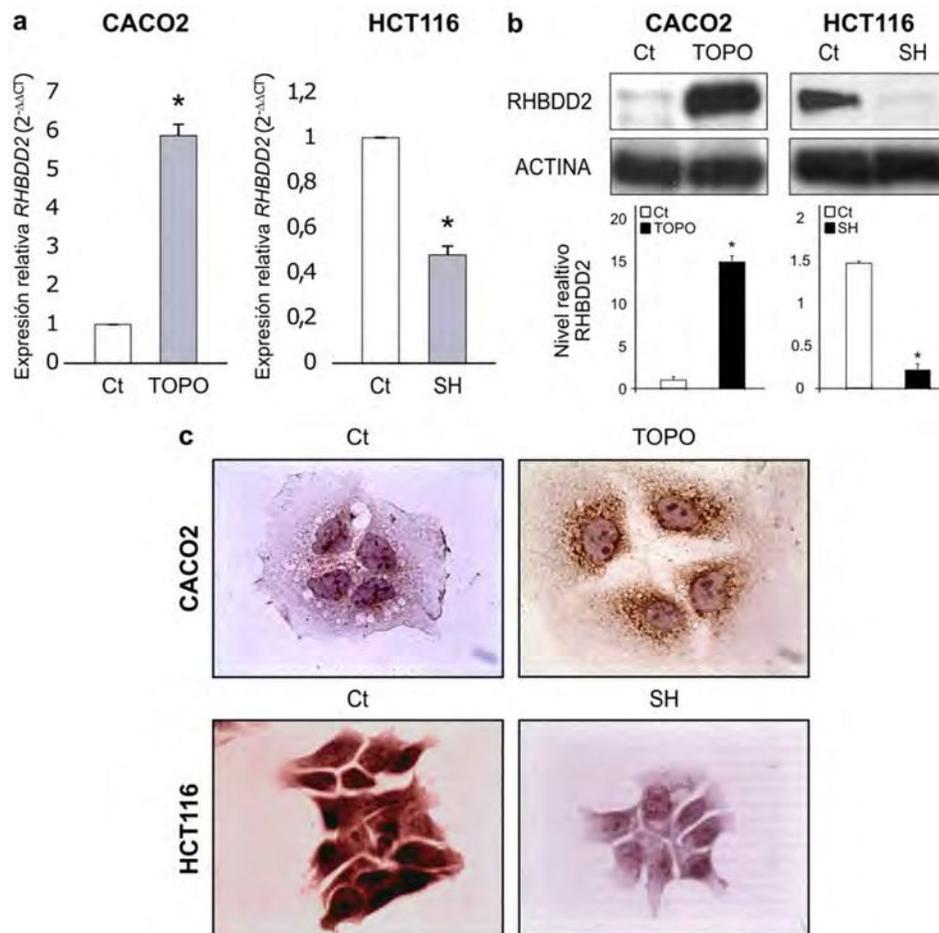


Figura 22: Validación del modelo de sobreexpresión y silenciamiento de *RHBDD2*. a) Expresión transcripcional de *RHBDD2* luego de la sobreexpresión y el silenciamiento. En las células TOPO-*RHBDD2* se observó un aumento de más de seis veces de cambio en la expresión del gen y en las SH-*RHBDD2* se detectó una reducción al medio en la expresión de *RHBDD2*. b) Los resultados transcripcionales fueron validados mediante WB. c) Las imágenes de ICQ muestran la distribución de la proteína, con una mayor concentración en la periferia del núcleo, extendiéndose gradualmente por el citoplasma hacia la membrana plasmática. * $p < 0.05$.

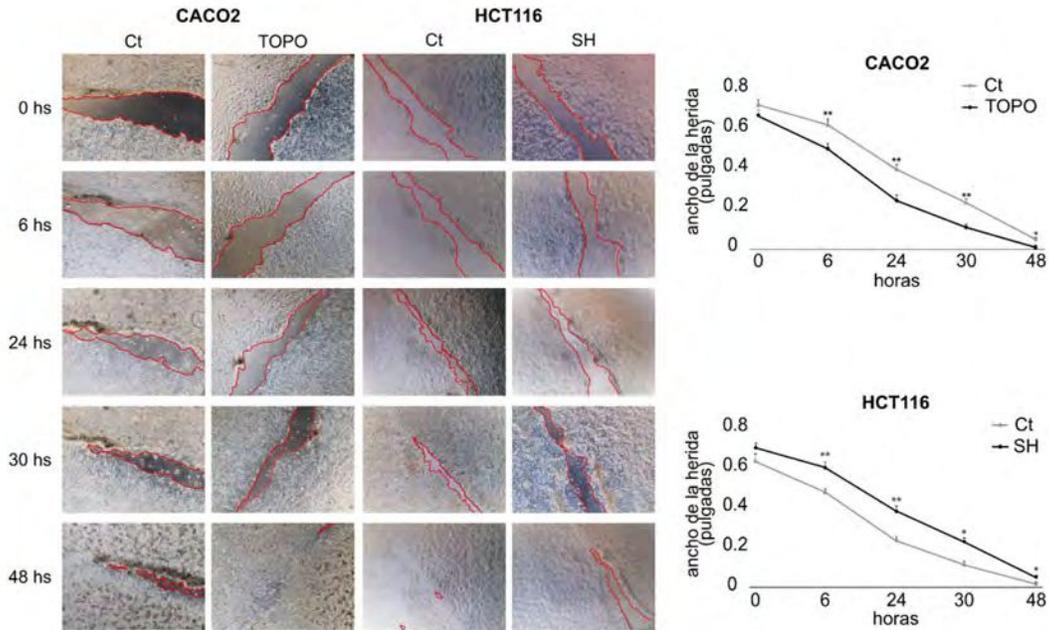


Figura 23: Efecto de la sobreexpresión y el silenciamiento de *RHBDD2* sobre la migración en células de cáncer de colon. Se evaluaron las consecuencias fenotípicas de las variaciones de la expresión de *RHBDD2* en las líneas celulares CACO2 y HCT116 sobre la migración celular, realizando un ensayo de cierre de herida. Las células TOPO-*RHBDD2* mostraron una mayor capacidad de cerrar la herida que las células control (Ct). El fenómeno opuesto se observó en las SH-*RHBDD2*. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$.

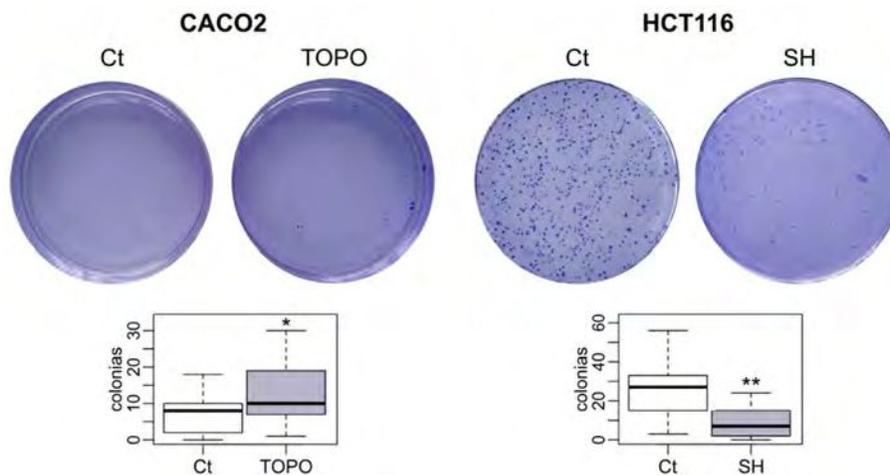


Figura 24: Efecto de la sobreexpresión y el silenciamiento de *RHBDD2* sobre el crecimiento libre de anclaje. Las células TOPO-*RHBDD2* mostraron una mayor capacidad clonogénica respecto a las células Ct. En contraste, las SH-*RHBDD2* presentaron una menor clonogenicidad que el Ct. En ambos casos se observaron diferencias significativas. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$.

3.4 Efecto de las variaciones de la expresión de *RHBDD2* sobre la proliferación y el ciclo celular.

Adhesión, motilidad (migración) y proliferación son procesos directamente relacionados con el crecimiento tumoral. Mediante un ensayo de conteo de células viables, se determinó una mayor proliferación en las TOPO-*RHBDD2* respecto a sus Ct hacia las 96hs de cultivo ($p < 0.05$, Figura 25). Por el contrario, las SH-*RHBDD2* mostraron una disminución en el número de células viables respecto a las Ct, en el mismo intervalo de tiempo ($p < 0.05$, Figura 25).

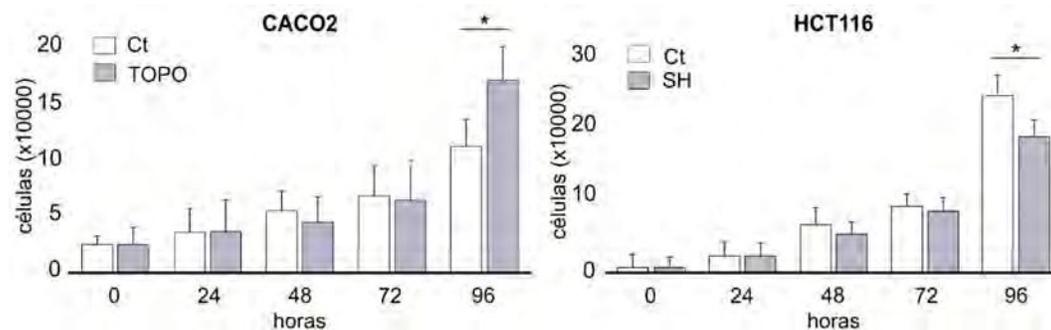


Figura 25: Efecto de la sobreexpresión y el silenciamiento de *RHBDD2* sobre la tasa de proliferación celular en CCR. Las células TOPO-*RHBDD2* mostraron una mayor tasa proliferativa que las células control. En cambio, en las SH-*RHBDD2* se observó una menor capacidad de proliferación celular. * $p < 0.05$.

Por otro lado, mediante citometría de flujo se observó una mayor frecuencia de células en fase S en las TOPO-*RHBDD2* en comparación con sus Ct y una disminución proporcional de células en fase G1 ($p < 0.01$; Figura 26). Las células SH-*RHBDD2* mostraron el efecto opuesto, con un aumento en las células G1 y una reducción significativa en células en fase S ($p < 0.01$; Figura 26).

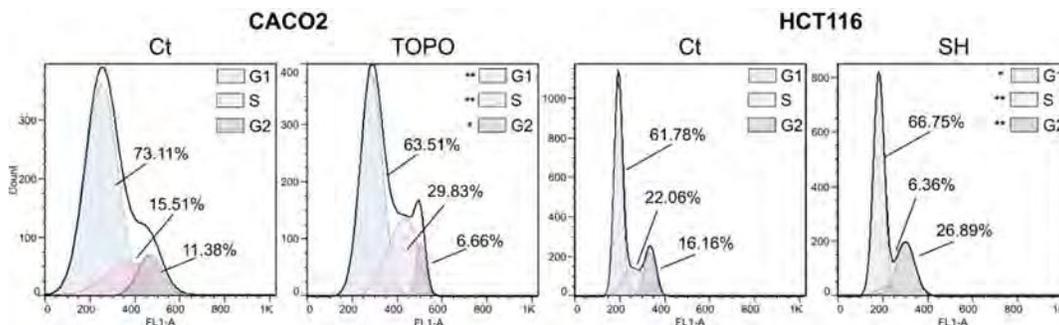


Figura 26: Análisis de las fases del ciclo celular ante la sobreexpresión y el silenciamiento de *RHBDD2* en líneas celulares de CCR. Se observa un aumento significativo en la proporción de células en fase S ante la sobreexpresión de *RHBDD2* y una disminución del porcentaje de células en dicha fase ante el silenciamiento del gen. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$.

3.5 Efecto de la sobreexpresión y el silenciamiento de *RHBDD2* sobre la respuesta al tratamiento con 5Fu.

Para evaluar el rol de *RHBDD2* en la resistencia celular al tratamiento con 5Fu, las células fueron expuestas a concentraciones de 5 μ M y 10 μ M del fármaco durante 24, 48 y 72hs. Luego, se evaluó la viabilidad celular. En las CACO2 las células TOPO-RHBDD2 mostraron mayor resistencia al 5Fu respecto a sus Ct luego de 48hs de tratamiento, con ambas dosis de la droga (Figura 27). En las HCT116, no se observaron diferencias significativas (Figura 27).

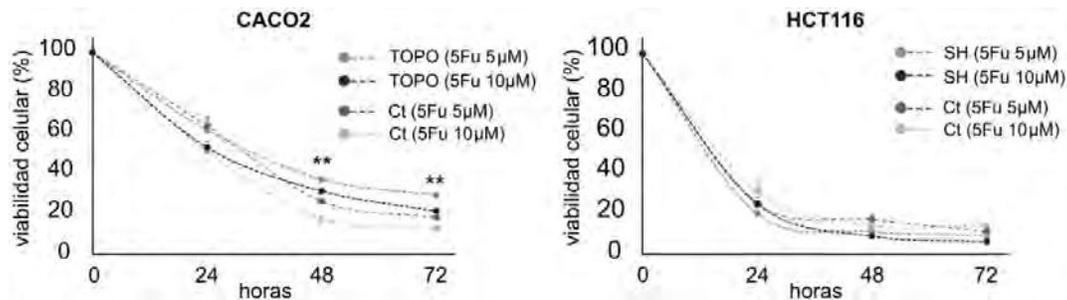


Figura 27: La sobreexpresión de *RHBDD2* aumentó la resistencia al tratamiento con 5Fu en las CACO2. Las células TOPO-RHBDD2 y SH-RHBDD2 fueron tratadas con 5 y 10 μ M de 5Fu y la viabilidad celular fue evaluada. Las TOPO-RHBDD2 mostraron un mayor número de células viables respecto al control, indicando una mayor resistencia al tratamiento. En las SH-RHBDD2 no se observaron diferencias significativas. ** $p < 0.01$.

4 RHBDD2 modula la expresión de genes del UPR

4.1 Análisis de la expresión de genes del UPR ante las variaciones en la expresión de *RHBDD2*.

Se evaluó la expresión de los genes *BiP*, *PERK*, *ATF4*, *CHOP*, *ATF6* e *IRE1* ante la sobreexpresión y el silenciamiento del *RHBDD2*.

En las células TOPO-RHBDD2, se observó un aumento significativo en la expresión de *BiP* ($p < 0.05$), mientras que en las SH-RHBDD2 se detectó una disminución de la expresión del gen ($p < 0.05$; Figura 28). Respecto a *CHOP*, se observó el efecto opuesto, con una marcada disminución en las TOPO-RHBDD2 ($p < 0.05$) y un significativo aumento en las SH-RHBDD2 ($p < 0.05$; Figura 28).

PERK mostró una reducción en su expresión tanto en las TOPO-RHBDD2 como en las SH-RHBDD2 en comparación a sus Ct ($p < 0.01$; Figura 28). *IRE1*, por su parte, disminuyó ante la sobreexpresión de *RHBDD2* ($p < 0.01$), y mostró una tendencia a aumentar en las SH-RHBDD2, aunque no significativa (Figura 28). Por último, *ATF4* y *ATF6* no mostraron diferencias frente a las variaciones de *RHBDD2* (Figura 28).

En conjunto, las variaciones en la expresión de *RHBDD2* provocaron cambios significativos en la expresión de los genes del UPR: *BiP*, *PERK*, *IRE1* y *CHOP*.

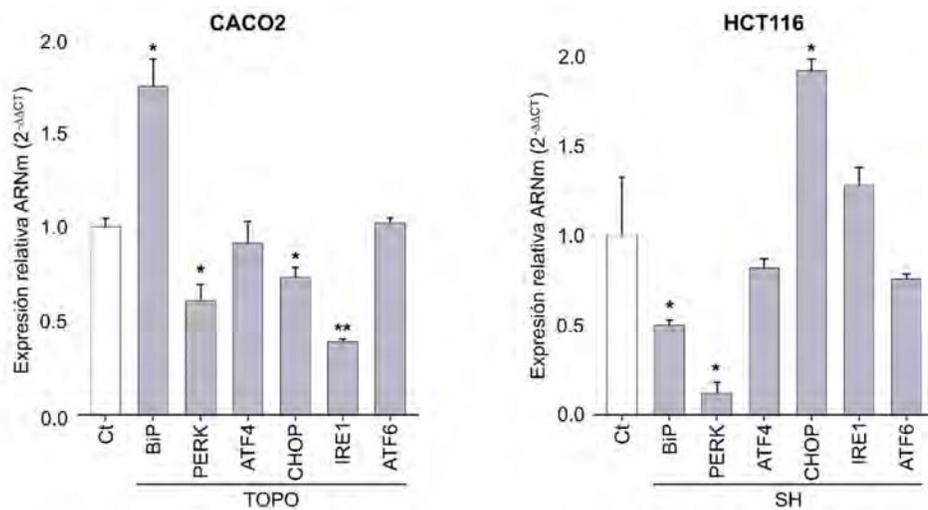


Figura 28: Expresión de genes del UPR ante las variaciones de expresión de *RHBDD2*. Se evaluó la expresión de los genes del UPR: *BIP*, *PERK*, *ATF4*, *CHOP*, *IRE1* y *ATF6* en las células TOPO-*RHBDD2* y SH-*RHBDD2*. La sobreexpresión de *RHBDD2* indujo la expresión de *BIP* y redujo la expresión de *CHOP*. El silenciamiento de *RHBDD2* redujo la expresión de *BIP* y aumentó la expresión de *CHOP*. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$.

4.2 Estudio de la expresión de genes del UPR frente a las variaciones en la expresión de *RHBDD2* ante el tratamiento con 5Fu.

En las células TOPO-*RHBDD2* se observó un aumento de *PERK* y *ATF6* y una reducción en la expresión de *ATF4*, *CHOP* e *IRE1* ($p < 0.05$; Figura 29).

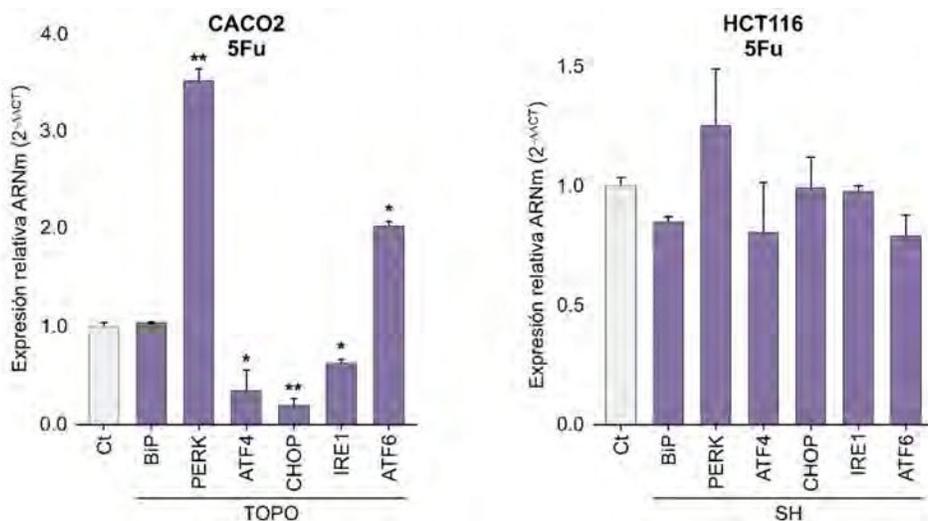


Figura 29: Expresión de genes del UPR ante las variaciones de la expresión de *RHBDD2* y el tratamiento con 5Fu. Se evaluó la expresión de *BIP*, *PERK*, *ATF4*, *CHOP*, *IRE1* y *ATF6* en las células TOPO-*RHBDD2* y SH-*RHBDD2*, ante el tratamiento con 5Fu. En las células TOPO-*RHBDD2* el tratamiento con la droga produjo un aumento significativo de *PERK* y *ATF6* y redujo la expresión de *ATF4*, *CHOP* e *IRE1*. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$.

En las SH-RHBDD2 el 5Fu no provocó cambios significativos en la expresión de ninguno de los genes del UPR analizados, en comparación con las células Ct (Figura 29).

4.3 Expresión de las proteínas BiP, PERK y CHOP frente a las variaciones en la expresión de *RHBDD2* en presencia y ausencia del tratamiento con 5Fu.

La expresión de las proteínas BiP, PERK y CHOP fue evaluada en ambos modelos en ausencia y presencia de 5Fu (Figura 30).

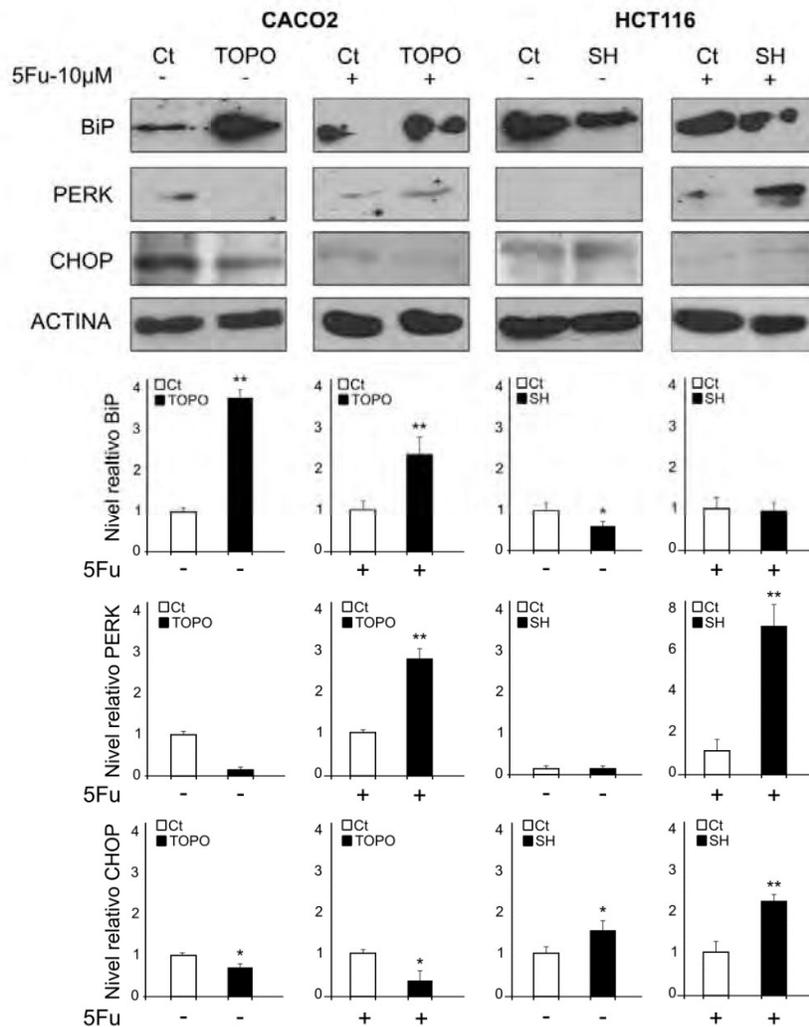


Figura 30: Expresión de las proteínas BiP, PERK y CHOP, ante las variaciones de expresión de *RHBDD2* y el tratamiento con 5Fu. Se evaluó la expresión de BiP, PERK, y CHOP en las células TOPO-RHBDD2 y SH-RHBDD2, en presencia y ausencia de 5Fu, mediante WB. La sobreexpresión de *RHBDD2* aumentó la expresión de BiP y redujo la expresión de CHOP. El silenciamiento, en cambio, produjo el efecto contrario. En las TOPO-RHBDD2 expuestas al 5Fu se indujo la expresión de BiP y PERK y se redujo la expresión de CHOP. En las SH-RHBDD2, la droga provocó un incremento en la expresión de PERK y CHOP. *p<0.05 **p<0.01.

Los resultados demostraron lo observado a nivel del ARNm. Se evidencia el marcado aumento de BiP en las TOPO-RHBDD2 y su reducción en las SH-RHBDD2 respecto a sus respectivos Ct, en presencia y en ausencia del 5Fu. Asimismo, se destacan diferencias que no habían sido evidenciadas a nivel transcripcional luego del tratamiento con 5Fu: el aumento de PERK en ambos modelos, y la disminución de CHOP en las TOPO-RHBDD2 y su reducción en las SH-RHBDD2 (Figura 30).

4.4 Asociación entre RHBDD2 y BiP en células de CCR.

Debido al comportamiento de *BiP* frente a las variaciones de la expresión de *RHBDD2* se ensayó la hipótesis de que ambas proteínas puedan interactuar. Mediante WB fue posible confirmar la inmunoprecipitación de RHBDD2 y BiP a partir de lisados de las células HCT116 (Figura 31).

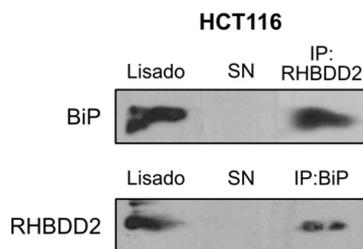


Figura 31: Co-inmunoprecipitación de RHBDD2 y BiP. Se utilizó la línea celular HCT116 para co-inmunoprecipitar RHBDD2 y BiP. Se detectó a la proteína BiP en el inmunoprecipitado de RHBDD2 y se halló la presencia de RHBDD2 en el inmunoprecipitado de BiP.

4.5 Identificación de sitios de unión de CHOP/DDIT3 en la secuencia promotora de *RHBDD2*.

También investigamos una posible función reguladora del FT CHOP/DDIT3 en la expresión del gen *RHBDD2*. DDIT3 tiene un papel relevante como respondedor a una amplia variedad de estresores celulares y es un efector final en el arresto del ciclo celular e inductor de apoptosis frente al estrés de RE.

Se analizó *in silico* la secuencia promotora de *RHBDD2* para la presencia de secuencias reguladoras Cis de unión a DDIT3. Notablemente, se identificaron varios sitios potenciales, lo que sugiere una regulación recíproca entre ambos genes (Figura 32). Serán necesarias validaciones experimentales para su confirmación.

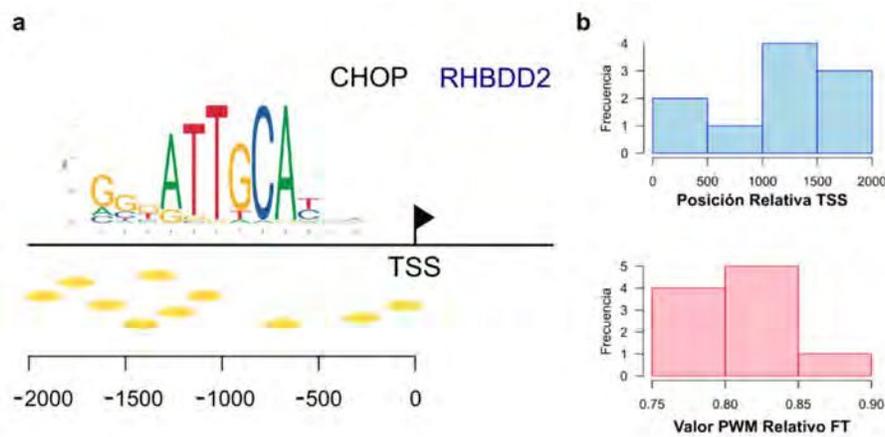


Figura 32: Análisis *in silico* del promotor de *RHBDD2*. a) Se detectó la presencia de varios sitios de unión del FT CHOP en la secuencia promotora de *RHBDD2* (óvalos amarillos). b) En barras azules se muestra la frecuencia y la posición relativa de los sitios de unión de CHOP desde el sitio de inicio de la transcripción (TSS). En barras rosas se observa la especificidad de los sitios de unión del FT.

5 Variaciones de la expresión de *RHBDD2* afectan a la vía de adhesión focal

En el análisis de enriquecimiento funcional de genes que coexpresan con *RHBDD2* en el contexto del CCR, se identificó entre los principales términos ontológicos a las adhesiones focales. Por otra parte, las variaciones en la expresión de *RHBDD2* en células de cáncer de colon afectaron la adhesión, la migración celular y el crecimiento libre de anclaje.

Para determinar si la expresión *RHBDD2* afecta a la vía de adhesión focal, se midieron los genes *PXN*, *FAK* y *TLN* en ambos modelos celulares antes y después del tratamiento con 5Fu. En las CACO2, antes del tratamiento no se evidenciaron diferencias entre las TOPO-*RHBDD2* y sus Ct. Luego del tratamiento, sin embargo, hubo una significativa inducción de *FAK* y *PXN* en las TOPO-*RHBDD2* (Figura 33).

En las HCT116, el silenciamiento de *RHBDD2* modificó la expresión de *FAK* en comparación con las células Ct (Figura 33). La expresión de *PXN* también se redujo, pero no fue estadísticamente significativa. No se observaron diferencias en las SH-*RHBDD2* en ninguno de los genes analizados después del tratamiento con 5Fu (Figura 33).

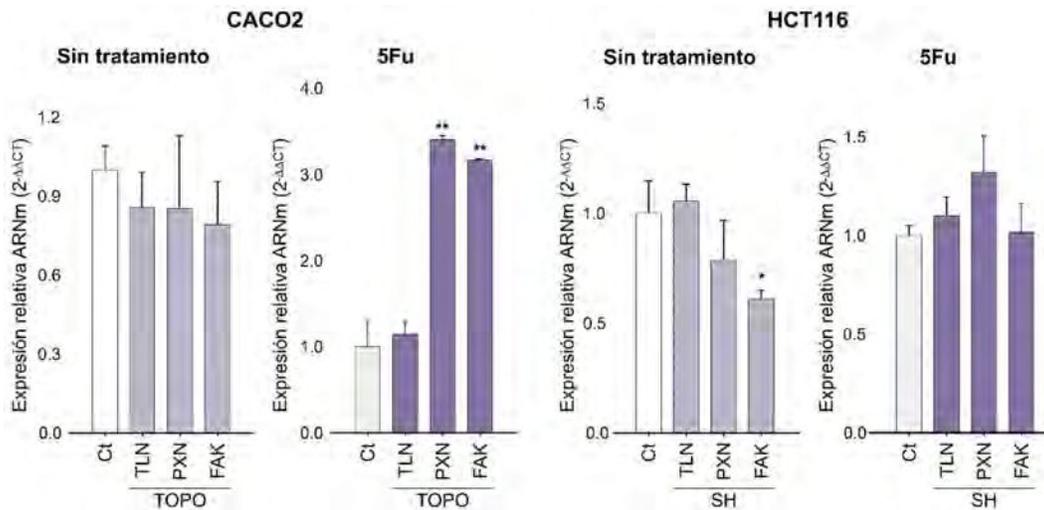


Figura 33: Expresión de genes de la vía de adhesión focal ante las variaciones de *RHBDD2* en presencia y ausencia del tratamiento con 5Fu. Se evaluó la expresión de los genes de adhesión focal: *TLN*, *PXN* y *FAK* en las células TOPO-RHBDD2 y SH-RHBDD2 en presencia y ausencia del tratamiento con 5Fu. En las HCT116 silenciamiento de *RHBDD2* redujo la expresión de *FAK*. En las células TOPO-RHBDD2 el tratamiento con 5Fu indujo significativamente la expresión de *PXN* y *FAK*. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$.

6 Análisis de muestras tumorales de recto frente al tratamiento neoadyuvante

6.1 Una elevada expresión de *RHBDD2* luego del tratamiento neoadyuvante en CR se asocia a mal pronóstico.

La siguiente etapa en este estudio fue evaluar por IHQ la expresión de la proteína *RHBDD2* en 38 muestras de tumores de CR obtenidas de 19 pacientes antes y después del tratamiento neoadyuvante. El patrón y la intensidad de expresión de *RHBDD2* se codificaron y analizaron siguiendo el procedimiento previamente establecido (Figura 14). *RHBDD2* mostró reacción positiva en todas las muestras pre-tratadas (19 casos de 19) con una prevalencia de moderada a alta intensidad de inmunomarcación (7 y 9 casos de 19, respectivamente), y sólo 3 casos con baja intensidad de *RHBDD2* (Tabla 10). La distribución tisular de *RHBDD2* (denominada % de expresión) varió de 10 a 100% en las biopsias analizadas (Tabla 10). La localización de la proteína fue predominantemente citoplasmática (Figura 14; Figura 34).

Tabla 10. Resultados de IHQ para RHBDD2 en tumores de recto antes y después del tratamiento neoadyuvante.

RHBDD2		
Tratamiento	Pre-tto	Post-tto
Intensidad	casos/total (%)	
Baja	3/19 (16)	5/19 (26,3)
Moderada	7/19 (37)	11/19 (58)
Intensa	9/19 (47)	3/19 (17,7)
Porcentaje	casos/total (%)	
10-40	5/19 (26)	8/19 (42)
50-70	2/19 (11)	9/19 (47)
70-100	12/19 (63)	2/19 (11)

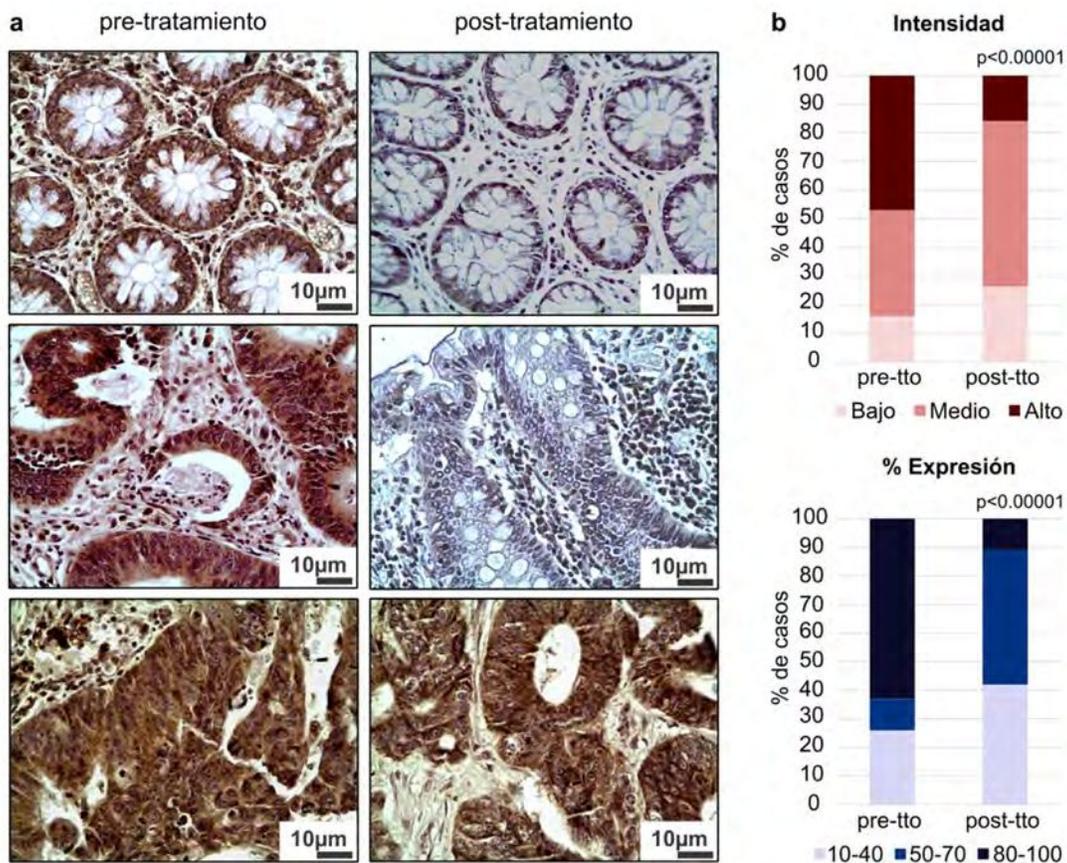


Figura 34: Expresión de RHBDD2 ante el tratamiento neoadyuvante en tumores de recto. a) Microfotografías de tumores pareados de recto incubados con anti-RHBDD2. La expresión de RHBDD2 en las biopsias pre-tratadas fue moderada/alta y disminuyó abruptamente en las muestras post-tratadas (paneles superior y medio). Sin embargo, hubo un grupo de pacientes en los que no se observó reducción de la expresión de RHBDD2 post-tratamiento (panel inferior). b) Se observa una reducción significativa de la intensidad y el porcentaje de expresión de RHBDD2 luego del tratamiento neoadyuvante.

En las muestras analizadas luego del tratamiento, se observó mayor variabilidad en la expresión: la mayoría (12 casos de 19) mostró una reducción significativa en la expresión de RHBDD2 en comparación con las pre-tratadas (Tabla 10; Figura 34); un grupo menor (7 casos de 19), sin embargo, mostró una alta expresión de la proteína (Tabla 10; Figura 34). Se definieron en consecuencia dos grupos, denominados LEAT (del inglés *Low Expression After Treatment*) y HEAT (del inglés *High Expression After Treatment*). Se realizó un análisis de asociación entre ambos grupos y los datos clínico-patológicos de los pacientes y se halló una asociación significativa entre el grupo HEAT y la presencia de metástasis ganglionar y/o a distancia ($p=0.018$; Figura 35).

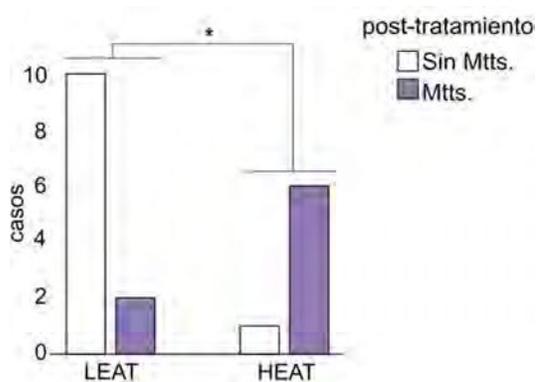


Figura 35: Variación de la expresión de RHBDD2 ante el tratamiento neoadyuvante y su asociación al desarrollo de metástasis. Las muestras fueron clasificadas en dos grupos: las que poseen baja expresión de RHBDD2 luego del tratamiento (LEAT) y las que presentan alta expresión de RHBDD2 luego del tratamiento (HEAT). Se observó una asociación significativa entre el grupo HEAT y la presencia de metástasis local o a distancia. * $p=0.0181$.

Por otro lado, se analizó la expresión intratumoral de RHBDD2. De modo relevante, se observó una mayor expresión de la proteína en la región invasora del tumor, en comparación con el tejido adyacente de apariencia normal (Figura 36). Este patrón fue característico en todas aquellas muestras en las que fue posible identificar y distinguir una zona de apariencia normal y una de aspecto proliferativo/invasor.

6.2 Análisis de la expresión de BiP, PERK y CHOP en muestras de recto frente al tratamiento neoadyuvante.

En las muestras pareadas de tumores de recto, se evaluó la expresión de las proteínas BiP, PERK y CHOP. La marcación del anticuerpo de CHOP no fue detectable por IHQ. La inmunotinción detectada para PERK fue muy leve, y se redujo aún más luego del tratamiento neoadyuvante, aunque no significativamente (Tabla 11; Figura 37). Por su parte, la expresión de BiP mostró una reducción significativa luego del tratamiento (Tabla 11; Figura 38), a excepción de ciertas áreas a nivel intratumoral en las que BiP se mantuvo con altos niveles de expresión, de modo similar a lo observado

con RHBDD2 (Figura 38). Estas áreas fueron usualmente coincidentes con el frente invasor del tumor o incluso con células tumorales invadiendo las capas musculares (Figura 38). A pesar de estas observaciones no se halló asociación entre la expresión de BiP y el desarrollo de metástasis de los pacientes analizados.

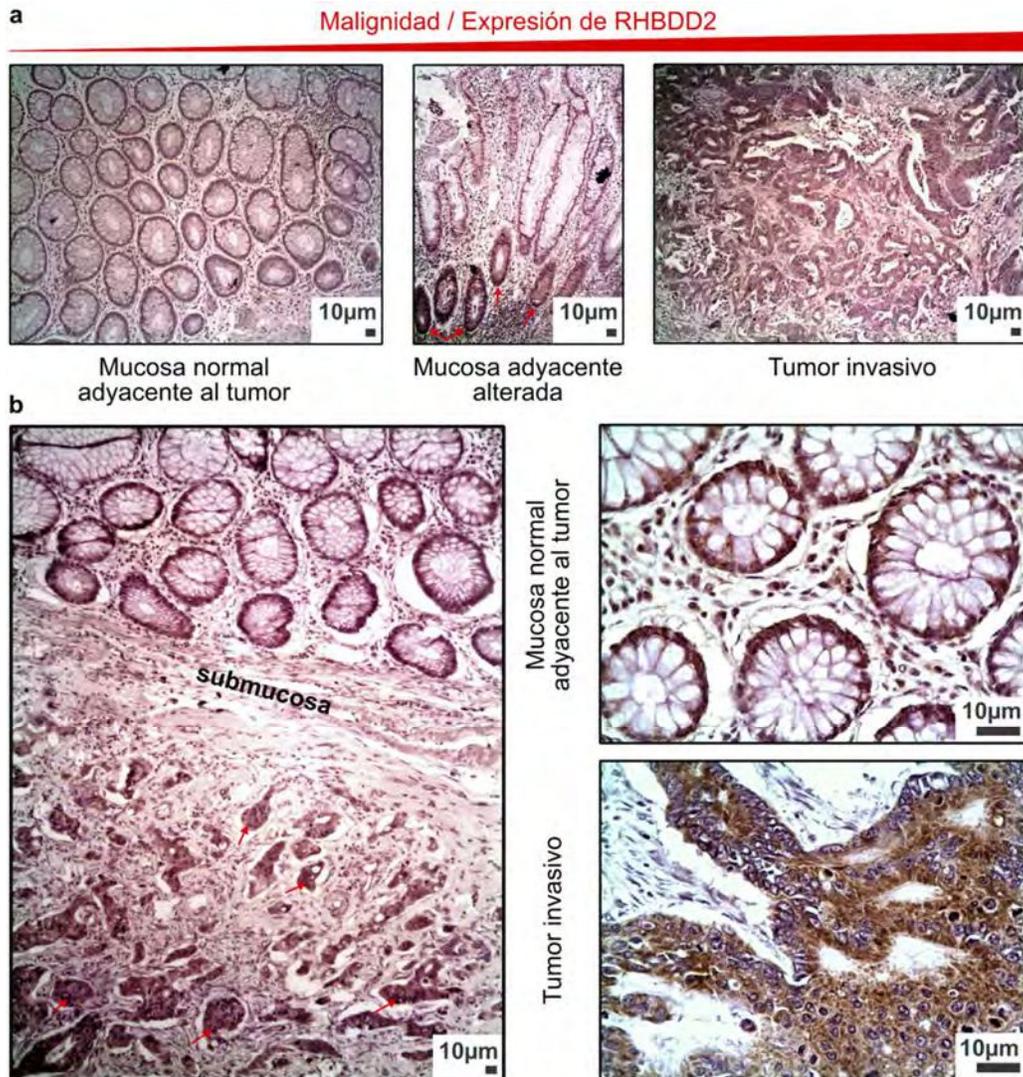


Figura 36: Expresión intratumoral de RHBDD2. Se detectaron variaciones en la expresión de RHBDD2 a nivel intratumoral. Se distinguió la mucosa normal adyacente al tumor, la submucosa y el tumor invadiendo las capas musculares. **a)** Microfotografías (10X) tomadas de la misma sección de tejido de una biopsia de un paciente post-tratamiento. De izquierda a derecha se observa una secuencia de malignidad tumoral, la expresión de RHBDD2 es muy baja en el tejido normal adyacente (izquierda), queda restringida a las glándulas más profundas en la mucosa más alterada (centro, flechas rojas) y alcanza su máxima expresión en el tumor invasivo (derecha). **b)** Sección de tejido obtenida de una biopsia de un paciente pre-tratado. En la fotografía (10X) se observa la mucosa aparentemente normal adyacente al tumor, la submucosa y el tumor invadiendo las capas musculares. RHBDD2 mostró expresión moderada en la mucosa normal adyacente, con un marcado aumento en las células tumorales invasoras (flechas rojas). A la derecha, se muestra una ampliación (40X) de ambas regiones.

Tabla 11. Resultados de IHQ para PERK y BiP en tumores de recto antes y después del tratamiento neoadyuvante.

		PERK		BiP	
Tratamiento		Pre-tto	Post-tto	Pre-tto	Post-tto
Intensidad		casos/total (%)		casos/total (%)	
Baja		7/14 (50)	10/14 (71)	1/19 (5,4)	10/19 (53)
Moderada		6/14 (43)	4/14 (29)	11/19 (57,8)	8/19 (42)
Intensa		1/14 (7)	0/14 (0)	7/19 (36,8)	1/19 (5,4)
Porcentaje		casos/total (%)		casos/total (%)	
10-40		13/14 (93)	12/14 (86)	3/19 (15,7)	6/19 (31,5)
50-70		0/14 (0)	1/14 (7)	3/19 (15,7)	3/19 (15,8)
70-100		1/14 (7)	1/14 (7)	13/19 (68,6)	10/19 (52,7)

En conjunto, estos resultados indican que después del tratamiento neoadyuvante, la expresión de RHBDD2 es heterogénea a nivel intertumoral e intratumoral, con una mayor expresión asociada a tumores más agresivos y regiones indiferenciadas e invasivas. Asimismo, se observó un patrón similar para BiP, lo que sugiere que estos tumores o regiones podrían ser más resistentes a las condiciones estresantes, producto del microambiente tumoral o del tratamiento quimioterapéutico en sí mismo.

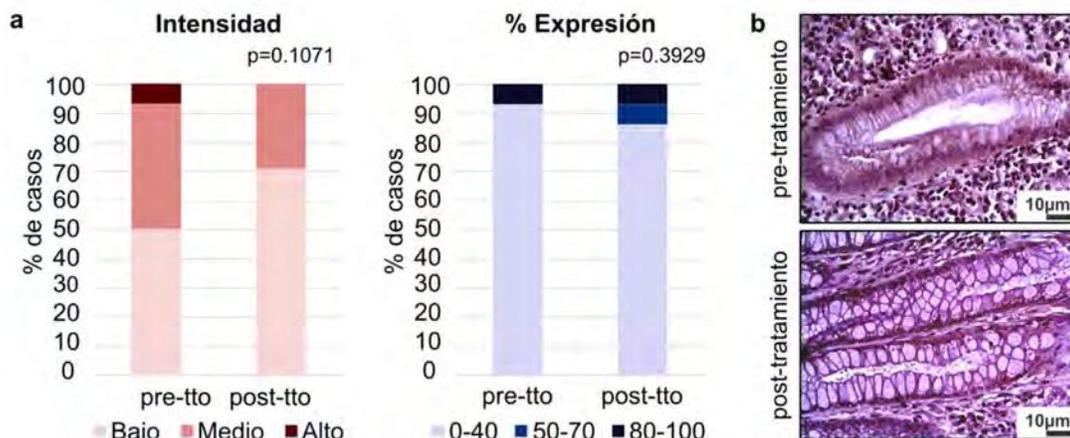


Figura 37: Expresión de PERK ante el tratamiento neoadyuvante en tumores de recto. a) Se observa una tendencia a la reducción de la intensidad y el porcentaje de expresión de PERK luego del tratamiento neoadyuvante. **b)** Microfotografías (40X) de la expresión de PERK en tumores de recto ante el tratamiento neoadyuvante.

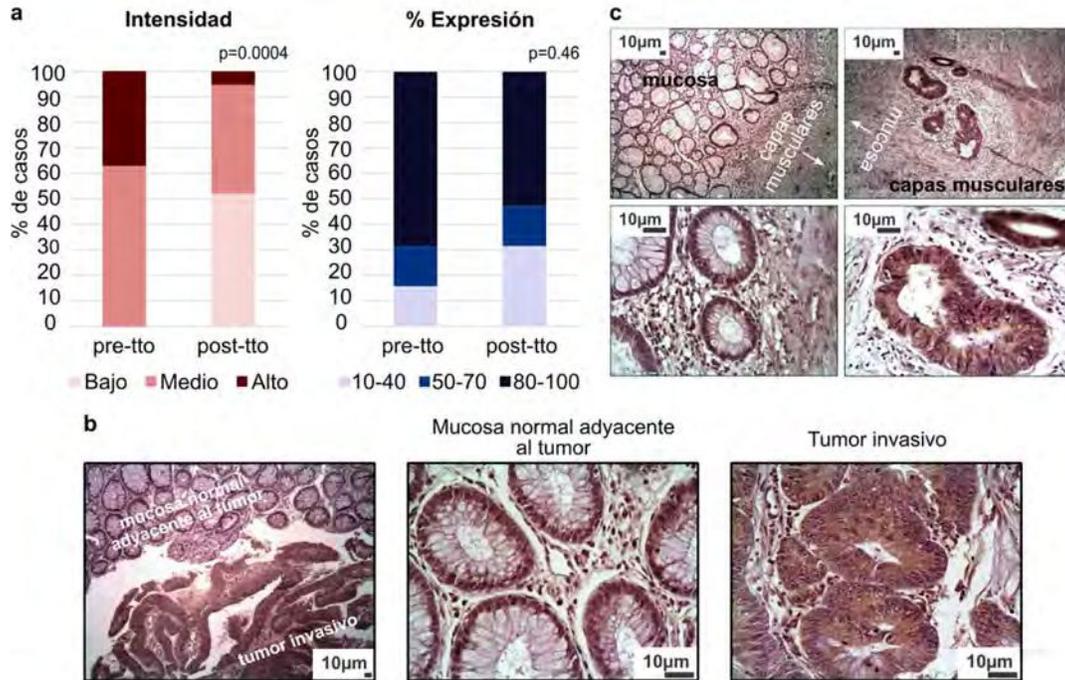


Figura 38: Expresión de BiP ante el tratamiento neoadyuvante en tumores de recto. a) La intensidad de expresión de BiP se redujo significativamente luego del tratamiento neoadyuvante. Se observa una tendencia a la reducción del porcentaje de expresión de la proteína BiP. **b)** La expresión intratumoral de BiP presenta un patrón semejante al de RHBDD2. Se detecta una menor expresión de BiP en la mucosa normal adyacente al tumor (medio-40X) y un aumento significativo de la intensidad de expresión en la porción invasiva del tumor (derecha-40X). **c)** Las diferencias en los niveles de expresión intratumoral de BiP se evidencian claramente en las células que invaden las capas musculares. Arriba 10X, abajo 40X.



El CCR es una enfermedad frecuentemente letal con pronóstico y respuesta al tratamiento heterogéneos. Estas diferencias residen en las características moleculares intrínsecas de los tumores. Los estudios multiómicos han revelado la existencia de al menos 4 subtipos moleculares consenso, que permitirían estratificar a los pacientes a fin de que reciban una terapia personalizada⁴⁴. Sin embargo, esta clasificación aun no forma parte de la práctica clínica estándar, siendo la RQT sistémica, con el uso del 5Fu como principal droga, el protocolo más empleado contra el CCR en sus estadios avanzados. De este modo, habrá un grupo de pacientes que tendrá una respuesta patológica completa al tratamiento, mientras que en otros grupos la enfermedad se mantendrá estable o incluso progresará.

El CR, a diferencia del de colon, debido fundamentalmente a su localización anatómica, permite un tratamiento con RQT neoadyuvante con la finalidad de mermar el crecimiento tumoral y evitar consecuencias postquirúrgicas mayores. En algunos casos se ha observado (protocolo *watch and wait*) respuesta completa al tratamiento, evitando la cirugía. Al momento, no existen marcadores moleculares que permitan predecir esta respuesta diferencial.

En base a resultados previos, el objetivo de esta tesis fue estudiar a través de diferentes enfoques el rol del gen *RHBDD2* como un potencial biomarcador pronóstico/predictivo de respuesta al tratamiento neoadyuvante en el CCR.

1 RHBDD2 se asocia a las vías biosintética secretora, de adhesión y de estrés de RE en el CCR

El primer enfoque fue determinar las vías moleculares asociadas a *RHBDD2* en el contexto del CCR a través de una aproximación *in silico*. El análisis funcional de los genes que coexpresan con *RHBDD2*, obtenidos de diversos estudios con microarreglos

en CCR, arrojó términos significativamente asociados con la Vía Biosintética Secretora, la Vía de Adhesión, la Vía de Señalización EPH y la Vía ATM, entre otros.

La vía de adhesión, está compuesta por un complejo de proteínas que regulan la unión entre las células y la matriz extracelular, cumpliendo un rol fundamental en la adherencia y en la migración¹²³. La expresión elevada de los intermediarios de la vía ha sido asociada a carcinogénesis, invasión y metástasis en el CCR¹²⁴.

Las efrinas (EPHs), han sido caracterizadas por influenciar el crecimiento celular, el movimiento, la morfogénesis, la migración y la adhesión durante el desarrollo embrionario¹²⁵. Esta información sería coincidente con el hecho de que *Rhbdd2* es un gen de expresión temprana durante el desarrollo embrionario, como fuera demostrado en un estudio previo de nuestro grupo en embriones de rata¹⁰⁸.

La vía ATM es una de las principales respondedoras al daño causado en el ADN por diferentes agentes estresantes, entre ellos el 5Fu¹²⁶.

Finalmente, la vía biosintética secretora fue representada en el análisis por diversos términos ontológicos como Tráfico de Membrana, Transporte Mediado por Vesículas y Retención de Proteínas en el Lumen del RE.

El análisis funcional de los FT asociados a *RHBDD2*, por su parte, mostró un enriquecimiento significativo de los términos ontológicos UPR, Adipogénesis y Mitofagia, procesos que se asocian a estrés del RE^{127,128,129}. Diversos miembros de la familia romboide han sido previamente asociados a estrés de RE. Entre ellos, *RHBDD1* y *Derlina-1* quienes forman parte de la degradación de proteínas en el RE (ERAD, del inglés *Endoplasmatic Reticulum associated degradation*) y de la regulación de la apoptosis inducida por estrés de RE^{130,131}.

2 Las variaciones de la expresión de RHBDD2 afectan la proliferación, la adhesión, la migración y la resistencia al tratamiento con 5Fu

A través de un enfoque *in vitro* se evaluó cómo la expresión de *RHBDD2* se ve afectada frente al tratamiento con 5Fu en las líneas celulares CACO2 y HCT116 y se realizó luego un análisis exhaustivo de las consecuencias fenotípicas de la sobreexpresión y el silenciamiento estables de *RHBDD2* en ambas líneas, respectivamente.

En coincidencia con un estudio previo que realizáramos sobre las COLO205¹⁰⁶, en esta tesis fue posible confirmar que *RHBDD2* también se induce frente al 5Fu en otras dos líneas celulares de CCR.

De modo interesante, al evaluar el patrón de expresión y de distribución de *RHBDD2*, luego de la exposición al 5Fu, se evidenció que la proteína se extiende más allá de la región perinuclear, alcanzando incluso las proyecciones citoplasmáticas emitidas por las células. La morfología de dichas proyecciones se vio notablemente alterada producto de la exposición a la droga, lo que sugiere que ante condiciones de estrés *RHBDD2* se puede localizar en sitios distintos al RE o Golgi -como fuera demostrado en estudios previos^{105,109}- pudiendo ser estos las vesículas de secreción. Esta hipótesis se apoya en dos de las predicciones *in silico* realizadas en la presente tesis: por un lado, el hecho de que *RHBDD2* se enmarca en la vía biosintética secretora, y por otro, que su topología determina la presencia de un largo dominio citosólico rico en prolinas que favorece las interacciones con ligandos específicos¹³². De este modo, *RHBDD2* podría actuar como un intermediario en el *sorting* de moléculas desde el RE, pasando por el Golgi, hacia las vesículas, ante las señales de estrés generadas en la célula por un agente citotóxico como el 5Fu.

Una de las acciones primarias del UPR es aliviar el estrés reduciendo el flujo de proteínas dentro del RE a través de una supresión general de la síntesis de proteínas y un aumento de la degradación vía ERAD¹³³. Se han reportado, sin embargo, otros mecanismos del UPR para la reducción de carga de proteínas en el RE, como ser una rápida y dinámica liberación y redistribución de los ARNm con señal en el RE, hacia el citosol¹³⁴.

En este contexto es factible proponer que *RHBDD2* contribuye con agilizar el tránsito de las proteínas fuera del RE hacia las vesículas y su eventual secreción. Serán necesarios estudios experimentales para validar dicha observación.

Por otra parte, en los modelos *in vitro* generados, se demostró que la sobreexpresión de *RHBDD2* favorece la proliferación, la adhesión, la migración y el crecimiento libre de anclaje. Estos resultados se asociarían a los hallados en tumores de CCR, en los que una mayor expresión del gen se asocia con los estadios más avanzados de la enfermedad¹⁰⁶. Asimismo, se determinó que la sobreexpresión de *RHBDD2* promueve resistencia al tratamiento con 5Fu, retardando significativamente la muerte celular en comparación con las células control.

Por el contrario, el silenciamiento en las HCT116 mostró un comportamiento opuesto a la sobreexpresión en las CACO2, con una disminución significativa en los procesos mencionados, a excepción del tratamiento con 5Fu, en el que no se observaron

diferencias significativas. La reducción de la proliferación celular en las células SH-RHBDD2 podría contrarrestar el efecto sobre la sensibilidad al tratamiento con 5Fu, considerando que la acción y efectividad del 5Fu depende de la dosis, pero también de la detención del ciclo celular¹³⁵.

3 RHBDD2 actúa como un intermediario en la vía del UPR

El enriquecimiento funcional y los efectos de la expresión de *RHBDD2* en las células de CCR, sumado a estudios previos, sugieren un rol como intermediario en la vía del UPR. En consecuencia, se evaluó la expresión de genes del UPR ante las variaciones en la expresión de *RHBDD2*.

La activación de la vía del UPR comienza cuando la chaperona BiP se libera de y activa a los sensores transmembrana PERK, IRE1 y ATF6. Corriente abajo de PERK, la activación de ATF4 y de CHOP permite, en respuesta al estrés, reducir la traducción, degradar las proteínas mal plegadas y en última instancia determinar la supervivencia o muerte celular.

La sobreexpresión de *RHBDD2* aumentó la expresión de la chaperona *BiP* pero redujo la de *PERK*, *IRE1* y *CHOP*. Ante el silenciamiento se observó una reducción de la expresión de *BiP* y *PERK* y un aumento en la expresión de *CHOP*.

Cuando las células que sobreexpresan *RHBDD2* fueron tratadas con 5Fu, que además es un inductor de estrés de RE¹³⁶, se produjo un aumento en la expresión de los sensores *PERK* y *ATF6*, y una reducción en la expresión de *ATF4* y *CHOP*.

Una de las funciones principales de la chaperona BiP es proteger a las células de la apoptosis inducida por estrés, a través de la supresión de la expresión de *CHOP*, el efector final de la vía que puede desencadenar la muerte celular^{137,138}. *BiP* es un factor crítico en la proliferación celular, se reportó aumentado en tumores sólidos de diversas localizaciones y en células iniciadoras de tumores (CIC, del inglés *cancer initiating cells*), identificadas como una de las principales causas de metástasis, resistencia al tratamiento y recurrencia¹³⁹. Se ha demostrado asimismo que la elevada expresión de *BiP* confiere resistencia a agentes quimiotóxicos, antihormonales, de daño al ADN y antiapoptóticos¹⁴⁰. Por otra parte, la reducción de su expresión sensibiliza a las células al tratamiento quimioterápico^{141,142}. De modo interesante, los resultados obtenidos en esta tesis demostraron que la sobreexpresión de *RHBDD2* produjo un marcado aumento en la expresión de *BiP*, mientras que su silenciamiento causó una reducción significativa.

Recientemente, se ha demostrado que, en situaciones de estrés, BiP puede relocalizarse en la membrana plasmática¹⁴³. La relocalización de chaperonas citoplasmáticas o inducidas por estrés de RE a la superficie celular representa un mecanismo adaptativo que diversifica la funcionalidad de las proteínas en respuesta al estrés, cambiando el rumbo de las vías de señalización y permitiendo desencadenar muerte celular o supervivencia¹⁴⁴. La relocalización de BiP, estaría mediada por IRE1, a través de sus motivos SH3 no canónicos presentes en el dominio citoplasmático rico en prolina. Este sitio de unión favorece, ante situaciones de estrés, una cascada de eventos que conducen a la relocalización de BiP en la membrana plasmática¹⁴³. La topología de la proteína RHBDD2 y la presencia de dominios de unión SH3 en su cola citoplasmática rica en prolinas, indicarían un rol similar al de IRE1, siendo BiP una de las proteínas a las que acompañaría en su relocalización y redistribución ante situaciones de estrés. Esto podría explicar el aumento de *BiP* ante la sobreexpresión de *RHBDD2* y su reducción ante el silenciamiento. Además, la co-inmunoprecipitación de ambas proteínas en las HCT116, refuerza esta idea y constituye la primera evidencia experimental de que RHBDD2 y BiP interactúan.

En cuanto a *IRE1* se observó que en las células que sobreexpresan *RHBDD2* se produce una disminución en su expresión. Posiblemente exista un balance entre ambas proteínas.

Es sabido que al activarse *PERK* se genera una cascada de reacciones que conducen a una reducción general de la síntesis de proteínas^{145,146,147}. El rol de *PERK* en la progresión tumoral, sin embargo, es controversial. Algunas evidencias afirman que la activación de *PERK* es suficiente para inhibir la proliferación tumoral, otros estudios muestran que el silenciamiento de *PERK* bloquea la progresión del ciclo celular^{148,149,150}. En línea con esta complejidad, tanto el silenciamiento como la sobreexpresión de *RHBDD2* causaron una significativa reducción en la expresión de *PERK*. La cual, sin embargo, aumentó significativamente al exponer las células al 5Fu. Estos resultados sostienen el rol complejo de la proteína PERK y demuestran que su implicancia en la tumorigénesis es dependiente de su expresión, el tipo de célula tumoral, el estado de proliferación celular, el microambiente tumoral y el modelo de estudio⁸⁸.

Aguas abajo de PERK, el factor de transcripción CHOP es un efector final de la vía que puede favorecer la apoptosis en condiciones de estrés de RE⁹². En células de CCR, se ha demostrado que *CHOP* induce apoptosis ante el tratamiento quimioterápico con drogas análogas a la Rapamicina⁹³. Por otra parte, en cáncer gástrico, la reducción de la expresión de *CHOP* en el tumor correlaciona con un peor pronóstico⁹⁴. En las células que sobreexpresan *RHBDD2* se demostró una reducción en la expresión de *CHOP*,

mientras que en las silenciadas se evidenció una inducción significativa del gen. El análisis de la secuencia promotora del gen *RHBDD2* determinó la presencia de motivos de unión a CHOP, lo que sugiere un posible mecanismo regulatorio entre ambas proteínas.

4 Las variaciones en la expresión de *RHBDD2* afectan la vía de las adhesiones focales

Uno de los efectos notorios en los modelos *in vitro* de expresión de *RHBDD2* fue la reducción y el aumento de los procesos de migración y crecimiento libre de anclaje ante el silenciamiento y la sobreexpresión, respectivamente. Dichos procesos se asocian a mecanismos de adhesión celular, término ontológico enriquecido en el análisis *in silico* de los genes que coexpresan con *RHBDD2*.

La vía de adhesiones focales se compone de un conjunto de proteínas que permiten conectar el citoesqueleto de actina en el interior celular, con la membrana plasmática y la matriz extracelular¹⁵¹. Por esta razón, cumple un rol fundamental en la adherencia y en la migración celular. La reorganización de la placa de adhesión focal es necesaria para permitir la movilidad de las células tumorales y dar lugar al fenómeno de metástasis¹²⁴.

TLN, *PXN* y *FAK* son tres intermediarios fundamentales de la vía de adhesión focal. Se ha demostrado que *PXN* aumenta en tejidos tumorales y en células tumorales metastásicas^{124,152}. Por su parte, *FAK*, se sobreexpresa en varias localizaciones tumorales, entre ellas el CCR¹²³. Se observó que protege a las células de carcinoma escamoso de cabeza y cuello de la muerte celular inducida por radiación y que su silenciamiento o inhibición aumentan la radiosensibilidad¹⁵³. En el CCR, *FAK* puede suprimir la formación de tumores^{124,154} y aumentar la sensibilidad al tratamiento con 5Fu cuando se encuentra silenciado en líneas celulares¹⁵⁵. Además, ha sido propuesto como un gen que vincula varias vías de señalización promoviendo el crecimiento tumoral, la metástasis y la quimiorresistencia¹²³.

Al evaluar los perfiles de expresión de estos genes ante las variaciones de la expresión de *RHBDD2*, se observó un aumento en la expresión de *PXN* y *FAK* en las células que sobreexpresan *RHBDD2* tratadas con 5Fu y una reducción de *FAK* en las células silenciadas.

Se ha establecido una conexión entre la vía del UPR y la vía de las adhesiones focales¹⁵⁶. La sobreexpresión de *BiP* se asoció al incremento en la expresión de *FAK* en tumores invasivos¹⁵⁶. Además, CD147, un biomarcador que se encuentra

significativamente aumentado en hepatocarcinoma, incrementa la transcripción de *BiP* mediada por *FAK* en respuesta al estrés de RE. Este fenómeno, confiere a las células tumorales quimiorresistencia y un aumento en su supervivencia¹⁵⁷. En CCR, *BiP* interactúa con $\beta 1$ -*integrina* y *FAK* provocando un aumento en la migración celular y la invasión a la matriz extracelular¹⁵⁸.

Estos resultados en conjunto demuestran que el aumento de *RHBDD2*, *BiP*, y *FAK* ante el 5Fu favorecen un fenotipo de quimiorresistencia celular.

5 La sobreexpresión de RHBDD2 promueve un fenotipo invasor y quimiorresistente en tumores de cáncer de recto

La heterogeneidad tumoral es una de las barreras que limitan el éxito de las terapias. Esta heterogeneidad puede resultar en una distribución no uniforme de subpoblaciones de células tumorales genéticamente distintas entre y dentro de los sitios de la enfermedad (heterogeneidad espacial, inter e intratumoral) o variaciones temporales en la composición molecular de las células cancerosas (heterogeneidad temporal). La heterogeneidad proporciona el combustible para la resistencia; por lo tanto, una evaluación precisa de la heterogeneidad tumoral es esencial para el desarrollo de terapias efectivas¹⁵⁹.

El siguiente enfoque en la presente tesis fue evaluar la expresión de *RHBDD2* y *BiP* *ex vivo* en tumores de recto antes y después del tratamiento neoadyuvante. El análisis antes del tratamiento mostró una elevada expresión de ambas proteínas en la mayoría de las muestras, consistente con su asociación al CCR. En las muestras post-tratadas, si bien los resultados mostraron una reducción significativa de *BiP* y *RHBDD2*, posiblemente producto de la afectación general de la quimioterapia sobre la maquinaria transcripcional, hubo un grupo de tumores asociados a pacientes que desarrollaron metástasis local o a distancia, en los cuales la expresión de *RHBDD2* se mantuvo alta. Este resultado, sería coincidente con un estudio previo en cáncer de mama en el que demostramos que la sobreexpresión de *RHBDD2* se asocia a pacientes que poseen ganglios linfáticos positivos¹⁰⁴. De un modo similar, recientemente se demostró que *RHBDD1*, una proteína filogenéticamente muy cercana a *RHBDD2*, promueve la metástasis en CCR a través de la vía de señalización *Wnt*⁹⁴. Estos resultados indicarían que existen al menos dos grupos de respuesta al tratamiento, basados en la expresión de *RHBDD2* luego del mismo, y en el pronóstico de los pacientes.

Por otro lado, se evaluó la expresión de *RHBDD2* y *BiP* a nivel intratumoral. Es sabido que luego de un tratamiento células tumorales residuales pueden permanecer con el

potencial de restaurar el crecimiento celular. En este sentido, se observaron áreas con células invasoras y proliferativas que mantuvieron una alta expresión de RHBDD2 y BiP, incluso en aquellos tumores donde la expresión general de ambas proteínas se había reducido dramáticamente luego del tratamiento. Este resultado demuestra la asociación de ambas proteínas con un fenotipo resistente e invasor, y resalta la importancia de la heterogeneidad intratumoral como un aspecto a considerar en la evaluación de un biomarcador pronóstico/predictivo de respuesta a terapia.

Monitorear la expresión de RHBDD2 durante el tratamiento neoadyuvante podría constituir una estrategia relevante en la medicina de precisión durante el protocolo *watch and wait* a fin de clasificar a los pacientes adecuadamente según su predicción de respuesta.

Será necesario profundizar el estudio sobre un mayor número de pacientes con CR para obtener una estratificación confiable basada en la expresión de RHBDD2 y su asociación con la respuesta al tratamiento neoadyuvante.



CONCLUSIONES

- ◆ La expresión de *RHBDD2* se induce frente al tratamiento con 5Fu en células de CCR.
- ◆ La sobreexpresión de *RHBDD2* incrementa la adhesión, la migración, el crecimiento libre de anclaje, la proliferación y confiere resistencia al tratamiento con 5Fu en células de CCR.
- ◆ Las variaciones en la expresión de *RHBDD2* afectan la expresión de los genes del UPR: *BiP*, *PERK* y *CHOP*. Se demostró la interacción entre *RHBDD2* y *BiP* en células de CCR. *RHBDD2* posee motivos SH3 no canónicos en su dominio citoplasmático que contribuirían con su unión a ligandos específicos, entre ellos *BiP*. La asociación negativa entre *RHBDD2* y *CHOP* y la presencia de sitios de unión a *CHOP/DDIT3* en la región promotora de *RHBDD2* indicaría un mecanismo de regulación entre ambas proteínas.
- ◆ La sobreexpresión de *RHBDD2* causó un incremento de los genes de la vía de adhesión focal *PXN* y *FAK* ante el tratamiento con 5Fu. El silenciamiento, redujo la expresión de *FAK*.
- ◆ *RHBDD2*, muestra elevada expresión en tumores de CR.

- ◆ Los tumores de recto con baja respuesta al tratamiento neoadyuvante mostraron una mayor expresión de RHBDD2 luego del mismo, asociándose a pacientes que presentaron progresión de la enfermedad.
- ◆ A nivel intratumoral, se observó mayor expresión de RHBDD2 y BiP en regiones asociadas a células tumorales invasivas.
- ◆ RHBDD2 constituye una proteína de la vía biosintética secretora que actuaría como intermediario de las vías del UPR y de adhesión focal contribuyendo con un fenotipo tumoral quimiorresistente en el CCR.
- ◆ Monitorear la expresión de RHBDD2 durante el tratamiento neoadyuvante podría ser una herramienta relevante para la estratificación de pacientes con CCR a fin de predecir su respuesta al tratamiento.
- ◆ La [Figura 39](#) representa un resumen de los principales resultados hallados en la presente tesis.

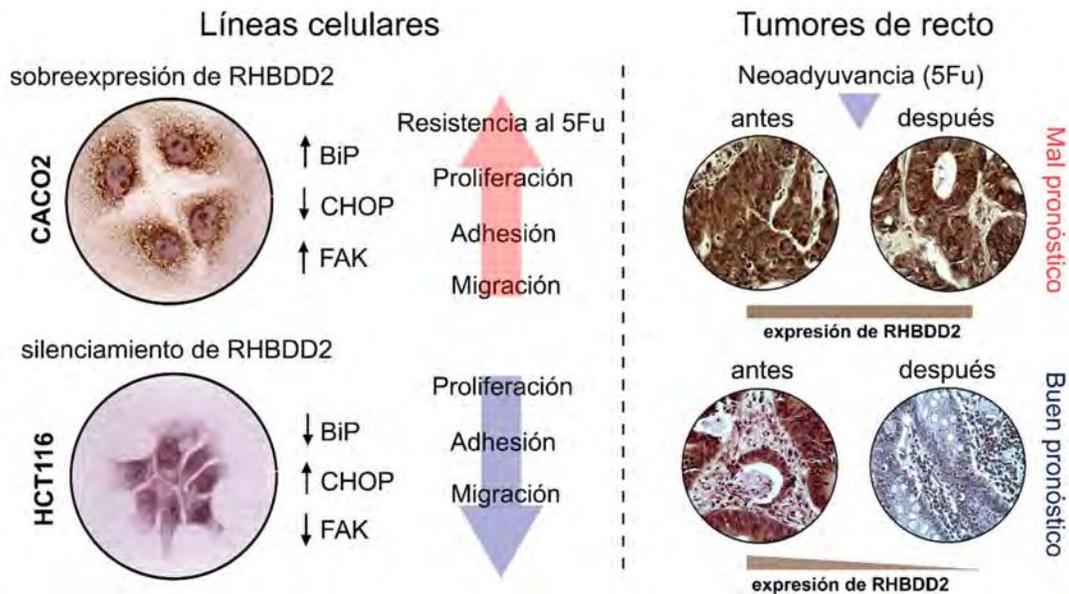


Figura 39: Resumen de los resultados más relevantes de la expresión de RHBDD2 en el CCR y su respuesta al tratamiento neoadyuvante. En las líneas celulares (derecha), la sobreexpresión de RHBDD2 incrementó la adhesión, la migración, la proliferación y la expresión de BiP y FAK y redujo la expresión de CHOP. En cambio, el silenciamiento de RHBDD2 redujo la adhesión, la migración, la proliferación celular y la expresión de los genes BiP y FAK y aumentó la expresión de CHOP. En los tumores de recto (izquierda) la elevada expresión de RHBDD2 luego del tratamiento neoadyuvante se asocia a mal pronóstico.

REFERENCIAS

1. Mescher A.L. Junqueira's, Basic Histology, Text and Atlas, 13th edition, 2013 ISBN: 978007178033.
2. Robbins and Cotran, Pathologic Basis of Disease, 9th edition, Elsevier Inc 2015. ISBN: 9780323609920.
3. Amelio PD and Sassi F. Gut Microbiota, Immune System, and Bone. *Calcif Tissue Int.* 2018; 102:415–425.
4. Patterson E, Ryan PM, Cryan JF, Dinan TG, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C. Gut microbiota, obesity and diabetes. *Postgrad Med J.* 2016; 92(1087):286-300.
5. Jangi, S. Gandhi R, Cox LM, Li N, von Glehn F, Yan R, Patel B, Mazzola MA, Liu S, Glanz BL, Cook S, Tankou S, Stuart F, Melo K, Nejad P, Smith K, Topçuoğlu BD, Holden J, Kivisäkk P, Chitnis T, De Jager PL, Quintana FJ, Gerber GK, Bry L, Weiner HL. Alterations of the human gut microbiome in multiple sclerosis. *Nat. Commun.* 2016; 7, 12015.
6. Lach G, Schellekens H, Dinan TG and Cryan JF. Anxiety, Depression, and the Microbiome: A Role for Gut Peptides. *Neurotherapeutics.* 2018; 15(1):36-59.
7. Rajagopala SV, Vashee S, Oldfield LM, Suzuki Y, Venter JC, Telenti A, Nelson KE. The Human Microbiome and Cancer. *Cancer Prev Res (Phila).* 2017; 10(4):226-234.
8. Helmink BA, M, Wadud Khan MA, Hermann A, V Gopalakrishnan and JA. Wargo. The microbiome, cancer, and cancer therapy. *Nat Med.* 2019; 25(3):377-388.
9. Hanahan and Weinberg. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000; 100(1):57-70.
10. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011; 144(5):646-74.
11. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2015. *Cancer J Clin* 2015; 65 (1):5-29.
12. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018; 68(6):394-424.
13. Instituto Nacional del Cáncer, Ministerio de salud de la Nación (<https://www.argentina.gob.ar/salud/instituto-nacional-del-cancer/>).
14. Fearon ER. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol* 2011; 6:479-507.
15. Segditsas S and Tomlinson I. Colorectal cancer and genetic alterations in the Wnt pathway. *Oncogene* 2006, 25:7531–37.
16. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature.* 2012; 487(7407):330-7.

17. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*. 1988; 319:525-32.
18. Thibodeau SN, BrenG, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science*. 1993; 260:816–19.
19. Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, Fan RS, Zborowska E, Kinzler KW, Vogelstein B. Inactivation of the type II TGF- β receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science*. 1995; 268:1336–38.
20. Fleming NI, Jorissen RN, Mouradov D, Christie M, Sakthianandeswaren A, Palmieri M, Day F, Li S, Tsui C, Lipton L, Desai J, Jones IT, McLaughlin S, Ward RL, Hawkins NJ, Ruzskiewicz AR, Moore J, Zhu HJ, Mariadason JM, Burgess AW, Busam D, Zhao Q, Strausberg RL, Gibbs P, Sieber OM. SMAD2, SMAD3 and SMAD4 mutations in colorectal cancer. *Cancer Res*. 2013; 73(2):725-35.
21. Yashiro M, Hirakawa K, Boland CR. Mutations in TGFbeta-RII and BAX mediate tumor progression in the later stages of colorectal cancer with microsatellite instability. *BMC Cancer*. 2010; 10:303.
22. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology*. 2007; 50:113–30.
23. Lynch HT and Krush AJ. 1971. Cancer family “G” revisited: 1895–1970. *Cancer*. 1971; 27:1505–11.
24. Merg A and Howe JR. Genetic conditions associated with intestinal juvenile polyps. *Am. J. Med. GenetC*. 2004; 129C:44–55.
25. Farraye FA, Odze RD, Eaden J, Itzkowitz SH. AGA Medical Position Statement on the Diagnosis and Management of Colorectal Neoplasia in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*. 2010, 138, 738–745.
26. Jess T, Rungoe C, Peyrin-Biroulet L. Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: A meta-analysis of population-based cohort studies. *Clin. Gastroenterol. Hepatol*. 2012, 10, 639–645.
27. Zhao Z, Feng Q, Yin Z, Shuang J, Bai B, Yu P, Guo M, Zhao Q. Red and processed meat consumption and colorectal cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2017; 8(47):83306-83314.
28. Schwingshackl L, Schwedhelm C, Hoffmann G, Knüppel S, Laure Preterre A, Iqbal K, Bechthold A, De Henauw S, Michels N, Devleesschauwer B, Boeing H, Schlesinger S. Food groups and risk of colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2018; 142(9):1748-1758.
29. Cho E, Smith-Warner SA, Ritz J, van den Brandt PA, Colditz GA, Folsom AR, Freudenheim JL, Giovannucci E, Goldbohm RA, Graham S, Holmberg L, Kim DH, Malila N, Miller AB, Pietinen P, Rohan TE, Sellers TA, Speizer FE, Willett WC, Wolk A, Hunter

- DJ. Alcohol intake and colorectal cancer: A pooled analysis of 8 cohort studies. *Ann. Intern. Med.* 2004, 140, 603–613.
30. Botteri E, Iodice S, Bagnardi V, Raimondi S, Lowenfels AB, Maisonneuve P. Smoking and colorectal cancer: A meta-analysis. *JAMA.* 2008, 300, 2765–2778.
31. Tjalsma H, Boleij A, Marchesi JR, Dutilh BE. A bacterial driver–passenger model for colorectal cancer: Beyond the usual suspects. *Nat. Rev. Microbiol.* 2012, 10, 575–582.
32. Lucas C, Barnich N, Nguyen HTT. Microbiota, Inflammation and Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(6). pii: E1310.
33. Niederreiter L, Adolph TE, Tilg H. Food, microbiome and colorectal cancer. *Dig Liver Dis.* 2018; 50(7):647-652.
34. Doubeni CA, Laiyemo AO, Major JM, Schootman M, Lian M, Park Y, Graubard BI, Hollenbeck AR, Sinha R. Socioeconomic status and the risk of colorectal cancer: an analysis of more than a half million adults in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study. *Cancer.* 2012; 118(14):3636-44.
35. Tamas K, Walenkamp AM, de Vries EG, van Vugt MA, Beets-Tan RG, van Etten B, de Groot DJ, Hospers GA. Rectal and colon cancer: Not just a different anatomic site. *Cancer Treat Rev.* 2015; 41(8):671-9.
36. Hoadley KA, Yau C, Wolf DM, Cherniack AD, Tamborero D, Ng S, Leiserson MD, Niu B, McLellan MD, Uzunangelov V, Zhang J, Kandoth C, Akbani R, Shen H, Omberg L, Chu A, Margolin AA, Van't Veer LJ, Lopez-Bigas N, Laird PW, Raphael BJ, Ding L, Robertson AG, Byers LA, Mills GB, Weinstein JN, Van Waes C, Chen Z, Collisson EA; Cancer Genome Atlas Research Network, Benz CC, Perou CM, Stuart JM. Multiplatform analysis of 12 cancer types reveals molecular classification within and across tissues of origin. *Cell.* 2014; 158, 929–944.
37. Schlicker A, Beran G, Chresta CM, McWalter G, Pritchard A, Weston S, Runswick S, Davenport S, Heathcote K, Castro DA, Orphanides G, French T, Wessels LF. Subtypes of primary colorectal tumors correlate with response to targeted treatment in colorectal cell lines. *BMC Med. Genomics.* 2012; 5, 66.
38. Perez-Villamil B, Romera-Lopez A, Hernandez-Prieto S, Lopez-Campos G, Calles A, Lopez-Asenjo JA, Sanz-Ortega J, Fernandez-Perez C, Sastre J, Alfonso R, Caldes T, Martin-Sanchez F, Diaz-Rubio EI. Colon cancer molecular subtypes identified by expression profiling and associated to stroma, mucinous type and different clinical behavior. *BMC Cancer.* 2012; 12, 260.
39. Budinska E, Popovici V, Tejpar S, D'Ario G, Lapique N, Sikora KO, Di Narzo AF, Yan P, Hodgson JG, Weinrich S, Bosman F, Roth A, Delorenzi M. Gene expression patterns unveil a new level of molecular heterogeneity in colorectal cancer. *J. Pathol.* 2013; 231, 63–76.

40. Sadanandam A, Lyssiotis CA, Homicsko K, Collisson EA, Gibb WJ, Wullschleger S, Ostos LC, Lannon WA, Grotzinger C, Del Rio M, Lhermitte B, Olshen AB, Wiedenmann B, Cantley LC, Gray JW, Hanahan D. A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. *Nat Med.* 2013; 19(5):619-25.
41. De Sousa E Melo, F Wang X, Jansen M, Fessler E, Trinh A, de Rooij LP, de Jong JH, de Boer OJ, van Leersum R, Bijlsma MF, Rodermond H, van der Heijden M, van Noesel CJ, Tuynman JB, Dekker E, Markowitz F, Medema JP, Vermeulen L. Poor-prognosis colon cancer is defined by a molecularly distinct subtype and develops from serrated precursor lesions. *Nat. Med.* 2013; 19, 614–618.
42. Marisa L, de Reyniès A, Duval A, Selves J, Gaub MP, Vescovo L, Etienne-Grimaldi MC, Schiappa R, Guenot D, Ayadi M, Kirzin S, Chazal M, Fléjou JF, Benchimol D, Berger A, Lagarde A, Pencreach E, Piard F, Elias D, Parc Y, Olschwang S, Milano G, Laurent-Puig P, Boige V. Gene expression classification of colon cancer into molecular subtypes: characterization, validation and prognostic value. *PLoS Med.* 2013; 10, e1001453.
43. Roepman P, Schlicker A, Tabernero J, Majewski I, Tian S, Moreno V, Snel MH, Chresta CM, Rosenberg R, Nitsche U, Macarulla T, Capella G, Salazar R, Orphanides G, Wessels LF, Bernards R, Simon IM. Colorectal cancer intrinsic subtypes predict chemotherapy benefit, deficient mismatch repair and epithelial-to-mesenchymal transition. *Int. J. Cancer.* 2014; 134, 552–562.
44. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Sonesson C, Marisa L, Roepman P, Nyamundanda G, Angelino P, Bot BM, Morris JS, Simon IM, Gerster S, Fessler E, De Sousa E Melo F, Missiaglia E, Ramay H, Barras D, Homicsko K, Maru D, Manyam GC, Broom B, Boige V, Perez-Villamil B, Laderas T, Salazar R, Gray JW, Hanahan D, Tabernero J, Bernards R, Friend SH, Laurent-Puig P, Medema JP, Sadanandam A, Wessels L, Delorenzi M, Kopetz S, Vermeulen L, Tejpar S. . The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med.* 2015; 21(11):1350-6.
45. Son J, Lyssiotis CA, Ying H, Wang X, Hua S, Ligorio M, Perera RM, Ferrone CR, Mullarky E, Shyh-Chang N, Kang Y, Fleming JB, Bardeesy N, Asara JM, Haigis MC, DePinho RA, Cantley LC, Kimmelman AC. Glutamine supports pancreatic cancer growth through a KRAS-regulated metabolic pathway. *Nature.* 2013; 496, 101–105.
46. De Vita, Hellman and Rosemberg, *Cancer Principles and Practice of Oncology*, Lippincott Williams and Wilkins, a Wolters Kluwer business, 2011. ISBN: 9781451105452
47. Marijnen, CAM. Organ preservation in rectal cancer: have all questions been answered?. *Lancet Oncol.* 2015; 16:e13–e2.
48. Habr-Gama A, Gama-Rodrigues J, Sao Juliao GP, Proscurshim I, Sabbagh C, Lynn PB, Perez OR. Local recurrence after complete clinical response and watch and wait in

- rectal cancer after neoadjuvant chemoradiation: impact of salvage therapy on local disease control. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2014; 88: 822–828.
49. Habr-Gama A, de Souza PM, Ribeiro U, Nadalin W, Gansl R, Sousa AH, Campos FG, Gama-Rodrigues J. Low rectal cancer: impact of radiation and chemotherapy on surgical treatment. *Dis Colon Rectum*. 1998; 41(9):1087-96.
50. Habr-Gama A, Perez RO, Nadalin W, Sabbaga J, Ribeiro U, Silva e Sousa AH, Campos FG, Kiss RD, Gama-Rodrigues J. Operative versus nonoperative treatment for stage 0 distal rectal cancer following chemoradiation therapy: long-term results. *Ann Surg*. 2004; 240: 711–717.
51. Habr-Gama A, Perez RO, Nadalin W, Nahas SC, Ribeiro U, Silva e Sousa AH, Campos FG, Kiss RD, Gama-Rodrigues J. Long-term results of preoperative chemoradiation for distal rectal cancer correlation between final stage and survival. *J Gastrointest Surg*. 2005; 9: 90–99.
52. Habr-Gama A, Perez RO, Proscurshim I, Campos FG, Nadalin W, Kiss RD, Gama-Rodrigues J. Patterns of failure and survival for nonoperative treatment of stage c0 distal rectal cancer following neoadjuvant chemoradiation therapy. *J Gastrointest Surg*. 2006; 10: 1319–1328.
53. Lim L, Chao M, Shapiro J, Millar JL, Kipp D, Rezo A, Fong A, Jones IT, McLaughlin S, Gibbs P. Long-term outcomes of patients with localized rectal cancer treated with chemoradiation or radiotherapy alone because of medical inoperability or patient refusal. *Dis Colon Rectum*. 2007; 50: 2032–2039.
54. Hughes R, Harrison M, Glynne-Jones R. Could a wait and see policy be justified in T3/4 rectal cancers after chemo-radiotherapy?. *Acta Oncol*. 2010; 49: 378–381.
55. Maas M, Beets-Tan RG, Lambregts DM, Lammering G, Nelemans PJ, Engelen SM, van Dam RM, Jansen RL, Sosef M, Leijtens JW, Hulsewé KW, Buijsen J, Beets GL. Wait-and-see policy for clinical complete responders after chemoradiation for rectal cancer. *J Clin Oncol*. 2011; 29: 4633–4640.
56. Dalton RS, Velineni R, Osborne ME, Thomas R, Harries S, Gee AS, Daniels IR. A single-centre experience of chemoradiotherapy for rectal cancer: is there potential for nonoperative management?. *Colorectal Dis*. 2012; 14: 567–571.
57. Das P, Minsky BD. A watch-and-wait approach to the management of rectal cancer. *Oncology (Williston Park)*. 2013; 27(10):962-8.
58. Renehan AG, Malcomson L, Emsley R, Gollins S, Maw A, Myint AS, Rooney PS, Susnerwala S, Blower A, Saunders MP, Wilson MS, Scott N, O'Dwyer ST. Watch-and-wait approach versus surgical resection after chemoradiotherapy for patients with rectal cancer (the OnCoRe project): a propensity-score matched cohort analysis. *Lancet Oncol*. 2016; 17(2):174-183.

59. Ghoshal K, Jacob ST. Specific inhibition of pre-ribosomal RNA processing in extracts from the lymphosarcoma cells treated with 5-fluorouracil. *Cancer Res.* 1994; 54(3):632-60.
60. Santi DV, McHenry CS, Sommer H. Mechanism of interaction of thymidylate synthetase with 5-fluorodeoxyuridylate. *Biochemistry.* 1974; 13(3):471-81.
61. Vodenkova S, Buchler T, Cervena K, Veskrnova V, Vodicka P, Vymetalkova V. 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future. *Pharmacol Ther.* 2020; 206:107447.
62. Johnston, P.G. and Kaye, S. Capecitabine: a novel agent for the treatment of solid tumors. *Anticancer Drugs* 2001; 12 639-646.
63. Schüller J, Cassidy J, Dumont E, Roos B, Durston S, Banken L, Utoh M, Mori K, Weidekamm E, Reigner B. Preferential activation of capecitabine in tumor following oral administration to colorectal cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2000; 45(4):291-7.
65. Hsiang YH, Lihou MG, Liu LF. Arrest of replication forks by drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin. *Cancer Res.* 1989; 49(18):5077-82.
66. De Roock W, De Vriendt V, Normanno N, Ciardiello F, Tejpar S. KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer. *Lancet Oncol.* 2011; 12(6):594-603.
67. Dong D, Stapleton C, Luo B, Xiong S, Ye W, Zhang Y, Jhaveri N, Zhu G, Ye R, Liu Z, Bruhn KW, Craft N, Groshen S, Hofman FM and Lee AS: A critical role for GRP78/BiP in the tumor microenvironment for neovascularization during tumor growth and metastasis. *Cancer Res.* 2011; 71: 2848-2857.
68. Mahadevan NR and Zanetti M: Tumor stress inside out: Cell extrinsic effects of the unfolded protein response in tumor cells modulate the immunological landscape of the tumor microenvironment. *J Immunol.* 2011; 187: 4403-4409.
69. Giampietri C, Petrunaro S, Conti S, Facchiano A, Filippini A, Ziparo E. Cancer Microenvironment and Endoplasmic Reticulum Stress Response. *Mediators Inflamm.* 2015; 417281.
70. Stolz A and Wolf DH: Endoplasmic reticulum associated protein degradation: A chaperone assisted journey to hell. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1803: 694-705.
71. Vandewynckel YP, Laukens D, Geerts A, Bogaerts E, Paridaens A, Verhelst X, Janssens S, Heindryckx F, Van Vlierberghe H. The paradox of the unfolded protein response in cancer. *Anticancer Res.* 2013; 33(11):4683-94.
72. Wang M, Kaufman RJ. The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. *Nat Rev Cancer.* 2014; 14(9):581-97.

73. Hetz C, Zhang K, Kaufman RJ. Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020; 21(8):421-438.
74. Yiwen B and Diehl JA. PERK integrates oncogenic signaling and cell survival during cancer development. *J Cell Physiol.* 2016; 231(10): 2088–2096.
75. Urra H, Dufey E, Avril T, Chevet E, Hetz C. Endoplasmic Reticulum Stress and the Hallmarks of Cancer. *Trends Cancer.* 2016; 2(5):252-262.
76. Yadav RK, Chae SW, Kim HR, Chae HJ. Endoplasmic reticulum stress and cancer. *J Cancer Prev.* 2014; 19(2):75-88.
77. Lee AS. GRP78 Induction in Cancer: Therapeutic and Prognostic Implications. *Cancer Res.* 2007; 67(8):3496–9.
78. Takahashi H, Wang J, Zheng H, Masuda S, Takano Y. Overexpression of GRP78 and GRP94 Is Involved in Colorectal Carcinogenesis. *Histol Histopathol.* 2011; 26, 663-671.
79. Xi J, Chen Y, Huang S, Cui F, Wang X. Suppression of GRP78 Sensitizes Human Colorectal Cancer Cells to Oxaliplatin by Downregulation of CD24. *Oncol Lett.* 2018; 15 (6), 9861-9867.
80. Aguirre-Ghiso J.A. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer.* 2007; 7(11):834-46.
81. Schewe, DM and Aguirre-Ghiso JA. ATF6alpha–Rheb–mTOR signaling promotes survival of dormant tumor cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105(30):10519-24.
82. Arai M, Kondoh N, Imazeki N, Hada A, Hatsuse K, Kimura F, Matsubara O, Mori K, Wakatsuki T, Yamamoto M. Transformation-associated gene regulation by ATF6alpha during hepatocarcinogenesis. *FEBS Lett.* 2006; 580(1):184-90.
83. Romero-Ramirez L, Cao H, Nelson D, Hammond E, Lee AH, Yoshida H, Mori K, Glimcher LH, Denko NC, Giaccia AJ, Le QT, Koong AC. XBP1 is essential for survival under hypoxic conditions and is required for tumor growth. *Cancer Res.* 2004; 64: 5943–5947.
84. Drogat B, Auguste P, Nguyen DT, Bouche-careilh M, Pineau R, Nalbantoglu J, Kaufman RJ, Chevet E, Bikfalvi A, Moenner M. IRE1 signaling is essential for ischemia-induced vascular endothelial growth factor-A expression and contributes to angiogenesis and tumor growth in vivo. *Cancer Res.* 2007; 67: 6700–6707.
85. Romero-Ramirez L, Cao H, Regalado MP, Kambham N, Siemann D, Kim JJ, Le QT, Koong AC. X box-binding protein 1 regulates angiogenesis in human pancreatic adenocarcinomas. *Transl Oncol.* 2009; 2: 31–38.
86. Auf G, Jabouille A, Guérit S, Pineau R, Delugin M, Bouche-careilh M, Magnin N, Favereaux A, Maitre M, Gaiser T, von Deimling A, Czabanka M, Vajkoczy P, Chevet E,

- Bikfalvi A, Moenner M. Inositol-requiring enzyme 1alpha is a key regulator of angiogenesis and invasion in malignant glioma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010; 107(35):15553-8.
87. Dejeans N, Pluquet O, Lhomond S, Grise F, Bouchecareilh M, Juin A, Meynard-Cadars M, Bidaud-Meynard A, Gentil C, Moreau V, Saltel F, Chevet E. Autocrine control of glioma cells adhesion and migration through IRE1alpha-mediated cleavage of SPARC mRNA. *J Cell Sci*. 2012; 125(Pt 18):4278-87.
88. Luo B, Lee AS. The critical roles of endoplasmic reticulum chaperones and unfolded protein response in tumorigenesis and anticancer therapies. *Oncogene*. 2013; 32(7):805-18; 10.1038/onc.2012.130.
89. Wortel IMN, van der Meer LT, Kilberg MS, van Leeuwen F4. Surviving Stress: Modulation of ATF4-Mediated Stress Responses in Normal and Malignant Cells. *Trends Endocrinol Metab*. 2017; 28(11):794-806.
90. Hu YL, Yin Y, Liu HY, Feng YY, Bian ZH, Zhou LY, Zhang JW, Fei BJ, Wang YG, Huang ZH. Glucose deprivation induces chemoresistance in colorectal cancer cells by increasing ATF4 expression. *World J Gastroenterol*. 2016; 22(27):6235-45.
91. Pällmann N, Livgård M, Tesikova M, Zeynep Nenseth H, Akkus E, Sikkeland J, Jin Y, Koc D, Kuzu OF, Pradhan M, Danielsen HE, Kahraman N, Mokhlis HM, Ozpolat B, Banerjee PP, Uren A, Fazli L, Rennie PS, Jin Y, Saatcioglu F. Regulation of the unfolded protein response through ATF4 and FAM129A in prostate cancer. *Oncogene*. 2019; 38(35):6301-6318.
92. Rozpedek W, Pytel D, Mucha B, Leszczynska H, Diehl JA, Majsterek I. The Role of the PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP Signaling Pathway in Tumor Progression During Endoplasmic Reticulum Stress. *Curr Mol Med*. 2016; 16(6):533-44.
93. He K, Zheng X, Li M, Zhang L, Yu J. mTOR inhibitors induce apoptosis in colon cancer cells via CHOP-dependent DR5 induction on 4E-BP1 dephosphorylation. *Oncogene*. 2016; 35(2):148-57.
94. Zhang X, Zhou T, Li W, Zhang T, Che N, Zu G. Clinicopathological and prognostic significance of C/EBP homologous protein (CHOP) in advanced gastric cancer. *Pathol Res Pract*. 2018; 214(8):1105-1109.
95. Bergbold N, Lemberg MK. Emerging role of rhomboid family proteins in mammalian biology and disease. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1828(12):2840-8.
96. Freeman M. Rhomboid proteases and their biological functions. *AnnuRevGenet*. 2008; 42:191-210.
97. McQuibban GA, Saurya S, Freeman M. Mitochondrial membrane remodelling regulated by a conserved rhomboid protease. *Nature*. 2003; 423(6939):537-41.

98. Urban S, Freeman M. Substrate specificity of rhomboid intramembrane proteases is governed by helix-breaking residues in the substrate transmembrane domain. *Mol Cell*. 2003; 11(6):1425-34.
99. Zou H, Thomas SM, Yan ZW, Grandis JR, Vogt A, Li LY. Human rhomboid family-1 gene RHBDF1 participates in GPCR-mediated transactivation of EGFR growth signals in head and neck squamous cancer cells. *FASEB J*. 2009; 23(2):425-32.
100. McQuibban GA, Bulman DE. The PARLance of Parkinson disease. *Autophagy*. 2011; 7(7):790-2.
101. Adrain C, Strisovsky K, Zettl M, Hu L, Lemberg MK, Freeman M. Mammalian EGF receptor activation by the rhomboid protease RHBDL2. *EMBO Rep*. 2011; 12(5):421-7.
102. Fleig L, Bergbold N, Sahasrabudhe P, Geiger B, Kaltak L, Lemberg MK. Ubiquitin-dependent intramembrane rhomboid protease promotes ERAD of membrane proteins. *Mol Cell*. 2012; 47(4):558-69.
103. Abba MC, Sun H, Hawkins KA, Drake JA, Hu Y, Nunez MI, Gaddis S, Shi T, Horvath S, Sahin A, Aldaz CM. Breast cancer molecular signatures as determined by SAGE: correlation with lymph node status. *Mol Cancer Res*. 2007; 5(9):881-90.
104. Abba MC, Lacunza E, Nunez MI, Colussi A, Isla-Larrain M, Segal-Eiras A, Croce MV, Aldaz CM. Rhomboid domain containing 2 (RHBDD2): a novel cancer-related gene over-expressed in breast cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1792(10):988-97.
105. Lacunza E, Canzoneri R, Rabassa ME, Zwenger A, Segal-Eiras A, Croce MV, Abba MC. RHBDD2: a 5-fluorouracil responsive gene overexpressed in the advanced stages of colorectal cancer. *Tumour Biol*. 2012; 33(6):2393-9.
106. Lacunza E, Rabassa ME, Canzoneri R, Pellon-Maison M, Croce MV, Aldaz CM, Abba MC. Identification of signaling pathways modulated by RHBDD2 in breast cancer cells: a link to the unfolded protein response. *Cell Stress Chaperones*. 2014; 19(3):379-88.
107. Canzoneri R, Lacunza E, Isla Larrain M, Croce MV, Abba MC. Rhomboid family gene expression profiling in breast normal tissue and tumor samples. *Tumour Biol*. 2014; 35(2):1451-8.
108. Ferretti VA, Canzoneri R, Barbeito CG, Croce MV, Abba MC, Lacunza E. Spatiotemporal expression of Rhomboid domain containing 2 (Rhbdd2) during rat development. *Acta Histochem*. 2015; 117(7):635-41.
109. Canzoneri R, Rabassa ME, Gurruchaga A, Ferretti V, Palma S, Isla-Larrain M, Croce MV, Lacunza E, Abba MC. Alternative splicing variant of RHBDD2 is associated with cell stress response and breast cancer progression. *Oncol Rep*. 2018; 40(2):909-915.

110. Mariadason JM, Arango D, Shi Q, Wilson AJ, Corner GA, Nicholas C, Aranes MJ, Lesser M, Schwartz EL, Augenlicht LH. Gene expression profiling-based prediction of response of colon carcinoma cells to 5-fluorouracil and camptothecin. *Cancer Res.* 2003; 15; 63(24):8791-812.
111. Boyer J, Allen WL, McLean EG, Wilson PM, McCulla A, Moore S, Longley DB, Caldas C, Johnston PG. Pharmacogenomic Identification of Novel Determinants of Response to Chemotherapy in Colon Cancer. *Cancer Res.* 2006; 66(5): 2765-77.
112. Nishitoh H. CHOP is a multifunctional transcription factor in the ER stress response. *J Biochem.* 2012; 151(3):217-9.
113. Singer GA, Lloyd AT, Huminiacki LB, Wolfe KH. Clusters of co-expressed genes in mammalian genomes are conserved by natural selection. *Mol Biol Evol.* 2005; 22:767–75; 10.1093/molbev/msi062.
114. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research.* 2003; 13(11):2498-504.
115. Mlecnik B, Galon J, Bindea G. Comprehensive functional analysis of large lists of genes and protein. *J Proteomics.* 2018; 171:2-10; 10.1016/j.jprot.2017.03.016.
116. Gillis J & Pavlidis P. “Guilt by Association” Is the Exception Rather Than the Rule in Gene Networks. *PLoS Comput Biol.* 2012; 8(3):e1002444.
117. Oliver S. Guilt-by-association goes global. *Nature.* 2000; 403: 601–603.
118. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. EdgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics.* 2010; 26(1):139-40.
119. Huber W, Carey VJ, Gentleman R, Anders S, Carlson M, Carvalho BS, Bravo HC, Davis S, Gatto L, Girke T, Gottardo R, Hahne F, Hansen KD, Irizarry RA, Lawrence M, Love MI, MacDonald J, Obenchain V, Oleś AK, Pagès H, Reyes A, Shannon P, Smyth GK, Tenenbaum D, Waldron L, Morgan M. Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nat Methods.* 2015; 12(2):115-21.
120. Delgaard Introductory Statistics with R. Second Edition, 2008 Springer. ISSN: 1431-8784.
121. Durkalski VL1, Palesch YY, Lipsitz SR, Rust PF. Analysis of clustered matched-pair data. *Stat Med.* 2003 Aug 15; 22(15):2417-28.
122. Acar EF, Sun L. A generalized Kruskal-Wallis test incorporating group uncertainty with application to genetic association studies. *Biometrics.* 2013; 69(2):427-35.
123. Sulzmaier FJ, Jean C, Schlaepfer DD. FAK in Cancer: Mechanistic Findings and Clinical Applications. *Nat Rev Cancer.* 2014; 14(9):598-610.

124. Yang, H. J., Chen, J. Z., Zhang, W. L. and Ding, Y. Q. Focal adhesion plaque associated cytoskeletons are involved in the invasion and metastasis of human colorectal carcinoma. *Cancer Invest.* 2010; 28, 127-134.
125. Kania A, Klein R. Mechanisms of ephrin-Eph signalling in development, physiology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016; 17(4):240-56; 10.1038/nrm.2015.16.
126. Geng L, Huehls AM, Wagner JM, Huntoon CJ, Karnitz LM. Checkpoint signaling, base excision repair, and PARP promote survival of colon cancer cells treated with 5-fluorodeoxyuridine but not 5-fluorouracil. *PLoS One.* 2011; 6(12):e28862; 10.1371/journal.pone.0028862.
127. Han J, Murthy R, Wood B, Song B, Wang S, Sun B, Malhi H, Kaufman RJ. ER stress signalling through eIF2 α and CHOP, but not IRE1 α , attenuates adipogenesis in mice. *Diabetologia.* 2013; 56(4):911-24.
128. Song S, Tan J, Miao Y, Zhang Q. Crosstalk of ER stress-mediated autophagy and ER-phagy: Involvement of UPR and the core autophagy machinery. *J Cell Physiol.* 2018; 233(5):3867-3874.
129. Lin Y, Jiang M, Chen W, Zhao T, Wei Y. Cancer and ER stress: Mutual crosstalk between autophagy, oxidative stress and inflammatory response. *Biomed Pharmacother.* 2019; 118:109249.
130. Kadowaki H, Satrimafitrah P, Takami Y, Nishitoh H. Molecular mechanism of ER stress-induced pre-emptive quality control involving association of the translocon, Derlin-1, and HRD1. *Sci Rep.* 2018; 8(1):7317.
131. Ikeda KN, Freeman M. Spatial proteomics reveal that the protein phosphatase PTP1B interacts with and may modify tyrosine phosphorylation of the rhomboid protease RHBDL4. *J Biol Chem.* 2019; 294(30):11486-11497.
132. Kay BK, Williamson MP, Sudol M. The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains *FASEB J.* 2000; 14(2):231-41.
133. Hetz C, Papa FR. The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control. *Mol Cell.* 2018; 18; 69(2):169-181.
134. Reid DW, Chen Q, Tay AS, Shenolikar S, Nicchitta CV. The unfolded protein response triggers selective mRNA release from the endoplasmic reticulum. *Cell.* 2014; 11; 158(6):1362-1374.
135. Yoshikawa R, Kusunoki M, Yanagi H, Noda M, Furuyama JI, Yamamura T, Hashimoto-Tamaoki T. Dual antitumor effects of 5-fluorouracil on the cell cycle in colorectal carcinoma cells: a novel target mechanism concept for pharmacokinetic modulating chemotherapy. *Cancer Res.* 2001; 61(3):1029-37.

136. Chern YJ, Wong JCT, Cheng GSW, Yu A, Yin Y, Schaeffer DF, Kennecke HF, Morin G, Tai IT. The interaction between SPARC and GRP78 interferes with ER stress signaling and potentiates apoptosis via PERK/eIF2 α and IRE1 α /XBP-1 in colorectal cancer. *Cell Death Dis.* 2019; 10(7):504.
137. Reddy RK, Mao C, Baumeister P, Austin RC, Kaufman RJ, Lee AS. Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors: role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation. *J Biol Chem.* 2003; 278: 20915–20924; 10.1074/jbc.M212328200.
138. Fu Y, Li J, Lee AS. GRP78/BiP inhibits endoplasmic reticulum BIK and protects human breast cancer cells against estrogen-starvation induced apoptosis. *Cancer Res.* 2007; 67: 3734–3740; 10.1158/0008-5472.CAN-06-4594.
139. Wu MJ, Jan CI, Tsay YG, Yu YH, Huang CY, Lin SC, Liu CJ, Chen YS, Lo JF, Yu CC. Elimination of head and neck cancer initiating cells through targeting glucose regulated protein78 signaling. *Mol Cancer.* 2010; 9: 283.
140. Gifford, J. B., Hill, R. GRP78 Influences Chemoresistance and Prognosis in Cancer. *Curr Drug Targets.* 2018; 19(6):701-708.
141. Pyrko, P., Schonthal, A. H., Hofman, F. M., Chen, T. C., Lee, A. S. The unfolded protein response regulator GRP78/BiP as a novel target for increasing chemosensitivity in malignant gliomas. *Cancer Res.* 2007; 67: 9809–9816.
142. Virrey, JJ, Dong D, Stiles C, Patterson JB, Pen L, Ni M, Schönthal AH, Chen TC, Hofman FM, Lee AS. Stress chaperone GRP78/BiP confers chemoresistance to tumor-associated endothelial cells. *Mol Cancer Res.* 2008; 6: 1268–1275.
143. Tsai YL, Ha DP, Zhao H, Carlos AJ, Wei S, Pun TK, Wu K, Zandi E, Kelly K, Lee AS. Endoplasmic reticulum stress activates SRC, relocating chaperones to the cell surface where GRP78/CD109 blocks TGF- β signaling. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2018; 115(18):E4245-E4254.
144. Zhang, K. Integration of ER stress, oxidative stress and the inflammatory response in health and disease. *Int J Clin Exp Med.* 2010; 3(1):33-40.
145. Diehl, J. A., Fuchs, S. Y., Koumenis, C. The cell biology of the unfolded protein response. *Gastroenterology.* 2011; 141: 38–41, 41 e31-32.
146. Teske BF, Wek SA, Bunpo P, Cundiff JK, McClintick JN, Anthony TG, Wek RC. The eIF2 kinase PERK and the integrated stress response facilitate activation of ATF6 during endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell.* 2011; 22: 4390–4405.
147. Pakos-Zebrucka K, Koryga I, Mnich K, Ljujic M, Samali A, Gorman AM. The integrated stress response. *EMBO Rep.* 2016; 17(10):1374-1395.

148. Hamanaka, R. B., Bennett, B. S., Cullinan, S. B., Diehl, J. A. PERK and GCN2 contribute to eIF2alpha phosphorylation and cell cycle arrest after activation of the unfolded protein response pathway. *Mol Biol Cell*. 2005; 16: 5493–5501.
149. Gupta S, McGrath B, Cavener DR. PERK regulates the proliferation and development of insulin-secreting beta-cell tumors in the endocrine pancreas of mice. *PLoS One*. 2009; 4:e8008.
150. Seo J, Lee SH, Park SY, Jeong MH, Lee SY, Kim MJ, Yoo JY, Jang S, Choi KC, Yoon HG. GPR177 promotes gastric cancer proliferation by suppressing endoplasmic reticulum stress-induced cell death. *J Cell Biochem*. 2018; 10.1002/jcb.27545.
151. Burridge K. Focal Adhesions: a personal perspective on a half century of progress. *FEBS J*. 2017; 284(20):3355-3361.
152. Deakin NO, Pignatelli J, Turner CE. Diverse roles for the paxillin family of proteins in cancer. *Genes Cancer* 2012; 3(5-6):362-70.
153. Hehlhans S, Eke I, Cordes N. Targeting FAK radiosensitizes 3-dimensional grown human HNSCC cells through reduced Akt1 and MEK1/2 signaling. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2012; 83(5):e669-76.
154. Jeong KY. Inhibiting focal adhesion kinase: A potential target for enhancing therapeutic efficacy in colorectal cancer therapy. *World J Gastrointest Oncol*. 2018; 10(10):290-292.
155. McLean GW, Carragher NO, Avizienyte E, Evans J, Brunton VG, and Frame MG. The role of focal-adhesion kinase in cancer—a new therapeutic opportunity. *Nature Reviews Cancer*. 2005; 5(7):505–515.
156. Su R, Li Z, Li H, Song H, Bao C, Wei J, Cheng L. Grp78 promotes the invasion of hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer*. 2010; 19; 10:20.
157. Tang J, Guo YS, Zhang Y, Yu XL, Li L, Huang W, Li Y, Chen B, Jiang JL, Chen ZN. CD147 induces UPR to inhibit apoptosis and chemosensitivity by increasing the transcription of Bip in hepatocellular carcinoma. *Cell Death Differ*. 2012; 19(11):1779-90.
158. Li Z, Zhang L, Zhao Y, Li H, Xiao H, Fu R, Zhao C, Wu H, Li Z. Cell-surface grp78 facilitates colorectal cancer cell migration and invasion. *Int. J. Biochem. Cell Biol* 2013; 45:987–994.
159. Dagogo-Jack I, Shaw AT. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018; 15(2):81-94.

ANEXO

1. Análisis de enriquecimiento funcional de genes que coexpresan con *RHBDD2* en CCR.

1.1 Listado de los microarreglos asociados al CCR incluidos en el análisis.

N	Dataset ID	n	Description
1	E-GEOD-17538	232	Transcription profiling of human colon cancer patients metastasis gene expression profile predicts recurrence and death in colon cancer patients [AE][EV][DE]
2	E-GEOD-17536	177	Transcription profiling of human colon cancer metastasis gene expression profile predicts recurrence and death in colon cancer patients (Moffitt Samples) [AE][EV][DE]
3	E-GEOD-17537	55	Transcription profiling of human colon cancer metastasis predicts recurrence and death in colon cancer patients (VMC Samples) [AE][EV][DE]
4	E-GEOD-33113	90	AMC colon cancer AJCCII [AE][EV][DE]
5	E-GEOD-33114	102	Methylation of Cancer Stem Cell-associated Wnt target genes predicts poor prognosis in colorectal cancer patients [AE][EV][DE]
6	E-GEOD-23878	59	Transcription profiling of colorectal carcinoma in order to identify potential key gene expression [AE][EV][DE]
7	E-TABM-176	131	Transcription profiling of sigmoid colon mucosal biopsies from irritable bowel syndrome patients and healthy control subjects [AE][EV][DE]
8	E-GEOD-8671	64	Transcription profiling of human pedunculated, sporadic colorectal polyps and corresponding normal mucosa obtained during colonoscopies [AE][EV][DE]
9	E-GEOD-18625	7	Identification of miR-145 targets involved in colon cancer [AE][EV][DE]
10	E-GEOD-13367	56	Genome-wide gene expression analysis of mucosal colonic biopsies and isolated colonocytes... [AE][EV][DE]
11	E-GEOD-18088	53	Correlation of molecular profiles and clinical outcome of stage UICC II colon cancer patients [AE][EV][DE]
12	E-GEOD-31595	37	Gene expression profiles to predict recurrence in stage II and III colon cancer [AE][EV][DE]

13	E-GEOD-9254	19	Transcription profiling of human normal mucosa, cecum, ascending, transverse, sigmoid and rectum [AE][EV][DE]
14	E-GEOD-13471	13	Expression data from human normal pre-frontal cortex, liver, and colon tissues and colon tumors [AE][EV][DE]
15	E-GEOD-20916	145	Modeling oncogenic signaling in colon tumors by multidirectional analyses of microarray data [AE][EV][DE]
16	E-GEOD-10714	33	Expression data from human colonic biopsy sample [AE][EV][DE]
17	E-GEOD-15960	18	Expression data from human colonic epithelial cells normal (N), adenoma (AD) or colorectal cancer (CRC) tissues [AE][EV][DE]
18	E-GEOD-4183	53	Transcription profiling of human colon samples - objective classification of colon biopsy specimens with gene expression signature [AE][EV][DE]
19	E-GEOD-18462	8	Comparison of gene expression profiles between paired primary and metastasis colorectal carcinoma [AE][EV][DE]
20	E-GEOD-35478	15	Characterization of colon cancer cells: a functional approach characterizing CD133 as a potential stem cell marker [AE][EV][DE]
21	E-GEOD-32474	174	Comparison between cell lines from 9 different cancer tissue (NCI-60) (Affymetrix U133 Plus 2.0) [AE][EV][DE]
22	E-GEOD-10650	6	Transcription profiling of human colon carcinoma cell line HCT116 PCLKC cell lines [AE][EV][DE]
23	E-GEOD-35566	19	Expression profiles of a panel of MSS and MSI colon cancer cell lines [AE][EV][DE]
24	E-GEOD-8742	10	Transcription profiling of human cell lines MCF7, COLO-205 and SK-MEL-5 following treatment with PEP008 [AE][EV][DE]
25	E-GEOD-34053	9	CD133+ colon cancer cells are more interactive with the tumor microenvironment than CD133- cells [AE][EV][DE]
26	E-GEOD-15799	9	Expression data from NS398-treated and control HT29 colon adenocarcinoma cell line samples [AE][EV][DE]
27	E-GEOD-16648	42	Networking of differentially expressed genes in human cancer cell lines resistant to methotrexate [AE][EV][DE]

28	E-MEXP-1372	12	Transcription profiling of human colon Caco2 cells treated with extracts from broccoli that had been cooked for different lengths of time [AE][EV][DE]
29	E-GEOD-20058	10	Genotypic and phenotypic characterization of the side population of gastric cancer cell lines [AE][EV][DE]
30	E-GEOD-19072	6	Loss of Rab25 promotes the development of intestinal neoplasia [AE][EV][DE]
31	E-GEOD-5486	8	Transcription profiling of human colon cancer cell lines LS180 (MSI+) and SW480 (MSI-) [AE][EV][DE]
32	E-GEOD-33112	12	Gene expression in colon cancer stem cells (CSC) cultures identified by Wnt signaling levels [AE][EV][DE]
33	E-GEOD-3526	353	Transcription profiling of human post mortem tissue samples [AE][EV][DE]
34	E-GEOD-7307	677	Transcription profiling of panel of 677 samples of normal and diseased human tissues [AE][EV][DE]

1.2 Listado de los 200 genes que coexpresan con *RHBDD2* en el contexto del CCR con mayor significancia estadística.

Score	Gene name	Gene description
4,88E-90	RHBDD2	rhomboid domain containing 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:23082]
8,51E-45	POR	P450 (cytochrome) oxidoreductase [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:9208]
7,37E-39	GNB2	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4398]
2,60E-37	AMDHD2	Uncharacterized protein {ECO:0000313 Ensembl:ENSP00000455547} [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:H3BQ06]
5,60E-37	N/A	N/A
3,58E-33	ATP6AP1	ATPase, H+ transporting, lysosomal accessory protein 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:868]
2,62E-31	TMEM222	transmembrane protein 222 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:25363]

4,39E-31	YKT6	YKT6 v-SNARE homolog (<i>S. cerevisiae</i>) [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:16959]
4,66E-31	C9ORF16	chromosome 9 open reading frame 16 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:17823]
2,36E-30	ACTR1A	ARP1 actin-related protein 1 homolog A, centractin alpha (yeast) [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:167]
4,40E-30	AKT1	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:391]
5,61E-30	FSCN3	fascin actin-bundling protein 3, testicular [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:3961]
2,50E-29	RNASEK	ribonuclease, RNase K [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:33911]
5,14E-28	BCL7B	B-cell CLL/lymphoma 7B [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1005]
1,75E-27	YIPF3	Yip1 domain family, member 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:21023]
5,89E-27	C7ORF50	chromosome 7 open reading frame 50 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:22421]
6,30E-27	B3GAT3	beta-1,3-glucuronyltransferase 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:923]
8,01E-27	MLF2	myeloid leukemia factor 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:7126]
2,16E-26	PLD3	phospholipase D family, member 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:17158]
2,23E-26	RP11-43N16.4	N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein, alpha [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:7641]
3,56E-26	CLPTM1	cleft lip and palate associated transmembrane protein 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2087]
4,26E-26	COPE	coatamer protein complex, subunit epsilon [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2234]
4,64E-26	PTOV1	prostate tumor overexpressed 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:9632]
7,26E-26	HSPB1	heat shock 27kDa protein 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:5246]
1,34E-25	TMEM8A	transmembrane protein 8A [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:17205]
1,35E-25	PRKCSH	protein kinase C substrate 80K-H [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:9411]

4,46E-25	TRAPPC1	trafficking protein particle complex 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:19894]
4,50E-25	CDK5	cyclin-dependent kinase 5 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1774]
4,58E-25	WBSCR16	Williams-Beuren syndrome chromosome region 16 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:14948]
5,92E-25	SDF4	stromal cell derived factor 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:24188]
6,33E-25	WBP2	WW domain binding protein 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:12738]
7,00E-25	G6PC3	glucose 6 phosphatase, catalytic, 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:24861]
7,65E-25	DBNL	drebrin-like [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2696]
7,91E-25	RP11-43N16.4	N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein, alpha [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:7641]
1,04E-24	CAPNS1	calpain, small subunit 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1481]
1,50E-24	SLC4A2	solute carrier family 4 (anion exchanger), member 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11028]
1,50E-24	C16ORF58	chromosome 16 open reading frame 58 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:25848]
1,64E-24	CST3	cystatin C [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2475]
1,90E-24	KDELR1	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6304]
1,91E-24	AP2M1	adaptor-related protein complex 2, mu 1 subunit [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:564]
3,28E-24	WIPI2	WD repeat domain, phosphoinositide interacting 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:32225]
3,51E-24	FIS1	fission 1 (mitochondrial outer membrane) homolog (<i>S. cerevisiae</i>) [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:21689]
5,18E-24	SNX17	sorting nexin 17 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:14979]
8,88E-24	PPP4C	protein phosphatase 4, catalytic subunit [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:9319]
9,19E-24	UBA1	ubiquitin-like modifier activating enzyme 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:12469]

1,68E-23	TMEM120A	transmembrane protein 120A [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:21697]
1,71E-23	TAX1BP3	P2RX5-TAX1BP3 readthrough (NMD candidate) [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:49191]
1,78E-23	BCAP31	B-cell receptor-associated protein 31 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:16695]
1,78E-23	CTSD	cathepsin D [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2529]
2,24E-23	GPAA1	glycosylphosphatidylinositol anchor attachment 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4446]
2,94E-23	AC006483.1	actin, beta [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:132]
3,05E-23	PLXNB2	plexin B2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:9104]
3,34E-23	GRINA	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate-associated protein 1 (glutamate binding) [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4589]
3,44E-23	ARF3	ADP-ribosylation factor 3 {ECO:0000313 Ensembl:ENSP00000438507} [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:F5H423]
3,46E-23	CORO1B	coronin, actin binding protein, 1B [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2253]
4,17E-23	AP2S1	adaptor-related protein complex 2, sigma 1 subunit [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:565]
5,97E-23	ABHD12	abhydrolase domain containing 12 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:15868]
5,98E-23	GNAI2	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4385]
7,37E-23	ASNA1	arsA arsenite transporter, ATP-binding, homolog 1 (bacterial) [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:752]
1,30E-22	PLOD3	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:9083]
1,38E-22	C9ORF16	chromosome 9 open reading frame 16 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:17823]
1,74E-22	PPP1CA	protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isozyme [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:9281]
1,83E-22	TADA3	transcriptional adaptor 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:19422]
1,91E-22	H1FX	H1 histone family, member X [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4722]

1,95E-22	ATP6V1F	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 14kDa, V1 subunit F [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:16832]
2,02E-22	MARCH2	membrane-associated ring finger (C3HC4) 2, E3 ubiquitin protein ligase [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:28038]
2,13E-22	STUB1	STIP1 homology and U-box containing protein 1, E3 ubiquitin protein ligase [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11427]
2,19E-22	SLC25A39	solute carrier family 25, member 39 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:24279]
2,45E-22	TUBB2A	tubulin, beta 3 class III [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:20772]
2,91E-22	STUB1	STIP1 homology and U-box containing protein 1, E3 ubiquitin protein ligase [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11427]
3,44E-22	RAB1B	RAB1B, member RAS oncogene family [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:18370]
3,67E-22	SH3BGR13	SH3 domain binding glutamate-rich protein like 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:15568]
3,75E-22	TMEM222	transmembrane protein 222 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:25363]
3,98E-22	TMEM115	transmembrane protein 115 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:30055]
4,66E-22	AES	amino-terminal enhancer of split [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:307]
4,86E-22	ALDOA	aldolase A, fructose-bisphosphate [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:414]
5,43E-22	ACTB	actin, beta [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:132]
6,35E-22	ZYX	zyxin [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:13200]
6,67E-22	PRKCD	protein kinase C, delta [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:9399]
7,18E-22	RP11-287D1.3	dynactin 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2711]
7,41E-22	ZDHHC5	zinc finger, DHHC-type containing 5 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:18472]
8,03E-22	SLC25A1	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; citrate transporter), member 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:10979]
8,05E-22	CLTB	clathrin, light chain B [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2091]

8,11E-22	IDH3G	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) gamma [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:5386]
8,37E-22	HYAL2	hyaluronoglucosaminidase 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:5321]
9,14E-22	ADD1	adducin 1 (alpha) [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:243]
9,69E-22	ZDHHC4	zinc finger, DHHC-type containing 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:18471]
9,72E-22	RHOC	ras homolog family member C [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:669]
1,35E-21	COPS7A	COP9 signalosome subunit 7A [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:16758]
1,95E-21	UBE2M	ubiquitin-conjugating enzyme E2M [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:12491]
2,17E-21	DNAAF5	dynein, axonemal, assembly factor 5 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:26013]
2,19E-21	FASTK	Fas-activated serine/threonine kinase [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:24676]
2,20E-21	GPAA1	glycosylphosphatidylinositol anchor attachment 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4446]
2,39E-21	LRP10	low density lipoprotein receptor-related protein 10 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:14553]
2,53E-21	DAGLB	diacylglycerol lipase, beta [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:28923]
2,64E-21	MAP7D1	MAP7 domain containing 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:25514]
2,82E-21	C12ORF10	chromosome 12 open reading frame 10 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:17590]
3,29E-21	CERS2	ceramide synthase 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:14076]
3,67E-21	DAGLB	diacylglycerol lipase, beta [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:28923]
3,90E-21	PI4K2A	phosphatidylinositol 4-kinase type 2 alpha [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:30031]
3,93E-21	AP2S1	adaptor-related protein complex 2, sigma 1 subunit [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:565]
4,06E-21	MIR6812	microRNA 6812 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:50116]

4,23E-21	CUX1	cut-like homeobox 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2557]
4,55E-21	CAPN1	calpain 1, (mu/I) large subunit [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1476]
4,82E-21	MBOAT7	membrane bound O-acyltransferase domain containing 7 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:15505]
5,17E-21	LTBP3	latent transforming growth factor beta binding protein 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6716]
5,20E-21	TFE3	transcription factor binding to IGHM enhancer 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11752]
5,64E-21	ZDHHC24	zinc finger, DHHC-type containing 24 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:27387]
6,08E-21	ARPC1A	actin related protein 2/3 complex, subunit 1A, 41kDa [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:703]
6,47E-21	TSC2	tuberous sclerosis 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:12363]
7,09E-21	NINJ1	ninjurin 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:7824]
7,45E-21	ATP6V0D1	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 38kDa, V0 subunit d1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:13724]
7,79E-21	AP2S1	adaptor-related protein complex 2, sigma 1 subunit [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:565]
8,12E-21	MFSD5	major facilitator superfamily domain containing 5 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:28156]
8,15E-21	MOSPD3	motile sperm domain containing 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:25078]
8,84E-21	TAF10	TAF10 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 30kDa [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11543]
1,24E-20	PPP2R1A	protein phosphatase 2, regulatory subunit A, alpha [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:9302]
1,28E-20	NOMO2	NODAL modulator 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:30060]
1,32E-20	EIF2AK1	eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:24921]
1,37E-20	PEA15	phosphoprotein enriched in astrocytes 15 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:8822]
1,41E-20	AGPAT1	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:324]

1,52E-20	AGPAT1	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:324]
1,61E-20	PFN1	profilin 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:8881]
1,76E-20	GTF2I	general transcription factor Iii, pseudogene 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4660]
1,85E-20	OS9	osteosarcoma amplified 9, endoplasmic reticulum lectin [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:16994]
1,86E-20	SCAMP4	secretory carrier membrane protein 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:30385]
1,97E-20	GTF2F1	persephin [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:9579]
2,08E-20	ARPC1B	actin related protein 2/3 complex, subunit 1B, 41kDa [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:704]
2,18E-20	PPP2R4	protein phosphatase 2A activator, regulatory subunit 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:9308]
2,22E-20	TEX264	testis expressed 264 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:30247]
2,27E-20	GDI1	GDP dissociation inhibitor 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4226]
2,44E-20	MIR671	chondroitin polymerizing factor 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:29270]
2,72E-20	SLC48A1	solute carrier family 48 (heme transporter), member 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:26035]
3,04E-20	ALDOA	aldolase A, fructose-bisphosphate [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:414]
3,19E-20	CFL1	cofilin 1 (non-muscle) [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1874]
3,43E-20	MAD1L1	MAD1 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast) [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6762]
3,56E-20	TAPBP	TAP binding protein (tapasin) [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11566]
3,74E-20	STXBP2	syntaxin binding protein 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11445]
4,28E-20	TMEM214	transmembrane protein 214 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:25983]
4,81E-20	PKM	pyruvate kinase, muscle [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:9021]

5,04E-20	OGDH	oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) dehydrogenase (lipoamide) [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:8124]
5,30E-20	OAZ2	ornithine decarboxylase antizyme 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:8096]
6,94E-20	PIP5K1C	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type I, gamma [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:8996]
7,10E-20	SHISA5	shisa family member 5 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:30376]
7,37E-20	GPAA1	glycosylphosphatidylinositol anchor attachment 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4446]
7,47E-20	ZYX	zyxin [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:13200]
7,53E-20	LMNA	lamin A/C [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6636]
7,95E-20	MIR4647	solute carrier family 35 (adenosine 3'-phospho 5'-phosphosulfate transporter), member B2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:16872]
8,05E-20	PI4KB	phosphatidylinositol 4-kinase, catalytic, beta [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:8984]
8,20E-20	ACTR1B	ARP1 actin-related protein 1 homolog B, centractin beta (yeast) [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:168]
8,56E-20	KIAA2013	KIAA2013 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:28513]
8,86E-20	LSR	lipolysis stimulated lipoprotein receptor [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:29572]
8,87E-20	GET4	golgi to ER traffic protein 4 homolog (S. cerevisiae) [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:21690]
9,06E-20	NUCB1	nucleobindin 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:8043]
9,52E-20	GNB1	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4396]
9,54E-20	ATG9A	autophagy related 9A [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:22408]
1,00E-19	SH3GLB2	SH3-domain GRB2-like endophilin B2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:10834]
1,02E-19	RALY	RALY heterogeneous nuclear ribonucleoprotein [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:15921]
1,05E-19	SSSCA1	Sjogren syndrome/scleroderma autoantigen 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11328]

1,31E-19	ADCK2	aarF domain containing kinase 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:19039]
1,44E-19	CTBP1	C-terminal binding protein 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2494]
1,52E-19	ADIPOR1	adiponectin receptor 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:24040]
1,58E-19	NOMO2	NODAL modulator 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:30060]
1,59E-19	PVRL2	poliovirus receptor-related 2 (herpesvirus entry mediator B) [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:9707]
1,67E-19	SURF4	surfeit 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11476]
1,70E-19	GUK1	guanylate kinase 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4693]
1,80E-19	CD81	CD81 molecule [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1701]
1,87E-19	ORAI2	ORAI calcium release-activated calcium modulator 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:21667]
1,87E-19	DRAP1	DR1-associated protein 1 (negative cofactor 2 alpha) [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:3019]
2,00E-19	SPINT1	serine peptidase inhibitor, Kunitz type 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11246]
2,11E-19	TGFB1	transforming growth factor, beta 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11766]
2,17E-19	FAM3A	family with sequence similarity 3, member A [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:13749]
2,45E-19	DNPEP	aspartyl aminopeptidase [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2981]
2,56E-19	TMEM127	transmembrane protein 127 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:26038]
2,80E-19	DNAJC30	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 30 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:16410]
3,17E-19	G6PC3	glucose 6 phosphatase, catalytic, 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:24861]
3,21E-19	N/A	N/A
3,25E-19	TTYH3	tweety family member 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:22222]

3,28E-19	PNPLA6	patatin-like phospholipase domain containing 6 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:16268]
3,39E-19	POLR2J2	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide J2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:23208]
3,63E-19	OAZ2	ornithine decarboxylase antizyme 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:8096]
4,16E-19	BSCL2	HNRNPUL2-BSCL2 readthrough (NMD candidate) [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:49189]
4,19E-19	PPDPF	pancreatic progenitor cell differentiation and proliferation factor [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:16142]
4,57E-19	BAD	BCL2-associated agonist of cell death [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:936]
5,10E-19	VPS18	vacuolar protein sorting 18 homolog (<i>S. cerevisiae</i>) [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:15972]
5,75E-19	CAPZB	capping protein (actin filament) muscle Z-line, beta [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1491]
6,04E-19	WBSCR22	Williams Beuren syndrome chromosome region 22 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:16405]
6,29E-19	AGAP3	ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:16923]
6,36E-19	BSG	basigin (Ok blood group) [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1116]
6,81E-19	TKT	transketolase [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11834]
7,17E-19	SSSCA1	Sjogren syndrome/scleroderma autoantigen 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11328]
7,59E-19	IDS	Iduronate 2-sulfatase (Hunter syndrome), isoform CRA_e {ECO:0000313 EMBL:EAW61285.1}
7,60E-19	C9ORF16	chromosome 9 open reading frame 16 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:17823]
7,63E-19	ABHD17AP1	abhydrolase domain containing 17A pseudogene 6 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:34044]
8,39E-19	PSAP	prosaposin [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:9498]
9,69E-19	ADRM1	adhesion regulating molecule 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:15759]
1,03E-18	STUB1	STIP1 homology and U-box containing protein 1, E3 ubiquitin protein ligase [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11427]

1,06E-18	HGS	hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4897]
1,08E-18	UBXN6	UBX domain protein 6 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:14928]
1,14E-18	BRAT1	BRCA1-associated ATM activator 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:21701]

2. Determinación de los FT que regulan los bioprocesos asociados a *RHBDD2* en contexto del CCR

2.1 Factores de transcripción que regulan a los genes que coexpresan con *RHBDD2*.

FT	ID del Gen	PValue
PAX5	PAX5	1,41E-20
TAXCREB	CNTN2	1,58E-18
HEN1	HENMT1	1,54E-14
SP1	SP1	8,70E-12
SEF1	NA	9,39E-12
MYOGNF1	MYOG	1,49E-11
AHRARNT	AHR	1,72E-10
YY1	YY1	1,64E-09
SREBP1	SREBF1	6,56E-09
HOX13	HOXA13	8,66E-09
CREB2	ATF4	1,21E-08
PPARG	PPARG	1,28E-07
AREB6	ZEB1	7,16E-07
GRE	NA	1,26E-06
LUN1	TOPORS	2,86E-05
E2F	E2F1	3,41E-05
MYB	MYB	6,02E-05
MIF1	MIF	8,44E-05
SRF	SRF	0,0003422
TCF11	NFE2L1	0,0009194
TCF11MAFG	MAFG	0,00186054
GCNF	NR6A1	0,00186934
CHOP	DDIT3	0,00510471
PAX6	PAX6	0,02195302
BRACH	NA	0,02336857
AP4	TFAP4	8,09E-17
NRSF	REST	1,79E-14
P53	TP53	1,06E-13
PAX2	PAX2	2,18E-13

ZID	ZBTB6	3,86E-13
ARP1	ACTR1A	3,67E-12
ELK1	ELK1	9,04E-12
ARNT	ARNT	1,72E-11
ROAZ	ZNF423	3,43E-11
MYOD	MYOD1	6,06E-11
NRF2	NFE2L2	2,35E-10
MYCMAX	MYC	2,48E-10
AHR	AHR	6,63E-10
RREB1	RREB1	1,59E-09
PAX4	PAX4	2,83E-09
MAZR	PATZ1	4,15E-09
P300	EP300	5,10E-09
NMYC	MYCN	6,61E-09
NGFIC	EGR4	1,28E-08
CP2	TFCP2	1,61E-08
NFKB	NFKB1	6,92E-08
ZIC2	ZIC2	7,95E-08
MZF1	MZF1	8,63E-08
AP2REP	KLF12	9,85E-08
OLF1	OR511	2,42E-07
SPZ1	SPZ1	2,56E-07
NFKAPPAB	NA	4,01E-07
ZIC3	ZIC3	4,36E-07
E47	TCF3	4,76E-07
CETS1P54	ETS1	6,87E-07
NFY	NFYA	7,29E-07
USF	USF1	1,04E-06
LMO2COM	LMO2	2,40E-06
COUP	NR2F2	2,83E-06
PPARA	PPARA	3,45E-06
NF1	NF1	3,81E-06
CMYB	MYB	5,14E-06
ATF6	ATF6	5,20E-06
ER	ESR1	6,72E-06
GATA2	GATA2	7,54E-06
NFE2	NFE2	7,77E-06
AP1	JUN	1,12E-05
AP2	AAK1	1,16E-05
HMX1	HMX1	1,38E-05
EGR3	EGR3	1,98E-05
HNF4	HNF4A	2,32E-05
PAX3	PAX3	2,78E-05
NFKAPPAB50	NA	4,71E-05
GR	NR3C1	4,90E-05

XBP1	XBP1	5,42E-05
COMP1	COMP	5,57E-05
BACH2	BACH2	8,79E-05
AML1	AML1	9,99E-05
RFX1	RFX1	1,07E-04
HTF	TF	1,17E-04
ATF	BATF	1,71E-04
STAT5A	STAT5A	2,61E-04

2.2 Factores de transcripción asociados a *RHBDD2*.

FT	ID del Gen	PValue
PAX5	PAX5	1,41E-20
TAXCREB	CNTN2	1,58E-18
HEN1	HENMT1	1,54E-14
SP1	SP1	8,70E-12
SEF1	NA	9,39E-12
MYOGNF1	MYOG	1,49E-11
AHRARNT	AHR	1,72E-10
YY1	YY1	1,64E-09
SREBP1	SREBF1	6,56E-09
HOX13	HOXA13	8,66E-09
CREB2	ATF4	1,21E-08
PPARG	PPARG	1,28E-07
AREB6	ZEB1	7,16E-07
GRE	NA	1,26E-06
LUN1	TOPORS	2,86E-05
E2F	E2F1	3,41E-05
MYB	MYB	6,02E-05
MIF1	MIF	8,44E-05
SRF	SRF	0,0003422
TCF11	NFE2L1	0,0009194
TCF11MAFG	MAFG	0,00186054
GCMF	NR6A1	0,00186934
CHOP	DDIT3	0,00510471
PAX6	PAX6	0,02195302
BRACH	NA	0,02336857

GLOSARIO

Adenomas serrados sésiles: lesión colónica plana benigna que posee potencial de malignización. A nivel histológico presentan arquitectura anormal que se extiende a la base de las criptas con dilatación, serración, crecimiento horizontal y células caliciformes en la base.

Amplificación génica: aumento del número de copias de un fragmento de ADN.

Angiogénesis: formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes. Permite el crecimiento tumoral proporcionando a las células el oxígeno y los nutrientes necesarios para su desarrollo y multiplicación.

Anticuerpo: glicoproteína del tipo inmunoglobulina generada en respuesta a un antígeno.

Anticuerpo monoclonal: inmunoglobulina dirigida contra un antígeno específico. La unión antígeno-anticuerpo permite el reconocimiento inmune y la destrucción de la célula portadora del antígeno.

Anticuerpo policlonal: conjunto de inmunoglobulinas dirigidas contra un antígeno. Los anticuerpos son derivados de diferentes líneas de células B y por lo tanto, reconocen distintos epítopes antigénicos.

Delecion: pérdida de material genético que puede involucrar desde un par de nucleótidos hasta un fragmento cromosómico.

Down-regulación: reducción o disminución de la expresión de un gen en particular.

Duplicación: repetición de un fragmento de un cromosoma a continuación del fragmento original.

Inestabilidad genómica: alteración estructural del material genético. Supone la modificación en el número cromosómico a través de delecciones, duplicaciones o translocaciones génicas.

Inestabilidad de microsatélites: disminución o aumento en la longitud de las secuencias microsatélites generados principalmente por mutaciones en los genes del sistema de reparación de ADN.

Epigenética: estudio de los cambios heredables en la expresión génica sin modificación de la secuencia de ADN.

Marcador predictivo: da información de la probabilidad de respuesta tumoral a un agente terapéutico o a una combinación.

Marcador pronóstico: proporciona información prospectiva de la evolución del paciente y así poder guiar las decisiones terapéuticas.

Metilación: adición de un grupo metilo (CH_3) en la base Citosina situada previa o continua a una molécula de Guanina. La metilación de una secuencia de ADN provoca la reducción de la expresión génica.

Microbioma: conjunto de genes de los microorganismos presentes en el cuerpo humano.

Mutación: cambio en la secuencia de nucleótidos del ADN.

Mutaciones activantes: mutación que determina la activación continua de la proteína portadora.

Mutaciones inactivantes: mutación que determina la inactivación de la proteína mutada.

Oncogén: gen mutado responsable de la transformación de una célula normal en una maligna.

Quimioterapia: técnica terapéutica que consiste en la administración de una sustancia química para el tratamiento del cáncer.

Secuencias microsatélite: secuencias cortas de ADN repetidas en tándem a lo largo del genoma.

Supresor de tumor: gen que inhibe la proliferación celular excesiva. Activo en células normales reduce la probabilidad de que la célula se transforme dando lugar a la formación de un tumor.

Radioterapia: tratamiento oncológico basado en el empleo de radiaciones ionizantes dirigidas al tumor. Los rayos X tienen como objetivo inducir la apoptosis celular.

Terapia dirigida: drogas inhibitoras de una molécula específica. Permiten que el tratamiento quimioterápico sea selectivo sobre las células tumorales inhibiendo una vía de señalización puntualmente alterada en el tumor.

Up-regulación: aumento de la expresión de un gen en particular.