

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

Análisis de microARNs en individuos con y sin Cáncer Colorrectal. Relación con la función telomérica y con el Índice de Masa Corporal

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Daniel González Gamo

DIRECTORA

María Pilar Iniesta Serrano

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Programa de Doctorado en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina



TESIS DOCTORAL

Análisis de microARNs en individuos con y sin Cáncer Colorrectal. Relación con la función telomérica y con el Índice de Masa Corporal

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Daniel González Gamo

DIRECTORA

María Pilar Iniesta Serrano

Madrid, 2022

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, sección de la Facultad de Farmacia, de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección y tutela de la Dra. María Pilar Iniesta Serrano. La investigación ha sido financiada con los fondos del Proyecto de Investigación en Salud del Instituto de Salud Carlos III PI15/01199, titulado: “Marcadores de senescencia y de función telomérica en pacientes obesos con cáncer colorrectal resecado con intención curativa. Implicaciones pronósticas” (proyecto activo desde el año 2016 al 2018, prorrogado hasta el 30 de Junio de 2020).

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta Tesis doctoral ha sido posible gracias, en primer lugar, a la contribución altruista de todos los pacientes que han dado su consentimiento informado para que sus muestras fuesen utilizadas en las investigaciones realizadas en este trabajo.

Quiero agradecer, especialmente, la confianza que mi directora, la Prof. Pilar Iniesta ha tenido en mí, así como el tiempo y esfuerzo que ha dedicado a enseñarme lo necesario para completar esta Tesis y a su aportación para que mi trabajo sea algo de lo que estar auténticamente orgulloso.

Mi agradecimiento más sincero a la Dra. Ana Barabash por su contribución a la realización de este trabajo. La Dra. Barabash ha puesto a punto los procedimientos utilizados en el análisis de microARNs, una parte importantísima de la Tesis; además, se ha encargado de llevar a cabo el control de la colección de muestras de tejidos adiposos y, gracias a sus trabajos previos, ha sido posible la selección de los microARNs estudiados en el presente trabajo; finalmente, ha participado en la realización de parte de los análisis de los sueros y tejidos que se encuentran aquí incluidos.

Gracias a todos los miembros de los grupos de investigación “Biología Molecular del Cáncer” de la UCM y “Cáncer y Obesidad” del IdISSC por su contribución y consejos.

A Elena Molina, del Biobanco del Hospital Clínico San Carlos, por la amabilidad que siempre me ha mostrado y su diligencia en el trabajo, a la hora de facilitar las muestras colorrectales de los pacientes con cáncer incluidos en los protocolos de la Tesis.

También es mi deseo agradecer a la Unidad de Genómica de la UCM su contribución a los análisis de PCR cuantitativa llevados a cabo en este trabajo.

Agradecimientos

A mi compañero de laboratorio Sergio, que me ha acompañado y aguantado estos cinco años de Tesis, y no sólo me ha ayudado con parte del trabajo sino que también ha hecho del proceso una experiencia agradable, y me ha desvelado algún que otro truco científico. También quiero agradecer a Gema su ayuda para realizar los cortes en el criostato y los buenos momentos que hemos pasado juntos. Quiero mencionar también a Sofía, y al resto de miembros, profesores y doctorandos de otros grupos del Departamento que han estado estos años trabajando cerca de mí.

También dar las gracias de corazón a mis camaradas desde la Universidad, de la ciencia y de la vida, Sergio y Juan Manuel, por hacer de la ciencia algo interesante, viva y divertida, y por todos los buenos recuerdos que tenemos juntos. Espero que podamos seguir recordando todos nuestros grandes momentos con cariño, y que hagamos juntos algunos mejores.

Por último, quiero agradecer a las personas más cercanas que tengo en mi vida. A mis padres Juan y Mari Luz, y a mi hermano Juan, que siempre tienen algún pensamiento bueno para mí y me han ayudado en lo que ha hecho falta. Al resto de mi nueva gran familia, que también me ha apoyado estos años y son una fuente de alegría. A Pedro, por estar pendiente de mí y, con su gran fortaleza y cariño, consigue llevarme con él a todas partes. A María, por su amor y por estar conmigo apoyándome cada día, dándome ánimos y haciéndome ver lo mejor de las cosas.

A mis abuelos Manuel y Maruja, por todo su amor y sabiduría. Siempre me dijeron que no había nada mejor que el saber y que aspirase a lo más alto que pudiera. Sin duda, hoy estarían orgullosos de ver a su nieto.

*Sin duda, esto no habría sido posible sin todos vosotros.
Gracias.*

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	7
ABREVIATURAS	13
I. INTRODUCCIÓN	19
1. EL CÁNCER, LA AMENAZA DEL SIGLO XXI.	21
1.1. Epidemiología del cáncer colorrectal.	23
1.2. Desarrollo del cáncer colorrectal.....	24
2. LA OBESIDAD.	28
2.1. Epidemiología de la obesidad.	28
2.2. Alteraciones de los tejidos adiposos y relación con el cáncer.....	32
2.3. Características de los tejidos adiposos omental y subcutáneo.	38
3. LOS MICROARNs.	40
3.1. Síntesis y mecanismos de acción.	40
3.2. Secreción, transporte y función a distancia.....	42
3.3. MicroARNs asociados a cáncer, a obesidad y a senescencia celular.	43
4. LOS TELÓMEROS.	46
4.1. Los telómeros y el problema de la replicación terminal.....	46
4.2. Estructura telomérica y complejo shelterin.....	46
4.3. Estructura y función de la telomerasa.	49
4.4. Regulación de la actividad telomerasa y la longitud telomérica.	50
4.5. Relación entre función telomérica y cáncer.	52
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	57
III. MATERIALES Y MÉTODOS	61
1. PACIENTES Y MUESTRAS.	63
2. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ADN.	71

3. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MICROARNS.	74
3.1. Extracción y cuantificación de microARNs a partir de suero.	74
3.2. Extracción y cuantificación de microARNs a partir de tejidos.	75
4. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.	76
5. DETERMINACIÓN DE LA LONGITUD TELOMÉRICA.	78
5.1. Determinación de la longitud telomérica absoluta mediante el análisis por Southern Blot de los fragmentos teloméricos de restricción (TRF).	78
5.2. Determinación de la longitud telomérica relativa mediante el análisis por qRT-PCR del ADN genómico.	81
6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD TELOMERASA EN TEJIDOS ADIPOSOS MEDIANTE TELOMERIC REPEAT AMPLIFICATION PROTOCOL (TRAP).	87
7. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DE MICROARN POR PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (QRT-PCR).	91
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	96
IV. RESULTADOS	99
1. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DE MICROARNS EN CÁNCER COLORRECTAL.	101
1.1. Expresión de microARNs en tejidos y asociaciones entre ellos.	101
1.2. Expresión de microARNs y su relación con las variables clínico-patológicas.	112
2. ESTUDIOS DE FUNCIÓN TELOMÉRICA: RELACIÓN CON LA EXPRESIÓN DE MICROARNS.	128
2.1. Ensayo de validación del análisis de longitud telomérica por qRT-PCR.	128
2.2. Longitud telomérica en tumores colorrectales y relación con las variables clínico-patológicas.	130
2.3. Longitud telomérica en tumores colorrectales y relación con la expresión de microARNs.	135

2.4. Longitud telomérica en tejidos adiposos y relación con el cáncer colorrectal.....	138
2.5. Longitud telomérica en tejidos adiposos y relación con las variables clínico-patológicas.....	139
2.6. Longitud telomérica en tejidos adiposos y relación con la expresión de microARNs.....	141
2.7. Actividad telomerasa en tejidos adiposos y relación con las variables clínico-patológicas.....	144
2.8. Actividad telomerasa en tejidos adiposos y relación con la expresión de microARNs.....	147
3. ÍNDICE DE MASA CORPORAL: RELACIÓN CON LA EXPRESIÓN DE MICROARNS Y CON PARÁMETROS DE FUNCIÓN TELOMÉRICA EN PACIENTES CON Y SIN CÁNCER COLORRECTAL.....	150
3.1. Relación entre el Índice de Masa Corporal y la expresión de los microARNs en pacientes con y sin cáncer colorrectal.....	150
3.2. Relación entre el Índice de Masa Corporal y el acortamiento telomérico en tejidos tumorales colorrectales.....	153
3.3. Relación entre el Índice de Masa Corporal y la longitud telomérica de tejidos adiposos.....	155
3.4. Relación entre el Índice de Masa Corporal y la actividad telomerasa en tejidos adiposos.....	157
4. ESTUDIOS PRONÓSTICO EN PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL.....	159
4.1. Estudios pronóstico en relación con las variables clínico-patológicas.....	159
4.2. Estudios pronóstico en relación con los parámetros de función telomérica.....	165
4.3. Estudios pronóstico en relación a la expresión de microARNs.....	170
V. DISCUSIÓN.....	175

1. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE MICROARNS.....	177
1.1. Expresión diferencial de microARNs en sueros y tejidos de pacientes con y sin cáncer colorrectal.	178
1.2. Asociaciones en la expresión de microARNs entre sueros y tejidos....	180
1.3. Relación de la expresión de microARNs con las variables clínico-patológicas en pacientes afectados de CCR.	182
2. LA LONGITUD TELOMÉRICA EN TEJIDOS COLORRECTALES Y ADIPOSOS: RELACIÓN CON LAS VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS Y CON LA EXPRESIÓN DE MICROARNS.	184
3. ÍNDICE DE MASA CORPORAL: RELACIÓN CON LA EXPRESIÓN DE MICROARNS Y CON PARÁMETROS DE FUNCIÓN TELOMÉRICA EN PACIENTES CON Y SIN CÁNCER COLORRECTAL.....	188
3.1. Relación entre el Índice de Masa Corporal y la expresión de los microARNs en pacientes con y sin cáncer colorrectal.	188
3.2. Índice de Masa Corporal y la función telomérica.	189
4. ESTUDIOS PRONÓSTICO BASADOS EN VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS, FUNCIÓN TELOMÉRICA, ÍNDICE DE MASA CORPORAL Y EXPRESIÓN DE MICROARNS EN PACIENTES AFECTADOS DE CÁNCER COLORRECTAL.	191
VI. CONCLUSIONES	197
BIBLIOGRAFÍA	203

RESUMEN

ANÁLISIS DE MICROARNs EN INDIVIDUOS CON Y SIN CÁNCER COLORRECTAL. RELACIÓN CON LA FUNCIÓN TELOMÉRICA Y CON EL ÍNDICE DE MASA CORPORAL.

Introducción:

El cáncer colorrectal (CCR) constituye uno de los tipos de tumores más frecuente y con mayores tasas de mortalidad en las sociedades occidentales. Además, diversos autores han demostrado la relación existente entre la obesidad y el riesgo a desarrollar cáncer colorrectal. En este contexto, la disfunción de los tejidos adiposos y, más concretamente, de los tejidos adiposos omental y subcutáneo, puede tener un papel importante en la fisiopatología de la obesidad y del cáncer colorrectal. Sin embargo, aunque no se conocen los mecanismos exactos que vinculan ambas patologías, se dispone de datos preliminares acerca del impacto que podría tener la expresión de los microARNs. Por otro lado, a pesar de los conocimientos sobre el papel que desempeña la función telomérica en la progresión tumoral y en el pronóstico clínico de pacientes afectados de cáncer colorrectal, su relación con la expresión de microARNs asociados a senescencia, y su papel en el mantenimiento de la función tisular de los tejidos adiposos, todavía no es conocida.

Objetivos:

El principal objetivo de esta Tesis consiste en analizar la expresión de microARNs relacionados con senescencia, obesidad y cáncer en pacientes afectados de CCR, considerando el Índice de Masa Corporal (IMC) de los mismos y parámetros de función telomérica.

Concretamente, se investigan los niveles de expresión de cuatro microARNs: 34a-5p, 132-3p, 143-3p, 181a-5p, en sueros, tejidos colorrectales tumorales y no tumorales, y en tejidos adiposos omentales (TAO) y subcutáneos (TAS) de 63 pacientes afectados de CCR. Además, se analizan sueros y tejidos adiposos de 53 sujetos control sin cáncer. En todos los casos se considera el Índice de Masa Corporal de los individuos incluidos en los protocolos y se llevan a cabo análisis de parámetros de función telomérica (longitud telomérica y actividad telomerasa) en los mismos grupos de sujetos.

Resultados:

Los individuos afectados de CCR presentaron en suero, frente al grupo control, niveles de expresión inferiores de los microARNs 34a-5p ($P = 0.03$), 132-3p ($P < 0.001$) y 143-3p ($P < 0.001$). En los tejidos colorrectales de pacientes con CCR el microARN 143-3p disminuye significativamente en el tejido tumoral, frente al no tumoral ($P < 0.001$). Finalmente, los TAS mostraron mayor expresión del microARN 181a-5p en pacientes con CCR, frente al grupo control ($P = 0.033$).

Con relación a variables clínico-patológicas, se observó asociación entre los estadios de Dukes más avanzados C y D, y una menor expresión del microARN 34a-5p en TAS ($P = 0.029$), una mayor expresión del 132-3p en tejido colorrectal tumoral ($P = 0.025$) y con menores niveles del microARN 132-3p en TAS ($P = 0.009$). Además, se relacionó la localización del tumor con diferencias en la expresión del microARN 132-3p en TAO ($P = 0.037$). En los TAS, se observó que mayores niveles de los microARNs 143-3p o 181a-5p confieren un buen pronóstico clínico tras la cirugía ($P = 0.028$, $P = 0.045$, respectivamente).

Los análisis de correlación de expresión de microARNs entre sueros, tejidos colorrectales tumorales y no tumorales, y TAO y TAS, revelaron asociaciones entre los niveles de expresión en sueros y TAO para los microARNs 34a-5p ($P = 0.051$) y 181a-5p ($P = 0.024$). También hubo correlación entre los niveles en suero y tejido tumoral del microARN 132-3p ($P = 0.009$). Además, en los tejidos adiposos, determinamos correlación entre TAO y TAS en la expresión de los microARNs 34a-5p ($P = 0.002$), 132-3p ($P < 0.001$), 143-3p ($P = 0.017$) y 181a-5p ($P < 0.001$).

Con respecto al IMC, los pacientes con obesidad afectados de CCR, en comparación a los grupos con sobrepeso y normopeso con CCR, presentaron menores niveles del microARN 181a-5p en el tejido tumoral ($P = 0.023$), así como de los microARNs 132-3p y 143-3p en los TAO ($P = 0.013$, $P = 0.039$, respectivamente). En cambio, en el grupo de pacientes control, los individuos con obesidad mostraron, frente al grupo control con sobrepeso, niveles superiores del microARN 143-3p en TAO ($P < 0.001$), así como de los microARNs 34a-5p y 143-3p en TAS ($P = 0.015$, $P = 0.002$, respectivamente).

En los ensayos de función telomérica, los tejidos colorrectales tumorales mostraron correlaciones inversas entre la longitud telomérica tumoral y la expresión de los microARNs 34a-5p ($P = 0.015$), 132-3p ($P = 0.003$) y 181a-5p ($P = 0.011$). Esta tendencia también se detectó en el tejido colorrectal no tumoral en el caso del microARN 181a-5p ($P = 0.035$). Asimismo, en individuos sin CCR, la expresión de los microARNs 34a-5p, 132-3p, 143-3p y 181a-5p en TAO con actividad telomerasa positiva fue superior a la del grupo control sin actividad telomerasa ($P = 0.025$, $P = 0.011$, $P = 0.010$, $P = 0.056$, respectivamente).

Los estudios de pronóstico realizados en pacientes afectados de CCR, indicaron asociación entre la obesidad y un pronóstico clínico adverso ($P = 0.035$), en tanto que el acortamiento telomérico en el tumor frente al tejido no tumoral confiere un pronóstico clínico más favorable, sin alcanzar significación estadística ($P = 0.114$). Por otro lado, los pacientes que presentaron telómeros más cortos en TAS mostraron un pronóstico clínico desfavorable ($P = 0.026$).

Conclusiones:

Los microARNs 34a-5p, 132-3p, 143-3p y 181a-5p pueden constituir biomarcadores de utilidad en la clínica del CCR. Además, un incremento significativo del IMC parece influir en los niveles de expresión de estos microARNs en muestras séricas y tisulares de pacientes con y sin CCR.

Se detectan correlaciones entre los niveles de expresión de los microARNs estudiados y los parámetros de función telomérica analizados, constituyendo la longitud telomérica un indicador con interés pronóstico en CCR.

ABSTRACT

ANALYSIS OF MICRORNAS IN INDIVIDUALS WITH AND WITHOUT COLORECTAL CANCER. RELATION WITH TELOMERIC FUNCTION AND THE BODY MASS INDEX.

Introduction:

Colorectal cancer (CRC) is one of the most frequent types of tumors and one with the highest mortality rates in Western societies. In addition, several authors have shown the relationship between obesity and the risk of developing colorectal cancer. In this context, the dysfunction of the adipose tissues and, more specifically, of the omental and subcutaneous adipose tissues, may play an important role in the physiopathology of obesity and colorectal cancer. However, although the exact mechanisms that link both diseases are not known, preliminary data is available about the impact that the expression of microRNAs could have. On the other hand, despite the knowledge about the role that telomeric function plays in tumor progression and in the clinical prognosis of patients with colorectal cancer, its relationship with the expression of microRNAs associated with senescence, and its role in the maintenance of the tissue functionality of adipose tissues, is not fully understood.

Objectives:

The main objective of this Thesis is to analyse the expression of microRNAs related to senescence, obesity and cancer in patients affected by CRC, considering their Body Mass Index (BMI) and telomere function parameters.

Specifically, the expression levels of four microRNAs are investigated: 34a-5p, 132-3p, 143-3p, 181a-5p, in serum, tumor and non-tumor colorectal tissues, and in omental (OAT) and subcutaneous (SAT) adipose tissues of 63 patients affected by CRC. In addition, serum and adipose tissues from 53 control subjects without cancer are analysed. In all cases, the Body Mass Index of the individuals included in the protocols is considered and analysis of telomere function parameters (telomere length and telomerase activity) are carried out in the same groups of subjects.

Results:

The individuals affected by CRC presented in serum, compared to the control group, lower expression levels of the microRNAs 34a-5p ($P = 0.03$), 132-3p ($P < 0.001$) and 143-3p ($P < 0.001$). In the colorectal tissues of patients with CRC, microRNA 143-3p is significantly decreased in tumor tissue, compared to non-tumor tissue ($P < 0.001$). Finally, the SAT showed higher expression of microRNA 181a-5p in patients with CRC, compared to the control group ($P = 0.033$).

Regarding clinical-pathological variables, an association was observed between the more advanced Dukes C and D stages and a lower expression of microRNA 34a-5p in SAT ($P = 0.029$), a higher expression of 132-3p in colorectal tumor tissue ($P = 0.025$) and with lower levels of microRNA 132-3p in SAT ($P = 0.009$). In addition, tumor location was associated with differences in the expression of microRNA 132-3p in OAT ($P = 0.037$). In SAT, higher levels of microRNAs 143-3p or 181a-5p was observed to confer a good clinical prognosis after surgery ($P = 0.028$, $P = 0.045$, respectively).

Correlation analysis of microRNA expression between serum, tumor and non-tumor colorectal tissues, and OAT and SAT revealed associations between expression levels in serum and OAT for microRNAs 34a-5p ($P = 0.051$) and 181a-5p ($P = 0.024$). There was also a correlation between serum and tumor tissue levels of microRNA 132-3p ($P = 0.009$). Furthermore, in adipose tissues, we determined a correlation between OAT and SAT in the expression of microRNAs 34a-5p ($P = 0.002$), 132-3p ($P < 0.001$), 143-3p ($P = 0.017$) and 181a-5p ($P < 0.001$).

Regarding BMI, patients with obesity affected by CRC, compared to the overweight and normal weight groups with CRC, presented lower levels of microRNA 181a-5p in tumor tissue ($P = 0.023$), as well as microRNAs 132-3p and 143-3p in OATs ($P = 0.013$, $P = 0.039$, respectively). In contrast, in the control group of patients, obese individuals showed, compared to the overweight control group, higher levels of microRNA 143-3p in OAT ($P < 0.001$), as well as microRNAs 34a-5p and 143-3p in SAT ($P = 0.015$, $P = 0.002$, respectively).

Regarding telomere function assays, colorectal tumor tissues showed inverse correlations between tumor telomere length and expression levels of microRNAs 34a-5p ($P = 0.015$), 132-3p ($P = 0.003$), and 181a-5p ($P = 0.011$). This trend was also detected in non-tumor colorectal tissue for microRNA 181a-5p ($P = 0.035$). Likewise, in individuals without CRC, the expression of microRNAs 34a-5p, 132-3p, 143-3p and 181a-5p in OAT with positive telomerase activity was higher than that of the control group without telomerase activity ($P = 0.025$, $P = 0.011$, $P = 0.010$, $P = 0.056$, respectively).

Prognostic studies conducted in patients with CRC indicated an association between obesity and an adverse clinical prognosis ($P = 0.035$), while telomere shortening in the tumor compared to non-tumor tissue confers a more favorable clinical prognosis, without reaching statistical significance ($P = 0.114$). On the other hand, patients who presented shorter telomeres in SAT showed an unfavorable clinical prognosis ($P = 0.026$).

Conclusions:

MicroRNAs 34a-5p, 132-3p, 143-3p and 181a-5p can be useful clinical biomarkers of CRC. Furthermore, a significant increase in BMI seems to influence the expression levels of these microRNAs in serum and tissue samples from patients with and without CRC.

Correlations are detected between the expression levels of the microRNAs studied and the parameters of telomere function analysed, where telomere length constitutes an indicator with prognostic interest in CRC.

ABREVIATURAS

ADRB1	Receptor β -adrenérgico 1.
ADBR2	Receptor β -adrenérgico 2.
ADBR3	Receptor β -adrenérgico 3.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ADNc	ADN complementario.
AgRP	Proteína relacionada con el agouti.
Anti-DIG-AP	Anti-digoxigenina-fosfatasa alcalina.
Anti-DIG-POD	Anti-digoxigenina-peroxidasa.
APC	Adenomatous polyposis coli.
ARN	Ácido ribonucleico.
ARNm	ARN mensajero.
BAX	Proteína X asociada a BCL2.
BRAF	B-Raf proto-oncogene serine/threonine kinase.
BSA	Albúmina sérica bovina.
C.C.	Coeficiente de correlación.
CART	Transcripción regulada de cocaína y anfetamina.
CCR	Cáncer colorrectal.
CDC4	Proteína de control de la división celular 4.
CIMP	Tumores con fenotipo hipermetilador de islas CpG.
CIN	Tumores con inestabilidad cromosómica.
CLS	Estructura en forma de corona.

Abreviaturas

COX-2	Ciclooxigenasa 2.
EE	Error estándar de la media.
FTO	Gen de masa grasa asociado a la obesidad.
GLP-1	Péptido similar al glucagón-1.
IGF	Factor de crecimiento similar a la insulina.
IGF2R	Receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 2.
IL	Interleucina.
ILE	Intervalo libre de enfermedad.
IMC	Índice de Masa Corporal.
KRAS	Oncogén viral del sarcoma de la rata Kirsten.
LEPR	Receptor de la leptina.
LNA	Locked nucleic acids.
LOH	Pérdida de heterocigosidad.
MAPK	Proteína kinasa activada por mitógenos.
MC3R	Receptor de melanocortina tipo 3.
MC4R	Receptor de melanocortina tipo 4.
MSH	Hormona estimulante de melanocitos.
MSI	Tumores con inestabilidad en microsatélites.
NFκB	Factor nuclear kappa B.
NPY	Neuropéptido Y.
OB	Dominio de unión a oligonucleótidos.

OMS	Organización Mundial de la Salud.
PCK	Proteína quinasa C.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PI3K	Fosfatidil-inositol 3 kinasa.
POMC	Proopiomelanocortina.
POT1	Proteína protectora de telómeros 1.
PYY	Péptido YY.
qRT-PCR	PCR cuantitativa a tiempo real.
RAP1	Proteína represora activadora 1.
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por ARN.
RPLPO	Ribosomal Protein Large P0.
TAO	Tejido adiposo omental.
TAS	Tejido adiposo subcutáneo.
TERRA	Telomeric repeat containing RNA.
TERT	Telomerasa transcriptasa inversa.
TGFBR	Receptor del factor de crecimiento transformante β .
TGFBR2	Receptor del factor de crecimiento transformante β 2.
TIN2	Factor nuclear 2 de interacción con TRF1.
TMB	Tetrametilbenzidina.
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α .
TP53	Proteína tumoral 53.

Abreviaturas

TPP1	Proteína homóloga de la displasia adrenocortical.
TRF	Fragmentos teloméricos de restricción.
TRF1	Factor de unión a repeticiones teloméricas 1.
TRF2	Factor de unión a repeticiones teloméricas 2.
UCP	Proteína desacoplante.
VEGF	Factor de crecimiento del endotelial vascular.

I. INTRODUCCIÓN

1. EL CÁNCER, LA AMENAZA DEL SIGLO XXI.

El término cáncer se utiliza para designar, de forma genérica, a un conjunto de enfermedades, actualmente en expansión, que afectan a decenas de millones de individuos. Se estima que durante los próximos 20 años, el número de personas que anualmente desarrollará algún tipo de cáncer aumentará en, hasta, un 50%. El incremento de la longevidad y factores ambientales como la contaminación, estilos de vida sedentarios o la exposición a carcinógenos representan los principales factores para explicar la tendencia al alza de la incidencia de cáncer en el mundo. Afortunadamente, los avances científicos en el campo de la oncología, durante los últimos años, han tenido una importancia fundamental en la mejora del pronóstico clínico de pacientes afectados por diferentes tipos tumorales.

Durante el desarrollo del proceso tumorigénico, las células sanas del individuo sufren transformaciones genéticas que alteran su funcionalidad y proliferación, con la consecuente afectación de la homeostasis tisular. En un esfuerzo para comprender la naturaleza del cáncer, se han intentado identificar sellos distintivos asociados a su desarrollo. De esta forma, se ha propuesto la existencia de una serie de características que están recogidas en la Figura 1.



Figura 1. Sellos distintivos del cáncer. Figura original de Hanahan (2022). Hasta el momento, se han propuesto 8 sellos distintivos del cáncer, además de 2 características promotoras de cáncer. Estas últimas corresponden a la inducción y acceso vascular de los tumores, y a la inflamación protumoral,

El cáncer colorrectal representa uno de los tipos tumorales más frecuentemente diagnosticado y con mayor mortalidad asociada, a nivel mundial. La detección de biomarcadores y de dianas terapéuticas que puedan beneficiar a los pacientes con un diagnóstico temprano y una terapia eficaz, representan objetivos fundamentales en el campo de la oncología clínica.

1.1. Epidemiología del cáncer colorrectal.

El cáncer colorrectal (CCR), o cáncer de colon o recto, es el segundo tipo de tumor más frecuentemente diagnosticado en España en ambos sexos, y también es la segunda causa en varones, y la tercera en mujeres, de muerte en el país por cáncer. Se estima, además, que hasta 27.000 personas van a desarrollar esta enfermedad en el transcurso del año 2022. A nivel mundial, a pesar de que el número absoluto de casos de CCR incrementa cada año, el riesgo relativo de fallecimiento en la población mayor de 50 años parece disminuir en el tiempo gracias a los programas de detección temprana de CCR (Murphy et al., 2017).

Diversas investigaciones han intentado encontrar factores de riesgo asociados al desarrollo del CCR y a la evolución a peores pronósticos clínicos (Huxley et al., 2009; Johnson et al., 2013). Entre los factores más frecuentemente asociados al riesgo de CCR, se encuentran:

- Hábitos diarios.

Los hábitos personales parecen influir de manera significativa en el posible desarrollo de CCR. Se ha visto que un consumo mayor de frutas y verduras disminuye el riesgo de desarrollar este tipo de cáncer (Sanjoaquin et al., 2004). Por otro lado, estilos de vida sedentarios, el desarrollo de obesidad (Moghaddam et al., 2007), el consumo de tabaco o alcohol (Hsing et al., 1998), así como el consumo excesivo de carne roja (Norat et al., 2005), constituyen los hábitos que, de forma más significativa, incrementan el riesgo de desarrollar la enfermedad.

- Diabetes.

La resistencia a la insulina, proceso vinculado a la obesidad, se ha visto asociada a un incremento del riesgo de entre el 20% y el 40% de desarrollar CCR (Larsson et al., 2005), y que además se ve agravado por aumentos excesivos de la masa corporal.

Introducción

- Historial familiar.

La presencia de CCR en un familiar de primer grado se encuentra relacionada con el riesgo relativo a desarrollar esta enfermedad, que llega a aumentar hasta en un 50% (Fuchs et al., 1994).

- Enfermedad inflamatoria intestinal.

Los individuos afectados por esta patología presentan un riesgo casi 2 veces superior de desarrollar CCR frente a los individuos sanos (Mellemkjaer et al., 1995).

1.2. Desarrollo del cáncer colorrectal.

El CCR se genera, de forma general, mediante una serie de alteraciones del epitelio sano colorrectal que empezaron a ser descritas por Fearon y Volgenstein (1990). Estas alteraciones provocan la formación de un adenoma que, tras la acumulación de un número de mutaciones, puede evolucionar y dar lugar al carcinoma colorrectal (Figura 2).

Experimentalmente se ha comprobado que los tumores colorrectales son heterogéneos en su fenotipo, así como en el número y tipo de alteraciones genéticas acumuladas. De esta manera, se han descrito tradicionalmente 3 subtipos moleculares de CCR (Tejpar y Van Cutsem, 2002), aunque otros investigadores han propuesto otras clasificaciones más recientemente (Guinney et al., 2015). Los 3 subtipos moleculares y sus características son:

1. Tumores con inestabilidad cromosómica (CIN), que representan la mayoría de los tumores colorrectales esporádicos, y que se relacionan con alteraciones en el número y la secuencia de los cromosomas. Suelen observarse ganancias o pérdidas de segmentos cromosómicos, reorganización cromosómica y pérdida de la heterocigosidad.

2. Tumores con inestabilidad en microsatélites (MSI), que presentan un fenotipo con altas tasas de mutación debido a defectos en los mecanismos de reparación del ADN por emparejamiento erróneo. Esto provoca la introducción de mutaciones en regiones con secuencias de ADN repetidas,

afectando principalmente a la estabilidad cromosómica y al marco de lectura de los genes afectados (Nojadeh et al., 2018).

3. Tumores con fenotipo hipermetilador de islas CpG (CIMP), que se caracterizan por la metilación aberrante de promotores de genes supresores de tumores, y en la mayoría de casos también de mecanismos de reparación del ADN por emparejamiento erróneo como es el caso de *MLH1* (Weisenberger et al., 2006).

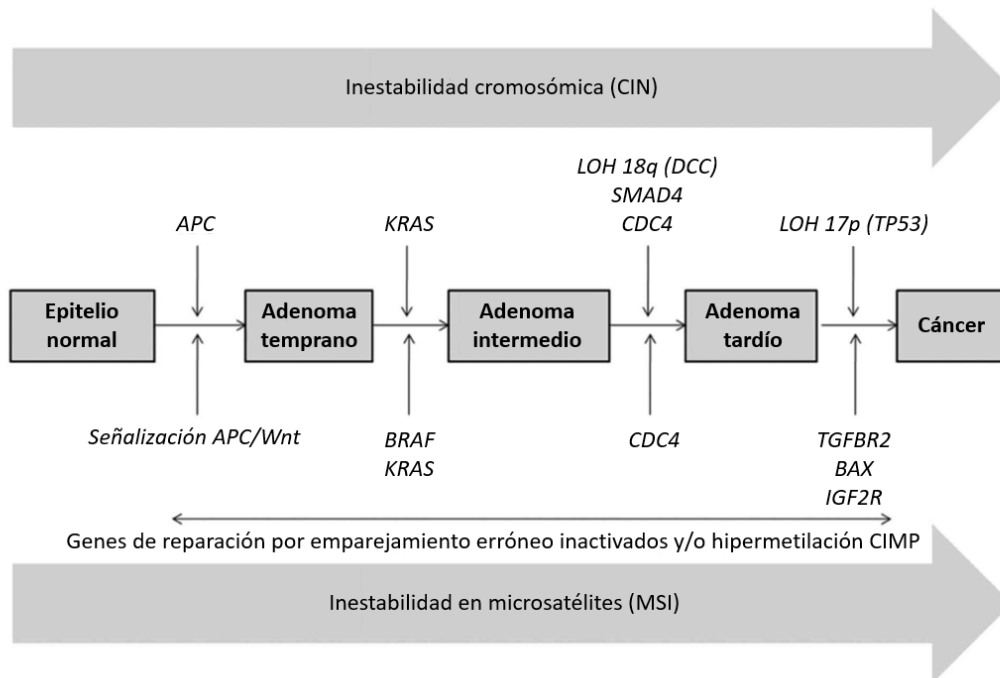


Figura 2. Modelo de la secuencia adenoma-carcinoma revisado por Nguyen y Duong (2018) para los subtipos moleculares de cáncer colorrectal CIN, CIMP y MSI. CIN = Inestabilidad cromosómica. CIMP = Fenotipo metilador de islas CpG. MSI = Inestabilidad en microsatélites. APC = Adenomatous polyposis coli. KRAS = Oncogén viral del sarcoma de la rata Kirsten. LOH = Pérdida de heterocigisidad. BRAF = B-Raf proto-oncogene serine/threonine kinase. TP53 = Proteína tumoral 53. TGFBR = Receptor del factor de crecimiento transformante β . BAX = Proteína X asociada a BCL2. IGF2R = Receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 2. CDC4 = Proteína de control de la división celular 4.

Según el modelo de Nguyen y Duong (2018), la evolución del epitelio sano a carcinoma ocurre, de manera general, a través de una serie de pasos y alteraciones fundamentales atendiendo al subtipo molecular del tumor:

En tumores CIN, la mutación o pérdida de *APC*, que se puede detectar hasta en un 90% de pacientes afectados con CCR, es capaz de inducir de forma persistente la señalización de genes regulados por Wnt. Este proceso provoca la activación de las vías de proliferación celular, migración, invasión y metástasis. Por otro lado, la activación aberrante de *KRAS* de forma temprana sucede en aproximadamente un tercio de los tumores colorrectales, indicando un papel potencialmente causal en el proceso tumorigénico (Margetis et al., 2017) además de relacionarse con el paso a adenoma intermedio (Nguyen et al., 2020). Como miembro de la familia *RAS*, está implicado en la regulación de la señalización de la proliferación, diferenciación y supervivencia celular. La pérdida alélica del cromosoma 18, que puede encontrarse en hasta el 70% de tumores colorrectales, afecta a regiones que contienen genes con función supresora de tumores, como *SMAD2* y *SMAD4*. La familia de *SMAD* es capaz de regular *downstream* una amplia gama de genes, como es el caso del factor de crecimiento transformante β (*TGF- β*), pudiendo afectar al desarrollo tumorigénico. Finalmente, la pérdida de la heterocigosidad o la mutación de *TP53*, que se ha observado en más de la mitad de tumores colorrectales, constituye un evento implicado en la transición de adenoma a carcinoma colorrectal, y su pérdida de función afecta a una gran cantidad de genes relacionados con el ciclo celular, la senescencia, la apoptosis, la reparación del ADN y el metabolismo (revisiones de Pino y Chung, 2010; Nguyen y Duong, 2018).

Los tumores con inestabilidad en microsatélites, o MSI, presentan elevadas tasas de error en la replicación de estas regiones, que se corresponden frecuentemente a repeticiones de secuencias de 1-2 pares de bases. Las inserciones o deleciones en estas secuencias provocan cambios en el marco de lectura de los ARN mensajeros durante la síntesis proteica, un hecho relacionado con la promoción del proceso tumorigénico. Entre los genes más comúnmente afectados, asociados a cáncer, se encuentran el receptor del factor de crecimiento transformante- β 2 (*TGFBR2*), la proteína X asociada a BCL2 (*BAX*)

o la proteína de control de la división celular 4 (*CDC4*) (revisiones de Boland y Goel, 2010; Nguyen y Duong, 2018).

En cuanto a los tumores con fenotipo hipermetilador de islas CpG (CIMP), se ha observado que la hipermetilación constituye un evento temprano durante el proceso tumorigénico. Tienen además un perfil característico, asociándose a tumores localizados en el colon derecho, con una diferenciación celular pobre, inestabilidad en microsatélites, *KRAS* no mutado, pero sí con mutación de *BRAF*. Por otro lado, se ha observado que los tumores esporádicos con inestabilidad en microsatélites se encuentran asociados a la metilación del gen reparador de errores del ADN *MLH1* (revisiones de Ashktorab y Brim, 2014; Nguyen y Duong, 2018).

2. LA OBESIDAD.

La obesidad es una enfermedad caracterizada por la acumulación en exceso de grasa corporal, que se almacena y afecta a la funcionalidad de los tejidos adiposos, provocando cambios sistémicos en el metabolismo del individuo e inflamación tisular subclínica. De acuerdo a la definición de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se considera que los individuos con un Índice de Masa Corporal (IMC) superior o igual a 30 kg/m² tienen obesidad, en tanto que un IMC superior o igual a 25 kg/m² e inferior a 30 kg/m² indica que la persona tiene sobrepeso.

Como consecuencia de esta enfermedad del metabolismo, se ha observado una asociación con otras afecciones como la hipertensión, la diabetes *mellitus*, la enfermedad cardiovascular, la hiperlipidemia o el cáncer.

El estudio de las alteraciones asociadas a la obesidad y su relación con estas enfermedades y, concretamente en esta Tesis el CCR, resulta fundamental en el desarrollo de terapias personalizadas que permitan un tratamiento clínico más eficaz y preciso.

2.1. Epidemiología de la obesidad.

La prevalencia de la obesidad se ha incrementado, a nivel mundial, en la última mitad de siglo XX y comienzos del XXI, llegando a alcanzar niveles pandémicos. Desde 1975, la proporción de niños y adolescentes con obesidad ha aumentado desde un 0.8% hasta un 6.7% en 2016, de acuerdo con los datos publicados por NCD-RisC (2017). En individuos adultos la incidencia de la obesidad, entre 1975 y 2014, ha ascendido desde un 4.8% hasta un 12.8% (NCD-RisC, 2016). Es actualmente la segunda causa de muerte prevenible más frecuente por detrás del tabaquismo. La relevancia médica de este fenómeno es de especial interés, dado el riesgo de desarrollar otras enfermedades asociadas como diabetes *mellitus* tipo 2, enfermedad de hígado grado, hipertensión, Alzheimer o cáncer (Figura 3).

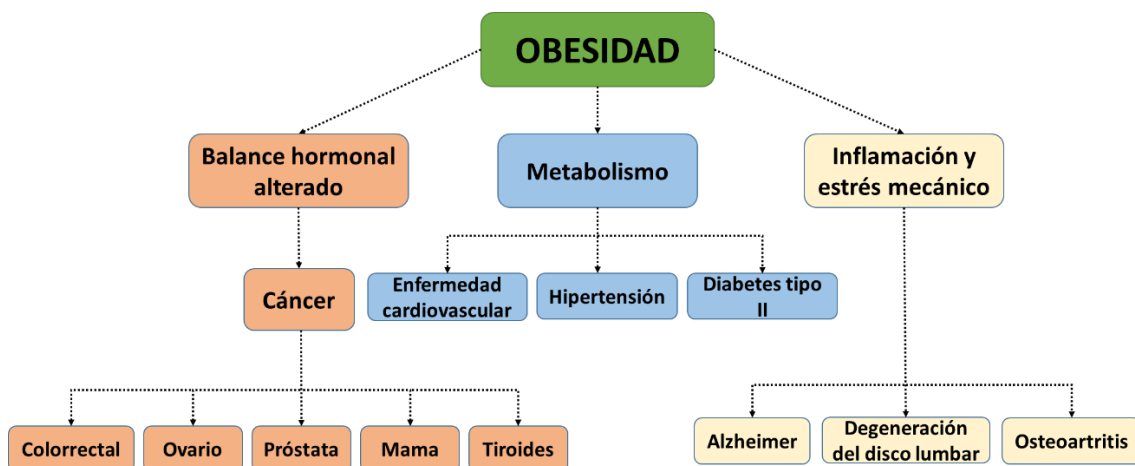


Figura 3. Complicaciones de la salud asociadas a la obesidad. Imagen modificada de Singh et al. (2017).

La obesidad es una enfermedad multifactorial compleja, y el estudio e identificación de los factores que afectan a su desarrollo resulta fundamental para intentar prevenir su constante expansión. Entre estos factores se incluyen:

- Factores socioeconómicos.

A medida que ha aumentado la renta en los países desarrollados desde los años 70, también se ha visto asociado un incremento en la proporción de la población con obesidad, primero en los países con rentas altas, seguidos por los países con rentas medias y bajas (revisión de Blüher, 2019).

- Hábitos.

La psicología personal, la fisiología, la actividad física personal y del entorno social, el consumo alimenticio, el tipo de producción alimentaria regional y la psicología social, componen un *cluster* de factores de riesgo que pueden afectar al desarrollo de la obesidad en la población (revisión de Blüher, 2019). Siendo de especial relevancia, se ha observado en niños menores de 3 años una fuerte asociación entre el desarrollo de obesidad con la obesidad presente en los progenitores, con un mayor peso en el momento del nacimiento o con el historial migratorio familiar (Beyerlein et al., 2014).

Además, la regulación de la ingesta y el metabolismo son claves en el mantenimiento de la masa corporal. Los mecanismos moleculares que regulan

Introducción

el apetito y el metabolismo resultan fundamentales a la hora de conocer las vías por las que se desarrolla esta afección, e implica una serie de redes químicas y neuronales que modulan la sensación de hambre y el gasto energético. Si bien tradicionalmente la leptina y la adiponectina han sido las moléculas más relevantes en este campo, también otras moléculas como los receptores de la melanocortina 3 y 4 (MC3R y MC4R) que regulan la respuesta del hipotálamo, y cuyos niveles y función pueden modularse mediante actividad física (Henagan et al., 2011; Ochoa et al., 2007), parecen tener un enorme impacto en la regulación del balance energético y la homeostasis (Figura 4).

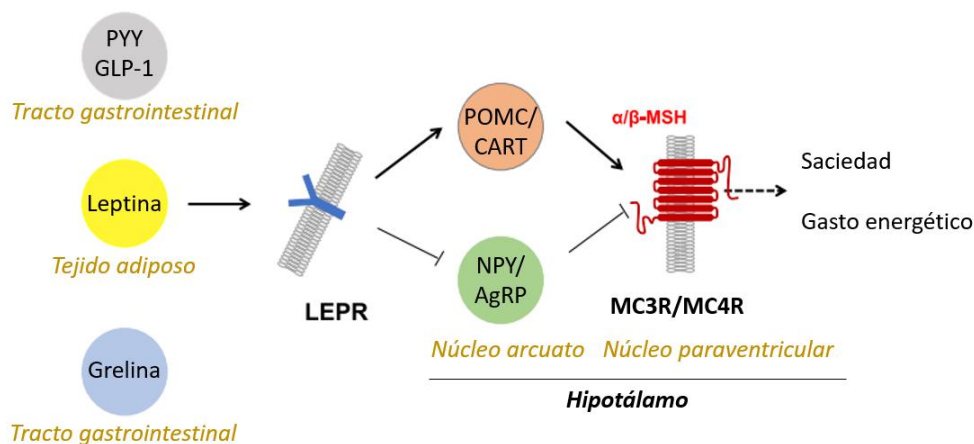


Figura 4. Componentes claves de la vía de la leptina-melanocortina. Las señales periféricas como PYY, GLP-1 o la Grelina desde el tracto gastrointestinal, así como de la leptina secretada por adipocitos se integran en el núcleo arcuato del hipotálamo donde las neuronas sensibles a POMC y CART son estimuladas, y las sensibles a NPY y AgRP son inhibidas, dando lugar a la secreción de los neuropéptidos α y β -MSH, que activan a los receptores de melanocortina MC3R y MC4R en el núcleo paraventricular y regulando la sensación de saciedad y el gasto energético. Modificación del original de Kühnen et al. (2020). PYY = Péptido YY. GLP-1 = Péptido similar al glucagón-1. LEPR = Receptor de la leptina. POMC = Propiomelanocortina. CART = Transcripción regulada de cocaína y amfetamina. NPY = Neuropéptido Y. AgRP = Proteína relacionada con el agouti. MSH = Hormona estimulante de melanocitos. MC3R = Receptor de melanocortina tipo 3. MC4R= Receptor de melanocortina tipo 4.

- Factores genéticos.

La genética y las alteraciones epigenéticas desempeñan un papel clave en la búsqueda de factores asociados al control del apetito y del metabolismo. Se pueden catalogar las mutaciones asociadas a la obesidad en sindrómicas o no sindrómicas (Revisión de Kühnen et al., 2020). Entre las sindrómicas, se encuentran las causadas por reordenamientos cromosómicos o de origen pleiotrópico, como los casos de los síndromes de Prader-Willi, Sim-1, síndrome de cromosoma X frágil o síndrome de Cohen. Acerca del origen no sindrómico de la obesidad, puede considerarse que es monogénico o poligénico, atendiendo al tipo y número de genes afectados (Revisión de Kühnen et al., 2020).

1. Se consideran alteraciones monogénicas, aquellas en las que la causa de la obesidad puede asociarse a un único gen. El primer gen para el que se detectaron polimorfismos asociados a un incremento de la grasa corporal fue el gen de masa grasa asociado a la obesidad (*FTO*); recientes investigaciones asocian estos polimorfismos a una mayor susceptibilidad al consumo de comidas con alto contenido graso o azúcar (revisión de Blüher, 2019). Otros genes mutados que se han asociado posteriormente al desarrollo de obesidad son *POMC*, *PC1*, *NPY*, *MC3R* o *MC4R* que tienen funciones reguladoras del apetito. También las mutaciones en el gen de la leptina, la grelina o de sus receptores pueden afectar enormemente a la regulación del metabolismo y al aporte energético.

2. Por otro lado, hay que considerar la obesidad de origen poligénico, que es la denominada obesidad común. En este caso, los individuos afectados pueden presentar mutaciones en diversos genes relacionados con distintas vías de señalización, entre las que se encuentran:

- Mutaciones de los receptores β -adrenérgicos 1, 2 y 3 (*ADRB1*, *ADBR2* y *ADBR3*), que impiden la señalización normal por la adrenalina a nivel celular y que se han visto asociados al desarrollo de obesidad infantil, a un incremento de la masa corporal a largo plazo, al aumento en la leptina circulante o a una disminución en la capacidad metabólica de los adipocitos.

- Mutaciones en los genes de proteínas desacoplantes (UCPs), que tienen una función reguladora del metabolismo energético. Se ha observado que estas mutaciones se encuentran frecuentemente asociadas a la obesidad.

2.2. Alteraciones de los tejidos adiposos y relación con el cáncer.

Además de la función de los tejidos adiposos para almacenar lípidos, estos tejidos también se comportan como un órgano con capacidades metabólicas y endocrinas. La mayor parte del tejido adiposo en individuos adultos se compone de tejido adiposo blanco, y se encuentra constituido principalmente de adipocitos, pre-adipocitos y células germinales, que se encuentran asociados a otros tipos celulares como macrófagos, células endoteliales o fibroblastos. Su función como órgano se realiza principalmente a través de la actividad de los adipocitos, los cuales regulan una amplia variedad de respuestas fisiológicas asociadas al metabolismo de lípidos y glucosa, además de modular las respuestas inflamatorias, la presión sanguínea, la angiogénesis y la contribución al mantenimiento de la homeostasis (revisión de Laforest et al., 2015). El incremento de la grasa corporal puede afectar de dos maneras al tejido adiposo: aumentando el número de adipocitos en el tejido, o concentrando el contenido de grasa en los adipocitos a través de su expansión en volumen. Si bien la regulación del volumen de los adipocitos es un proceso reversible, la proliferación e incremento total del número de adipocitos no parecen ser reversibles. Por tanto, un incremento del IMC en determinadas etapas de la vida, en las que la hiperplasia del tejido adiposo constituye un evento común, como durante el período de gestación, los primeros meses de vida o la pubertad, pueden derivar en el desarrollo de obesidad para toda la vida (Simmonds et al., 2015). Además, puede suceder que un exceso de los depósitos de grasa corporal devengan en un grado de hipertrofia de los adipocitos de tal magnitud que puede provocar eventos de hipoxia y necrosis en estos tejidos (Rosenow et al., 2013).

Como consecuencia de las mencionadas alteraciones en los tejidos adiposos, se suceden una serie de modificaciones en la expresión y secreción de adipoquinas y hormonas esteroideas, además de dar lugar al desarrollo de desórdenes metabólicos y de inflamación crónica que pueden influir en el desarrollo y agresividad tumorales (Figura 5). Entre las alteraciones más relevantes en tejidos adiposos disfuncionales (Revisión de Hursting et al., 2012), cabe destacar:

Hormonas y factores de crecimiento:

- Insulina.

La resistencia a la insulina en individuos con obesidad y una mayor liberación de la insulina circulante se han asociado a un incremento en el riesgo de desarrollo de diversos tumores, incluido el CCR (Ma et al., 2004). Además, esta hormona es capaz de inducir la producción de IGF-1 hepático, que puede inducir la vía de fosfatidil-inositol 3 kinasa (PI3K)/Akt, además de la vía de la proteína kinasa activada por mitógenos (MAPK), ambas vías relacionadas con la regulación del crecimiento celular y la mitogénesis (revisión de Pollak, 2004).

- Factor de crecimiento semejante a insulina de tipo I (IGF-1).

IGF-1 es un inhibidor de la apoptosis e inicia el tránsito de la fase G1 a la fase S del ciclo celular, a través de la activación de las vías de señalización PI3K/Akt y MAPK (revisión de Pollak, 2004). Es una molécula con funcionalidad reguladora paracrina y endocrina, y se ha visto que su mayor presencia en la circulación se relaciona con el desarrollo de tumores y con peores pronósticos clínicos en pacientes afectados de cáncer (Hursting y Berger, 2010). Existen, además, algunos indicios de que el IGF-1 podría afectar a la señalización en tumores, mediante su interacción con células tumorales a través de su receptor, o de forma indirecta a través de la activación de moléculas como p53.

- Factor de crecimiento del endotelial vascular (VEGF).

Es un promotor de la angiogénesis sintetizado por adipocitos y por células tumorales, y cuya producción es inducida tanto por insulina como por IGF-1 (Miele et al., 2000). En individuos con obesidad se puede observar un aumento en los niveles de VEGF circulante (Loebig et al., 2010), que en pacientes con cáncer se asocia con un mayor grado de agresividad tumoral (Cao et al., 2009).

Hormonas esteroideas:

- Estrógenos.

Estas moléculas se producen mediante la conversión de andrógenos principalmente en los ovarios y, en menor medida, en los tejidos adiposos. Al unirse a su receptor, son capaces de promover la proliferación celular e inhibir la apoptosis. Se ha observado, en mujeres con obesidad, su relación con diversos

tipos de tumores, como el cáncer de mama (Harbeck et al., 2019) o de endometrio (Ulrich, 2011). Los estrógenos pueden, además, inducir la síntesis de VEGF así como promover una angiogénesis más ordenada, reduciendo el grado de hipoxia y necrosis en el tumor (Péqueux et al., 2012).

- Testosterona y otros andrógenos.

Los andrógenos circulantes desempeñan un papel clave en el desarrollo y crecimiento de más del 80% de los tumores de próstata. La presencia de andrógenos, de otras citoquinas como la interleucina 6 (IL-6), o de factores de crecimiento como el IGF-1, pueden afectarse recíprocamente al activar el receptor de andrógenos, que, a su vez, estimula la síntesis de estas moléculas. La sobreexpresión o mutación del receptor de andrógenos puede provocar la unión inespecífica de ligandos que, a su vez, activan las vías de supervivencia y proliferación celular (Loneragan y Tindall, 2011).

Adipoquinas:

- Leptina.

A medida que se acumula la grasa corporal almacenada, los niveles de leptina circulantes ascienden. Existen 6 receptores de la leptina, aunque sólo uno de ellos posee un dominio de señalización intracelular, que corresponde a ObRb. En ensayos “*in vitro*”, la activación de ObRb estimula la supervivencia y proliferación celular en tumores de mama (Saxena et al., 2007), endometrio (Sharma et al., 2006) o colon (Hoda et al., 2007). La leptina es capaz de señalar a través de varias vías de proliferación y de regulación del ciclo celular como: Jack/STAT3, PI3k/Akt y ERK1/2. La leptina interviene además en la transactivación de las vías de señalización Notch, EGFR y Survivina, que pueden afectar a la migración e invasión tumorales (Knight et al., 2011). La leptina también puede promover el crecimiento tumoral y es capaz de inducir la síntesis de VEGF, y de esta manera el proceso de angiogénesis (Rene Gonzalez et al., 2009). Algunos estudios sugieren que el factor determinante en el desarrollo de neoplasias no son los niveles de leptina circulantes, considerados de forma absoluta, sino que es la proporción leptina/adiponectina la que genera este riesgo (Yamaji et al., 2010).

- Adiponectina.

El incremento de los depósitos de grasa corporal disminuye los niveles de adiponectina circulantes. Se conocen dos receptores para esta molécula, que al unirse a su ligando inducen la fosforilación de AMPK, que interviene en diferentes vías de señalización del metabolismo y de la síntesis de proteínas. Algunos ensayos “*in vitro*” indican que la adiponectina es capaz de inhibir el crecimiento y la proliferación celular en tumores de mama (Körner et al., 2007), endometrio (Cong et al., 2007) o colon (Kim et al., 2010). Tiene también la capacidad de inhibir la angiogénesis al promover la apoptosis de células endoteliales (Bråkenhielm et al., 2004). Diversos estudios epidemiológicos muestran que un mayor nivel en la expresión de la adiponectina disminuye el riesgo de cáncer de mama postmenopáusico (Miyoshi et al., 2003), de cáncer de endometrio (Cust et al., 2007) o de cáncer colorrectal en varones (Xu et al., 2011).

Sistema inmune e inflamación:

- Infiltración de macrófagos.

El desarrollo de la obesidad provoca un estado de inflamación subclínica de los tejidos adiposos, dando lugar a que los macrófagos rodeen los adipocitos necróticos, formando estructuras en forma de corona (CLS). El 50% de las mujeres con cáncer de mama presentan CLS, y en mujeres con sobrepeso u obesidad la activación del factor nuclear kappa B (NFκB) o la mayor presencia de mediadores proinflamatorios han sido detectados en el tejido tumoral mamario inflamado (Morris et al., 2011). Además, en modelos murinos se ha relacionado la obesidad con la mayor presencia de macrófagos M1, de carácter proinflamatorio y asociados al desarrollo de CCR, en comparación con ratones normopeso que presentaban mayor presencia de macrófagos M2 de fenotipo anti-inflamatorio (Lumeng et al., 2007).

- NFκB.

Este factor de transcripción es activado como respuesta a múltiples factores de crecimiento, citoquinas o a moléculas proinflamatorias, y posee un papel importante en la regulación de la proliferación, la apoptosis, la angiogénesis y la inflamación celular. La obesidad puede inducir la síntesis de

NFκB en los tejidos adiposos, induciendo la transcripción de genes asociados a inflamación y cáncer como *IL-6*, *COX-2* e *IL-1β* (Baker et al., 2011).

Citoquinas:

- IL-6.

La expresión de IL-6 se encuentra incrementado en los tejidos adiposos y en el plasma de individuos con obesidad (Kern et al., 2001). Esta citoquina es secretada por diversos tipos celulares que se encuentran en el tejido adiposo, como macrófagos, adipocitos, fibroblastos o células endoteliales. En la publicación de Sindhu et al. (2015), la presencia de IL-6 en el tejido adiposo se correlaciona con la expresión local de otros marcadores de inflamación. Además, puede tener un papel antiinflamatorio, inhibiendo la actividad del factor de necrosis tumoral α (TNF-α) o favoreciendo la polarización de los macrófagos a su fenotipo M2 (Pedersen et al., 2001; Mauer et al., 2014).

- TNF-α.

La rápida acumulación de depósitos de grasa puede provocar un incremento en la síntesis de TNF-α por parte de los macrófagos, los adipocitos y los preadipocitos. Investigaciones realizadas en ratones muestran un aumento significativo, de hasta el 70%, en la expresión de TNF-α en el tejido colorrectal de ratones obesos, que da lugar a la síntesis de β-catenina (Liu et al., 2012) y a la activación de la vía Wnt. El grupo de Zhao y Zhang (2018) observó, en un modelo “*in vitro*” de líneas celulares colorrectales humanas, que el tratamiento con TNF-α es capaz de promover la movilidad e invasión celulares, a través de la activación de la síntesis de TROP-2.

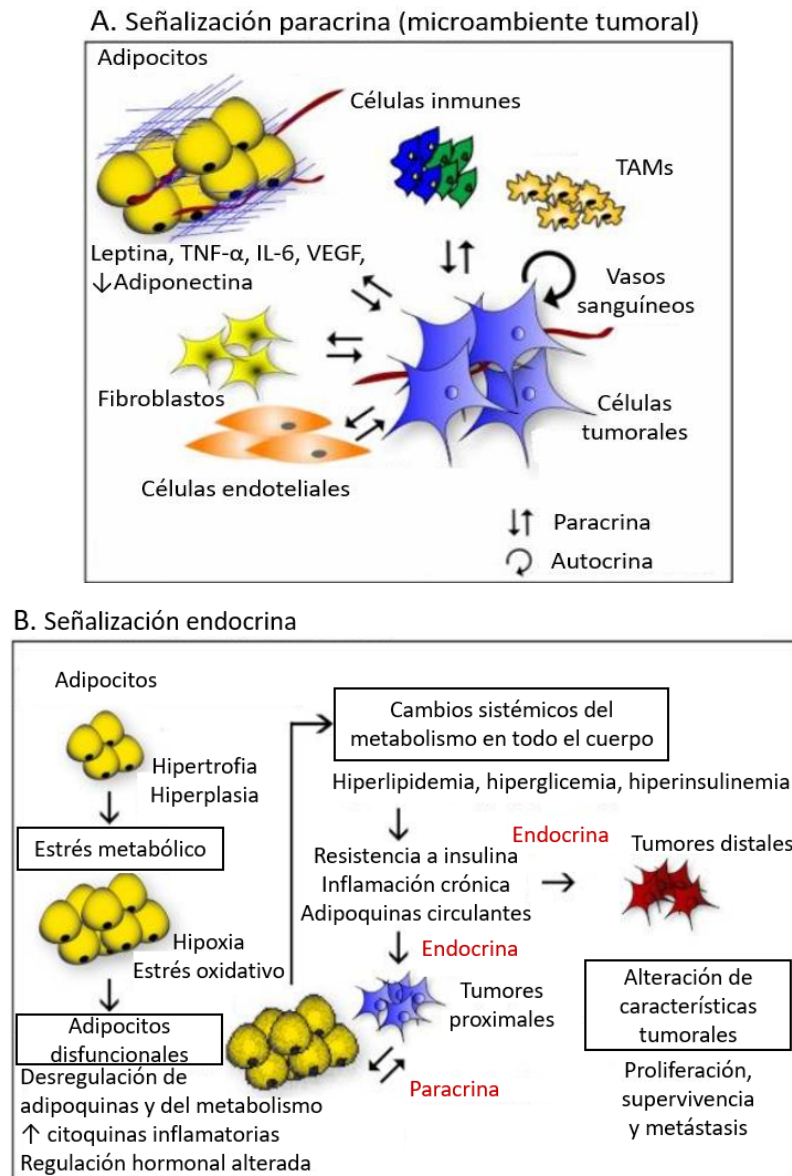


Figura 5. Interacciones paracrinas y endocrinas entre adipocitos y células tumorales. Modificación del original de Park et al. (2011). A) Señalización paracrina del tejido adiposo al microambiente tumoral. Los adipocitos influyen en las células tumorales y otros tipos celulares como macrófagos asociados a tumores (TAMs), células inmunitarias y endoteliales a través de la liberación de adipoquinas, citoquinas o factores angiogénicos. B) Señalización endocrina del tejido adiposo a través de cambios sistémicos en el organismo. La obesidad puede dar lugar a la hipertrofia e hiperplasia de los adipocitos, provocando la disfunción de los tejidos adiposos y generando resistencia a la insulina, inflamación crónica y desregulación de las adipoquinas circulantes. Como resultado, la disfunción de los tejidos adiposos afecta tanto a tejidos y tumores próximos como a distancia, modulando el comportamiento y agresividad tumoral.

2.3. Características de los tejidos adiposos omental y subcutáneo.

El tejido adiposo situado inmediatamente bajo la piel es el denominado tejido adiposo subcutáneo (TAS), mientras que los tejidos adiposos que rodean a los órganos internos se denominan tejidos adiposos viscerales (Figura 6). Entre estos últimos, uno de los mayores depósitos de grasa corporal, y con especial relevancia en la investigación médica del CCR, es el tejido adiposo omental (TAO), que drena directamente al hígado a través de la circulación portal.

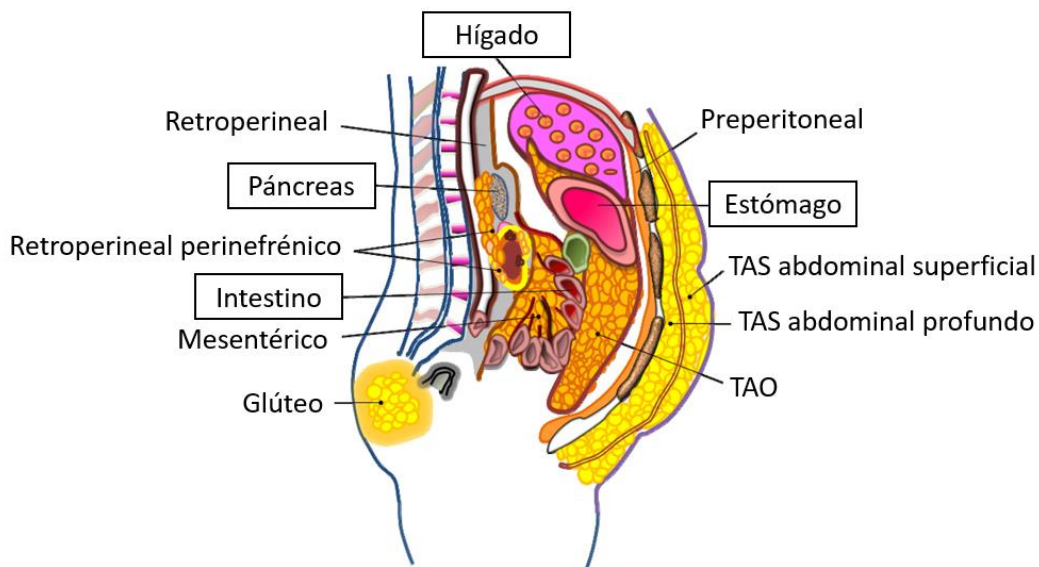


Figura 6. Localización de los principales depósitos de grasa en humanos. Entre los tejidos adiposos subcutáneos se incluyen el abdominal y el del glúteo. Entre los tejidos adiposos viscerales se encuentran los asociados a órganos digestivos. El tejido adiposo omental se encuentra unido al estómago y al colon, mientras que el mesentérico cubre el intestino. TAO = Tejido adiposo omental. TAS = Tejido adiposo subcutáneo.

Existen diferencias en la distribución de los depósitos grasos atendiendo al sexo, edad o etnia de los individuos (revisión de Staiano y Katzmarzyk, 2005). En mujeres, los depósitos grasos se acumulan generalmente en los TAS, mientras que al alcanzar la menopausia la acumulación es mayor en los TAO y en los TAS localizados en la zona abdominal. Los varones, en cambio, almacenan principalmente los depósitos grasos en los TAO tras alcanzar la pubertad. Existen algunas diferencias también atendiendo a la etnia. Así, la

población europea, de origen hispano o asiática, presenta mayores depósitos de grasa en los TAO. Sin embargo, la población de origen africano presenta una acumulación superior de depósitos grasos en los TAS.

Aunque ya se ha comentado la asociación entre el incremento en la grasa corporal y el riesgo de desarrollar diferentes enfermedades, como diabetes, hipertensión o síndrome metabólico, el sitio concreto de almacenamiento de los depósitos grasos afecta considerablemente a la fisiopatología de estas afecciones. La acumulación grasa en los TAO se asocia con un mayor riesgo de sufrir síndrome metabólico, y es el principal responsable del desarrollo de la resistencia a la insulina y de la inflamación crónica (McLaughlin et al., 2011). También se ha visto que esta acumulación en los TAO se asocia a la liberación de adipoquinas inflamatorias en individuos afectados de diabetes *mellitus* tipo 2. En cambio, la acumulación en los TAS de los depósitos grasos parece aliviar la resistencia a la insulina, evitando el desarrollo de diabetes *mellitus* tipo 2. Sin embargo, algunos factores como la edad, la regulación hormonal o el estado nutricional pueden provocar la disfunción de los TAS, perdiendo su potencial papel protector (Pandžić y Grizelj, 2016).

Aunque ambos tejidos adiposos, TAO y TAS, expresan grupos de genes similares (Gerhard et al., 2014), los niveles de expresión entre ambos tipos difieren (Arderiu et al., 2020; Korac et al., 2021), lo que estaría relacionado con su diversidad funcional. En los TAS, por ejemplo, la expresión de genes proinflamatorios es considerablemente superior que en los TAO, en individuos que desarrollan obesidad (Spoto et al., 2014).

3. LOS MICROARNs.

Los microARNs son pequeñas moléculas de ARN no codificante, de entre 18 y 23 nucleótidos, que intervienen en la regulación de un gran número de vías de señalización. Este papel modulador los convierte, desde su descubrimiento hace casi 30 años, en objeto de estudio de especial interés en el campo de la biología molecular y, más específicamente, en el campo de la fisiopatología, ya que se han relacionado con diversas enfermedades en las que la desregulación de estos microARNs desempeña una función importante en su desarrollo y evolución. Hasta el momento, más de 2000 microARNs han sido caracterizados, y su relación con algunas de las patologías más frecuentemente desarrolladas por el ser humano, como son el cáncer y la obesidad, continúa siendo uno de los campos de investigación de gran relevancia.

3.1. Síntesis y mecanismos de acción.

Los microARNs son transcritos a partir del ADN genómico, generalmente de las regiones intrónicas de genes, aunque también se ha descubierto recientemente la existencia de microARNs de origen intergénico (Lagos-Quintana et al., 2003). El mecanismo canónico de esta transcripción, realizada fundamentalmente por la ARN polimerasa II (Lee et al., 2004; Borchert y Lanier, 2004), da lugar a la síntesis de un ARN con forma de horquilla, de entre 60 y 70 nucleótidos, (Bartel, 2004) denominado pri-microARN. Este pri-microARN contiene la secuencia de uno o varios microARNs, y sufre un proceso de maduración a través de la actividad catalítica de dos endonucleasas. En primer lugar, el pri-microARN se une, en el núcleo, a la proteína de unión al ARN, DGCR8, que a su vez se encuentra asociada a Drosha. La enzima Drosha, a través de su actividad endonucleasa, separa la región en forma de lazo, dando lugar a un precursor del microARN con las regiones flanqueantes intactas. Este precursor es transportado al citoplasma a través de la exportina 5, tras lo cual, se lleva a cabo un proceso de maduración final a través de su unión a la proteína de unión al ARN, TRBP, asociada a la endonucleasa Dicer. La actividad enzimática de Dicer libera un microARN de doble cadena, de entre 18 y 23 nucleótidos, cuyas hebras pueden dar lugar a un único microARN funcional, en cuyo caso la otra hebra es degradada, o a dos microARNs funcionales.

Una vez obtenido el microARN maduro, éste se une a Ago2 para formar el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC o miRISC), que es capaz de unirse a los ARN mensajeros (ARNm) con secuencias complementarias al microARN. Esta unión involucra particularmente a los nucleótidos 2-7 del microARN, denominada región semilla. También se ha observado que el extremo 3' del microARN tiene capacidad para reconocer el ARNm diana. Además, hay algunos microARNs que presentan, en su región central situada entre los nucleótidos 9-11, complementariedad con las secuencias del ARNm diana, lo que señala a Ago2 para el corte del ARNm a través de su actividad endonucleasa (Figura 7).

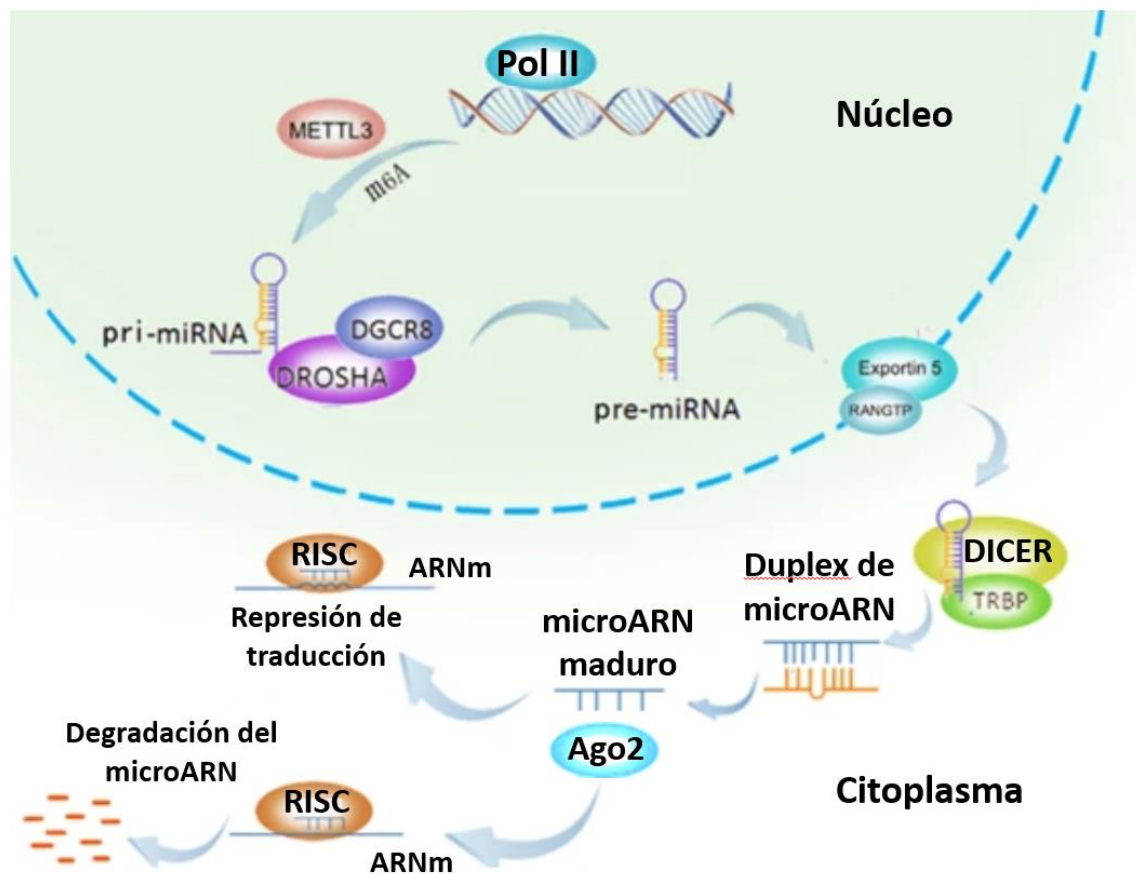


Figura 7. Biogénesis y mecanismo de acción canónico de los microARNs. Modificación de Peng y Croce (2016). El precursor del microARN es sintetizado en el núcleo por la ARN polimerasa II y Drosha lo corta antes de ser exportado al citoplasma, donde Dicer realiza un segundo corte que da lugar al microARN maduro. La unión de este microARN maduro a Ago2 da lugar al complejo RISC, que puede unirse a ARN mensajeros con la secuencia diana y es capaz de inhibir la traducción de proteínas.

En la mayoría de casos, esta complementariedad de la región central no existe, y lo que ocurre es que Ago2 es reclutado por un complejo que incluye a GW182 y que se encuentra en los cuerpos P del citoplasma, donde se produce la inhibición de la traducción. Además de la inhibición de la traducción por estas vías, se ha visto que algunos microARNs tienen la capacidad de unirse a la región 5' UTR de los ARNm (Zhang et al., 2018), provocando su silenciamiento. Además del silenciamiento de la transcripción, se ha observado la capacidad de los microARNs para regular la transcripción a través de su unión a cajas TATA en las regiones de los promotores génicos (Zhang, Fan et al., 2014).

Aunque se ha observado que los microARNs realizan parte de su actividad en el citoplasma celular, también se ha descrito que existe una alta compartimentalización del complejo miRISC junto al ARNm en diferentes localizaciones subcelulares (revisión de O'Brien et al., 2018), como son; el retículo endoplasmático rugoso, el aparato de Golgi, los cuerpos multivesiculares, los cuerpos P, los gránulos de estrés, los endosomas, los lisosomas, la mitocondrias, o el núcleo.

3.2. Secreción, transporte y función a distancia.

Desde hace años, se conoce la presencia de microARNs en diversos fluidos biológicos, incluido el plasma, el suero, la saliva, la leche materna, el fluido cerebroespinal o el fluido folicular del ovario (revisión de O'Brien et al., 2018). La presencia de ARNasas en estos fluidos llevó a la investigación de los mecanismos por los cuales los microARNs se conservan, a pesar de la presencia de estas ARNasas y de otros factores que pueden afectar a su estabilidad. Se ha observado que los microARNs pueden ser transportados y conservados a través de su unión a Ago2, formando el complejo miRISC, aunque también pueden circular en plasma encontrándose asociados a vesículas extracelulares (Arroyo et al., 2011; Geekiyanage et al., 2020), encapsulados en exosomas (Gallo et al., 2012), o en el seno de las lipoproteínas (Vickers et al., 2011).

La secreción de los microARNs en exosomas es un proceso regulado por diferentes rutas, como la vía de las ceramidas (Kosaka et al., 2010), la señalización por IL-4 (Yang et al., 2011) o la vía mediada por el ácido

docosaheptaenoico (Hannafon et al., 2015). Se conocen algunos de los mecanismos de integración de los microARNs extracelulares a las células receptoras, como la endocitosis por parte de los exosomas, mediada por clatrina o caveolina (Tian et al., 2014; Wei et al., 2017), la recepción de microARNs asociados a lipoproteínas a través del receptor de HDL (Vickers et al., 2011), o la unión directa de microARNs a receptores específicos de la membrana celular (Chen et al., 2012). De esta manera, los microARNs extracelulares son capaces de ejercer su función en células a distancia, modulando su expresión y función. Alternativamente, se ha descubierto que algunos microARNs tienen la capacidad de unirse a receptores de tipo Toll, activando cascadas de señalización que pueden regular procesos biológicos como la inflamación a través de la síntesis de citoquinas, como IL-6 o TNF- α (Fabbri et al., 2012).

3.3. MicroARNs asociados a cáncer, a obesidad y a senescencia celular.

Los primeros estudios realizados en los microARNs ya mostraron la importancia de estas moléculas en la regulación de diferentes procesos biológicos, al relacionarse con el desarrollo embrionario murino (Bernstein et al., 2003; Wang et al., 2007). Posteriormente, se han investigado los microARNs en relación con el desarrollo y evolución de diversas patologías humanas. Entre los estudios sobre microARNs asociados a enfermedades, en esta Tesis consideramos de especial relevancia aquellos que están relacionados con el cáncer y con la obesidad. En cáncer, se ha detectado la desregulación de una gran variedad de microARNs que afectan a una o a varias de las características celulares distintivas del cáncer, como son la proliferación, la supervivencia, la apoptosis o la capacidad de migración celular.

A través de una extensa revisión bibliográfica, contando con la inestimable ayuda de la Dra. Ana Barabash, se han seleccionado distintos microARNs que se describen como diferencialmente desregulados en CCR y que participan en los procesos de función telomérica, proliferación, senescencia celular u obesidad. De esta forma, se eligieron como microARNs de interés para ser investigados en esta Tesis, los que se indican seguidamente:

- microARN 34a-5p

Se trata de uno de los microARNs más estudiados por participar en un bucle de retroalimentación positivo con p53, a través de la inhibición de *SIRT1* (Yamakuchi y Lowenstein, 2009). Modula la actividad de p53 en relación con la reparación celular, la senescencia y la apoptosis; está involucrado en la pérdida de función de p53, teniendo, como consecuencia, un papel clave en la progresión tumoral (Cha et al., 2012; Slabáková et al., 2017). También es un regulador de la migración e invasión celulares, inhibiendo *Notch1* y *Jagged1*, y disminuyendo los niveles celulares de vimentina y fibronectina (Zhang et al., 2017).

Además, el microARN 34a-5p es capaz de inhibir la actividad telomerasa a través de la cascada de señalización FoxM1/c-Myc, al disminuir la expresión del componente catalítico de la telomerasa *hTERT* (Xu et al., 2015).

En tejidos adiposos, el incremento en la expresión de este microARN se asocia a diferenciación celular, así como a senescencia, a través de la inducción de la síntesis de IL-6 e IL-8 (Park et al., 2015). La expresión del microARN 34a-5p resulta superior en los tejidos adiposos de individuos con obesidad, correspondiéndose con la fracción de adipocitos maduros del tejido, de acuerdo con las investigaciones llevadas a cabo por Ortega et al (2010).

- microARN 132-3p

Tiene un papel regulador en la inhibición de la progresión, la invasión y las metástasis en pacientes con CCR (Zheng et al., 2014; Zhang et al., 2019), y está descrito como supresor de la actividad de SIRT1 (Zhang, Huang et al., 2014), pudiendo regular procesos como la proliferación y la supervivencia celulares, a través de p53. Se ha observado una disminución de los niveles de este microARN en tumores colorrectales, en asociación a un incremento de la invasividad de estos cánceres, así como a la presencia de metástasis (Zhang et al., 2019). Los niveles séricos y en tejidos adiposos del microARN 132-3p se encuentran alterados en personas con obesidad; su mayor expresión está vinculada a parámetros asociados con la metabolización de la glucosa o la diferenciación de los adipocitos (Klötting et al., 2009; Heneghan et al., 2011). También se ha relacionado con la síntesis de citoquinas, como la IL-8 o la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (Strum et al., 2009).

- microARN 143-3p

Pertenece al *cluster* de los microARNs 143/145, y su expresión está regulada a nivel post-transcripcional por p53 (Suzuki et al., 2009). Tiene un papel fundamental en la regulación de la proliferación celular, a través de su gen diana *KRAS* (Chen et al., 2009; Wang et al., 2021) y es capaz de suprimir la invasión y metastatización en diversos tipos tumorales (Guo et al., 2019). En tumores colorrectales, la expresión de este microARN disminuye a medida que avanza la progresión tumoral (Bai et al., 2016). También tiene un papel fundamental en la regulación de la diferenciación de adipocitos, a través de la señalización de *ERK5* (Esau et al., 2004), y puede afectar al grado de resistencia a la insulina, a través de la *Igfr2* (Xihua et al., 2017)

- MicroARN 181a-5p

Es un inhibidor de la expresión de SIRT1 (Huang y Xu, 2019), afectando a la regulación de p53 y a diversos procesos biológicos asociados al ciclo celular y a la supervivencia. Su función en el cáncer colorrectal no está todavía aclarada; algunos autores indican que este microARN es capaz de inhibir la proliferación celular, la migración y la invasión en CCR (Shang et al., 2020). Otros autores, sin embargo, le otorgan un papel protumoral, favoreciendo el crecimiento tumoral y las metástasis (Sun et al., 2018). El microARN 181a-5p se ha asociado con la capacidad de inducir la angiogénesis, a través de la señalización mediada por *VEGF* (Ji et al., 2014). Se ha observado que los niveles de expresión de este microARN disminuyen en los tejidos adiposos de individuos con obesidad o diabéticos, y tiene un papel activador de la vía de señalización mediada por *Akt* (Lozano-Bartolomé et al., 2018).

MicroARN de referencia:

Para seleccionar un microARN de referencia, se tuvieron en cuenta los datos existentes en la bibliografía sobre el tema. Así, se eligió una molécula cuya expresión fuera estable en sueros, tejidos colorrectales tumorales y no tumorales, así como en TAO y en TAS. Se determinó que el microARN 103-3p era un buen candidato, ya que presentaba las características requeridas para su uso en los análisis de expresión de microARNs establecidos en esta Tesis (Peltier y Latham, 2008; Neville et al., 2008; Boisen et al. 2015; Elias et al., 2017).

4. LOS TELÓMEROS.

4.1. Los telómeros y el problema de la replicación terminal.

Durante la replicación del ADN lineal de eucariotas, las hebras rezagadas no pueden ser duplicadas por completo, ya que en cada ronda de replicación, coincidiendo con la maduración de los fragmentos de Okazaki, se van perdiendo pequeños fragmentos de ADN localizados en sus extremos. Esto es debido a la incapacidad de las ADN polimerasas para llevar a cabo su proceso biosintético sin disponer de un cebador que proporcione el extremo 5' de las nuevas cadenas. Si este problema no se solventase, se produciría un acortamiento crítico del ADN cromosómico que activaría los programas de senescencia y de muerte celular. Originalmente fueron Watson (1972) y Olovnikov (1973) quienes sugirieron la existencia de algún mecanismo por el cual se mantuviese la longitud del ADN cromosómico durante los sucesivos ciclos de replicación. Treinta y cinco años antes de estas investigaciones, el genetista Müller trabajando con especímenes de *Drosophila melanogaster* expuestos a radiaciones con rayos X, observó que los extremos cromosómicos, a diferencia del resto del genoma, no presentaban inserciones o deleciones de ADN, gracias a la presencia de una caperuza protectora que denominó telómero, del término griego “telos” que significa fin, y “meros” que significa parte (Revisión de Chuaire, 2006). En 1975, Blackburn y Joseph Gall, investigando en *Tetrahymena thermophila*, observaron que todos los cromosomas terminaban con secuencias nucleotídicas repetidas. Una colaboración entre Blackburn y Szostak (1982) corroboró la importancia de estas secuencias. Sin embargo, el descubrimiento de la existencia de una enzima responsable de la elongación telomérica no llegaría hasta más tarde, cuando Blackburn y Greider (1985) observaron la síntesis de “novo” de la secuencia 5'-TTGGGG-3' en *Tetrahymena thermophila*. Esta enzima fue denominada telomerasa.

4.2. Estructura telomérica y complejo shelterin.

Los telómeros humanos se conforman a base de repeticiones de la secuencia nucleotídica 5'-TTAGGG-3' (Moyzis et al., 1988). Estructuralmente, los telómeros de los extremos cromosómicos adoptan una forma cerrada,

denominada *T-loop* que protege las monohebras de los extremos 3' de la acción de los mecanismos de reparación celulares (Griffith et al., 1999) (Figura 8).

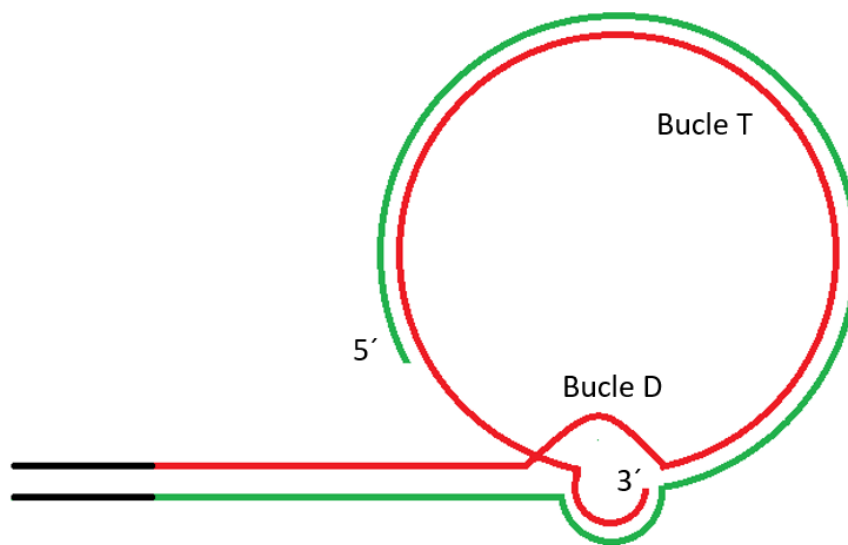


Figura 8. Esquema de la estructura terminal en bucle D y bucle T de los telómeros.

La estabilidad de la estructura telomérica depende en gran parte del complejo *shelterin*, que se encuentra integrado por seis proteínas que se unen a las secuencias teloméricas y estabilizan su estructura (Figura 9). Esas seis proteínas corresponden a: proteína represora activadora 1 (RAP1), factor de unión a repeticiones teloméricas 1 (TRF1), factor de unión a repeticiones teloméricas 2 (TRF2), factor nuclear 2 de interacción con TRF1 (TIN2), proteína homóloga de la displasia adrenocortical (TPP1 o ACD), y proteína protectora de telómeros 1 (POT1).

En cuanto a su función: TRF1 y TRF2 forman homodímeros y permiten la unión del complejo *shelterin* al ADN telomérico de doble cadena. La proteína RAP1 es reclutada a los telómeros a través de su unión a TRF2, y contribuye a la prevención de eventos de recombinación homóloga. POT1 se une a la región monohebra 3' del telómero e interactúa con TPP1 para formar un heterodímero que tiene funciones reguladoras de la actividad telomerasa. Finalmente, TIN2 interactúa de manera simultánea con TRF1, TRF2 y TPP1 para facilitar y estabilizar la formación del complejo *shelterin* (Chen, 2019).

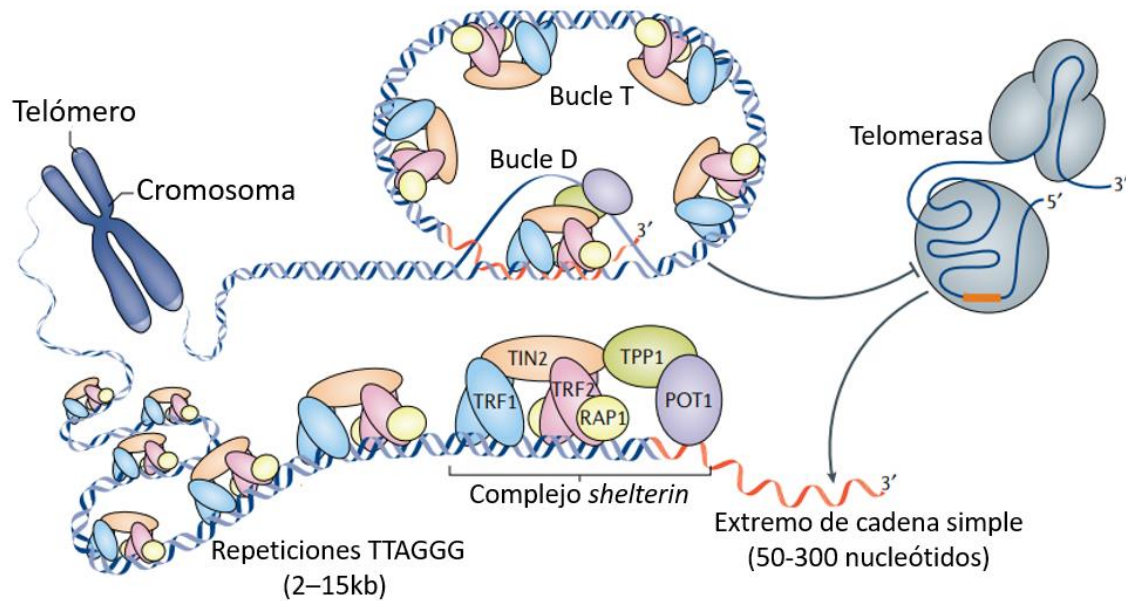


Figura 9. Estructura telomérica y del complejo shelterin. Modificación del original de Lim y Cech (2021). El ADN telomérico está integrado por secuencias repetidas de 5'-TTAGGG-3'; finaliza en una hebra de cadena sencilla capaz de invadir la estructura en doble cadena del ADN, para formar un bucle de desplazamiento D y un bucle telomérico T. Estas estructuras son reguladas por el complejo shelterin, y pueden restringir el acceso de la telomerasa al extremo 3'. La apertura del telómero, durante fase S del ciclo celular en las células en las que telomerasa está activa, permite el acceso de la enzima al extremo 3' del ADN y realizar su actividad catalítica. TRF1= Factor de unión a repeticiones teloméricas 1. TRF2 = factor de unión a repeticiones teloméricas 2. RAP1 = Proteína represora activadora 1. POT1 = Proteína protectora de telómeros 1. TIN2= Factor nuclear 2 de interacción con TRF1. TPP1 = Proteína homóloga de la displasia adrenocortical.

Si bien la función principal del telómero es la protección de la información genética contenida en los cromosomas, se han podido observar otras funciones realizadas en estas regiones cromosómicas. Algunos investigadores han descrito que la región telomérica interviene en la biosíntesis de *telomeric repeat containing RNA (TERRA)*, y que éstos ARNs no codificantes tienen una función reguladora de genes cercanos a la región telomérica denominados *TPE*, como

también de genes situados a mayor distancia, denominados *TPE-OLD* (Pedram et al., 2006). Entre las funciones asociadas a los *TERRA*, se encuentran la regulación de la actividad telomerasa, la formación de heterocromatina en los extremos cromosómicos, la resistencia a la inestabilidad genómica y la recombinación homóloga entre telómeros (Revisión de Cusanelli y Chartrand, 2015).

4.3. Estructura y función de la telomerasa.

La telomerasa es una ADN polimerasa ARN dependiente de organismos eucariotas con cromosomas lineales cuya función es la incorporación de nuevas repeticiones teloméricas a los extremos de los fragmentos cromosómicos, siendo la principal responsable del mantenimiento telomérico. Estructuralmente, es una ribonucleoproteína compuesta por una subunidad catalítica que en humanos se denomina telomerasa transcriptasa inversa (hTERT) y un componente de ARN (hTR o hTERC) que es empleado como molde para sintetizar nuevas repeticiones teloméricas 5'-TTAGGG-3' (Figura 10).

Algunas de las características esenciales de la subunidad catalítica hTERT son las siguientes: el dominio transcriptasa reversa se encuentra localizado en la mitad cercana al dominio C-terminal; tiene una región conservada específica de la telomerasa, denominada dominio T, que se encuentra situada en posición adyacente a los dominios transcriptasa reversa en dirección N-terminal; posee además una gran región N-terminal con secuencias altamente conservadas y con funcionalidad relevante para la actividad de la enzima (Revisión de Cong et al., 2002).

En cuanto a *hTR*, posee el dominio que funciona como molde para la síntesis de nuevas secuencias teloméricas. Posee además una estructura secundaria con características asociadas a la funcionalidad de la telomerasa, y que presenta 4 elementos funcionales muy conservados, que corresponden a; un dominio con forma de pseudonudo compuesto por CR2/CR3, un dominio CR4/CR5, un dominio con caja H/ACA (CR6/CR8), y un dominio CR7. Estas regiones desempeñan un papel fundamental en el reconocimiento por proteínas asociadas a *hTR* que pueden contribuir a su estabilidad, acumulación o a la

Introducción

formación del complejo de la ribonucleoproteína, como es el caso de hGAR, NHP2, la disquerina o hNOP10.

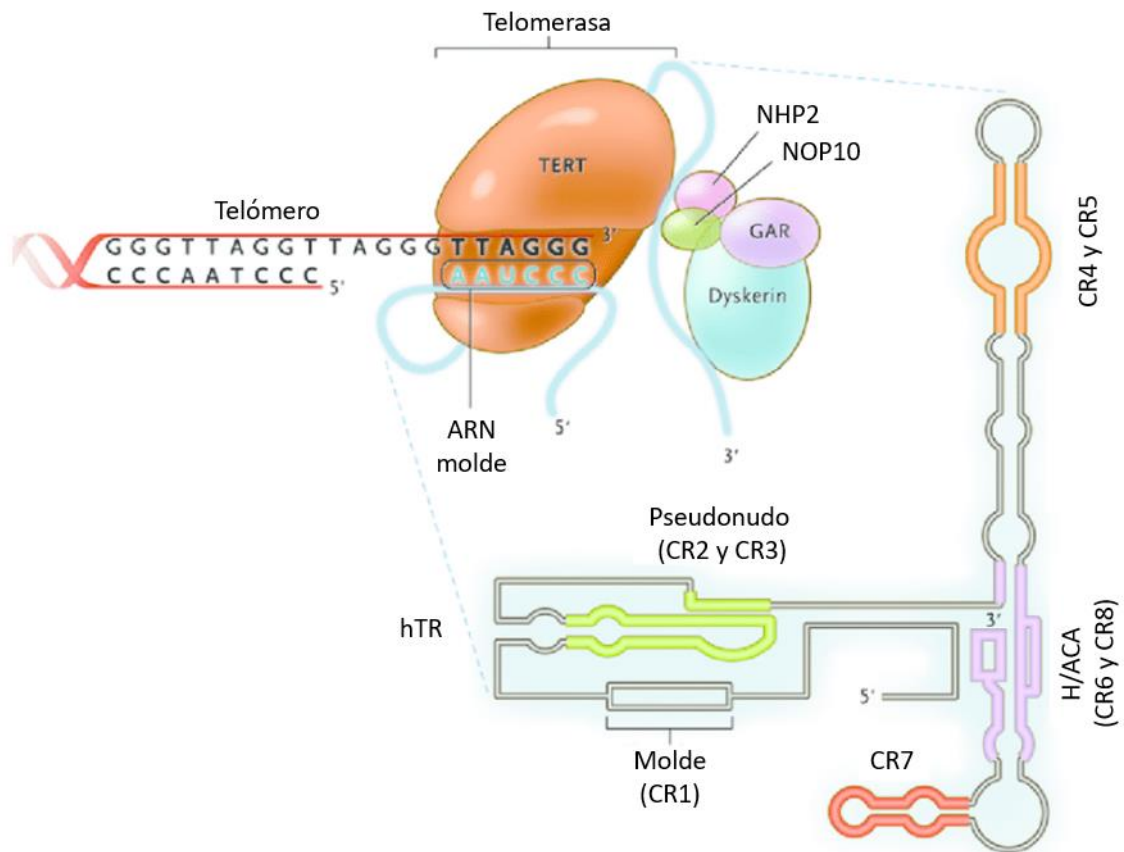


Figura 10. El complejo ribonucleoproteico de la telomerasa y sus componentes. Modificación del original de Calado y Young (2009). TERT = Telomerasa transcriptasa reversa. hTR = ARN de la telomerasa.

4.4. Regulación de la actividad telomerasa y la longitud telomérica.

La regulación de la actividad telomerasa, que es determinante en el mantenimiento de la longitud telomérica y de la homeostasis, sucede a distintos niveles, entre los que se incluyen: la transcripción del ARNm; el *splicing* del ARNm; la maduración y las modificaciones de *hTR* y *hTERT*; el transporte y la localización subcelular de estos componentes; la formación del complejo de la ribonucleoproteína; el acceso de la telomerasa al telómero y la propia actividad enzimática.

En la mayoría de tejidos y células diferenciadas, la actividad telomerasa es neutralizada durante el desarrollo embrionario, proceso que coincide con la disminución en los niveles del ARNm de *hTERT* (Wright et al., 1996). Sin embargo, la expresión ectópica de *hTERT* parece ser suficiente para recuperar la actividad de la enzima, recuperando así la inmortalidad replicativa en estos casos (Counter et al., 1998). Se ha observado que en algunas especies la localización del gen *hTERT* en la región subtelomérica permite regular su transcripción en función de la longitud telomérica, y aunque en humanos el gen se encuentra a más de 2 megabases del telómero, el grupo de Kim et al. (2016) ha observado que la compactación de la cromatina, así como los niveles de la proteína TRF2 y la expresión de los *TERRA* intervienen en la regulación de la transcripción de *hTERT*.

Además, el splicing del ARNm de *hTERT* puede desempeñar un papel clave en la funcionalidad de la telomerasa. Sólo el transcrito completo de *hTERT* se ha asociado con la positividad de la actividad telomerasa (Ulaner et al., 2000), y algunos estudios apuntan a que isoformas alternativas del ARNm podrían dar lugar a complejos con actividad telomerasa negativa como forma de regulación enzimática.

A nivel post-traducciona, se ha observado en diferentes líneas celulares que la expresión aberrante de *hTERT* no es suficiente para recuperar la actividad telomerasa (Ulaner et al., 2000). Entre los mecanismos observados que afectan a la regulación de la actividad telomerasa, se encuentra la fosforilación de la enzima a través de la actividad de la proteína quinasa C (PKC) o la proteína quinasa B, que podrían regular la actividad de la enzima o su localización subcelular. Algunas evidencias de ello se han observado en tumores mamarios, donde la actividad telomerasa es controlada por la PKC (Li et al., 1998), y en linfocitos T, donde el grupo de Liu et al. (2001) observó que la fosforilación de *hTERT* provoca su translocalización del citoplasma al núcleo celular.

Otro nivel de regulación en el mantenimiento telomérico implica al complejo *shelterin* y a sus componentes. El papel regulador de *shelterin* puede ser inhibidor o promotor de la elongación telomérica, dependiendo del contexto celular. Se ha observado que TRF1 es un regulador negativo de la longitud telomérica, y su sobreexpresión se asocia en diversos tumores a longitudes

teloméricas más cortas (García-Aranda et al., 2006). Por otro lado, el reclutamiento de la telomerasa es realizado por el dominio de unión a oligonucleótidos (OB) de TPP1 (Nandakumar et al., 2012), que ocurre durante la fase S del ciclo celular. Además, la proteína POT1 puede tener un papel dual atendiendo a su localización; su unión a la región monohebra del ADN telomérico permite el reclutamiento de la telomerasa al extremo 3' terminal, promoviendo la actividad de la enzima; por otro lado, si POT1 se encuentra unido al ADN monohebra en el extremo 3' terminal, impide la unión de la telomerasa a esta región, inhibiendo el proceso de elongación telomérica (Let et al., 2005). Además, se ha observado que POT1 puede regular la estructura G4 de los telómeros a través de su unión a TPP1 (Hwang et al., 2012). La estructura G4 tiene un carácter dual en el mantenimiento telomérico; inhibiendo la unión de la telomerasa a la región de ADN de cadena simple o favoreciendo la productividad de la enzima dependiendo del momento del ciclo celular en el que se forma el complejo G4 (Jansson et al., 2019).

4.5. Relación entre función telomérica y cáncer.

Existe una amplitud de investigaciones que han vinculado la expresión aberrante de telomerasa o la disfunción telomérica con el proceso tumorigénico. Hay dos barreras biológicas fundamentales que una célula debe superar para alcanzar la inmortalidad celular y sufrir la transformación a célula maligna; son la senescencia replicativa y la crisis (revisión de Jafri et al., 2016). La senescencia replicativa, también conocido como estadio de mortalidad M1, sucede en aquellas células que presentan uno o varios cromosomas en los que se ha perdido el telómero, quedando el cromosoma expuesto por el extremo. Durante esta fase, la proliferación celular se encuentra bloqueada en condiciones normales, aunque la presencia de alteraciones tumorigénicas permite a algunas de estas células superar la fase M1 y continuar los ciclos de replicación, dando lugar a un nuevo estadio llamado crisis M2. En esta fase, las señales de proliferación y senescencia se encuentran balanceadas, y la presencia de cromosomas con ADN expuesto provoca la fusión de estos, lo que provoca una apoptosis celular generalizada. Puede suceder que de entre estas células se genere un clon, con una probabilidad muy inferior a 1 por cada 100.000 células,

con capacidad de progresar a la inmortalidad replicativa (Figura 11). Existen dos mecanismos por los cuales sucede esta transformación, que son; la reactivación aberrante de la actividad telomerasa, y la adquisición de un mecanismo independiente de la telomerasa ALT. En la mayoría de casos, la reactivación de la telomerasa es el evento más común de transformación, mientras que el mecanismo ALT se presenta en tan solo un 10% de los tumores. El mecanismo ALT funciona mediante la recombinación homóloga de telómeros que permite la extensión de los telómeros más cortos, y requiere de la pérdida de factores que intervienen en la compactación de la cromatina telomérica como ATRX o DAXX, generando así alteraciones en la secuencia telomérica y la activación de la respuesta al daño del ADN, induciendo el proceso de recombinación homóloga (revisión de Jafri et al., 2016).

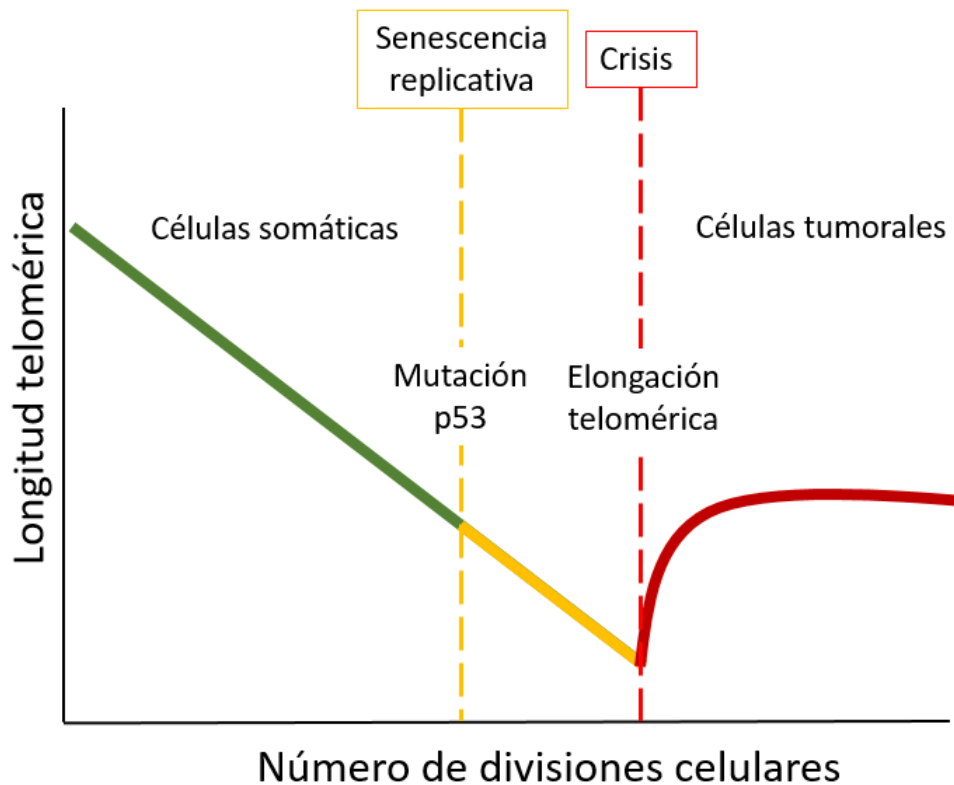


Figura 11. Acortamiento telomérico, senescencia, crisis e inmortalización celular. Las células somáticas pierden ADN telomérico a medida que realizan consecuentes divisiones celulares. El acortamiento telomérico crítico provoca la senescencia celular, y únicamente las células con mutaciones tumorigénicas como en p53 pueden proceder con el ciclo de división celular. Finalmente, se pierde la protección de los telómeros, y comienza un proceso de recombinación homóloga de los telómeros que provoca la apoptosis celular. Las células que puedan reactivar la telomerasa o el mecanismo ALT progresan hacia su transformación maligna.

La actividad telomerasa en células somáticas se encuentra generalmente inhibida, y son únicamente las células germinales las que presentan actividad para esta enzima. Específicamente, los tejidos con alta capacidad proliferativa han mostrado mayores niveles de activación de la telomerasa, como es el caso de la piel, el tracto gastrointestinal, la médula ósea o los linfocitos activados (Revisión de Artandi y DePinho, 2010).

Sin embargo, hay una excepción a estos casos, que sucede en tejidos tumorales. Muchos estudios han mostrado en tumores la expresión aberrante y elevada de la subunidad catalítica de la telomerasa hTERT (Minafra et al., 2017), confiriendo a estas células la capacidad de regenerar el ADN telomérico. La relación que tiene la función telomérica con el pronóstico clínico de pacientes afectados de CCR ha sido investigada previamente por otros autores, y se ha visto que la sobreexpresión del ARNm de *hTERT* en el tumor incrementaba el riesgo de muerte hasta casi el doble que los pacientes con expresión inferior de este gen (Bertorelle et al., 2013).

En tumores colorrectales, la regulación de la longitud telomérica y de la actividad telomerasa depende de una amplia variedad de mutaciones o metilaciones de genes asociados a función telomérica. Las diferencias en la longitud telomérica que presentan los pólipos respecto al tejido sano alcanzan hasta las 4.6 kb, y estas diferencias no pueden ser únicamente atribuibles a diferencias en la proliferación, sino que probablemente el acortamiento telomérico preceda incluso a la formación del adenoma colorrectal (Roger et al., 2013).

En tumores CIN, algunos de los genes más frecuentemente mutados son *APC*, *TP53*, *SMAD2* y *SMAD4*, además de la activación aberrante de las proteínas *KRAS* y *BRAF*. Estos genes y proteínas reguladores de la proliferación y ciclo celular contribuyen en parte a altas tasas de replicación en lesiones preneoplásicas y al acortamiento telomérico. Además, se conoce que *TP53* es un inhibidor de *hTERT*, y la mutación del primero puede provocar la activación de la telomerasa (Li et al., 1999), contribuyendo al mantenimiento telomérico.

En tumores MSI, la pérdida de la funcionalidad normal del mecanismo de reparación de ADN por emparejamiento erróneo provoca la introducción de errores en las repeticiones teloméricas y el deslizamiento de la ADN polimerasa durante la replicación (Kroupa et al., 2019), lo que puede provocar que las células de estos tumores sufran recombinación cromosómica y superar así las crisis generadas por el acortamiento crítico de los telómeros. Los genes más comúnmente afectados en esta vía de reparación son *MSH2*, *MSH3*, *MSH6*, *MLH1*, *MLH3*, *PMS1* y *PMS2*.

Introducción

Finalmente, en tumores CIMP, es frecuente la inactivación de los genes citados anteriormente asociados al mecanismo de reparación de ADN por emparejamiento erróneo, y especialmente de *MLH1*. No se conoce aún con detalle la relación entre acortamiento telomérico y este tipo de tumores, pero se especula que la disfunción telomérica podría tener un enorme impacto en la generación de tumores similares a aquellos con inestabilidad cromosómica.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La desregulación de la expresión de microARNs es un proceso que se encuentra vinculado al mecanismo tumorigénico, dada la capacidad de estas moléculas para ejercer efectos pro-tumorales o anti-tumorales, dependiendo del contexto tisular y celular.

Además, la obesidad afecta al riesgo de desarrollo de diversas enfermedades, como es el caso del cáncer colorrectal, así como a pronósticos clínicos desfavorables, a través de la liberación de citoquinas, adipoquinas o microARNs que pueden realizar su función en otros tejidos a distancia. Concretamente, cabe destacar la alteración y disfunción de los tejidos adiposos que rodean la región visceral y que se encuentran íntimamente conectados a las regiones del colon y del recto.

Nuestra hipótesis es que la secreción de microARNs intracelulares podría representar una forma de comunicación intertisular, mediante su transporte a través del torrente sanguíneo, donde podrían ser detectados, posibilitando su uso como biomarcadores en el cáncer colorrectal. Además, podría tratarse de moléculas de utilidad para establecer el diferente pronóstico clínico en individuos obesos y no obesos que desarrollan cáncer colorrectal. Por otro lado, el estudio de la función telomérica en tejidos adiposos podría constituir un parámetro indicativo del estado funcional de estos tejidos, teniendo en cuenta el contexto altamente inflamatorio que afecta a los individuos con cáncer colorrectal y obesidad.

Considerando la hipótesis planteada, proponemos como objetivo general de esta Tesis:

- Analizar la expresión de una serie de microARNs relacionados con senescencia, obesidad y cáncer en pacientes afectados de cáncer colorrectal, considerando el Índice de Masa Corporal de los mismos y parámetros de función telomérica.

A partir del objetivo general, como objetivos específicos proponemos los siguientes:

Hipótesis y Objetivos

1. Determinar la posibilidad de emplear los microARNs objeto de estudio (34a-5p, 132-3p, 143-3p y 181a-5p) como biomarcadores séricos en cáncer colorrectal.
2. Analizar y correlacionar los niveles de los microARNs 34a-5p, 132-3p, 143-3p y 181a-5p en sueros, tejidos colorrectales y tejidos adiposos en pacientes afectados y no afectados de cáncer colorrectal.
3. Relacionar la expresión de los microARNs 34a-5p, 132-3p, 143-3p y 181a-5p con las variables clínico-patológicas y con el pronóstico clínico de pacientes afectados de cáncer colorrectal.
4. Investigar la relación entre obesidad y cáncer colorrectal, a través del estudio de la expresión de los microARNs 34a-5p, 132-3p, 143-3p y 181a-5p, así como de la función telomérica.
5. Evaluar la relación entre los niveles de expresión de los microARNs 34a-5p, 132-3p, 143-3p y 181a-5p en tejidos adiposos omentales y subcutáneos con los parámetros de función telomérica, en individuos con y sin cáncer colorrectal, obesos y no obesos.
6. Valorar el impacto del IMC y de los parámetros de función telomérica en el pronóstico clínico de pacientes afectados de cáncer colorrectal.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. PACIENTES Y MUESTRAS.

Para la elaboración de este trabajo, se dispuso de muestras tisulares obtenidas a partir de un total de 94 pacientes afectados de Cáncer Colorrectal (CCR). Dichas muestras fueron suministradas por el Biobanco del Hospital Clínico San Carlos de Madrid, en el caso de los tejidos colorrectales, o bien obtenidas a partir de la colección de muestras C.0001253 del mismo Hospital, en el caso de los tejidos adiposos. También se dispuso de muestras de suero. Los pacientes incluidos en los protocolos habían sido sometidos a cirugía de intención curativa en el Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo del Hospital Clínico San Carlos de Madrid. El período de seguimiento para estos sujetos fue de hasta 60 meses tras la cirugía. Los detalles de inclusión y exclusión para análisis posteriores se detallan a continuación (Figura 12).

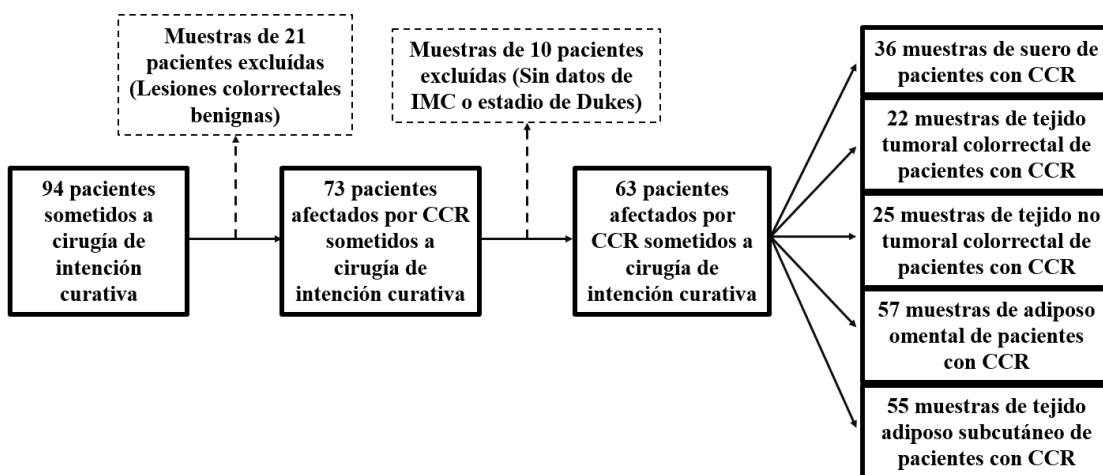


Figura 12. Diagrama de flujo con los datos del número de pacientes sometidos a cirugía por cáncer colorrectal (CCR) incluidos en esta Tesis; de los excluidos debido a no disponer de las variables clínicas, y número de muestras disponibles de suero, de tejidos colorrectales tumorales, de tejidos colorrectales no tumorales, y de tejidos adiposos omentales y subcutáneos. IMC = Índice de Masa Corporal.

Además, se incorporaron a este trabajo 53 pacientes sometidos a cirugía bariátrica, que fueron considerados como grupo control en nuestro estudio (Figura 13).

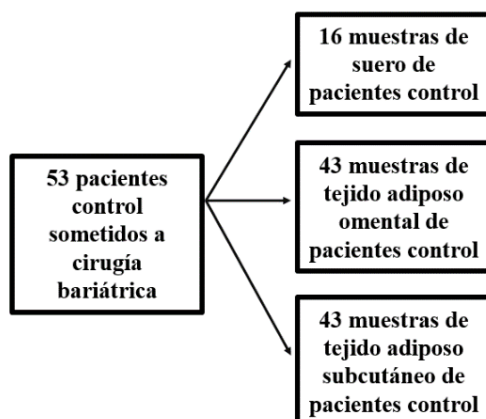


Figura 13. Diagrama de flujo con los datos del número de pacientes control sometidos a cirugía bariátrica incluidos en esta Tesis, y número de muestras de sueros, y tejidos adiposos omentales y subcutáneos del mencionado grupo control.

Previo consentimiento informado de los pacientes para llevar a cabo los experimentos incluidos en esta Tesis, se ha dispuesto de: sueros, tejidos colorrectales tumorales, tejidos colorrectales no tumorales con corroboración microscópica de ausencia de células tumorales, así como tejidos adiposos omentales (TAO) y subcutáneos (TAS).

Los pacientes se clasificaron en función de su Índice de Masa Corporal (IMC), de acuerdo con los criterios establecidos por la Organización Mundial de la Salud:

1. $IMC < 25 \text{ kg/m}^2$ se considera normopeso.
2. $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$ y $\leq 29.9 \text{ kg/m}^2$ se considera sobrepeso.
3. $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ se considera obesidad.

Las muestras de tejidos tumorales se conservaron en bloques de medio congelante *Tissue Tek* (Sakura Europe, Alphen aan den Rijn, Países Bajos), y se almacenaron a -80°C hasta su uso. Se realizaron cortes de 5 micras en criostato Leica CM 1510 S, que fueron fijados en portaobjetos para su análisis por un anatomopatólogo del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico San Carlos. El análisis se realizó mediante observación microscópica de las

muestras en tinción de hematoxilina-eosina. Se incluyeron en este trabajo únicamente aquellas muestras en las que se demostró, al menos, un 80% de tejido tumoral y menos del 10% de necrosis. Fueron excluidos de estudios posteriores los casos en los que el ADN o el ARN estaban degradados.

Los adenocarcinomas colorrectales se categorizaron dependiendo de su estadio clínico-patológico, según la clasificación publicada por Turnbull y cols. en 1967 (Tabla 1), modificación de la original realizada por Dukes. Las características de los estadios se describen a continuación:

ESTADIO	CARACTERÍSTICAS
ESTADIO A	Tumor confinado al colon y a sus paredes.
ESTADIO B	Extensión del tumor a la grasa periférica.
ESTADIO C	Metástasis tumorales a hígado, pulmón, hueso, diseminación del tumor.
ESTADIO D	Metástasis tumorales a hígado, pulmón, hueso, diseminación del tumor. No operable debido a la invasión parietal; invasión a los órganos adyacentes.

Tabla 1. Clasificación de Dukes revisada por Turnbull y cols. en 1967 para tumores colorrectales.

También se clasificaron estos tumores dependiendo de su localización anatómica en tumores de colon derecho, de colon izquierdo o de recto.

Adicionalmente se tuvo acceso a la información relativa a los descriptores T, N y M, del sistema de clasificación TNM (Tabla 2). Los descriptores hacen referencia a distintas características de los tumores:

Descriptor T: Se refiere al grado de invasión de tejidos vecinos locales por el tumor.

Descriptor N: Se refiere al grado de invasión ganglionar.

Descriptor M: Refiere a la existencia o no de metástasis a distancia del tumor primario.

DEFINICIÓN	
Tx	El tumor primario no puede ser evaluado.
T0	No hay evidencia de tumor primario.
Tis	Carcinoma in situ, carcinoma intramucosal.
T1	El tumor invade la submucosa.
T2	El tumor invade la muscularis propia.
T3	El tumor invade los tejidos pericorreciales a través de la muscularis propia.
T4a	El tumor invade a través del peritoneo visceral.
T4b	El tumor invade directamente o se adhiere a órganos y estructuras adyacentes.
Nx	Los nodos linfáticos regionales no pueden ser evaluados.
N0	Sin metástasis en nodos linfáticos regionales.
N1a	Un nodo linfático regional es positivo.
N1b	Dos o tres nodos linfáticos regionales son positivos.
N1c	No hay nodos linfáticos afectados, pero hay depósitos tumorales en la subserosa, mesentería o pericólicas no peritonealizadas, o pericorreciales/mesocorreciales.
N2a	De cuatro a seis nodos linfáticos regionales son positivos.
N2b	Siete o más nodos linfáticos regionales son positivos.
M0	No hay evidencia de metástasis a distancia.
M1a	Metástasis en un lugar u órgano es identificado sin metástasis peritoneal.
M1b	Metástasis a dos o más lugares u órganos son identificado sin metástasis peritoneal.

Tabla 2. Definición de los descriptores TNM y sus categorías. Fuente: <https://www.cancer.gov/types/colorectal/hp/colon-treatment-pdq>

En la Tabla 3 se recogen las variables clínico-patológicas del total de casos de pacientes afectados por cáncer colorrectal incluidos en la Tesis, y de los que se tuvo acceso al menos a uno de las siguientes muestras: suero, tejidos colorrectales tumoral y no tumoral, TAO y TAS.

VARIABLE		NÚMERO DE CASOS
SEXO		63
	Mujer	27
	Hombre	36
ESTADIO		63
	A	12
	B	26
	C	16
	D	9
LOCALIZACIÓN		63
	Colon derecho	17
	Colon izquierdo	23
	Recto	23
DESCRIPTOR T		63
	T1	5
	T2	13
	T3	28
	T4	17
DESCRIPTOR N		63
	N0	40
	N1	15
	N2	8
DESCRIPTOR M		63
	M0	57
	M1	6

Tabla 3. Clasificación de casos totales en función de las variables clínico-patológicas.

De este grupo de 63 casos de pacientes con CCR, se tuvo acceso a muestras tisulares colorrectales tumorales de un total 22 de ellos. Las variables clínico-patológicas de estos casos se recogen en la Tabla 4:

VARIABLE	NÚMERO DE CASOS
SEXO	22
Mujer	9
Hombre	13
ESTADIO	22
A	1
B	8
C	7
D	6
LOCALIZACIÓN	22
Colon derecho	15
Colon izquierdo	6
Recto	1
ÍNDICE DE MASA CORPORAL	22
Normopeso	6
Sobrepeso	9
Obeso	7
DESCRIPTOR T	22
T1	0
T2	1
T3	13
T4	8
DESCRIPTOR N	22
N0	11
N1	7
N2	4
DESCRIPTOR M	22
M0	19
M1	3

Tabla 4. Características clínico-patológicas de los casos con tejido colorrectal tumoral analizados en esta Tesis.

Para los estudios de microARNs en suero, se dispuso de un total de 36 muestras de suero de pacientes con CCR, y de 16 muestras de suero de pacientes control (Tabla 5). Dado que un objetivo de este trabajo se centra en el estudio de la relación entre la obesidad y el CCR, se intentó incluir muestras pertenecientes a todos los grupos de IMC. Sin embargo, en el grupo control únicamente se tuvo acceso a muestras obtenidas a partir de individuos con obesidad.

ÍNDICE DE MASA CORPORAL	MUESTRAS DE SUERO	
	CASOS DE CCR	CASOS CONTROL, SIN CCR
	36	16
Normopeso	9	
Sobrepeso	15	
Obeso	12	16

Tabla 5. Resumen de los grupos de IMC de los pacientes con muestras de suero disponibles.

Los casos con los sujetos de los que se analizaron los tejidos adiposos se clasificaron también atendiendo al IMC (Tabla 6):

ÍNDICE DE MASA CORPORAL	MUESTRAS DE TEJIDOS ADIPOSOS	
	CASOS DE CCR	CASOS CONTROL, SIN CCR
	57	48
Normopeso	16	
Sobrepeso	21	19
Obeso	20	29

Tabla 6. Resumen de los grupos de IMC de pacientes con muestras de tejidos adiposos omentales y subcutáneos analizadas. IMC = Índice de Masa Corporal.

En el caso de los estudios de expresión de microARNs y función telomérica en tejidos adiposos, los diagramas de flujo presentados en las Figuras 14 y 15 recogen el número de casos incluidos en los distintos protocolos.

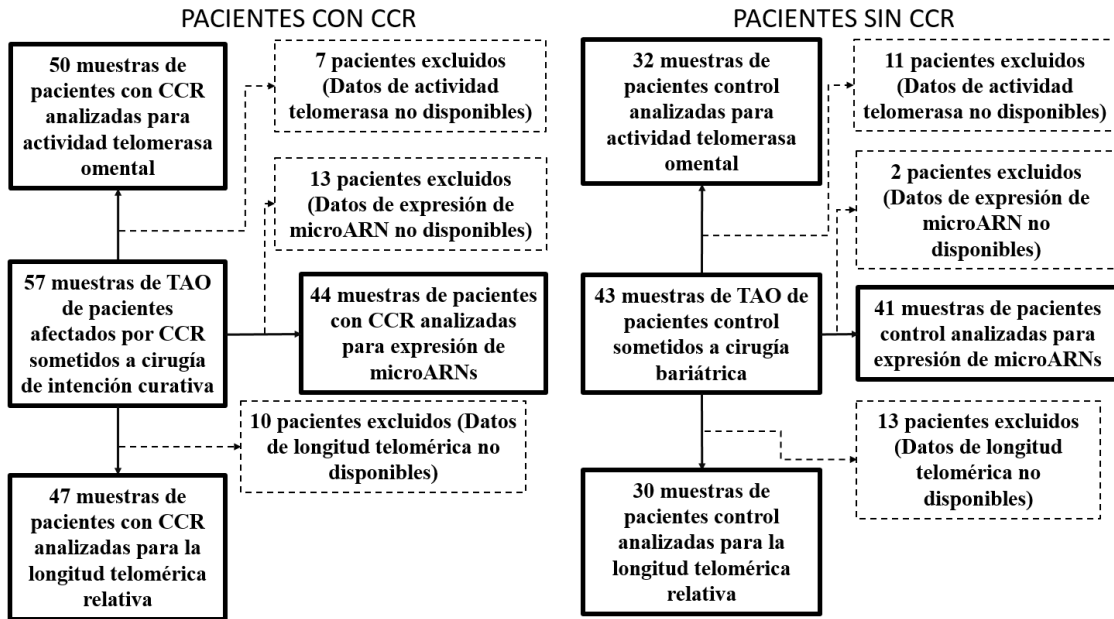


Figura 14. Diagrama de flujo para las muestras de TAO en pacientes con y sin CCR, incluidas en los diferentes análisis realizados. TAO = Tejido adiposo omental. CCR = Cáncer colorrectal.

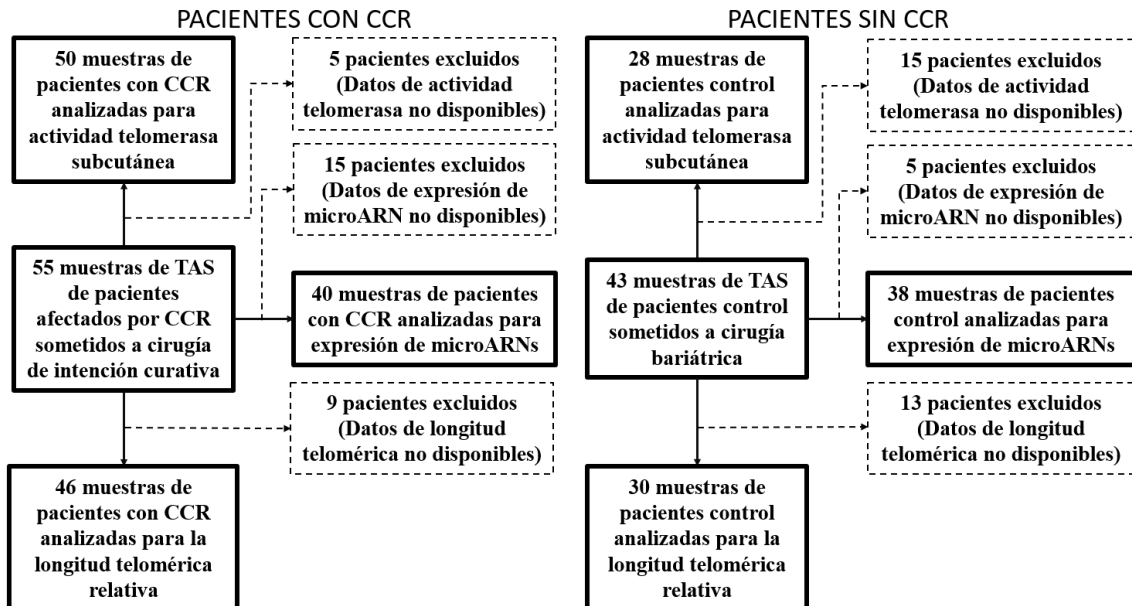


Figura 15. Diagrama de flujo para las muestras de TAS en pacientes con y sin CCR, incluidas en los diferentes análisis realizados. TAS = Tejido adiposo subcutáneo. CCR = Cáncer colorrectal.

2. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ADN.

La extracción del ADN genómico de las muestras de pacientes con CCR se realizó utilizando el procedimiento de Blin y Stafford (1976). Las muestras embebidas en *Tissue Tek*® (Sakura Europe, Alphen aan den Rijn, Países Bajos) fueron cortadas con cuchillas estériles en criostato en secciones de 20 micras. Se emplearon 15 de estos cortes para la extracción de ADN, de los que se eliminó parte del *Tissue Tek* mediante centrifugación durante 10 minutos a 10.000 rpm y a 4°C, retirando el medio sobrenadante sin arrastrar la muestra. Para los tejidos adiposos, se emplearon de 20 mg a 40 mg de tejido cortado con cuchilla estéril; estos tejidos se habían conservado congelados en una solución de *RNAlater* (Life Technologies, Carlsbad, California).

Se prepararon tubos eppendorf de 2 ml con 1.25 ml de solución Tampón 1 (Tabla 7), a los que se añadieron los tejidos. Posteriormente, se homogeneizaron mecánicamente con ayuda de un homogenizador *IKA*® *T10 Basic ULTRA-TURRAX*® (IKA, Staufen, Alemania), cuyo vástago se mantuvo sumergido previamente en una solución de NaOH 4 N al menos 4 horas, lavándolo posteriormente con agua ultrapura estéril. Se añadieron después 50 µl de proteinasa K (500 µg/ml; Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos), se mezcló por inversión y se añadieron 62.5 µl de SDS al 20%, que se volvieron a mezclar por inversión. Las muestras se transfirieron seguidamente a tubos falcon de 15 ml, llevando a cabo una digestión a 65°C en baño de agua durante 3 horas. Una vez finalizada la digestión, se añadieron a cada tubo un volumen de solución de fenol a pH 8 y 1.25 ml de la solución Tampón 2 (Tabla 7). Se agitaron los tubos y se realizó una centrifugación a 4.000 rpm durante 15 minutos. Una vez finalizada, se transfirió la fase superior acuosa, en cada caso, a un tubo falcon de 15 ml, al que se añadió un volumen de la mezcla cloroformo-alcohol isoamílico 24:1. Se volvieron a mezclar los tubos por agitación y se centrifugaron 5 minutos a 4.000 rpm, tras lo que se transfirieron las fases acuosas a tubos falcon de 15 ml, añadiendo a continuación 2 volúmenes de etanol absoluto y dejando las muestras a -20°C hasta el día siguiente para conseguir la precipitación de los ácidos nucleicos.

Al día siguiente, se centrifugaron los tubos a 4.000 rpm durante 15 minutos a 4°C, tras lo cual se retiró el sobrenadante por decantación y se añadió a cada

tubo 2 ml de etanol al 70% frío. Una vez lavado el *pellet* precipitado, se volvió a centrifugar a 4.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. De nuevo se retiró el sobrenadante por decantación y se secaron en campana durante, aproximadamente, 15 minutos. Seguidamente, se resuspendió el *pellet* en 30 µl de agua ultrapura estéril y se procedió a la cuantificación del ADN por espectrofotometría en *NanoDrop*.

SOLUCIÓN DE EXTRACCIÓN DEL ADN	COMPOSICIÓN
Solución Tampón 1	Tris HCl 10 mM, pH 7.5; EDTA 10 mM; NaCl 0.15 M
Solución Tampón 2	Tris HCl 10 mM, pH 7.5; EDTA 10 mM; NaCl 0.65 M

Tabla 7. Composición química de las soluciones Tampón 1 y Tampón 2, utilizadas en el protocolo de extracción de ADN.

La valoración de ADN por espectrofotometría en *NanoDrop*® 2000 (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts) se basa en la capacidad que tiene el ADN de doble cadena de absorber luz ultravioleta a 260 nm. Está descrito que una unidad de densidad óptica a esa longitud de onda corresponde a una concentración de 50 µg/ml (Sambrook et al. 1989). Se empleó como blanco agua ultrapura estéril, y se midieron 1.5 µl de cada muestra problema. Además, se puede conocer la pureza relativa del ADN extraído al determinar las absorbancias de las muestras a las longitudes de onda de 230 nm y 280 nm y compararlas con la de 260 nm. Un ratio A260/A230 inferior a 1.8 indicaría la presencia de contaminantes como sales caotrópicas o fenoles, pudiendo comprometer aquellas técnicas empleadas más adelante si este ratio es inferior a 1.5. El ratio A260/A280 nos revela la presencia de proteínas, si el ratio es inferior a 1.6, o una elevada concentración de ARN si el ratio es superior a 2.1, pudiendo en ambos casos dificultar la utilización de este ADN posteriormente. Las muestras empleadas en este trabajo han tenido en cuenta estos criterios y se encuentran todas en los rangos deseables.

Una vez realizada la cuantificación del ADN, se procedió a la valoración de su integridad mediante su observación tras electroforesis en gel de agarosa 1.2% en tampón TBE 1X (Composición TBE 10X: Tris 1 M, ácido bórico 0.9 M y EDTA 0.01 M), a 80V durante 50 minutos. Al observar el gel bajo radiación

ultravioleta, se comprobó que no hubiera degradación en forma de *smearing* en el gel para determinar que la mayoría del ADN extraído tenía una calidad aceptable para las técnicas que se iban a utilizar. Las muestras de ADN se almacenaron a -20°C hasta su uso.

3. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MICROARNs.

Para la extracción de microARNs a partir de tejidos y sueros se utilizó el kit de extracción *miRNeasy mini kit* de Qiagen, siguiendo el manual del proveedor con mínimas modificaciones.

3.1. Extracción y cuantificación de microARNs a partir de suero.

Como paso previo para la extracción en sueros, se preparó una mezcla que contenía, por muestra, 800 μ l de *Qiazol*, 1.25 μ l (0.8 μ g/ μ l) de MS2 y 1 μ l de *Exiqon RNA Spike in mix* (UniSp2, UniSp4, UniSp5. Ref 203203).

Una vez listas las muestras de sueros, se pipetearon 250 μ l de muestra a un tubo eppendorf de 1.5 ml, y se centrifugaron durante 5 minutos a 4.000 rpm y 4°C. De este tubo se transfirieron 200 μ l de suero sobrenadante a un tubo *Phase Lock Gel Heavy* y se añadieron 750 μ l de la mezcla con *Qiazol* antes preparada, que se mezcló por vórtex. Tras 5 minutos de incubación, se añadieron 200 μ l de cloroformo a cada tubo y se dejó reposar durante 2 minutos. Inmediatamente se centrifugaron los tubos a 12.000 rpm durante 15 minutos a 4°C, y se transfirió la fase superior acuosa a un tubo nuevo de 2 ml al que se añadieron 1.5 volúmenes de etanol al 100%. Una vez realizada la mezcla, se transfirieron 700 μ l de muestra en etanol a las columnas del kit, que se centrifugaron durante 15 segundos a 10.000 rpm, tras lo que se descartó la elución y se repitió el proceso con el resto de la muestra sobrante. Después se añadieron 700 μ l del *Buffer RWT* a cada columna y se centrifugó durante 15 segundos a 8.000 rpm, descartando de nuevo la elución. Posteriormente, se pipetearon 500 μ l de *Buffer RPE* a cada columna, tras lo cual se centrifugó durante 15 segundos a 10.000 rpm. Este paso se repitió dos veces adicionales pero centrifugando durante 2 minutos hasta que la membrana quedó seca, desechando el tubo colector y, seguidamente, se realizó otra centrifugación durante 1 minuto a 10.000 rpm. La elución se llevó a cabo con 50 μ l de agua libre de ARNasas que se pipetearon directamente en la membrana, esperando 1 minuto antes de centrifugar las columnas a 8.000 rpm durante 1 minuto.

3.2. Extracción y cuantificación de microARNs a partir de tejidos.

En el caso de las muestras embebidas en *Tissue Tek*, se realizó un paso previo de centrifugación de 10 minutos a 8000 rpm y 4°C, desechando el *Tissue Tek*.

Se transfirieron unos 20-40 mg de tejido, o 10 cortes de 20 µm, a un tubo eppendorf de 2 ml con 700 µl de *Qiazol*. En este tubo se realiza la homogeneización con *Ultra-Turrax*, tratando previamente el vástago durante al menos 4 horas en una solución de NaOH 4 N, y limpiando con agua ultra pura estéril. Las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 12.000 rpm a 4°C, tras lo cual se transfirió el sobrenadante a un tubo *Phase Lock Heavy* de 1.5 ml y se les añadió 140 µl de cloroformo, que se mezcló por agitación durante 15 segundos y se dejó en reposo 3 minutos. A partir de este punto, la extracción continuó de manera similar a la descrita en suero.

La cuantificación de los microARNs totales en tejidos se realizó mediante espectrofotometría en *NanoDrop®2000*, obteniendo los valores de absorbancia de las muestras a 260 nm para determinar su concentración, así como a 280 nm para detectar posibles contaminaciones de la muestra. Como blanco se empleó agua libre de ARNasas, y sólo se consideraron como muestras válidas aquellas cuya concentración de microARNs fue superior a 15 ng/µl, con un ratio $A_{260}/A_{280} > 1.8$, considerando así que las muestras tienen la pureza suficiente. En el caso de la cuantificación de microARNs en suero, está descrito que no hay un método fiable para su cuantificación absoluta, por lo que los protocolos utilizan aproximaciones para que las concentraciones empleadas entren en el rango de las técnicas empleadas.

4. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.

Para la extracción de proteínas, a los tubos con muestras de tejidos embebidos en *Tissue Tek* y que contenían 10 cortes de 20 µm se aplicó un paso previo de eliminación de dicho medio, que se llevó a cabo mediante centrifugación durante 10 minutos a 10.000 rpm y 4°C, tras lo cual se descartó el *Tissue Tek*.

Para empezar la extracción, se prepararon tubos eppendorf de 2 ml a los que se pipetearon 400 µl del reactivo de lisis incluido en el kit *TeloTTAGGG Telomerase PCR ELISA*® (Roche, Basilea, Suiza). Se añadieron a estos tubos, bien los 10 cortes de 20 µm procesados, o bien de 20 a 40 mg de tejido fresco congelado o en *RNAlater*. En estos tubos se realizó la homogeneización mecánica utilizando *IKA*® *T10 Basic ULTRA-TURRAX*® (IKA, Staufen, Alemania), habiendo tratado el vástago durante, al menos, 4 horas en una solución de NaOH 4 N. Una vez finalizada la homogeneización, se dejan los tubos en hielo durante media hora, tras lo cual se centrifugan los tubos durante 20 minutos a 12.000 rpm y a 4°C. A continuación, se transfieren los sobrenadantes a tubos nuevos en hielo, y se procede inmediatamente a la cuantificación de proteínas. La cuantificación de proteínas se realizó mediante valoración espectrofotométrica a 280 nm en *Nanodrop* o mediante valoración por el método de Bradford. Una vez realizada la valoración de la concentración de proteínas, las muestras se conservaron a -80°C en congelador hasta su uso posterior.

La valoración por espectrofotometría a 280 nm se basa en la capacidad que tienen determinados aminoácidos aromáticos de las proteínas (principalmente tirosina y triptófano, pero también cisteínas unidas mediante puentes disulfuro) de absorber a esa longitud de onda. Las valoraciones se realizaron en *NanoDrop*®2000, utilizando como blanco el reactivo de lisis empleado durante la extracción, y se midieron 1.5 µl de cada muestra. La ventaja de este método es la rapidez en la valoración de proteínas y la poca cantidad de muestra utilizada con respecto a otras técnicas más convencionales como la de Bradford.

En la valoración de proteínas por el método de Bradford (1976), se considera el cambio de absorbancia de las muestras de 465 nm a 595 nm cuando

las proteínas entran en contacto con una solución ácida de Coomassie Brilliant Blue G-250, que provoca la estabilización del reactivo indicador y su cambio de color a través de interacciones hidrofóbicas e iónicas con los aminoácidos básicos de las proteínas de la muestra.

Para la aplicación de este procedimiento, se añadieron a una cubeta espectrofotométrica 200 μ l del reactivo comercial *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad, Hércules, California, Estados Unidos) y 800 μ l de agua ultrapura estéril, a los que posteriormente se añadieron 4 μ l de muestra del extracto proteico, que se mezclaron por inversión. Como blanco, se emplearon 200 μ l del reactivo, 800 μ l de agua ultrapura estéril y 4 μ l de reactivo de lisis sin muestra. La valoración de las proteínas en las muestras se hizo por duplicado mediante la interpolación de los valores de absorbancia en una curva de calibrado, preparada a partir de una solución estándar de albúmina sérica bovina (BSA), a concentración 2 mg/ml (Bio-Rad), con diluciones de 0 mg/ml a 10 mg/ml.

5. DETERMINACIÓN DE LA LONGITUD TELOMÉRICA.

5.1. Determinación de la longitud telomérica absoluta mediante el análisis por Southern Blot de los fragmentos teloméricos de restricción (TRF).

Para la determinación de la longitud telomérica absoluta de los telómeros en kilobases, se empleó el kit *TeloTAGGG*® *Telomere Length Assay* (Roche, Basilea, Suiza). Para ello, el ADN genómico fue digerido mediante el uso de enzimas de restricción, que cortan este ADN en las regiones no teloméricas, y permite la separación de los fragmentos de ADN teloméricos por electroforesis en geles de agarosa (Figura 16). Tras esta separación, se transfirieron las muestras desde el gel a una membrana de nylon mediante la técnica de *Southern Blot*. Una vez en la membrana, se realizó una hibridación con sondas específicas que tienen como diana las repeticiones de la secuencia del telómero. Las sondas, que se encuentran marcadas con digoxigenina, se incubaron con un anticuerpo anti-digoxigenina que se encuentra unido a una fosfatasa alcalina (anti-DIG-AP). Para la observación final de los fragmentos teloméricos, se empleó el sustrato *CDP-Star*, lo que provoca la emisión de una señal quimioluminiscente por la fosfatasa alcalina hasta el momento en que metaboliza todo el sustrato (Figura 16). Esta señal puede marcar una película autorradiográfica y ser registrada posteriormente en el programa informático *Quantity one*® (Bio-Rad), para finalmente ser analizada y obtener la longitud telomérica media de cada muestra en el programa *Image gauge 3.46*® (Fujifilm, Tokyo, Japon).

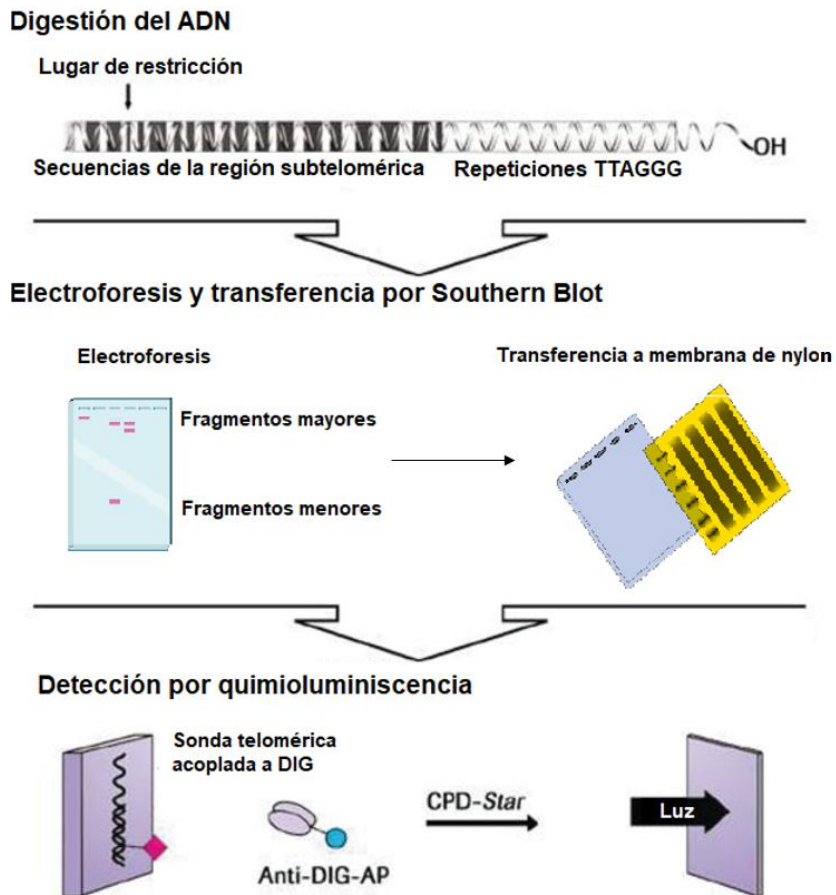


Figura 16: Esquema del ensayo de determinación de longitud telomérica por Southern Blot de los Fragmentos teloméricos de restricción (TRF). Fuente: Manual del kit TeloTAGGG® Telomere Length Assay.

Para la aplicación de este protocolo, se siguieron las instrucciones incluidas en el propio kit *TeloTAGGG® Telomere Length Assay*. Para cada muestra de tejido colorrectal a analizar, se emplearon 2.5 µg de ADN genómico. Para la digestión enzimática, se preparó tampón de digestión 1X, al que se añadieron las enzimas Hinf I y RsaI a 20 U/µl en un volumen de reacción final de 20 µl. Tras la digestión, se detuvo la reacción mediante la incorporación de 4 µl de tampón de carga en las muestras, y se procedió a la electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en tampón TAE 1X (diluido a partir de tampón TAE 50X: Tris 2 M, 57.1 ml de ácido acético glacial, pH 8 y EDTA 50 mM). Se empleó como marcador de peso molecular una mezcla de 3 µl del marcador incluido en el kit, 2 µl de tampón de carga y 5 µl de agua ultrapura estéril. Una vez cargadas las muestras, se realizó la electroforesis durante 4 horas a 83 V.

Finalizada la electroforesis, se llevó a cabo un tratamiento al gel de agarosa durante 10 minutos en una solución de HCL 0.25 M, tras lo que se lavó dos veces con agua destilada y se introdujo en solución de desnaturalización (NaCl 1.5 M, NaOH 0.5M), durante 15 minutos, dos veces seguidas con agitación orbital suave. Tras ello, se realizaron dos lavados en agua destilada del gel, y se procedió a la neutralización introduciendo la membrana en una solución neutralizadora (0.5 M tris-HCl, 3 M NaCl, pH 7.5) durante 15 minutos, en agitación suave.

Para la transferencia del gel a la membrana de nylon, se necesita activar previamente la membrana. Este procedimiento se realizó durante 7 minutos en agua ultrapura estéril. La transferencia se hizo por capilaridad en tampón de transferencia SSC 20X (NaCl 3 M, citrato sódico 0.3 M, pH 7) durante la noche, y posteriormente se procedió a la fijación del ADN a la membrana de nylon mediante la exposición a radiación ultravioleta de 254 nm durante 7 minutos, seguido de un tratamiento de calor a 80°C durante 30 minutos. Una vez fijada la muestra a la membrana, se realizó un lavado en SSC 2X y se introdujo en un cilindro de hibridación, al que se añadieron 18 ml de solución de prehibridación (solución reconstituida de *DIG Easy Hyb Granules*, incluidos en el kit) previamente calentada a 42°C, manteniendo en rotación a 42°C durante 60 minutos. Finalizada la prehibridación, se retiró la solución del cilindro y se añadieron 10 ml de solución de hibridación, que contiene 2 µl de sonda marcada con digoxigenina, y se mantuvo el cilindro durante 3 horas en rotación a 42°C. Tras ese periodo, se retiró la membrana y se lavó dos veces durante 5 minutos en la solución astringente de lavado I (*Stringent Washing Buffer I*: SSC 2X, SDS 0.1%) a temperatura ambiente, seguido de dos lavados de 15 minutos en la solución astringente de lavado II (*Stringent Washing Buffer II*: SSC 0.2X, SDS 0.1%) a 50°C, y con un último lavado en tampón (*Washing Buffer*), durante 4 minutos a temperatura ambiente.

Seguidamente, se procedió al bloqueo de la membrana mediante un tratamiento con 70 ml de solución de bloqueo 1X durante 30 minutos, tras lo cual se añadieron 7 µl a 75 mU/ml del anticuerpo anti-digoxigenina unido a la fosfatasa alcalina (Anti-DIG-AP) y se dejó incubando durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se lavó la membrana dos veces durante 15 minutos en

Washing Buffer 1X y, una vez limpia, se incubó en 100 ml de *Detection Buffer* 1X del propio kit durante 5 minutos en agitación suave, que se retiró tras la incubación.

Para revelar la membrana, se preparó primero una mezcla de 11.2 ml de agua ultrapura estéril, 1.25 ml de *Detection Buffer* 10X y 5 ml de reactivo de revelado. La mezcla de revelado se usó durante 15 segundos sobre la membrana, que al ser colocada sobre una película autorradiográfica (*Amersham Hyperfilm*® MP. GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) nos permitió conservar la imagen de la película y guardarla con el programa informático *Quantity one*® (Bio-Rad).

Para obtener la longitud telomérica media de cada muestra, la imagen guardada se analizó en el programa *Image gauge 3.46*® (Fujifilm, Tokyo, Japon). Dado que cada muestra presenta un patrón de telómeros con distintos tamaños moleculares y con distintas densidades ópticas, el cálculo de la longitud telomérica media se hizo obteniendo los valores de densidades ópticas a distancias regulares, y referenciándolo a dicha distancia, dado que los fragmentos teloméricos de mayor tamaño tienen mayor señal que los de menor tamaño. Se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{Longitud telomérica media} = \sum (\text{DO}_i \times \text{Li}) / \sum (\text{DO}_i)$$

En dicha fórmula, DO_i hace referencia a la Densidad Óptica en cada posición i , y Li hace referencia a la longitud del patrón molecular en kilobases en cada posición i .

5.2. Determinación de la longitud telomérica relativa mediante el análisis por qRT-PCR del ADN genómico.

La determinación de la longitud telomérica relativa se basa en las diferencias de emisión de fluorescencia durante la amplificación por PCR (Figura 17) de los fragmentos teloméricos y su comparación con respecto a un control o muestra (Cawthon, 2002). La comparación de esta señal permite obtener un ratio relativo de longitud telomérica denominado ratio T/S, llamado así por el número de copias o repeticiones de telómero en la muestra (T) con respecto al gen endógeno de referencia o *housekeeping* (S). Posteriormente, el ratio T/S de cada

muestra es referido o comparado respecto a una muestra control o *pool* de muestras. Se empleó como gen de referencia endógeno *RPLP0* (*Ribosomal Protein Large P0*), que codifica para la subunidad grande 60S del ribosoma eucariota.

Los *primers* de ADN empleados en este trabajo se detallan en la Tabla 8 a continuación:

PRIMER	SECUENCIA
Telómero foward:	5' - CGGTTTGGTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTT - 3'
Telómero reverse:	5' - GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT - 3'
RPLP0 foward:	5' - CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC - 3'
RPLP0 reverse:	5' - CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA - 3'

Tabla 8. Secuencias de los primers empleados durante la qRT-PCR para el cálculo de longitudes teloméricas.

Para la detección de la amplificación del ADN, se empleó el reactivo comercial *SYBR Green*® (Roche, Alemania), que al intercalarse en la doble cadena de ADN, emite una señal fluorescente que pudo ser medida en un termociclador *7900HT Fast Real-Time PCR System* (Life Technologies, EEUU). Como muestra control, se preparó un *pool* de muestras de tejido colorrectal no tumoral cuya longitud tumoral absoluta se encontraba en torno a las 7kb, siendo determinados previamente por la técnica TRF descrita en el apartado anterior.

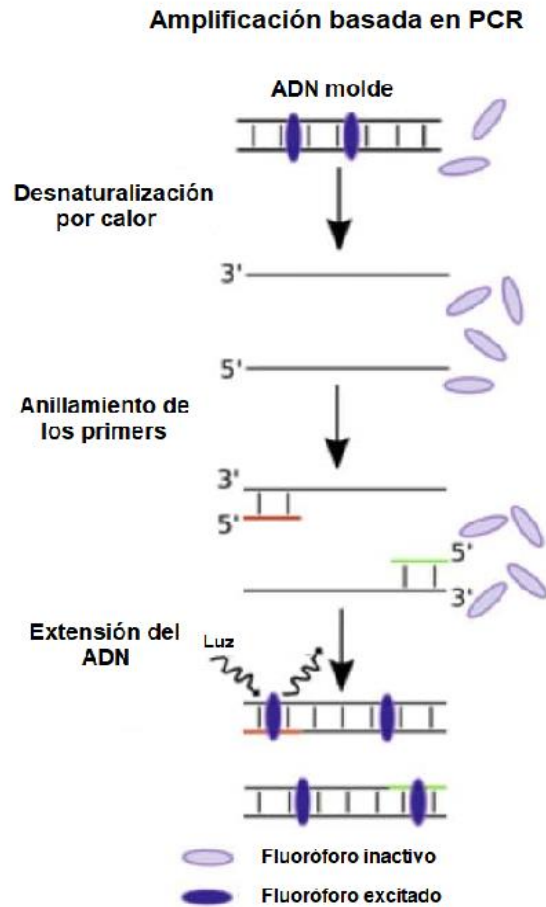


Figura 17. Esquema representativo de la amplificación del ADN mediante PCR.
 Fuente: <https://bitesizebio.com/29508/real-time-pcr-digest/>

En primer lugar, la amplificación de secuencias teloméricas se realizó siempre por triplicado. Se preparó, para cada triplicado, una mezcla en la que se pipetearon 20 ng de ADN de la muestra, 0.06 μ l del *primer* de telómeros *foward* (900 nM), y 0.18 μ l del *primer* de telómeros *reverse* (300nM). Para la amplificación de *RPLP0*, para cada triplicado se preparó una mezcla de 20 ng de ADN de la muestra, 0.06 μ l del *primer* de *RPLP0 foward* (500 nM), y 0.1 μ l del *primer* de *RPLP0 reverse* (300 nM).

A continuación, se pipetearon a cada tubo 10 μ l de la mezcla de reacción *FastStar Universal SYBR Green Master (ROX) 2X* (Roche, Alemania), y después se completó hasta un volumen de reacción de 20 μ l con agua ultrapura estéril. Se procedió entonces a la amplificación de las secuencias teloméricas (Tabla 9)

y del gen de referencia *RPLP0* (Tabla 10) de las muestras en un termociclador en el que se aplicaron los siguientes programas de amplificación:

FASE	TIEMPO	TEMPERATURA (°C)	Nº DE CICLOS
Desnaturalización	10 minutos	95 °C	1
Amplificación			
Desnaturalización	15 segundos	95 °C	25
Hibridación	30 segundos	52 °C	
Elongación	2 minutos	72 °C	

Tabla 9. Programa de termociclador empleado para la amplificación de las secuencias teloméricas.

FASE	TIEMPO	TEMPERATURA (°C)	Nº DE CICLOS
Desnaturalización	10 minutos	95 °C	1
Amplificación			
Desnaturalización	15 segundos	95 °C	25
Hibridación	30 segundos	60 °C	
Elongación	2 minutos	72 °C	

*Tabla 10. Programa de termociclador empleado para la amplificación de la secuencia de *RPLP0*.*

Durante estas amplificaciones, el termociclador mide en cada ciclo la fluorescencia emitida por cada muestra, que va incrementando a medida que se sintetiza ADN de doble cadena, y que en condiciones óptimas debe duplicarse con cada ciclo. Una vez el termociclador detecta una variación significativa de la fluorescencia que supere un umbral o *threshold*, se obtiene un valor para cada muestra llamado *Cycle threshold* (Ct) que corresponde al ciclo en el que la muestra ha alcanzado ese umbral de detección (Figura 18).

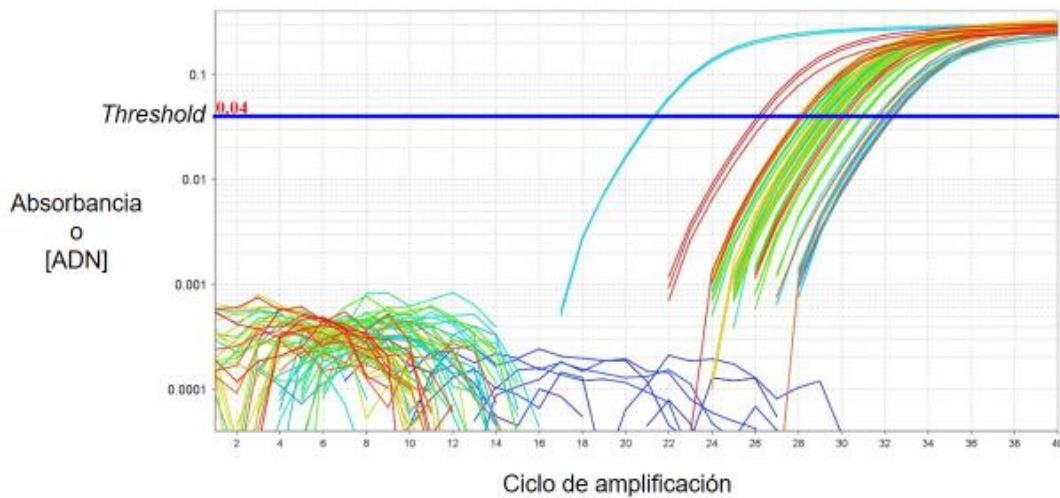


Figura 18. Representación del tipo de gráfica obtenida mediante qRT-PCR, mostrando la línea de threshold y los puntos donde se toma el Cycle threshold (Ct).

El valor de Ct en cada caso se utilizó para calcular los ratios T/S según está descrito por Pfaffl (2001). Uno de los requisitos para considerar que la técnica ha funcionado adecuadamente es que, tal como ya se ha dicho, cada ciclo duplique la secuencia diana con respecto al ciclo anterior, es decir, que la eficiencia sea del 100%. Para calcular la eficiencia de las qRT-PCR, se hizo el cálculo tanto en el caso de telómeros como de *RPLP0*, mediante la inclusión de una curva estándar preparada a partir de un *pool* control, constituido por muestras colorrectales no tumorales, diluida en proporción 1/5 hasta 4 veces, siendo el último punto de la curva una dilución final 1:625. Finalmente, se obtuvo el valor de la eficiencia para cada placa de amplificación obteniendo la pendiente de la curva estándar, observando su Ct con respecto al logaritmo de la cantidad de nanogramos de ADN incluidos en cada muestra. La fórmula para obtener la eficiencia a partir de la pendiente es:

$$\text{Eficiencia amplificación} = (10^{-(1/\text{pendiente})})$$

Se acepta generalmente que eficiencias comprendidas entre el 90%-110% son aceptables para esta técnica, por lo que sólo se aceptaron las placas que se encontrasen entre esos valores.

Materiales y Métodos

Una vez determinada la eficiencia y aceptando la validez de la amplificación, se procedió al cálculo del ratio T/S de las muestras, según describe Pfaffl:

$$\text{Ratio T/S} = \frac{\text{EficienciaTel}^{\Delta Ct \text{ Tel}(\text{control}-\text{muestra})}}{\text{EficienciaRPLPO}^{\Delta Ct \text{ RPLPO}(\text{control}-\text{muestra})}}$$

6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD TELOMERASA EN TEJIDOS ADIPOSOS MEDIANTE TELOMERIC REPEAT AMPLIFICATION PROTOCOL (TRAP).

Para la determinación de la actividad telomerasa en los tejidos adiposos, se empleó el método descrito por Kim et al. (2015), utilizando el kit comercial *TeloTAGGG® Telomerase PCR ELISA* (Roche). Este procedimiento se basa primero en la elongación con repeticiones teloméricas de una hebra inicial, seguido de una amplificación mediante sondas específicas de la secuencia telomérica en una muestra, y finalmente realizando la detección de estas secuencias por ELISA (Figura 19).

Durante la elongación de la secuencia telomérica, se introduce un cebador específico biotinilado llamado P1-TS a nuestra muestra de proteínas. En el caso de las muestras en las que hay telomerasa con actividad enzimática positiva, la telomerasa es capaz de incorporar repeticiones de la secuencia telomérica – TTAGGG- al extremo 3' del cebador P1-TS. Tras este paso, se realiza una amplificación de la secuencia telomérica mediante PCR, usando los cebadores P1-TS y P2.

Una vez finalizada la amplificación de las secuencias teloméricas, se procede a su detección por quimioluminiscencia. Esta detección se lleva a cabo desnaturalizando las muestras e hibridando las secuencias con una sonda marcada con digoxigenina (llamada P3), que posteriormente se fija sobre una placa de ELISA gracias a que sus pocillos se encuentran cubiertos de estreptavidina, lo cual permite su unión a través de la biotina de P1-TS. Una vez fijados a la placa, se emplea un anticuerpo anti-digoxigenina que posee un elemento conjugado con actividad peroxidasa (anti-DIG-POD o anti-digoxigenina-peroxidasa). Este anticuerpo con actividad peroxidasa es capaz, en presencia del sustrato cromógeno tetrametilbenzidina (TMB), de provocar un cambio de color en el sustrato que cambia a un color azulado. Esta transformación del sustrato permite valorar cualitativamente la presencia de actividad telomerasa en la muestra, ya que tras pasar un umbral en el cambio de color valorado por absorbancia, se puede determinar si las muestras presentan actividad telomerasa positiva.

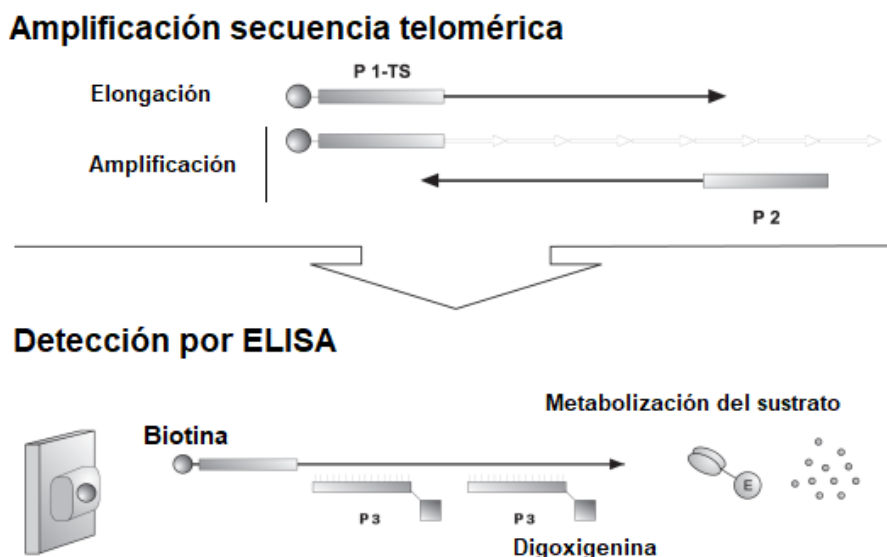


Figura 19: Esquema del ensayo de determinación de actividad telomerasa por ELISA. Fuente: Imagen del protocolo del kit TeloTAGGG® Telomerase PCR ELISA.

Para la aplicación de este protocolo, descrito en el propio kit *TeloTAGGG® Telomerase PCR ELISA* (Roche), se partió de 10 a 15 μg de extracto de proteína para cada muestra de tejido adiposo, que se transfirieron a tubos de PCR estériles de 0.2 ml. Después se completaron hasta 25 μl con agua ultrapura estéril, y se les añadió otros 25 μl de Mezcla de reacción (compuesta por *Buffer* Tris, *primer* P1-Ts biotinilado, *primer* P2, nucleótidos, sustrato de telomerasa y Taq polimerasa). Se analizaron, además, diluciones 1:10 de todas las muestras, con objeto de detectar la posible presencia de inhibidores de la PCR en las muestras, ya que está descrita la viabilidad de la técnica en muestras diluidas en esa proporción (Wright et al., 1995). Como control positivo, se empleó un extracto incluido en el propio kit, procedente de células inmortalizadas de riñón humano que se sabe poseen actividad telomerasa positiva, y que se conservan liofilizadas hasta ser reconstituidas en agua ultrapura estéril a una concentración aproximada de 103 células/ μl . Del bote reconstituido se tomaron 3 μl para emplear como control positivo, completando hasta los 25 μl con agua ultrapura estéril y añadiendo 25 μl de Mezcla de reacción. Como controles negativos,

primero se sometió a una mezcla de 3 μl de extracto del control positivo con 7 μl de agua ultrapura estéril a un tratamiento de calor a 85°C durante 10 minutos para provocar la inactivación enzimática, tras lo cual se dejó incubando en hielo durante 5 minutos. Después, se le añadió 1.2 μl de enzima *ARNase DNase-free* (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, Roche) y 25 μl de Mezcla de reacción, tras lo que se dejó incubando a 37°C durante 30 minutos, eliminando así la cadena de ARN de la telomerasa. Como segundo control negativo, se utilizó un tubo en el que, en lugar de extracto proteico, sólo se incluyó agua ultrapura estéril.

Una vez preparados los tubos con las muestras y el reactivo, se procedió a realizar la elongación y amplificación de las secuencias teloméricas en un termociclador (Tabla 11) siguiendo los pasos detallados en la Tabla a continuación:

FASE	TIEMPO	TEMPERATURA (° C)	NÚMERO DE CICLOS
Elongación	25 minutos	25 °C	1
Inactivación de la telomerasa	5 minutos	94 °C	1
Amplificación			30
Desnaturalización	30 segundos	90 °C	
Hibridación	30 segundos	50 °C	
Elongación	90 segundos	72 °C	
Elongación final	10 minutos	72 °C	1
Mantenimiento	∞	4 °C	1

Tabla 11. Programa de termociclador para amplificación de las secuencias teloméricas a través de la actividad telomerasa de las muestras analizadas.

Una vez amplificadas las muestras, se tomaron 5 μl de cada tubo y se transfirieron a un tubo nuevo, donde se añadió 20 μl de *Denaturation agent* (solución de NaOH < 0.5%). Se dejó durante 10 minutos a temperatura ambiente y se añadieron 225 μl de *Hybridation buffer*, que contiene P3, y se mezcló mediante vórtex. Después se transfirieron 100 μl de esta mezcla a los pocillos de la placa de ELISA, y tras tapar con una lámina autoadhesiva, se dejó incubando durante 2 horas y a 37°C en agitación orbital a 250 rpm.

Tras la incubación, se desechó todo el sobrenadante de los pocillos y se procedió a realizar 3 lavados con 250 μ l de *Washing buffer* en cada pocillo, con al menos 30 segundos de actuación antes de proceder con el siguiente lavado. A continuación, se pipetearon 100 μ l del anticuerpo anti-DIG-POD (0.5 U/ml) a cada pocillo, se tapó la placa con otra lámina autoadhesiva y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos en agitador orbital a 250 rpm. Finalizada esta incubación, se realizaron 5 lavados con 250 μ l de *Washing buffer*, de nuevo dejando al menos 30 segundos de acción antes de proceder con el siguiente. Una vez realizados los lavados, se procedió a añadir el sustrato, pipeteando 100 μ l del sustrato TMB a cada pocillo y tapando la placa de nuevo con lámina autoadhesiva, incubando la placa 15 minutos a temperatura ambiente en agitación. Inmediatamente después, se añadieron 100 μ l de *Stop reagent* (solución con ácido sulfúrico al 5%) sobre los pocillos con sustrato para detener la reacción, pasando instantáneamente de un color azul a un color amarillo, favoreciendo el análisis posterior al ofrecer una máxima sensibilidad.

La valoración de absorbancia de las muestras se realizó con la aplicación bioinformática *Microplate Manager*® (Bio-Rad), y se tomaron los valores a 450 nm y 690 nm. Para determinar si las muestras tenían actividad telomerasa, se aplicó el siguiente cálculo:

$$\Delta\text{Absorbancia muestra} = (A_{450\text{nm}} - A_{690\text{nm}})$$

Una vez obtenido este valor, se calculó la media de este valor para los dos controles negativos, y se restó su valor obtenido para cada una de las muestras de la siguiente forma:

$$\text{Absorbancia corregida} = \Delta\text{Absorbancia}_{\text{muestra}} - \Delta\text{Absorbancia}_{\text{control}}$$

Tras el cálculo, las muestras problema con valores inferiores a 0.2 se consideraron como telomerasa negativas, mientras que los valores superiores a 0.2 se consideraron indicativos de positividad para telomerasa. Además, sólo se considera validada la prueba si los valores Δ Absorbancia en los controles positivos son superiores a 1.5, y el Δ Absorbancia en los controles negativos inferior a 0.2.

7. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DE MICROARN POR PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (QRT-PCR).

Para los análisis de expresión en sueros, tejidos colorrectales y tejidos adiposos, se utilizaron los kits *miRCURY LNA RT Kit* y *miRCURY LNA SYBR® Green PCR Kit* (Qiagen, Hilden, Alemania). Se aplicó la técnica de qRT-PCR, que consiste en sintetizar una cadena de ADN complementario (ADNc), a partir de la hebra molde de microARN, y su posterior amplificación por PCR. En el primer paso, se incorpora un ARN pequeño similar en estructura a los microARN o *Spike-in*, UniSp6, a las muestras, que servirá como control de similar eficiencia de la retrotranscripción. A continuación se realiza la retrotranscripción, en la que se emplea una ADN sintetasa ARN dependiente (retrotranscriptasa o transcriptasa reversa) que, en un tampón de reacción adecuado y que incluya nucleótidos (2'-desoxinucleósido'trifosfatos o dNTPs) y cofactores (Mg^{2+}), es capaz de sintetizar una hebra complementaria de ADN a partir de la hebra molde de microARN (Figura 20). Este proceso se produce gracias a la acción de una etiqueta o *tag* de politiminas, que se une por complementariedad a los microARNs a través de su cola de poliadenilatos, proporcionando un origen para la síntesis del ADNc.

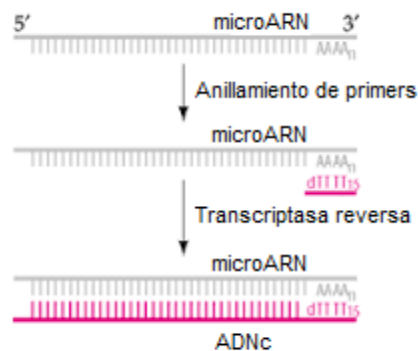


Figura 20: Esquema del proceso de retrotranscripción en el análisis de microARNs. Fuente original: <https://learninglink.oup.com>

Una vez sintetizado el ADNc, se procede a la amplificación y detección por qRT-PCR, empleando para ello *primers* específicos y mejorados con *Locked nucleic acids* (LNA), que aumentan la afinidad y especificidad con la región

complementaria, siendo los LNA especialmente útiles para el estudio de moléculas de pequeño tamaño como los microARNs. Para la detección de amplificados, se emplea *SYBR® Green*, incluido en el kit utilizado, que es un compuesto que se intercala en el ADN y genera una señal luminosa que puede detectarse y, al igual que en la PCR de telómeros descrita anteriormente, permite obtener un valor Ct para cada muestra que corresponde al ciclo donde el incremento de señal luminiscente varía de forma significativa durante la fase de amplificación exponencial. Para evitar señales no relacionadas con la propia PCR, se empleó el reactivo *ROX* del propio kit, que genera una señal luminiscente base similar en todas las muestras y permite discriminar cualquier señal por debajo de ese nivel. Los microARNs empleados en esta Tesis se citan a continuación, utilizando hsa-miR-103-3p como referencia endógena del resto de los microARNs (Tabla 12):

MICROARN	REFERENCIA COMERCIAL	MIMAT
hsa-miR-103-3p	YP00204063	MIMAT0000101
hsa-miR-34a-5p	YP00204486	MIMAT0000255
hsa-miR-132-3p	YP00206035	MIMAT0000426
hsa-miR-143-3p	YP00205992	MIMAT0000435
hsa-miR-181a-5p	YP00206081	MIMAT0000256

Tabla 12: MicroARNs escogidos, referencia de los primers de Qiagen y anotación de los microARNs maduros MIMAT (<https://www.mirbase.org/>). Se utilizó hsa-miR-103-3p como microARN de referencia del resto.

Para llevar a cabo este protocolo, se ajustaron todas las muestras de tejido a una concentración de microARNs de 5 ng/μl, mientras que en el caso de los sueros se procede sin este paso previo. Se realizó además la retrotranscripción de un *pool* integrado por 5 muestras de tejidos adiposos omentales control, también a concentración de 5 ng/μl, para su futuro uso como curva estándar y poder calcular la eficiencia de la reacción. Se preparó para cada muestra un tubo de PCR de 0.2 ml al que se añadió la mezcla de reacción de retrotranscripción (Tabla 13):

REACTIVO	VOLUMEN
Reaction Buffer 5x	2 μ l
Agua ultrapura estéril	4.5 μ l
Enzyme mix	1 μ l
UniSp6	0.5 μ l
Muestra (5 ng/ μ l)	2 μ l

Tabla 13. Volúmenes empleados para la retrotranscripción de microARNs.

A continuación se procedió a realizar la retrotranscripción en el termociclador aplicando el siguiente programa (Figura 21):



Figura 21. Programa de termociclador para la retrotranscripción de microARNs.

Para realizar los análisis de expresión de microARNs en tejidos adiposos y colorrectales por qRT-PCR, se preparó una curva patrón a partir del *pool* de muestras control especificado anteriormente. Para ello, se comenzó con la preparación de diluciones 1:4 a partir del ADNc del *pool*, utilizando una dilución inicial 1:20 hasta llegar a una dilución 1:1280. En el caso de los análisis de sueros, el *pool* de TAO control se empleó desde una dilución inicial 1:10, con diluciones 1:4 de ésta, hasta llegar a una dilución final 1:640.

Para el análisis de las muestras problema, los ADNc de las muestras de sueros se diluyeron hasta una dilución final de 1:40, mientras que los ADNc de las muestras problema de tejidos colorrectales y adiposos se diluyeron hasta una dilución final 1:80.

Para cada muestra, la reacción de qRT-PCR (Tabla 14) se realizó por triplicado, con los siguientes reactivos:

REACTIVO	VOLUMEN
PCR Master Mix	2 µl
Primers Mix 10X	4.5 µl
ROX	1 µl
ADNc	0.5 µl
Muestra	2 µl

Tabla 14. Volúmenes empleados en la amplificación de ADNc mediante qRT-PCR.

La amplificación se realizó en termociclador *7900HT Fast Real-Time PCR System* (Life Technologies, EEUU), siguiendo el programa de termociclador que se indica a continuación (Tabla 15):

FASE	TIEMPO	TEMPERATURA (°C)	Nº DE CICLOS
Desnaturalización	10 minutos	95 °C	1
Amplificación			
Desnaturalización	10 segundos	95 °C	40
Hibridación/Elongación	1 minuto	60 °C	

Tabla 15. Programa de termociclador para la amplificación de microARNs (qRT-PCR).

El cálculo de la eficiencia para cada placa se obtuvo a partir del valor de la pendiente de la curva estándar del *pool*, según la ecuación:

$$\text{Eficiencia amplificación} = 10^{-\left(\frac{1}{\text{pendiente}}\right)}$$

Sólo se consideraron las placas que tuvieran una eficiencia de entre el 90% y el 110%, y los valores para cada muestra se calcularon como la media de los valores de los Ct obtenidos en los triplicados.

Para el cálculo de la expresión relativa de los microARNs en los tejidos, se calculó el Delta Delta Ct (Livak y Schmittgen, 2001), con la siguiente fórmula:

$$\text{Expresión relativa} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

O, expandiendo la ecuación:

Expresión relativa =

$$2^{-((Ctm\ miARN - Ctm\ Housekeeping) - (Ctr\ miARN - Ctr\ Housekeeping))}$$

Donde Ctm se refiere al valor de Ct de las muestras analizadas, y Ctr se refiere al valor de Ct de las muestras utilizadas como referencia; en este caso la media de tejidos adiposos omentales de pacientes sin cáncer.

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los análisis estadísticos en esta tesis se realizaron con el programa informático *IBM SPSS® Statistics 25*. En el caso de las variables cuantitativas, se realizó primero un estudio de la normalidad y homocedasticidad para determinar si eran variables paramétricas o no paramétricas, a través del análisis de Kolgomorov-Smirnov, siendo no paramétricas aquellas cuyo valor de P en esta prueba fuera $P > 0.05$.

En la búsqueda de correlaciones entre variables cualitativas, se utilizó el estadístico de Chi cuadrado (χ^2), determinando que existe una relación entre ellas cuando el resultado es $P < 0.05$ en esta prueba.

Para la búsqueda de correlaciones entre variables cuantitativas, se empleó la correlación de Pearson sólo cuando ambas variables fueran paramétricas, y en el caso de que al menos una variable fuera no paramétrica se empleó el test de Spearman. En este test, la obtención de $P < 0.05$ muestra una correlación entre las variables cuantitativas.

Para la determinación de la existencia de variaciones significativas en una variable cuantitativa dependiendo una variable cualitativa, se empleó, cuando había dos grupos de estudio y la variable cuantitativa es paramétrica, el test t de Student; cuando hubo 3 o más grupos de estudio y la variable cuantitativa es paramétrica, se empleó el test de Análisis de la varianza (ANOVA). En cambio, cuando la variable era no paramétrica y había dos grupos de estudio, se empleó el test de U-Mann Whitney, mientras que para tres o más grupos, se utilizó el test de Kruskal-Wallis. Para estos estadísticos, un valor $P < 0.05$ revela que existen diferencias significativas de las medias entre los diferentes grupos para la variable analizada.

Cuando se quiso comparar diferencias entre muestras relacionadas, se recurrió al uso del test t para muestras relacionadas, si las variables utilizadas eran paramétricas, o el test de Wilcoxon de muestras relacionadas si al menos una no era paramétrica. Un resultado del estadístico con valor $P < 0.05$ revela que los grupos comparados son distintos entre ellos al observar la variable cuantitativa.

Finalmente, se realizaron curvas de supervivencia de Kaplan-Meier asociadas a la recurrencia de la enfermedad, que a través del test Log-Rank permite identificar si hay diferencias entre los distintos grupos con respecto al Intervalo Libre de Enfermedad (ILE) de los pacientes desde el momento de la cirugía. En esta tesis, el seguimiento de los pacientes se llevó a cabo hasta los 60 meses tras la cirugía cuando fue posible, y sólo se incluyeron los pacientes que fueron sometidos a dicha cirugía con intención curativa, excluyendo a aquellos que se encontraban clasificados como estadio D de Dukes, así como los fallecidos durante el post-operatorio (supervivencia inferior a 0.5 meses). Para la determinación de los distintos grupos de estudio con variables cuantitativas, se estableció un punto de corte en dicha variable para separar los grupos con la mayor significación estadística posible, utilizando para ello la herramienta informática online *Cutoff Finder*, disponible en: https://molpathoheidelberg.shinyapps.io/CutoffFinder_v1/

IV. RESULTADOS

1. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DE MICROARNS EN CÁNCER COLORRECTAL.

1.1. Expresión de microARNs en tejidos y asociaciones entre ellos.

La búsqueda de relaciones en la expresión de los microARNs entre diferentes tejidos y su asociación con el cáncer colorrectal (CCR) es uno de los objetivos de estudio en esta Tesis. Con el fin de analizar la posibilidad de utilizar los niveles de microARNs en suero como potenciales biomarcadores en pacientes afectados de CCR, resulta fundamental establecer si existe alguna relación entre los niveles séricos de expresión y la afectación por CCR en los pacientes, así como la relación con su expresión en tejidos colorrectales tumorales y no tumorales y en tejidos adiposos omentales (TAO) y subcutáneos (TAS). Además, se consideran las posibles asociaciones entre los patrones de expresión en tejidos colorrectales con la expresión en tejidos adiposos. Para establecer estas relaciones, se procedió a la determinación de la expresión relativa de los microARNs en sujetos control y en pacientes con CCR mediante qRT-PCR en sueros, TAO y TAS, así como en tejidos colorrectales tumorales y no tumorales en el grupo con cáncer. Los resultados se incluyen en la Tabla 16.

MUESTRA ANALIZADA Y microARN	EXPRESIÓN RELATIVA (Media ± EE)	
	SUJETOS CONTROL SIN CCR	PACIENTES CON CCR
SUERO	n = 16	n = 36
microARN 34a-5p	1.54 ± 0.52	0.75 ± 0.19
microARN 132-3p	1.34 ± 0.32	0.29 ± 0.06
microARN 143-3p	1.75 ± 0.51	0.32 ± 0.05
microARN 181a-5p	1.11 ± 0.14	1.64 ± 0.47
TEJIDO COLORRECTAL TUMORAL		n = 20
microARN 34a-5p		1.41 ± 0.18
microARN 132-3p		0.90 ± 0.12
microARN 143-3p		0.33 ± 0.11
microARN 181a-5p		0.98 ± 0.13
TEJIDO COLORRECTAL NO TUMORAL		n = 24
microARN 34a-5p		1.39 ± 0.23
microARN 132-3p		1.19 ± 0.13
microARN 143-3p		2.12 ± 0.46
microARN 181a-5p		1.26 ± 0.19
TEJIDO ADIPOSO OMENTAL	n = 41	n = 44
microARN 34a-5p	1.15 ± 0.10	1.32 ± 0.11
microARN 132-3p	1.57 ± 0.17	1.68 ± 0.11
microARN 143-3p	1.34 ± 0.21	1.36 ± 0.10
microARN 181a-5p	1.35 ± 0.21	1.13 ± 0.07
TEJIDO ADIPOSO SUBCUTÁNEO	n = 38	n = 40
microARN 34a-5p	1.30 ± 0.19	1.07 ± 0.14
microARN 132-3p	1.18 ± 0.12	1.17 ± 0.12
microARN 143-3p	1.16 ± 0.14	1.59 ± 0.26
microARN 181a-5p	1.10 ± 0.08	1.39 ± 0.11

Tabla 16. Expresión relativa de los microARNs 34a-5p, 132-3p, 143-3p y 181a5p en muestras de sueros, tejidos colorrectales tumorales y no tumorales, y tejidos adiposos omentales y subcutáneos en individuos con y sin CCR. CCR = Cáncer colorrectal. EE = Error estándar de la media.

El análisis de microARNs en sueros mostró que la expresión de los microARN 34a-5p, 132-3p y 143-4p disminuye significativamente en pacientes

con cáncer colorrectal respecto a los individuos no afectados de este tipo tumoral (Figura 22; $P = 0.003$; $P < 0.001$; $P < 0.001$, respectivamente; test de Kruskal-Wallis). No fue así para el microARN 181a-5p, para el que no se detectaron diferencias significativas en suero.

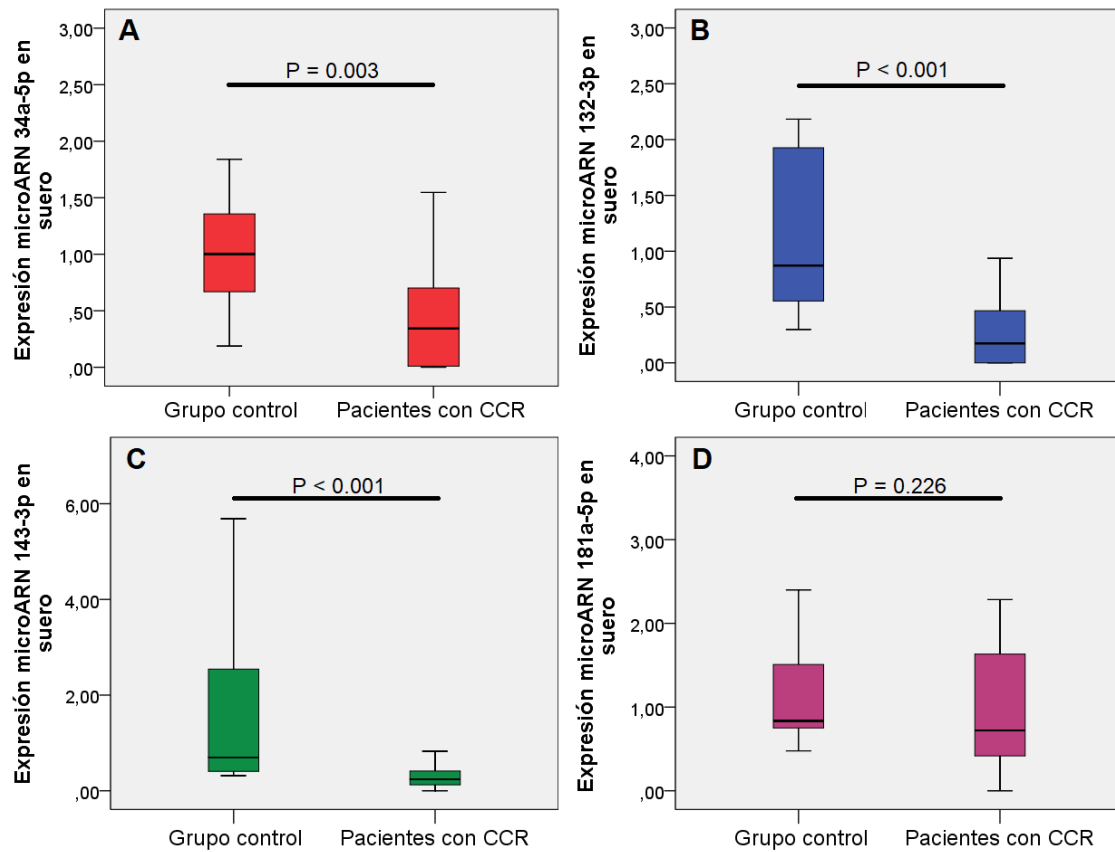


Figura 22. Diagramas de cajas representando la expresión relativa de los microARNs 34a-5p (A), 132-3p (B), 143-3p (C) y 181a-5p (D) en muestras de suero de sujetos control sin CCR y pacientes con CCR. Pueden observarse, en cada caso, la mediana, los cuartiles y los valores mínimos y máximos. CCR = Cáncer colorrectal.

A continuación se analizaron los resultados de expresión de microARNs en tejidos colorrectales tumorales frente a los tejidos no tumorales (Figura 23), y se observó un descenso significativo en la expresión del microARN 143-3p en tejidos colorrectales tumorales con respecto a sus controles no tumorales ($P < 0.001$; test de Wilcoxon). En el caso del microARN 132-3p, también hubo una

Resultados

disminución de la expresión en el tejido tumoral, aunque las diferencias quedaron al borde de la significación estadística ($P = 0.079$; test de Wilcoxon).

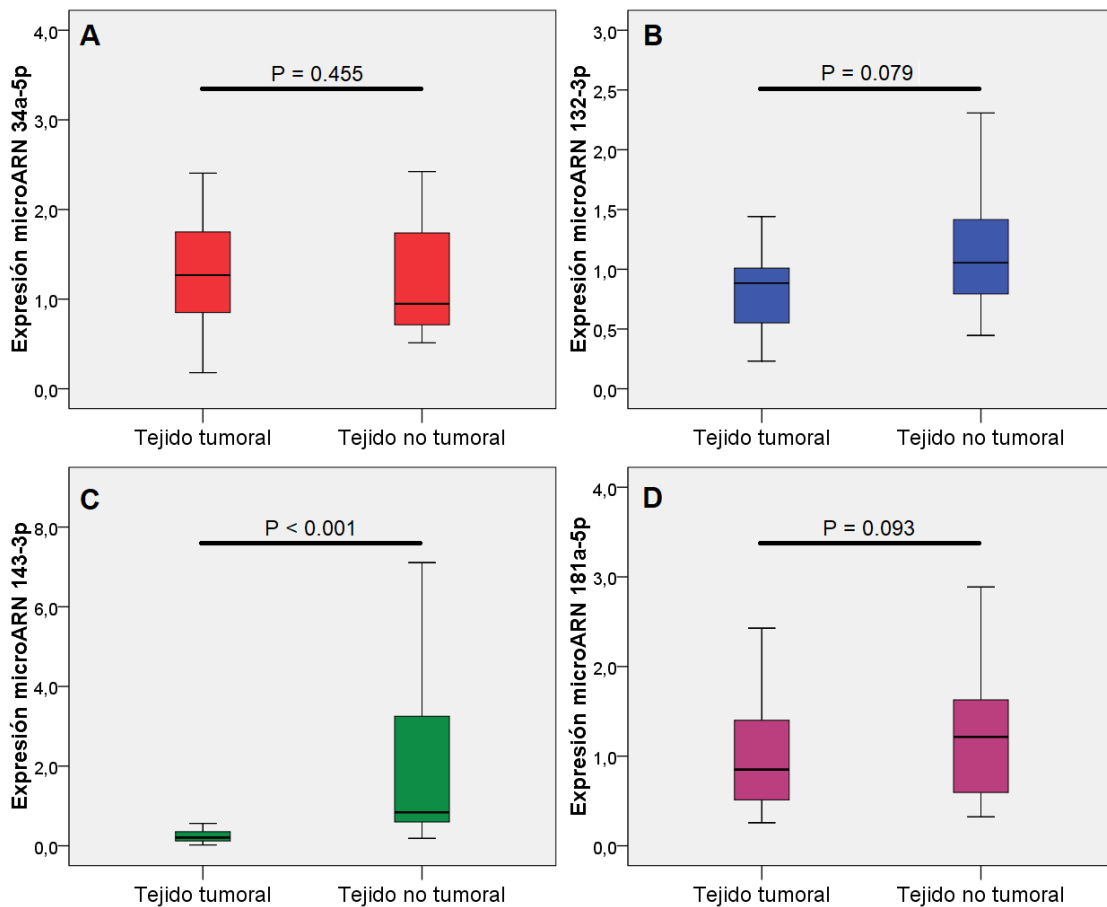


Figura 23. Diagramas de cajas representando la expresión relativa de los microARNs 34a-5p (A), 132-3p (B), 143-3p (C) y 181a-5p (D) en muestras de tejidos colorrectales tumorales y no tumorales de pacientes con cáncer colorrectal. Pueden observarse, en cada caso, la mediana, los cuartiles y los valores mínimos y máximos.

Seguidamente, se buscaron diferencias en la expresión de estos microARNs en TAO y TAS. Los datos obtenidos en TAO no evidenciaron diferencias significativas en los niveles de expresión para ninguno de los microARNs de estudio (Figura 24).

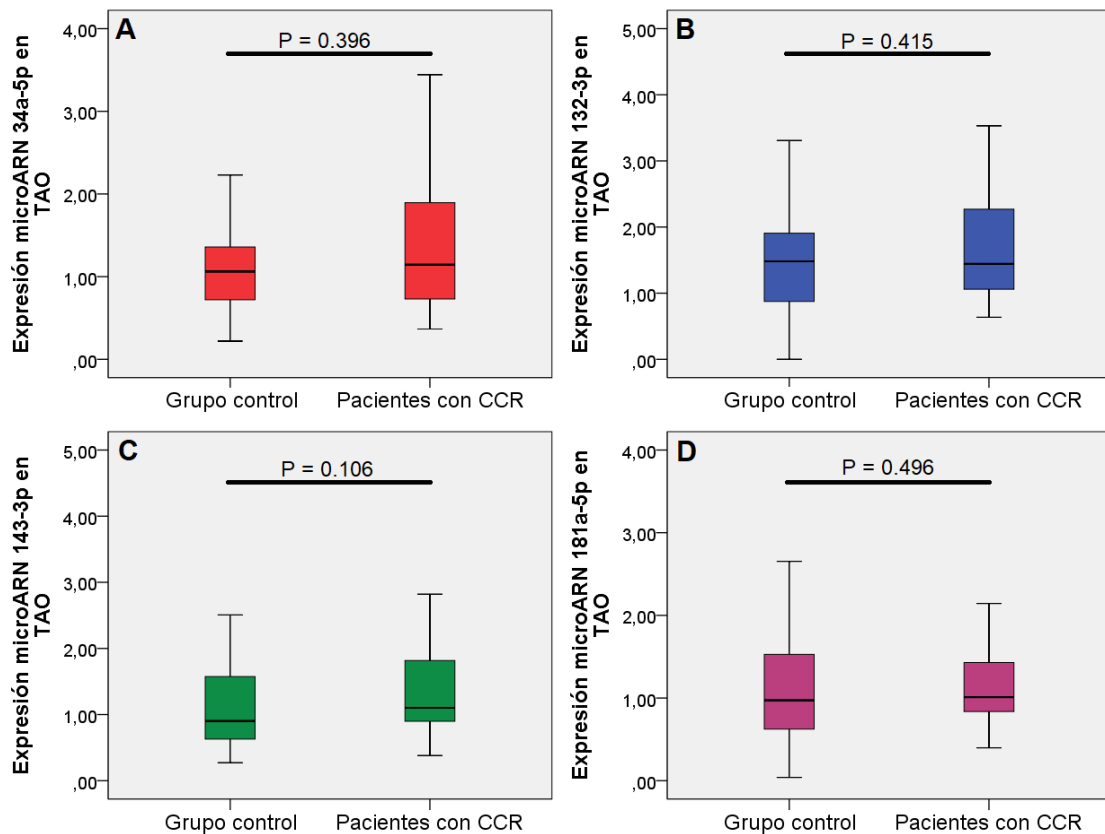


Figura 24. Diagramas de cajas representando la expresión relativa de los microARNs 34a-5p (A), 132-3p (B), 143-3p (C) y 181a-5p (D) en muestras de tejido adiposo omental de sujetos control sin CCR y pacientes con CCR. Pueden observarse, en cada caso, la mediana, los cuartiles y los valores mínimos y máximos. CCR = Cáncer colorrectal.

En el caso de los análisis de expresión de microARNs en TAS, se observó un incremento significativo en el caso del microARN 181a-5p en pacientes afectados por CCR ($P = 0.033$; test de Kruskal-Wallis; Figura 25).

Resultados

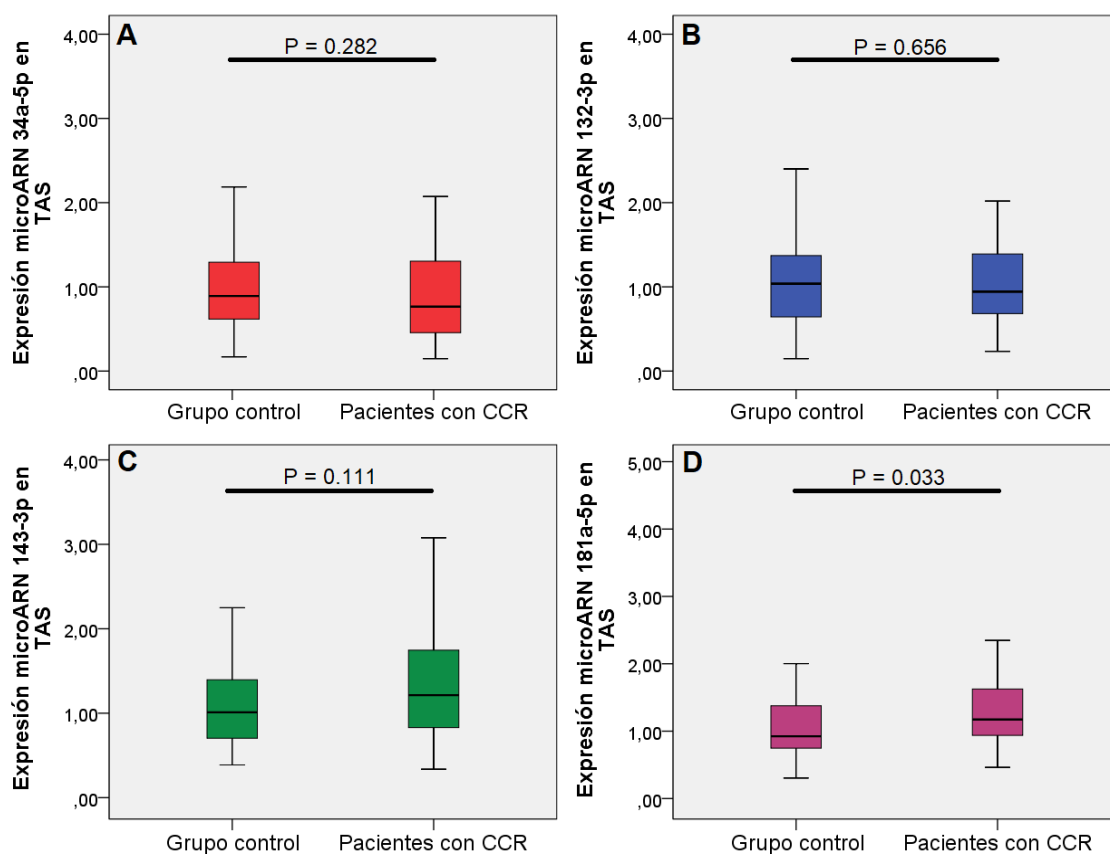


Figura 25. Diagramas de cajas representando la expresión relativa de los microARNs 34a-5p (A), 132-3p (B), 143-3p (C) y 181a-5p (D) en muestras de tejido adiposo subcutáneo de sujetos control sin CCR y pacientes con CCR. Pueden observarse, en cada caso, la mediana, los cuartiles y los valores mínimos y máximos. CCR = Cáncer colorrectal.

Procedimos con la búsqueda de posibles correlaciones entre la expresión de los microARNs estudiados en suero, tejidos colorrectales tumorales y no tumorales, TAO y TAS: 34a-5p (Tabla 17), 132-3p (Tabla 18), 143-3p (Tabla 19) y 181a-5p (Tabla 20). Para ello, se analizaron sueros y tejidos de pacientes afectados por CCR e individuos control. Se incluyeron en este análisis un total de 52 sueros, 20 tejidos colorrectales tumorales, 24 tejidos colorrectales no tumorales, 85 muestras de TAO y 77 de TAS.

Comenzando con el análisis de correlaciones en sueros y tejidos del microARN 34a-5p (Tabla 17), la correlación observada entre la expresión de este microARN en sueros y TAO quedó al borde de la significación estadística (P = 0.051; correlación de Spearman). Además, se detectaron correlaciones

estadísticamente significativas entre la expresión del microARN 34a-5p en tejidos tumorales y no tumorales ($P = 0.009$; correlación de Spearman), así como entre los TAO y TAS (Figura 26; $P < 0.001$; correlación de Spearman).

		Correlaciones de Spearman para el microARN 34a-5p				
		Suero	Tejido colorrectal tumoral	Tejido colorrectal no tumoral	Tejido adiposo omental	Tejido adiposo subcutáneo
Suero	C.C.		-0.322	-0.193	0.387	0.192
	P valor		0.193	0.401	0.051	0.461
	Nº casos		18	21	26	17
Tejido colorrectal tumoral	C.C.	-0.322		0.568	0.279	0.115
	P valor	0.193		0.009	0.315	0.707
	Nº casos	18		20	15	13
Tejido colorrectal no tumoral	C.C.	-0.193	0.568		0.216	-0.109
	P valor	0.401	0.009		0.390	0.688
	Nº casos	21	20		18	16
Tejido adiposo omental	C.C.	0.387	0.279	0.216		0.597
	P valor	0.051	0.315	0.390		<0.001
	Nº casos	26	15	18		72
Tejido adiposo subcutáneo	C.C.	0.192	0.115	-0.109	0.597	
	P valor	0.461	0.707	0.688	<0.001	
	Nº casos	17	13	16	72	

Tabla 17. Correlaciones entre la expresión del microARN 34a-5p en sueros, tejidos colorrectales tumorales y no tumorales, y tejidos adiposos omentales y subcutáneos. C.C. = Coeficiente de correlación de Spearman.

Después realizamos el análisis de correlaciones entre sueros y tejidos del microARN 132-3p (Tabla 18). Se determinó la existencia de una correlación significativa entre su expresión en sueros y tejidos colorrectales no tumorales ($P = 0.009$; correlación de Spearman). Los datos también mostraron una correlación inversa entre la expresión de este microARN en tejidos colorrectales tumorales y TAS ($P = 0.003$; correlación de Spearman). Finalmente, se pudo observar una correlación entre los niveles de expresión del microARN 132-3p entre los TAO y TAS (Figura 26, $P < 0.001$; correlación de Spearman).

		Correlaciones de Spearman para el microARN 132-3p				
		Suero	Tejido colorrectal tumoral	Tejido colorrectal no tumoral	Tejido adiposo omental	Tejido adiposo subcutáneo
Suero	C.C.		0.032	0.555	-0.068	0.056
	P valor		0.898	0.009	0.748	0.825
	Nº casos		18	21	25	18
Tejido colorrectal tumoral	C.C.	0.032		0.048	0.097	-0.747
	P valor	0.898		0.840	0.732	0.003
	Nº casos	18		20	15	13
Tejido colorrectal no tumoral	C.C.	0.555	0.048		0.237	0.256
	P valor	0.009	0.840		0.344	0.339
	Nº casos	21	20		18	16
Tejido adiposo omental	C.C.	-0.068	0.097	0.237		0.601
	P valor	0.748	0.732	0.344		<0.001
	Nº casos	25	15	18		73
Tejido adiposo subcutáneo	C.C.	0.056	-0.747	0.256	0.601	
	P valor	0.825	0.003	0.339	<0.001	
	Nº casos	18	13	16	73	

Tabla 18. Correlaciones entre la expresión del microARN 132-3p en sueros, tejidos colorrectales tumorales y no tumorales, y tejidos adiposos omentales y subcutáneos. C.C. = Coeficiente de correlación de Spearman.

El análisis de correlaciones entre sueros y tejidos del microARN 143-3p (Tabla 19) mostró únicamente significación estadística al comparar los niveles de expresión en los TAO y TAS (Figura 26, P = 0.017; correlación de Spearman).

		Correlaciones de Spearman para el microARN 143-3p				
		Suero	Tejido colorrectal tumoral	Tejido colorrectal no tumoral	Tejido adiposo omental	Tejido adiposo subcutáneo
Suero	C.C.		0.003	0.161	-0.020	0.333
	P valor		0.990	0.486	0.938	0.208
	Nº casos		18	21	18	16
Tejido colorrectal tumoral	C.C.	0.003		0.092	-0.120	0.052
	P valor	0.990		0.701	0.671	0.865
	Nº casos	18		20	15	13
Tejido colorrectal no tumoral	C.C.	0.161	0.092		-0.228	-0.159
	P valor	0.486	0.701		0.362	0.557
	Nº casos	21	20		18	16
Tejido adiposo omental	C.C.	-0.020	-0.120	-0.228		0.281
	P valor	0.938	0.671	0.362		0.017
	Nº casos	18	15	18		71
Tejido adiposo subcutáneo	C.C.	0.333	0.052	-0.159	0.281	
	P valor	0.208	0.865	0.557	0.017	
	Nº casos	16	13	16	71	

Tabla 19. Correlaciones entre la expresión del microARN 143-3p en sueros, tejidos colorrectales tumorales y no tumorales, y tejidos adiposos omentales y subcutáneos. C.C. = Coeficiente de correlación de Spearman.

Por último se analizaron las posibles correlaciones de la expresión del microARN 181a-5p entre sueros y tejidos (Tabla 20). Se detectó significación estadística al correlacionar los niveles de expresión en sueros con los TAO (P = 0.024; correlación de Spearman). También hubo una correlación significativa en la expresión del microARN 181a-5p entre los TAO y TAS (Figura 26; P < 0.001; correlación de Spearman).

		Correlaciones de Spearman para el microARN 181a-5p				
		Suero	Tejido colorrectal tumoral	Tejido colorrectal no tumoral	Tejido adiposo omental	Tejido adiposo subcutáneo
Suero	C.C.		-0.289	-0.100	0.451	0.100
	P valor		0.245	0.666	0.024	0.693
	Nº casos		18	21	25	18
Tejido colorrectal tumoral	C.C.	-0.289		0.374	0.157	-0.264
	P valor	0.245		0.104	0.576	0.384
	Nº casos	18		20	15	13
Tejido colorrectal no tumoral	C.C.	-0.100	0.374		-0.115	-0.053
	P valor	0.666	0.104		0.651	0.846
	Nº casos	21	20		18	16
Tejido adiposo omental	C.C.	0.451	0.157	-0.115		0.575
	P valor	0.024	0.576	0.651		<0.001
	Nº casos	25	15	18		73
Tejido adiposo subcutáneo	C.C.	0.100	-0.264	-0.053	0.575	
	P valor	0.693	0.384	0.846	<0.001	
	Nº casos	18	13	16	73	

Tabla 20. Correlaciones entre la expresión del microARN 181a-5p en sueros, tejidos colorrectales tumorales y no tumorales, y tejidos adiposos omentales y subcutáneos. C.C. = Coeficiente de correlación de Spearman.

Dada la elevada correlación de los niveles de expresión de los microARNs estudiados entre TAO y TAS, se incluyen a continuación las gráficas representativas de dichas asociaciones (Figura 26), mostrando las correlaciones significativas de los microARNs 34a-5p, 132-3p, 143-3p y 181a-5p entre estos dos tejidos.

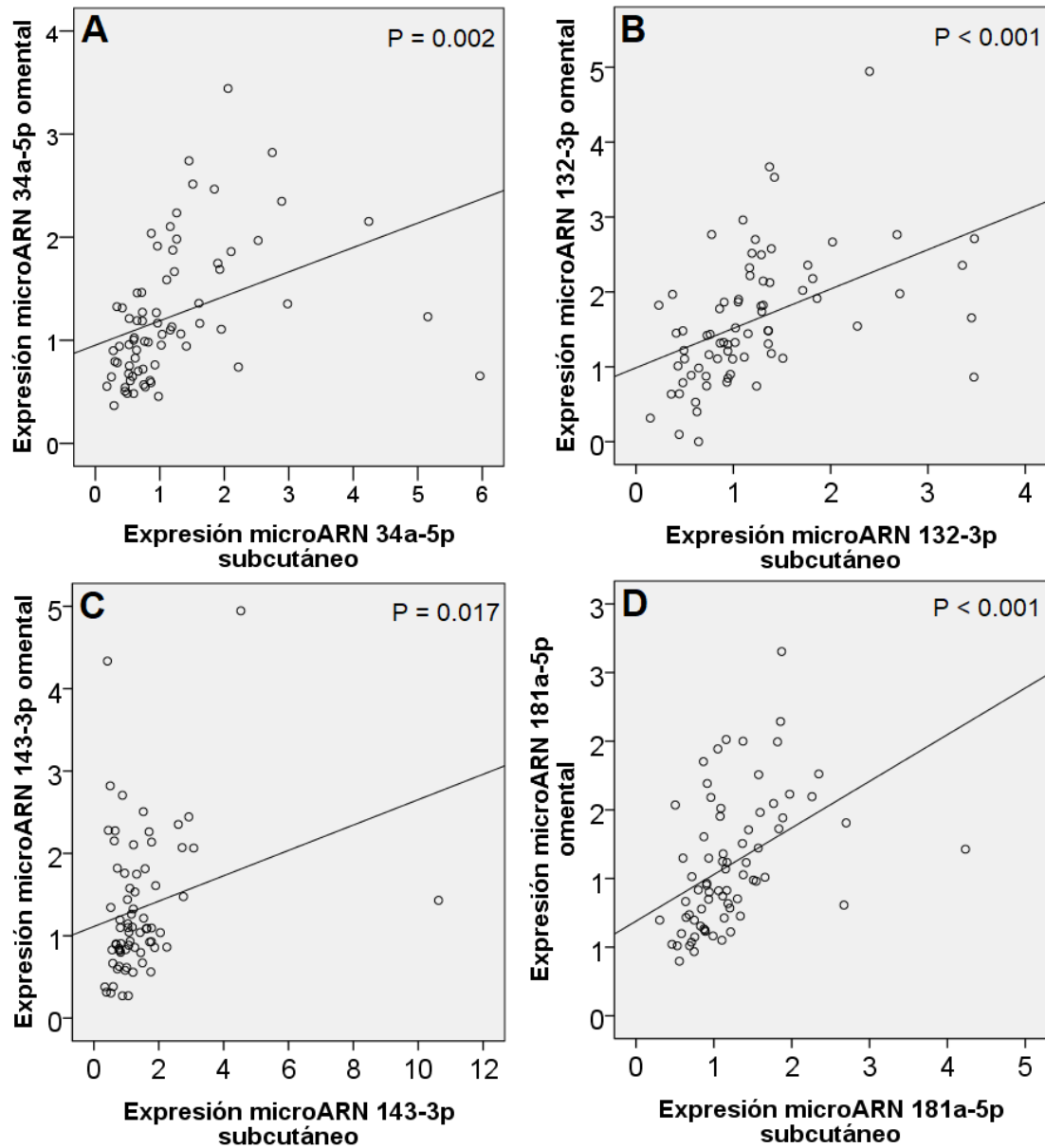


Figura 26. Correlación de Spearman de la expresión de los microARNs 34a-3p (A), 132-3p (B), 143-3p (C) y 181a-5p (D) entre tejidos adiposos omentales y subcutáneos.

Resultados

1.2. Expresión de microARNs y su relación con las variables clínico-patológicas.

A continuación, se analizaron relaciones entre la expresión de los microARNs considerados en esta Tesis y las variables clínico-patológicas de pacientes afectados por CCR.

Dado el reducido tamaño muestral para los tejidos tumorales, se procedió a agrupar las categorías algunas de las variables.

Se comenzó el estudio buscando la relación entre la expresión en suero del microARN 34a-5p y las variables clínico-patológicas de los tumores colorrectales (Tabla 21).

VARIABLE	Nº DE CASOS (Suero)	EXPRESIÓN DEL microARN 34a-5p (Media ± EE)	P ; test de Kruskal-Wallis
ESTADIO	36		
A y B	20	0.92 ± 0.30	P = 0.230
C y D	16	0.53 ± 0.22	
T, tumor primario	36		
T1. T2. T3	11	0.75 ± 0.22	P = 0.836
T4	25	0.74 ± 0.40	
N, invasión de ganglios linfáticos	36		
N0	22	0.86 ± 0.28	P = 0.731
N1	8	0.65 ± 0.40	
N2	6	0.48 ± 0.30	
M, metástasis	36		
M0	33	0.80 ± 0.21	P = 0.262
M1	3	0.11 ± 0.10	
LOCALIZACIÓN DEL TUMOR	36		
Colon derecho	20	0.46 ± 0.11	P = 0.972
Colon izquierdo	8	1.13 ± 0.64	
Recto	8	1.08 ± 0.54	

Tabla 21. Expresión relativa del microARN 34a-5p en sueros y relación con las variables clínico-patológicas en pacientes con cáncer colorrectal.

El análisis en sueros del microARN 34a-5p no mostró ninguna evidencia significativa de que exista alguna asociación con las variables clínico-patológicas aquí estudiadas.

Se procedió con el análisis de la expresión del microARN 34a-5p en tejidos colorrectales tumorales, así como su asociación con las mismas variables (Tabla 22).

VARIABLE	Nº DE CASOS (Tejido colorrectal tumoral)	EXPRESIÓN DEL microARN 34a-5p (Media \pm EE)	P ; test de Kruskal- Wallis
ESTADIO	20		
A y B	8	1.45 \pm 0.23	P = 0.119
C y D	12	1.39 \pm 0.27	
T, tumor primario	20		
T1. T2. T3	8	1.61 \pm 0.28	P = 0.190
T4	12	1.10 \pm 0.15	
N, invasión de ganglios linfáticos	20		
N0	10	1.45 \pm 0.22	P = 0.833
N1	6	1.48 \pm 0.47	
N2	4	1.20 \pm 0.36	
M, metástasis	20		
M0	17	1.43 \pm 0.21	P = 0.791
M1	3	1.29 \pm 0.21	
LOCALIZACIÓN DEL TUMOR	20		
Colon derecho	15	1.37 \pm 0.22	P = 0.725
Colon izquierdo	4	1.48 \pm 0.44	
Recto	1	1.70	

Tabla 22. Expresión relativa del microARN 34a-5p en tejidos colorrectales tumorales y relación con las variables clínico-patológicas en pacientes con cáncer colorrectal. EE = Error estándar de la media.

A la vista de los resultados obtenidos, tampoco se pudo establecer ninguna relación entre la expresión de este microARN en tejidos colorrectales tumorales con las variables clínico-patológicas consideradas.

Resultados

Finalmente, se analizaron los TAO y TAS, y la relación entre la expresión del microARN 34a-5p con las variables del estudio (Tabla 23 y Tabla 24, respectivamente).

VARIABLE	Nº DE CASOS (TAO)	EXPRESIÓN DEL microARN 34a-5p (Media ± EE)	P ; test de Kruskal-Wallis
ESTADIO	44		
A y B	25	1.48 ± 0.16	P = 0.105
C y D	19	1.12 ± 0.15	
T, tumor primario	44		
T1. T2. T3	9	1.43 ± 0.28	P = 0.551
T4	35	1.30 ± 0.12	
N, invasión de ganglios linfáticos	44		
N0	26	1.45 ± 0.15	P = 0.096
N1	12	1.16 ± 0.16	
N2	6	1.09 ± 0.36	
M, metástasis	44		
M0	39	1.36 ± 0.12	P = 0.346
M1	5	1.04 ± 0.29	
LOCALIZACIÓN DEL TUMOR	44		
Colon derecho	16	1.07 ± 0.14	P=0.085
Colon izquierdo	13	1.21 ± 0.15	
Recto	15	1.70 ± 0.23	

Tabla 23. Expresión relativa del microARN 34a-5p en tejidos adiposos omentales, y relación con las variables clínico-patológicas en pacientes con cáncer colorrectal. TAO = Tejido adiposo omental. EE = Error estándar de la media.

De los datos de expresión del microARN 34a-5p obtenidos en TAO, no se pudieron establecer asociaciones estadísticamente significativas con ninguna de las variables del estudio. Sin embargo, cabe destacar que los mayores niveles de expresión del microARN 34a-5p en los TAO se registraron cuando el tumor se encuentra localizado en el recto, con diferencias próximas a la significación estadística.

VARIABLE	Nº DE CASOS (TAS)	EXPRESIÓN DEL microARN 34a-5p (Media ± EE)	P ; test de Kruskal-Wallis
ESTADIO	40		
A y B	24	1.25 ± 0.20	P = 0.029
C y D	16	0.79 ± 0.17	
T, tumor primario	40		
T1. T2. T3	9	1.02 ± 0.24	P = 0.910
T4	31	1.08 ± 0.17	
N, invasión de ganglios linfáticos	40		
N0	25	1.21 ± 0.20	P = 0.066
N1	10	0.86 ± 0.23	
N2	5	0.74 ± 0.31	
M, metástasis	40		
M0	38	1.09 ± 0.15	P = 0.664
M1	2	0.70 ± 0.06	
LOCALIZACIÓN DEL TUMOR	40		
Colon derecho	13	0.87 ± 0.31	P = 0.071
Colon izquierdo	13	0.95 ± 0.14	
Recto	14	1.30 ± 0.21	

Tabla 24. Expresión relativa del microARN 34a-5p en tejidos adiposos subcutáneos, y relación con las variables clínico-patológicas en pacientes con cáncer colorrectal. TAS = Tejido adiposo subcutáneo. EE = Error estándar de la media.

En el caso del análisis de expresión del microARN 34a-5p en TAS, se pudo establecer una asociación estadísticamente significativa entre la expresión de este microARN en TAS y el estadio de Dukes, disminuyendo en los estadios más avanzados (P = 0.029; test de Kruskal-Wallis; Tabla 24). Además, al igual que ocurre en los TAO, se observaron mayores niveles de expresión de este microARN en TAS cuando el tumor se localizaba en el recto, con diferencias al borde de la significación estadística.

Resultados

Se realizó a continuación el estudio y análisis de la expresión del microARN 132-3p, y su relación con las variables clínico-patológicas de los tumores colorrectales en pacientes con CCR, empezando por el análisis de expresión en sueros (Tabla 25).

VARIABLE	Nº DE CASOS (Suero)	EXPRESIÓN DEL microARN 132-3p (Media ± EE)	P ; test de Kruskal-Wallis
ESTADIO	36		
A y B	20	0.27 ± 0.07	P = 0.896
C y D	16	0.32 ± 0.12	
T, tumor primario	36		
T1. T2. T3	11	0.31 ± 0.08	P = 0.836
T4	25	0.25 ± 0.09	
N, invasión de ganglios linfáticos	36		
N0	22	0.25 ± 0.06	P = 0.784
N1	8	0.26 ± 0.12	
N2	6	0.50 ± 0.26	
M, metástasis	36		
M0	33	0.31 ± 0.07	P = 0.187
M1	3	0.07 ± 0.07	
LOCALIZACIÓN DEL TUMOR	36		
Colon derecho	20	0.28 ± 0.07	P = 0.480
Colon izquierdo	8	0.18 ± 0.09	
Recto	8	0.44 ± 0.21	

Tabla 25. Expresión relativa del microARN 132-3p en suero y relación con las variables clínico-patológicas en pacientes con cáncer colorrectal. EE = Error estándar de la media.

El análisis de expresión en sueros no reveló ninguna asociación entre la expresión del microARN 132-3p y las variables consideradas.

Seguidamente, se procedió a la búsqueda de asociaciones entre la expresión del microARN 132-3p en tejidos colorrectales tumorales con las variables clínico-patológicas en pacientes afectados de CCR (Tabla 26).

VARIABLE	Nº DE CASOS (Tejido colorrectal tumoral)	EXPRESIÓN DEL microARN 132-3p (Media ± EE)	P ; test de Kruskal-Wallis
ESTADIO	20		
A y B	8	0.62 ± 0.10	P = 0.025
C y D	12	1.09 ± 0.17	
T, tumor primario	20		
T1. T2. T3	8	0.93 ± 0.15	P = 0.190
T4	12	0.86 ± 0.21	
N, invasión de ganglios linfáticos	20		
N0	10	0.73 ± 0.18	P = 0.090
N1	6	0.96 ± 0.07	
N2	4	1.22 ± 0.35	
M, metástasis	20		
M0	17	0.85 ± 0.12	P = 0.491
M1	3	1.16 ± 0.49	
LOCALIZACIÓN DEL TUMOR	20		
Colon derecho	15	0.80 ± 0.12	P = 0.308
Colon izquierdo	4	1.15 ± 0.34	
Recto	1	1.44	

Tabla 26. Expresión relativa del microARN 132-3p en tejidos colorrectales tumorales y relación con las variables clínico-patológicas en pacientes afectados de cáncer colorrectal. EE = Error estándar de la media.

De estos resultados, pudimos determinar que existen diferencias significativas en la expresión del microARN 132-3p en los tumores dependiendo del estadio de Dukes, correspondiendo a los estadios más tempranos una expresión relativa inferior en comparación con los estadios más avanzados (P = 0.025; test de Kruskal-Wallis).

Por último, se realizó el análisis para el microARN 132-3p en TAO (Tabla 27) y TAS (Tabla 28) de pacientes afectados de CCR, investigando posibles

Resultados

asociaciones con las variables clínico-patológicas de los casos de CCR incluidos en los protocolos de esta Tesis.

VARIABLE	Nº DE CASOS (TAO)	EXPRESIÓN DEL microARN 132-3p (Media ± EE)	P ; test de Kruskal-Wallis
ESTADIO	44		
A y B	25	1.79 ± 0.16	P = 0.260
C y D	19	1.55 ± 0.15	
T, tumor primario	44		
T1. T2. T3	9	1.59 ± 0.29	P = 0.631
T4	35	1.71 ± 0.12	
N, invasión de ganglios linfáticos	44		
N0	26	1.80 ± 0.16	P = 0.295
N1	12	1.64 ± 0.21	
N2	6	1.28 ± 0.20	
M, metástasis	44		
M0	39	1.69 ± 0.12	P = 0.618
M1	5	1.60 ± 0.37	
LOCALIZACIÓN DEL TUMOR	44		
Colon derecho	16	1.35 ± 0.18	P = 0.037
Colon izquierdo	13	1.79 ± 0.20	
Recto	15	1.94 ± 0.18	

Tabla 27. Expresión relativa del microARN 132-3p en tejidos adiposos omentales, y relación con las variables clínico-patológicas en pacientes con cáncer colorrectal. TAO = Tejido adiposo omental. EE = Error estándar de la media.

En este caso, pudimos observar que existen diferencias significativas en la expresión del microARN 132-3p en TAO dependiendo de la localización del tumor, siendo los pacientes con tumores de colon derecho los que menor expresión muestran de este microARN en el TAO, mientras que los pacientes con tumores de recto registraron los niveles de expresión más elevados en el TAO (P = 0.037; test de Kruskal-Wallis).

VARIABLE	Nº DE CASOS (TAS)	EXPRESIÓN DEL microARN 132-3p (Media ± EE)	P ; test de Kruskal-Wallis
ESTADIO	40		
A y B	24	1.39 ± 0.17	P = 0.009
C y D	16	0.85 ± 0.15	
T, tumor primario	40		
T1. T2. T3	9	0.97 ± 0.14	P = 0.686
T4	31	1.24 ± 0.15	
N, invasión de ganglios linfáticos	40		
N0	25	1.35 ± 0.17	P = 0.095
N1	10	0.83 ± 0.11	
N2	5	0.97 ± 0.45	
M, metástasis	40		
M0	38	1.19 ± 0.13	P = 0.664
M1	2	0.89 ± 0.41	
LOCALIZACIÓN DEL TUMOR	40		
Colon derecho	13	1.11 ± 0.26	P = 0.478
Colon izquierdo	13	1.32 ± 0.26	
Recto	14	1.10 ± 0.11	

Tabla 28. Expresión relativa del microARN 132-3p en tejidos adiposos subcutáneos, y relación con las variables clínico-patológicas en pacientes con cáncer colorrectal. TAS = Tejido adiposo subcutáneo. EE = Error estándar de la media.

En cuanto a los resultados del estudio de expresión del microARN 132-3p en TAS, se observó una disminución de la expresión de este microARN en el TAS de aquellos pacientes con cánceres de estadios de Dukes más avanzados en comparación con los de estadios más tempranos (P = 0.009; test de Kruskal-Wallis).

Seguidamente, se llevó a cabo el análisis para el microARN 143-3p, así como el estudio de la relación entre su expresión en sueros y tejidos de pacientes con CCR y las variables clínico-patológicas disponibles. A continuación se

Resultados

muestran los resultados obtenidos para los análisis de expresión en sueros (Tabla 29).

VARIABLE	Nº DE CASOS (Suero)	EXPRESIÓN DEL microARN 143-3p (Media ± EE)	P ; test de Kruskal-Wallis
ESTADIO	36		
A y B	20	0.42 ± 0.09	P = 0.080
C y D	16	0.20 ± 0.04	
T, tumor primario	36		
T1. T2. T3	11	0.31 ± 0.05	P = 0.618
T4	25	0.35 ± 0.14	
N, invasión de ganglios linfáticos	36		
N0	22	0.40 ± 0.08	P = 0.232
N1	8	0.18 ± 0.06	
N2	6	0.23 ± 0.06	
M, metástasis	36		
M0	33	0.34 ± 0.06	P = 0.103
M1	3	0.11 ± 0.06	
LOCALIZACIÓN DEL TUMOR	36		
Colon derecho	20	0.30 ± 0.05	P = 0.762
Colon izquierdo	8	0.36 ± 0.19	
Recto	8	0.32 ± 0.12	

Tabla 29. Expresión relativa del microARN 143-3p en sueros y relación con las variables clínico-patológicas en pacientes con cáncer colorrectal. EE = Error estándar de la media.

No pudimos, en este caso, determinar ninguna asociación significativa entre la expresión del microARN 143-3p en suero y las variables clínicas estudiadas.

Las relaciones encontradas entre la expresión del microARN 143-3p en tejidos colorrectales tumorales con las variables clínico-patológicas se muestran en la Tabla 30. A partir de los resultados que se obtuvieron, no se pudo establecer ninguna diferencia significativa.

VARIABLE	Nº DE CASOS (Tejido colorrectal tumoral)	EXPRESIÓN DEL microARN 143-3p (Media ± EE)	P ; test de Kruskal-Wallis
ESTADIO	20		
A y B	8	0.19 ± 0.04	P = 0.355
C y D	12	0.43 ± 0.18	
T, tumor primario	20		
T1. T2. T3	8	0.40 ± 0.18	P = 0.700
T4	12	0.24 ± 0.05	
N, invasión de ganglios linfáticos	20		
N0	10	0.39 ± 0.22	P = 0.622
N1	6	0.23 ± 0.06	
N2	4	0.35 ± 0.13	
M, metástasis	20		
M0	17	0.34 ± 0.13	P = 0.560
M1	3	0.31 ± 0.13	
LOCALIZACIÓN DEL TUMOR	20		
Colon derecho	15	0.23 ± 0.04	P = 0.330
Colon izquierdo	4	0.67 ± 0.55	
Recto	1	0.56	

Tabla 30. Expresión relativa del microARN 143-3p en tejidos colorrectales tumorales y relación con las variables clínico-patológicas en pacientes con cáncer colorrectal. EE = Error estándar de la media.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos en los análisis de expresión del microARN 143-3p en TAO (Tabla 31) y TAS (Tabla 32), y las correspondientes asociaciones con las variables clínico-patológicas de los CCRs.

VARIABLE	Nº DE CASOS (TAO)	EXPRESIÓN DEL microARN 143-3p (Media ± EE)	P ; test de Kruskal-Wallis
ESTADIO	44		
A y B	25	1.45 ± 0.13	P = 0.250
C y D	19	1.24 ± 0.15	
T, tumor primario	44		
T1. T2. T3	9	1.74 ± 0.19	P = 0.053
T4	35	1.26 ± 0.11	
N, invasión de ganglios linfáticos	44		
N0	26	1.42 ± 0.12	P = 0.677
N1	12	1.27 ± 0.21	
N2	6	1.24 ± 0.25	
M, metástasis	44		
M0	39	1.42 ± 0.10	P = 0.054
M1	5	0.81 ± 0.12	
LOCALIZACIÓN DEL TUMOR	44		
Colon derecho	16	1.46 ± 0.18	P = 0.723
Colon izquierdo	13	1.37 ± 0.19	
Recto	15	1.24 ± 0.14	

Tabla 31. Expresión relativa del microARN 143-3p en tejidos adiposos omentales, y relación con las variables clínico-patológicas en pacientes con cáncer colorrectal. TAO = Tejido adiposo omental. EE = Error estándar de la media.

De los datos de expresión del microARN 143-3p en TAO se observó un descenso, que se acercaba a la significación estadística, en los niveles de expresión de este microARN en TAO cuando los tumores colorrectales presentaban mayor grado de invasión local, determinado por el descriptor T (P = 0.053; test de Kruskal-Wallis). También se observó un descenso en la expresión del microARN, al borde de la significación estadística, en los TAO de pacientes con CCR que presentaban metástasis en el momento del diagnóstico (P = 0.054; test de Kruskal-Wallis).

VARIABLE	Nº DE CASOS (TAS)	EXPRESIÓN DEL microARN 143-3p (Media ± EE)	P ; test de Kruskal-Wallis
ESTADIO	40		
A y B	24	1.90 ± 0.41	P = 0.075
C y D	16	1.12 ± 0.13	
T, tumor primario	40		
T1. T2. T3	9	1.45 ± 0.32	P = 0.783
T4	31	1.63 ± 0.32	
N, invasión de ganglios linfáticos	40		
N0	25	1.85 ± 0.40	P = 0.356
N1	10	1.06 ± 0.11	
N2	5	1.32 ± 0.36	
M, metástasis	40		
M0	38	1.62 ± 0.27	P = 0.264
M1	2	0.89 ± 0.08	
LOCALIZACIÓN DEL TUMOR	40		
Colon derecho	13	1.81 ± 0.75	P = 0.239
Colon izquierdo	13	1.39 ± 0.21	
Recto	14	1.57 ± 0.20	

Tabla 32. Expresión relativa del microARN 143-3p en tejidos adiposos subcutáneos, y relación con las variables clínico-patológicas en pacientes con cáncer colorrectal. TAS = Tejido adiposo subcutáneo. EE = Error estándar de la media.

Seguidamente, se procedió al análisis de la expresión del microARN 143-3p en TAS. Se observó un descenso en la expresión de este microARN, al borde de la significación estadística, en el TAS de pacientes con tumores de estadios de Dukes más avanzados (P = 0.075; test de Kruskal-Wallis).

Finalmente, se buscaron asociaciones entre la expresión del microARN 181a-5p, en pacientes con CCR, y las variables clínico-patológicas objeto de estudio. Se comenzó con los análisis de expresión del microARN 181a-5p en sueros (Tabla 33).

VARIABLE	Nº DE CASOS (Suero)	EXPRESIÓN DEL microARN 181a-5p (Media ± EE)	P ; test de Kruskal-Wallis
ESTADIO	36		
A y B	20	2.03 ± 0.81	P = 0.535
C y D	16	1.15 ± 0.34	
T, tumor primario	36		
T1. T2. T3	11	1.14 ± 0.23	P = 0.904
T4	25	2.77 ± 1.45	
N, invasión de ganglios linfáticos	36		
N0	22	1.87 ± 0.74	P = 0.816
N1	8	1.66 ± 0.63	
N2	6	0.75 ± 0.20	
M, metástasis	36		
M0	33	1.75 ± 0.51	P = 0.198
M1	3	0.39 ± 0.21	
LOCALIZACIÓN DEL TUMOR	36		
Colon derecho	20	1.36 ± 0.47	P = 0.434
Colon izquierdo	8	2.80 ± 1.81	
Recto	8	0.16 ± 0.23	

Tabla 33. Expresión relativa del microARN 181a-5p en sueros y relación con las variables clínico-patológicas en pacientes con cáncer colorrectal. EE = Error estándar de la media.

De acuerdo con los resultados obtenidos, no se observaron diferencias significativas en la expresión del microARN 181a-5p en sueros en relación con las distintas variables clínico-patológicas. En la Tabla 34 se incluyen los resultados encontrados al relacionar la expresión de este microARN en tejidos colorrectales tumorales con las mismas variables. Tampoco se observaron en este caso diferencias significativas en la expresión del microARN 181a-5p en tejidos colorrectales tumorales en relación con las variables clínicas del estudio.

VARIABLE	Nº DE CASOS (Tejido colorrectal tumoral)	EXPRESIÓN DEL microARN 181a-5p (Media ± EE)	P ; test de Kruskal-Wallis
ESTADIO	20		
A y B	8	0.83 ± 0.18	P = 0.487
C y D	12	1.09 ± 0.19	
T, tumor primario	20		
T1. T2. T3	8	0.99 ± 0.16	P = 0.758
T4	12	0.98 ± 0.25	
N, invasión de ganglios linfáticos	20		
N0	10	0.91 ± 0.18	P = 0.628
N1	6	0.92 ± 0.22	
N2	4	1.26 ± 0.41	
M, metástasis	20		
M0	17	0.89 ± 0.12	P = 0.153
M1	3	1.53 ± 0.54	
LOCALIZACIÓN DEL TUMOR	20		
Colon derecho	15	0.93 ± 0.15	P = 0.751
Colon izquierdo	4	1.13 ± 0.38	
Recto	1	1.21	

Tabla 34. Expresión relativa del microARN 181a-5p en tejidos colorrectales tumorales y relación con las variables clínico-patológicas en pacientes con cáncer colorrectal. EE = Error estándar de la media.

El análisis de la expresión del microARN 181a-5p en TAO (Tabla 35) y TAS (Tabla 36) y su relación con las variables clínico-patológicas de interés se muestran a continuación.

VARIABLE	Nº DE CASOS (TAO)	EXPRESIÓN DEL microARN 181a-5p (Media ± EE)	P ; test de Kruskal-Wallis
ESTADIO	44		
A y B	25	1.14 ± 0.08	P = 0.749
C y D	19	1.12 ± 0.11	
T, tumor primario	44		
T1. T2. T3	9	0.99 ± 0.10	P = 0.375
T4	35	1.17 ± 0.08	
N, invasión de ganglios linfáticos	44		
N0	26	1.14 ± 0.08	P = 0.895
N1	12	1.10 ± 0.15	
N2	6	1.15 ± 0.22	
M, metástasis	44		
M0	39	1.17 ± 0.07	P = 0.134
M1	5	0.85 ± 0.11	
LOCALIZACIÓN DEL TUMOR	44		
Colon derecho	16	1.14 ± 0.10	P = 0.400
Colon izquierdo	13	1.25 ± 0.14	
Recto	15	1.02 ± 0.11	

Tabla 35. Expresión relativa del microARN 181a-5p en tejidos adiposos omentales, y relación con las variables clínico-patológicas en pacientes con cáncer colorrectal. TAO = Tejido adiposo omental. EE = Error estándar de la media.

En el caso de los TAO, no se encontraron diferencias significativas en la expresión del microARN 181a-5p considerando las variables clínico-patológicas de los tumores de pacientes con CCR.

VARIABLE	Nº DE CASOS (TAS)	EXPRESIÓN DEL microARN 181a-5p (Media ± EE)	P ; test de Kruskal-Wallis
ESTADIO	40		
A y B	24	1.55 ± 0.17	P = 0.068
C y D	16	1.15 ± 0.11	
T, tumor primario	40		
T1. T2. T3	9	1.42 ± 0.21	P = 0.616
T4	31	1.38 ± 0.13	
N, invasión de ganglios linfáticos	40		
N0	25	1.52 ± 0.16	P = 0.301
N1	10	1.11 ± 0.10	
N2	5	1.25 ± 0.29	
M, metástasis	40		
M0	38	1.41 ± 0.12	P = 0.352
M1	2	0.96 ± 0.22	
LOCALIZACIÓN DEL TUMOR	40		
Colon derecho	13	1.28 ± 0.37	P = 0.392
Colon izquierdo	13	1.50 ± 0.15	
Recto	14	1.30 ± 0.15	

Tabla 36. Expresión relativa del microARN 181a-5p en tejidos adiposos subcutáneos, y relación con las variables clínico-patológicas en pacientes con cáncer colorrectal. TAS = Tejido adiposo subcutáneo. EE = Error estándar de la media.

En TAS, se detectó un descenso en la expresión del microARN 181a-5p, acercándose a la significación estadística, en el TAS de pacientes con tumores en estadios de Dukes más avanzados (P = 0.068; test de Kruskal-Wallis).

2. ESTUDIOS DE FUNCIÓN TELOMÉRICA: RELACIÓN CON LA EXPRESIÓN DE MICROARNS.

2.1. Ensayo de validación del análisis de longitud telomérica por qRT-PCR.

Uno de los objetivos de la presente Tesis consiste en analizar la relevancia de la función telomérica en relación con el CCR, el IMC y con la expresión de los microARNS que se estudian. Para el análisis de longitud telomérica en tejidos colorrectales y adiposos mediante qRT-PCR, primero se realizó un ensayo de validación de la técnica mediante la comparación de los valores de acortamiento telomérico en las muestras tumorales, medido como ratio T/N, tanto por qRT-PCR como por *Southern Blot*. El valor del ratio T/N mediante *Southern Blot* se pudo obtener a través de la determinación de la longitud media de los fragmentos teloméricos (TRF, *Telomere Restriction Fragments*) en muestras colorrectales tumorales y no tumorales, y dividiendo el valor obtenido en la muestra tumoral por el valor obtenido en la muestra no tumoral. Los telómeros de los tejidos colorrectales tumorales medidos mediante esta técnica presentaron telómeros más cortos que sus parejas no tumorales (Tumoral = 5.44 kb \pm 0.48 kb; No tumoral = 8.56 kb \pm 0.90 kb).

Para la obtención del ratio T/N mediante qRT-PCR, primero se procedió a la obtención de los ratios T/S tal como se explica en la sección de Materiales y Métodos para las muestras colorrectales tumorales y no tumorales, tras lo cual se obtuvo el ratio T/N mediante la división del ratio T/S de cada una de las muestras tumorales entre el ratio T/S de su pareja no tumoral. En este caso, los telómeros colorrectales tumorales también presentaron telómeros más cortos que su pareja no tumoral (Tumoral = 1.49 \pm 0.25; No tumoral = 2.01 \pm 0.47).

Para llevar a cabo este ensayo, se seleccionaron 12 parejas de muestras colorrectales tumorales y no tumorales de pacientes afectados de CCR, analizando la posible existencia de correlaciones entre los resultados obtenidos por las dos metodologías que se indican (Figura 27).

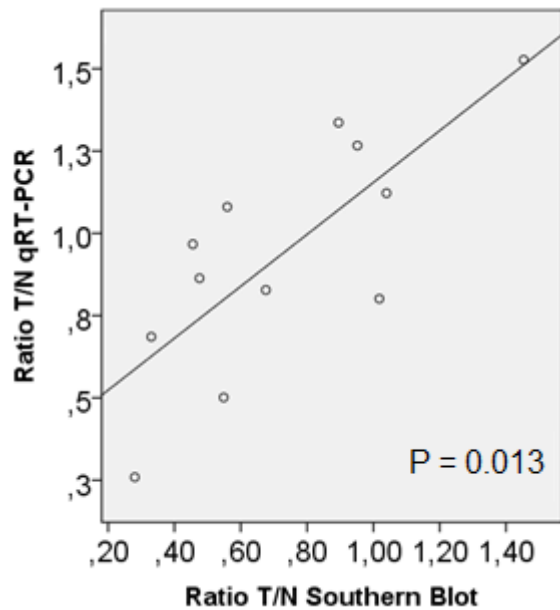


Figura 27. Correlación del ratio de acortamiento telomérico tumoral (ratio T/N) medido por qRT-PCR y por Southern Blot.

Este ensayo de validación mostró una correlación positiva y estadísticamente significativa ($P = 0.013$; coeficiente de correlación de Spearman = 0.692) entre ambas variables (Figura 27). Por ello, determinamos que el uso de la técnica de la qRT-PCR para el análisis de la longitud telomérica podía emplearse tanto para el estudio de tejidos colorrectales como de tejidos adiposos.

Resultados

2.2. Longitud telomérica en tumores colorrectales y relación con las variables clínico-patológicas.

Dada la relevancia de la longitud telomérica en el desarrollo y progresión del cáncer colorrectal, se procedió a la búsqueda de posibles asociaciones entre la longitud de los telómeros de los tejidos colorrectales tumorales y las variables clínico-patológicas consideradas. Asimismo, se analizó el impacto del grado de acortamiento telomérico del tejido colorrectal tumoral en relación con dichas variables. Para ello, se utilizaron los datos de las longitudes teloméricas relativas (ratio T/S) obtenidas mediante qRT-PCR en hasta un total de 21 muestras colorrectales tumorales, y un total de 23 muestras colorrectales no tumorales (Tabla 37).

VARIABLE	Nº DE CASOS (Tejido colorrectal tumoral)	LONGITUD TELOMÉRICA RELATIVA (Media ± EE)	P ; Test de Kruskal- Wallis
ESTADIO	21		
A	0		
B	8	1.53 ± 0.38	
C	7	1.17 ± 0.32	P = 0.809
D	6	1.82 ± 0.62	
T, tumor primario	21		
T3	13	1.00 ± 0.21	
			P = 0.020
T4	8	2.29 ± 0.43	
N, invasión de ganglios linfáticos	21		
N0	10	1.73 ± 0.40	
N1	7	1.12 ± 0.34	P = 0.818
N2	4	1.55 ± 0.66	
M, metástasis	21		
M0	18	1.51 ± 0.26	
			P = 0.841
M1	3	1.40 ± 0.89	
LOCALIZACIÓN DEL TUMOR	21		
Colon derecho	14	1.92 ± 0.31	
Colon izquierdo	6	0.67 ± 0.09	P = 0.089
Recto	1	0.45	

Tabla 37. Longitudes teloméricas relativas medidas como ratio T/S en tejidos colorrectales tumorales y su relación con variables clínico-patológicas en pacientes con cáncer colorrectal. EE = Error estándar de la media.

A partir de los datos obtenidos, se observó una asociación significativa entre la longitud telomérica tumoral y el grado de invasión local del tumor, teniendo los tumores T3 una longitud telomérica tumoral inferior a la de los tumores T4 (P = 0.020; test de Mann-Whitney U). Además, se observaron longitudes teloméricas más largas en tumores localizados en el colon derecho, con diferencias en este caso al borde de la significación estadística (P = 0.089; test de Mann-Whitney U).

Resultados

A continuación, se intentó determinar si el grado de acortamiento telomérico tumoral, determinado como ratio T/N, tenía alguna relación con las variables clínico-patológicas de los cánceres colorrectales. Se utilizó para ello el máximo número de parejas de tejidos tumorales y no tumorales disponibles, que corresponden a un total de 21 pacientes (Tabla 38):

VARIABLE	Nº DE CASOS	RATIO T/N (Media ± EE)	P ; Test de Kruskal- Wallis
ESTADIO	21		
A	0		
B	8	0.85 ± 0.14	P = 0.700
C	7	0.94 ± 0.11	
D	6	1.49 ± 0.80	
T, tumor primario	21		
T3	13	0.82 ± 0.08	P = 0.469
T4	8	1.47 ± 0.59	
N, invasión de ganglios linfáticos	21		
N0	10	1.36 ± 0.47	P = 0.604
N1	7	0.81 ± 0.10	
N2	4	0.75 ± 0.10	
M, metástasis	21		
M0	18	1.10 ± 0.27	P = 0.763
M1	3	0.83 ± 0.02	
LOCALIZACIÓN DEL TUMOR	21		
Colon derecho	14	1.13 ± 0.35	P = 0.613
Colon izquierdo	6	0.95 ± 0.12	
Recto	1	0.89	

Tabla 38. Acortamiento telomérico relativo en los tejidos colorrectales tumorales respecto a los no tumorales, medido como ratio T/N, y su relación con las variables clínico-patológicas en pacientes con cáncer colorrectal. EE = Error estándar de la media.

Para el análisis del grado de acortamiento telomérico tumoral, medido como ratio T/N, no se pudo establecer ninguna asociación significativa con las variables clínico-patológicas del estudio.

Seguidamente, se buscaron posibles asociaciones entre el acortamiento telomérico tumoral (ratio T/N inferior a 1; Tabla 39) o el acortamiento telomérico tumoral significativo (ratio T/N inferior o igual a 0.8; Tabla 40) con estas variables.

VARIABLE	ACORTAMIENTO TELOMÉRICO (RATIO T/N < 1)	MANTENIMIENTO TELOMÉRICO (RATIO T/N ≥ 1)	P ; test de Chi cuadrado
ESTADIO	15	6	
B	5	3	
C	5	2	P = 0.694
D	5	1	
T, tumor primario	15	6	
T3	10	3	
			P = 0.631
T4	5	3	
N, invasión de ganglios linfáticos	15	6	
N0	5	5	
N1	6	1	P = 0.103
N2	4	0	
M, metástasis	15	6	
M0	12	6	
			P = 0.237
M1	3	0	
LOCALIZACIÓN DEL TUMOR	15	6	
Colon derecho	11	3	
Colon izquierdo	3	3	P = 0.350
Recto	1	0	

Tabla 39. Asociación entre acortamiento o mantenimiento telomérico y las variables clínico-patológicas en tumores de pacientes con cáncer colorrectal.

Resultados

El análisis del acortamiento telomérico tumoral no reveló la existencia de ninguna asociación significativa con las variables clínico-patológicas estudiadas (Tabla 39).

En el estudio de las posibles asociaciones entre variables clínico-patológicas y el acortamiento telomérico significativo en tumores, que se muestra en la Tabla 40, tampoco se detectaron diferencias significativas.

VARIABLE	ACORTAMIENTO TELOMÉRICO (RATIO T/N ≤ 0.8)	MANTENIMIENTO TELOMÉRICO (RATIO T/N > 0.8)	P ; test de Chi cuadrado
ESTADIO	6	15	
B	3	5	
C	1	6	P = 0.583
D	2	4	
T, tumor primario	6	15	
T3	4	9	
			P = 0.776
T4	2	6	
N, invasión de ganglios linfáticos	6	15	
N0	3	7	
N1	2	5	P = 0.983
N2	1	3	
M, metástasis	6	15	
M0	6	12	
			P = 0.237
M1	0	3	
LOCALIZACIÓN DEL TUMOR	6	15	
Colon derecho	5	9	
Colon izquierdo	1	5	P = 0.558
Recto	0	1	

Tabla 40. Asociación entre acortamiento telomérico significativo y las variables clínico-patológicas en tumores de pacientes con cáncer colorrectal.

2.3. Longitud telomérica en tumores colorrectales y relación con la expresión de microARNs.

Se continuó con la búsqueda de relaciones entre la longitud telomérica en tejidos colorrectales tumorales y no tumorales y la expresión de los microARNs analizados en esta Tesis. Para llevar a cabo el análisis de correlaciones, se consideraron los datos de las longitudes teloméricas relativas, medidas por q-RT-PCR y determinadas como ratios T/S, y los resultados de expresión relativa de los microARNs de interés en los tejidos correspondientes.

Se comenzó con el estudio de los tejidos colorrectales tumorales, para el que se incluyó un total de 19 muestras (Figura 28).

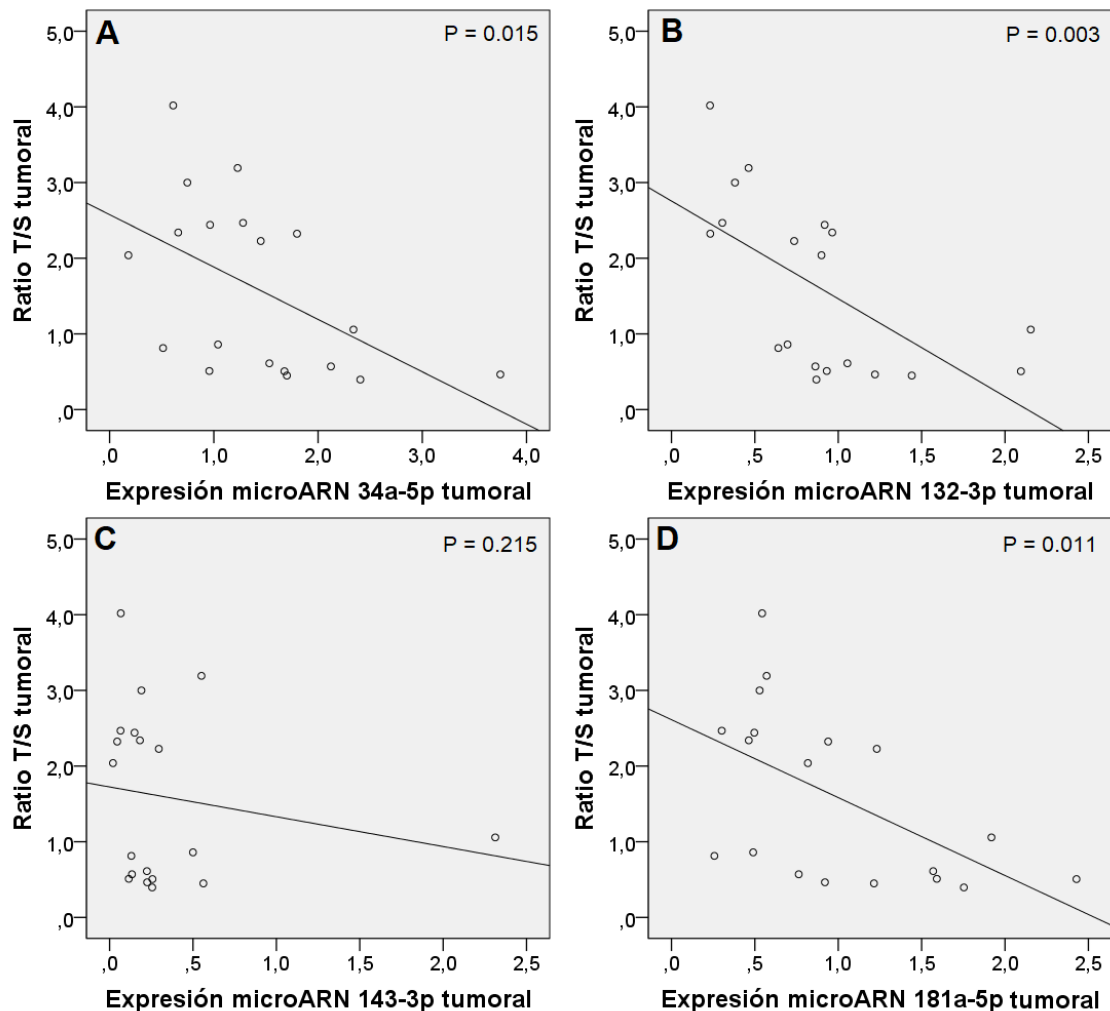


Figura 28. Correlaciones entre longitudes teloméricas relativas y niveles de expresión de los microARNs 34a-5p (A), 132-3p (B), 143-3p (C) y 181a-5p (D) en tejidos colorrectales tumorales.

Resultados

De los resultados obtenidos se pudo observar que tres de los microARNs estudiados en tejidos tumorales mostraron una correlación estadísticamente significativa e inversa con la longitud telomérica tumoral relativa, medida como ratio T/S. Concretamente, se correlacionaron significativamente los microARNs: 34a-5p ($P = 0.015$; coeficiente de correlación de Spearman = -0.551), 132-3p ($P = 0.003$; coeficiente de correlación de Spearman = -0.644) y 181a-5p ($P = 0.011$; coeficiente de correlación de Spearman = -0.567). En cambio, el microARN 143-3p, a pesar de presentar también una tendencia negativa en la correlación, no mostró significación estadística suficiente para asociar ambas variables ($P = 0.215$).

Se prosiguió con el análisis en tejidos colorrectales no tumorales. Para ello se obtuvieron los datos de longitud telomérica relativa y de expresión de microARNs en un total de 22 muestras (Figura 29). Únicamente se detectó correlación entre la longitud telomérica no tumoral y la expresión del microARN 181a-5p ($P = 0.035$; coeficiente de correlación de Spearman = -0.451).

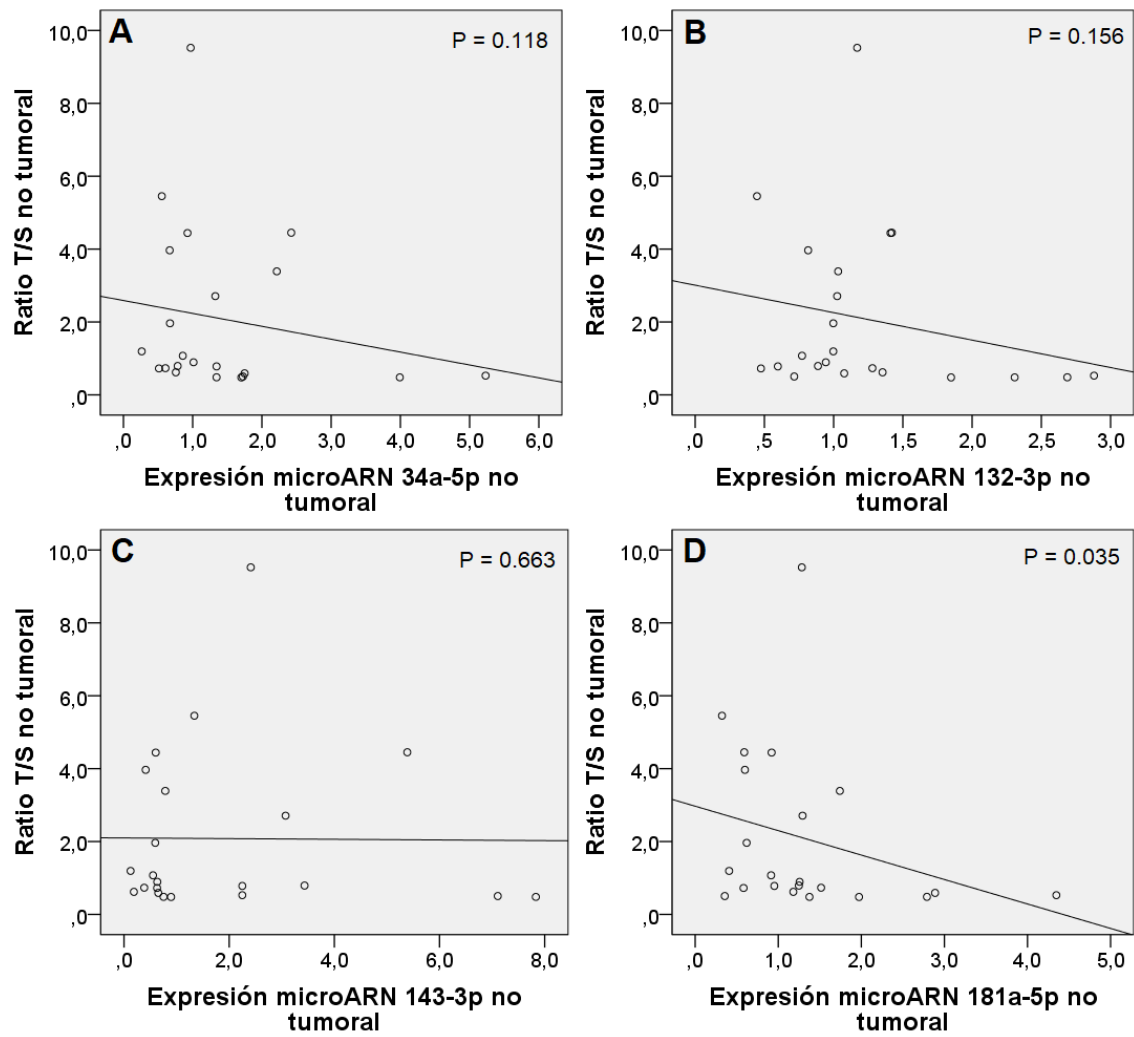


Figura 29. Correlaciones entre longitudes teloméricas relativas y niveles de expresión de los microARNs 34a-5p (A), 132-3p (B), 143-3p (C) y 181a-5p (D) en tejidos colorrectales no tumorales.

Resultados

2.4. Longitud telomérica en tejidos adiposos y relación con el cáncer colorrectal.

Dada la relevancia que tiene la longitud telomérica en procesos de senescencia celular, disfunción tisular y en procesos tumorigénicos, se exploró la posible asociación entre el CCR y la presencia de alteraciones en la función telomérica de los tejidos adiposos omentales o subcutáneos considerados en este trabajo. Para ello, se analizaron las longitudes teloméricas de tejidos adiposos de pacientes con CCR y de individuos control (Figura 30). Este estudio no reveló diferencias significativas entre los grupos considerados.

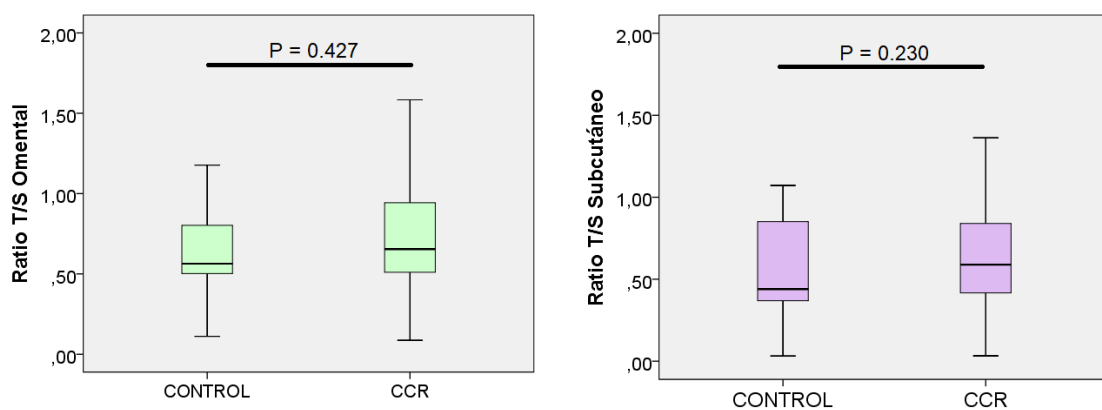


Figura 30. Diagramas de cajas representando la longitud telomérica relativa en tejidos adiposos omentales y subcutáneos en pacientes con y sin CCR. Pueden observarse, en cada caso, la mediana, los cuartiles y los valores mínimos y máximos. CCR = Cáncer colorrectal.

2.5. Longitud telomérica en tejidos adiposos y relación con las variables clínico-patológicas.

A continuación, se relacionaron los resultados de longitud telomérica relativa obtenidos en TAO y TAS de pacientes afectados de CCR con las variables clínico-patológicas (Tabla 41 y Tabla 42, respectivamente).

VARIABLE	Nº DE CASOS (Tejido adiposo omental)	RATIO T/S (Media ± EE)	P ; test Mann-Whitney U
ESTADIO	47		
A	10	1.77 ± 0.09	
B	20	0.91 ± 0.13	
			P = 0.736
C	11	1.45 ± 0.76	
D	6	0.57 ± 0.14	
T, tumor primario	47		
T1	5	0.75 ± 0.16	
T2	11	0.79 ± 0.08	
			P = 0.403
T3	22	1.26 ± 0.39	
T4	9	0.56 ± 0.08	
N, invasión de ganglios linfáticos	47		
N0	31	0.84 ± 0.09	
N1	11	1.46 ± 0.76	P = 0.460
N2	5	0.61 ± 0.24	
M, metástasis	47		
M0	42	1.00 ± 0.21	
			P = 0.756
M1	5	0.63 ± 0.15	
LOCALIZACIÓN DEL TUMOR	47		
Colon derecho	17	0.62 ± 0.06	
Colon izquierdo	12	0.63 ± 0.07	P = 0.013
Recto	18	1.51 ± 0.46	

Tabla 41. Longitudes teloméricas relativas, medidas como ratio T/S, en tejidos adiposos omentales, y su relación con variables clínico-patológicas en pacientes con cáncer colorrectal. EE = Error estándar de la media.

Resultados

De los datos obtenidos en TAO, se observaron diferencias estadísticamente significativas en las longitudes teloméricas dependiendo de la localización del tumor, siendo detectadas longitudes teloméricas más largas en TAO de pacientes con tumores de recto ($P = 0.013$).

VARIABLE	Nº DE CASOS (Tejido adiposo subcutáneo)	RATIO T/S (Media±EE)	P ; test Mann- Whitney U
ESTADIO	46		
A	9	0.86 ± 0.19	
B	20	0.65 ± 0.08	
			P = 0.268
C	11	0.70 ± 0.09	
D	6	0.51 ± 0.17	
T, tumor primario	46		
T1	5	0.64 ± 0.16	
T2	10	0.76 ± 0.18	
			P = 0.141
T3	22	0.75 ± 0.08	
T4	9	0.45 ± 0.05	
N, invasión de ganglios linfáticos	46		
N0	30	0.72 ± 0.08	
N1	11	0.59 ± 0.10	
N2	5	0.69 ± 0.20	P = 0.743
M, metástasis	46		
M0	41	0.70 ± 0.06	
			P = 0.251
M1	5	0.56 ± 0.19	
LOCALIZACIÓN DEL TUMOR	46		
Colon derecho	16	0.48 ± 0.07	
Colon izquierdo	12	0.78 ± 0.11	P = 0.037
Recto	18	0.80 ± 0.10	

Tabla 42. Longitudes teloméricas relativas, medidas como ratio T/S, en tejidos adiposos subcutáneos, y su relación con variables clínico-patológicas en pacientes con cáncer colorrectal. EE = Error estándar de la media.

También se encontraron diferencias estadísticamente significativas al analizar la longitud telomérica en TAS dependiendo de la localización del tumor.

En este caso, se detectaron mayores longitudes teloméricas en TAS de pacientes con tumores de colon izquierdo o de recto ($P = 0.037$).

2.6. Longitud telomérica en tejidos adiposos y relación con la expresión de microARNs.

Seguidamente, se llevaron a cabo los análisis de función telomérica. Concretamente, se investigaron las longitudes teloméricas (medidas como ratios T/S) de TAO y TAS, y se estudiaron posibles asociaciones con los niveles de expresión de los microARNs objeto de estudio. Este análisis se realizó tanto en pacientes afectados de cáncer colorrectal como en individuos sin cáncer. En el caso del estudio en pacientes con CCR, se incluyeron hasta 73 muestras de TAO (Tabla 43) y 67 muestras de TAS (Tabla 44). En las siguientes Tablas se especifican los datos obtenidos.

microARN	Correlación entre la longitud telomérica relativa de tejidos adiposos omentales y la expresión de los microARNs	
	Coefficiente de correlación	P; Correlación de Spearman
34a-5p	0.281	P = 0.102
132-3p	0.029	P = 0.871
143-3p	0.070	P = 0.691
181a-5p	-0.131	P = 0.454

Tabla 43 Correlaciones entre las longitudes teloméricas en tejidos adiposos omentales y la expresión de los microARNs 34a-5p, 132-3p, 43-3p y 181a-5p en pacientes con cáncer colorrectal.

Resultados

microARN	Correlación entre la longitud telomérica relativa de tejidos adiposos subcutáneos y la expresión de los microARNs	
	Coefficiente de correlación	P; Correlación de Spearman
34a-5p	0.288	P = 0.110
132-3p	0.270	P = 0.135
143-3p	0.338	P = 0.059
181a-5p	0.042	P = 0.819

Tabla 44. Correlaciones entre las longitudes teloméricas en tejidos adiposos subcutáneos y la expresión de los microARNs 34a-5p, 132-3p, 43-3p y 181a-5p en pacientes con cáncer colorrectal.

A la vista de los resultados obtenidos en pacientes afectados de CCR, en el análisis de los TAO no se pudo determinar la existencia de ninguna correlación entre la longitud telomérica y la expresión de los microARNs analizados. En el caso del análisis de los TAS, se encontró una correlación positiva al borde de la significación estadística entre la longitud telomérica y la expresión del microARN 143-3p (P = 0.059; correlación de Spearman).

A continuación, se procedió a realizar el análisis en el grupo control sin cáncer, comparando la longitud telomérica relativa en los TAO, TAS y la expresión de los microARNs. Se incluyeron, en este caso, hasta 28 muestras de TAO (Tabla 45), y hasta 25 muestras de TAS (Tabla 46).

microARN	Correlación entre la longitud telomérica relativa de tejidos adiposos omentales y la expresión de los microARNs	
	Coefficiente de correlación	P; Correlación de Spearman
34a-5p	0.190	P = 0.333
132-3p	0.114	P = 0.562
143-3p	-0.200	P = 0.317
181a-5p	0.095	P = 0.631

Tabla 45. Correlaciones entre las longitudes teloméricas en tejidos adiposos omentales y la expresión de los microARNs 34a-5p, 132-3p, 43-3p y 181a-5p en sujetos sin cáncer colorrectal.

microARN	Correlación entre la longitud telomérica relativa de tejidos adiposos subcutáneos y la expresión de los microARNs	
	Coefficiente de correlación	P; Correlación de Spearman
34a-5p	0.025	P = 0.904
132-3p	-0.123	P = 0.559
143-3p	0.115	P = 0.583
181a-5p	0.048	P = 0.818

Tabla 46. Correlaciones entre las longitudes teloméricas en tejidos adiposos subcutáneos y la expresión de los microARNs 34a-5p, 132-3p, 43-3p y 181a-5p en sujetos sin cáncer colorrectal.

En base a los datos que se obtuvieron, no se pudo establecer ninguna correlación estadísticamente significativa entre la longitud telomérica de los TAO o TAS y la expresión de los microARNs analizados en el grupo control.

Resultados

2.7. Actividad telomerasa en tejidos adiposos y relación con las variables clínico-patológicas.

La actividad telomerasa fue analizada en TAO y TAS como parte del estudio de la función telomérica propuesto previamente. En primer lugar, se analizó la posible asociación entre la actividad telomerasa en tejidos adiposos y la afectación por CCR. Los análisis se realizaron tanto en TAO (Tabla 47), como en TAS (Tabla 48), cuyos resultados se presentan a continuación.

Grupo	ACTIVIDAD TELOMERASA EN TEJIDOS ADIPOSOS OMENTALES		P; test de Chi cuadrado
	Negativa	Positiva	
Grupo control	18	14	P = 0.204
Pacientes con CCR	35	15	

Tabla 47. Resumen de casos de positividad para actividad telomerasa en tejidos adiposos omentales de pacientes con y sin CCR. CCR = Cáncer colorrectal.

Como puede observarse, los resultados no fueron indicativos de diferencias significativas para la actividad telomerasa en TAO. Tampoco se observaron diferencias en el caso de los análisis realizados en los TAS.

Grupo	ACTIVIDAD TELOMERASA EN TEJIDOS ADIPOSOS SUBCUTÁNEOS		P; test de Chi cuadrado
	Negativa	Positiva	
Grupo control	24	4	P = 0.972
Pacientes con CCR	43	7	

Tabla 48. Resumen de casos de positividad para actividad telomerasa en tejidos adiposos subcutáneos de pacientes con y sin CCR. CCR = Cáncer colorrectal.

Seguidamente, se procedió a la búsqueda de asociaciones entre la actividad telomerasa en tejidos adiposos y las variables clínico-patológicas en pacientes con CCR. Para ello, se dispuso de hasta 50 TAO (Tabla 49) y TAS (Tabla 50). Se presentan a continuación los resultados obtenidos.

VARIABLE	ACTIVIDAD TELOMERASA EN TEJIDOS ADIPOSOS OMENTALES		P; test de Chi cuadrado
	NEGATIVA	POSITIVA	
SEXO	35	15	
Varón	15	13	
Mujer	20	2	P = 0.005
ESTADIO	35	15	
A	7	3	
B	14	8	
C	10	2	P = 0.689
D	4	2	
T, tumor primario	35	15	
T1	4	1	
T2	6	5	
T3	16	9	P = 0.527
T4	9	2	
N, invasión de ganglios linfáticos	35	15	
N0	21	11	
N1	10	2	P = 0.512
N2	4	2	
M, metástasis	35	15	
M0	31	4	
M1	14	1	P = 0.841
LOCALIZACIÓN DEL TUMOR	35	15	
Colon derecho	12	6	
Colon izquierdo	7	5	P = 1.000
Recto	16	4	

Tabla 49. Asociación entre la actividad telomerasa en tejidos adiposos omentales y las variables clínico-patológicas en pacientes con cáncer colorrectal.

Los datos obtenidos mostraron que existe una asociación estadísticamente significativa entre la actividad telomerasa en el TAO y el sexo de los pacientes, siendo el grupo del sexo masculino el que presenta una activación más frecuente de la enzima (P = 0.005; test de Chi cuadrado).

Resultados

En el caso de los TAS, no se encontraron asociaciones significativas entre la actividad telomerasa y las variables de estudio (Tabla 50).

VARIABLE	ACTIVIDAD TELOMERASA EN TEJIDOS ADIPOSOS SUBCUTÁNEOS		P; test de Chi cuadrado
	NEGATIVA	POSITIVA	
SEXO	43	7	P = 0.444
Varón	23	5	
Mujer	20	2	
ESTADIO	43	7	
A	8	2	P = 0.718
B	19	3	
C	10	2	
D	6	0	
T, tumor primario	43	7	P = 0.765
T1	5	0	
T2	9	2	
T3	20	3	
T4	9	2	
N, invasión de ganglios linfáticos	43	7	
N0	28	5	P = 0.777
N1	11	1	
N2	4	1	
M, metástasis	43	7	P = 1.000
M0	38	5	
M1	7	0	
LOCALIZACIÓN DEL TUMOR	43	7	P = 0.547
Colon derecho	16	2	
Colon izquierdo	10	3	
Recto	17	2	

Tabla 50. Asociación entre la actividad telomerasa en tejidos adiposos subcutáneos y las variables clínico-patológicas en pacientes con cáncer colorrectal.

2.8. Actividad telomerasa en tejidos adiposos y relación con la expresión de microARNs.

El siguiente paso en nuestro estudio, fue determinar si existen asociaciones entre la actividad telomerasa en los TAO y TAS y la expresión de los microARNs de estudio, así como su relación con el CCR. Los datos de estos análisis para los controles sin CCR en TAO (Tabla 51) y TAS (Tabla 52) se detallan a continuación:

microARN	Expresión de los microARNs atendiendo a la positividad de la actividad telomerasa en TAO (Media ± EE)		P; test Mann-Whitney U
	NEGATIVA n = 16	POSITIVA n = 14	
34a-5p	1.50 ± 0.17	0.97 ± 0.13	P = 0.025
132-3p	2.14 ± 0.29	1.26 ± 0.22	P = 0.011
143-3p	1.84 ± 0.35	1.01 ± 0.28	P = 0.010
181a-5p	1.14 ± 0.34	1.11 ± 0.09	P = 0.056

Tabla 51. Asociación entre actividad telomerasa en tejidos adiposos omentales de individuos control y la expresión de los microARNs 34a-5p, 132-3p, 143-3p y 181a-5p. TAO = Tejidos adiposos omentales. EE = Error estándar de la media.

microARN	Expresión de los microARNs atendiendo a la positividad de la actividad telomerasa en TAS (Media ± EE)		P; test Mann-Whitney U
	NEGATIVA n = 20	POSITIVA n = 3	
34a-5p	1.40 ± 0.24	0.95 ± 0.33	P = 0.534
132-3p	1.43 ± 0.19	1.11 ± 0.11	P = 0.523
143-3p	1.29 ± 0.21	0.96 ± 0.08	P = 0.738
181a-5p	0.99 ± 0.09	0.68 ± 0.08	P = 0.121

Tabla 52. Asociación entre actividad telomerasa en tejidos adiposos subcutáneos de individuos sin cáncer colorrectal y la expresión de los microARNs 34a-5p, 132-3p, 143-3p y 181a-5p. TAS = Tejidos adiposos subcutáneos. EE = Error estándar de la media.

Resultados

En el grupo de individuos no afectados de CCR, observamos diferencias de expresión de los microARNs en los TAO entre los casos con actividad telomerasa positiva y negativa en este tejido. Se encontró una disminución en el grupo de actividad telomerasa positiva de la expresión de los microARNs: 34a-5p (P = 0.025; test de Mann-Whitney U), 132-3p (P = 0.011; test de Mann-Whitney U), 143-3p (P = 0.010; test de Mann-Whitney U) y 181a-5p (P = 0.056; test de Mann-Whitney U).

En el caso del análisis de la actividad telomerasa en los TAS, no se apreciaron diferencias significativas en la expresión de los microARNs (Tabla 52), posiblemente debido al reducido número de muestras con actividad telomerasa positiva, ya que sólo 3 de ellas mostraron activación de la enzima.

Se procedió con el análisis en pacientes afectados de CCR. Los resultados obtenidos al relacionar los datos de actividad telomerasa en TAO (Tabla 53) y TAS (Tabla 54) de sujetos con CCR y los niveles de expresión de los microARNs considerados en este trabajo, se detallan a continuación.

microARN	Expresión de los microARNs atendiendo a la positividad de la actividad telomerasa en TAO (Media ± EE)		P; test Mann-Whitney U
	NEGATIVA	POSITIVA	
	n = 27	n = 10	
34a-5p	1.35 ± 0.14	1.18 ± 0.14	P = 0.811
132-3p	1.85 ± 0.14	1.47 ± 0.23	P = 0.194
143-3p	1.33 ± 0.12	1.35 ± 0.22	P = 0.824
181a-5p	1.15 ± 0.10	1.03 ± 0.07	P = 0.918

Tabla 53. Asociación entre la actividad telomerasa en tejidos adiposos omentales en pacientes con cáncer colorrectal y la expresión de los microARNs 34a-5p, 132-3p, 143-3p y 181a-5p. TAO = Tejidos adiposos omentales. EE = Error estándar de la media.

microARN	Expresión de los microARNs atendiendo a la positividad de la actividad telomerasa en TAS (Media \pm EE)		P; test Mann-Whitney U
	NEGATIVA n = 32	POSITIVA n = 3	
34a-5p	0.96 \pm 0.12	0.88 \pm 0.18	P = 0.814
132-3p	1.18 \pm 0.13	0.72 \pm 0.18	P = 0.239
143-3p	1.37 \pm 0.13	0.89 \pm 0.08	P = 0.251
181a-5p	1.33 \pm 0.10	1.10 \pm 0.17	P = 0.596

Tabla 54. Asociación entre la actividad telomerasa en tejidos adiposos subcutáneos en pacientes con cáncer colorrectal y la expresión de los microARNs 34a-5p, 132-3p, 143-3p y 181a-5p. TAS = Tejidos adiposos subcutáneos. EE = Error estándar de la media.

Como se deduce de los resultados obtenidos, en el grupo de pacientes afectados de CCR, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de expresión de los microARNs y la actividad telomerasa en tejidos adiposos.

3. ÍNDICE DE MASA CORPORAL: RELACIÓN CON LA EXPRESIÓN DE MICROARNS Y CON PARÁMETROS DE FUNCIÓN TELOMÉRICA EN PACIENTES CON Y SIN CÁNCER COLORRECTAL.

3.1. Relación entre el Índice de Masa Corporal y la expresión de los microARNs en pacientes con y sin cáncer colorrectal.

El siguiente objetivo de esta Tesis consistió en investigar posibles asociaciones entre el Índice de Masa Corporal (IMC) de los pacientes considerados y la expresión de los microARNs de interés, así como su relación con el CCR. Para ello, se dispuso de muestras de sueros, tejidos colorrectales tumorales y no tumorales, y TAO y TAS, de los pacientes con CCR y de los controles sin CCR, siempre que fue posible. Además, se clasificaron los grupos de pacientes de acuerdo con los datos de IMC en el momento en que se practicaron las cirugías, siendo los grupos de estudio: pacientes normopeso, pacientes sobrepeso y pacientes con obesidad.

De este modo, se analizó la relación entre los diferentes grupos de IMC y la expresión de los microARNs en suero y tejidos. Los resultados obtenidos en pacientes con CCR se detallan a continuación en la Tabla 55.

Suero/tejidos	Expresión de los microARNs en los distintos grupos de IMC (Cantidad relativa; media \pm EE)			P ; Test de Kruskal-Wallis
	Normopeso	Sobrepeso	Obesidad	
Sueros	n = 9	n = 15	n = 12	n = 36
34a-5p	0.69 \pm 0.35	0.95 \pm 0.40	0.54 \pm 0.16	P = 0.794
132-3p	0.47 \pm 0.10	0.25 \pm 0.12	0.22 \pm 0.08	P = 0.071
143-3p	0.31 \pm 0.07	0.33 \pm 0.12	0.32 \pm 0.06	P = 0.443
181a-5p	2.05 \pm 1.07	1.95 \pm 0.93	0.94 \pm 0.28	P = 0.544
Tejidos colorrectales tumorales	n = 5	n = 8	n = 7	n = 20
34a-5p	1.61 \pm 0.40	1.31 \pm 0.12	1.38 \pm 0.45	P = 0.497
132-3p	1.35 \pm 0.32	0.76 \pm 0.14	0.75 \pm 0.13	P = 0.398
143-3p	0.63 \pm 0.42	0.27 \pm 0.08	0.19 \pm 0.04	P = 0.606
181a-5p	1.63 \pm 0.28	0.90 \pm 0.18	0.62 \pm 0.09	P = 0.023
Tejidos colorrectales no tumorales	n = 6	n = 10	n = 8	n = 24
34a-5p	1.31 \pm 0.32	1.13 \pm 0.17	1.77 \pm 0.64	P = 0.922
132-3p	1.27 \pm 0.15	1.04 \pm 0.20	1.32 \pm 0.30	P = 0.275
143-3p	1.85 \pm 0.85	1.95 \pm 0.67	2.54 \pm 0.94	P = 0.958
181a-5p	1.34 \pm 0.38	1.09 \pm 0.23	1.43 \pm 0.44	P = 0.734
Tejidos adiposos omentales	n = 12	n = 16	n = 16	n = 44
34a-5p	1.26 \pm 0.19	1.40 \pm 0.22	1.29 \pm 0.16	P = 0.924
132-3p	2.07 \pm 0.24	1.29 \pm 0.14	1.18 \pm 0.18	P = 0.013
143-3p	1.48 \pm 0.21	1.54 \pm 0.15	1.08 \pm 0.14	P = 0.039
181a-5p	1.23 \pm 0.15	1.11 \pm 0.11	1.08 \pm 0.10	P = 0.698
Tejidos adiposos subcutáneos	n = 19	n = 19	n = 14	n = 40
34a-5p	1.29 \pm 0.40	1.02 \pm 0.21	0.92 \pm 0.13	P = 0.993
132-3p	1.56 \pm 0.32	0.82 \pm 0.10	1.21 \pm 0.16	P = 0.104
143-3p	2.55 \pm 0.78	1.14 \pm 0.15	1.21 \pm 0.13	P = 0.080
181a-5p	1.56 \pm 0.28	1.11 \pm 0.10	1.52 \pm 0.17	P = 0.186

Tabla 55. Asociación entre el Índice de Masa Corporal en pacientes con cáncer colorrectal y la expresión de los microARNs 34a-5p, 132-3p, 143-3p y 181a-5p en sueros, tejidos colorrectales tumorales y no tumorales, y tejidos adiposos omentales y subcutáneos. IMC = Índice de Masa Corporal. EE = Error estándar de la media.

En el caso de pacientes afectados de CCR, se observaron menores niveles en la expresión del microARN 132-3p en el suero de pacientes con

Resultados

obesidad ($P = 0.071$; test de Kruskal-Wallis). En los tejidos tumorales, se pudo observar la existencia de diferencias significativas en la expresión del microARN 181a-5p, siendo el grupo de pacientes normopeso el que mostró los mayores niveles de expresión ($P = 0.023$; test de Kruskal-Wallis). Además, se apreciaron diferencias de expresión en TAO para los microARNs 132-3p ($P = 0.013$; test de Kruskal-Wallis) y 143-3p ($P = 0.039$; test de Kruskal-Wallis), mostrando el primero mayores niveles de expresión en pacientes normopeso, y el segundo microARN menor expresión en pacientes con obesidad. Además, los datos indicaron que el microARN 143-3p muestra menores niveles de expresión en los TAS de pacientes con sobrepeso u obesidad ($P = 0.080$; test de Kruskal-Wallis).

Se procedió después a la búsqueda de asociaciones entre los grupos del IMC y la expresión de los microARNs en el grupo de sujetos sin cáncer. No se pudo realizar una evaluación de la expresión en suero debido a que el grupo control está integrado únicamente por individuos con obesidad. Los detalles de este análisis se recogen en la Tabla 56.

Tejido	Expresión de los microARNs en los distintos grupos de IMC (Cantidad relativa; media \pm EE)			P ; test Mann-Whitney U
	Normopeso	Sobrepeso	Obesidad	
Tejidos adiposos omentales	n = 0	n = 19	n = 22	n = 41
34a-5p		0.96 \pm 0.08	1.32 \pm 0.16	P = 0.150
132-3p		1.44 \pm 0.25	1.69 \pm 0.23	P = 0.239
143-3p		0.68 \pm 0.06	2.24 \pm 0.36	P < 0.001
181a-5p		1.22 \pm 0.11	1.47 \pm 0.38	P = 0.113
Tejidos adiposos subcutáneos	n = 0	n = 19	n = 19	n = 38
34a-5p		0.89 \pm 0.11	1.72 \pm 0.35	P = 0.015
132-3p		1.06 \pm 0.10	1.31 \pm 0.21	P = 0.389
143-3p		0.85 \pm 0.07	1.66 \pm 0.30	P = 0.002
181a-5p		1.16 \pm 0.10	1.03 \pm 0.12	P = 0.307

Tabla 56. Asociación entre el Índice de Masa Corporal en pacientes sin cáncer colorrectal y la expresión de los microARNs 34a-5p, 132-3p, 143-3p y 181a-5p en tejidos adiposos omentales y subcutáneos. IMC = Índice de Masa Corporal. EE = Error estándar de la media.

En el grupo de controles sin CCR, la expresión del microARN 143-3p aumenta significativamente en TAO de pacientes con obesidad ($P < 0.001$; test de Mann-Whitney U). Al analizar la expresión en los TAS, se observó un incremento significativo de los microARNs 34a-5p ($P = 0.015$; test de Mann-Whitney U) y 143-3p en los pacientes con obesidad ($P = 0.002$; test de Mann-Whitney U).

3.2. Relación entre el Índice de Masa Corporal y el acortamiento telomérico en tejidos tumorales colorrectales.

En la Tabla 57 se incluyen los resultados obtenidos al evaluar el acortamiento telomérico en tejidos tumorales de pacientes con CCR, en función de los diferentes grupos de IMC considerados.

VARIABLE	GRUPO DE ÍNDICE DE MASA CORPORAL			Test de Kruskal-Wallis
	Normopeso	Sobrepeso	Obesidad	
Nº DE CASOS	6	9	6	
RATIO T/N (Media ± EE)	0.75 ± 0.14	0.75 ± 0.09	1.84 ± 0.73	P = 0.019

Tabla 57. Grado relativo de acortamiento telomérico tumoral, medido como ratio T/N, en pacientes con cáncer colorrectal. EE = Error estándar de la media.

A partir de estos datos, se pudo determinar que los pacientes normopeso y sobrepeso poseen un grado de acortamiento telomérico tumoral relativo similar, en contraste con los pacientes con obesidad, que muestran un ratio T/N significativamente superior ($P = 0.019$; test de Kruskal-Wallis).

Se compararon a continuación los índices de acortamiento telomérico tumoral y acortamiento telomérico tumoral significativo (determinados como ratio T/N < 1 y ratio T/N ≤ 0.8 , respectivamente) con el grupo de IMC en pacientes con CCR. Los datos se resumen en la Tabla siguiente (Tabla 58).

ESTATUS TELOMÉRICO	GRUPO DE ÍNDICE DE MASA CORPORAL			P; test de Chi cuadrado
	Normopeso	Sobrepeso	Obesidad	
ACORTAMIENTO (RATIO T/N ≤ 1)	5	8	2	P = 0.049
MANTENIMIENTO (RATIO T/N > 1)	1	1	4	

Tabla 58. Asociación entre acortamiento telomérico en tumores colorrectales y los grupos de IMC. IMC = Índice de masa corporal.

De los resultados incluidos en la Tabla 58, para sujetos afectados de CCR, puede deducirse que los tumores de pacientes normopeso y sobrepeso acortan con mayor frecuencia los telómeros que los tumores de individuos con obesidad (P = 0.049; test de Chi cuadrado).

A continuación, se consideraron los datos de acortamiento telomérico tumoral significativo, datos que se relacionaron con los diferentes grupos de IMC. Como puede observarse en la Tabla 59, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en este caso.

ESTATUS TELOMÉRICO	GRUPO DE ÍNDICE DE MASA CORPORAL			P; test de Chi cuadrado
	Normopeso	Sobrepeso	Obesidad	
ACORTAMIENTO SIGNIFICATIVO (RATIO T/N ≤ 0.8)	3	3	0	P = 0.146
MANTENIMIENTO (RATIO T/N > 0.8)	3	6	6	

Tabla 59. Asociación entre acortamiento telomérico significativo en tumores colorrectales y los grupos de IMC. IMC = Índice de masa corporal.

3.3. Relación entre el Índice de Masa Corporal y la longitud telomérica de tejidos adiposos.

En primer lugar, se consideró el grupo de casos afectado de CCR. Las Tablas siguientes (Tabla 60 y Tabla 61) muestran los datos obtenidos en los TAO y en los TAS.

GRUPO DE ÍNDICE DEL MASA CORPORAL	Nº DE CASOS (TAO)	Longitud telomérica relativa (Media \pm error estándar)	Test de Kruskal-Wallis
	47		
NORMOPESO	13	0.68 \pm 0.11	P = 0.575
SOBREPESO	16	0.79 \pm 0.08	
OBESIDAD	18	1.32 \pm 0.47	

Tabla 60. Asociación entre el IMC y las longitudes teloméricas relativas de tejidos adiposos omentales en pacientes con cáncer colorrectal. IMC = Índice de masa corporal. TAO = Tejido adiposo omental.

No se apreciaron diferencias estadísticamente significativas en las longitudes teloméricas dependiendo del grupo de IMC, tanto en los análisis realizados en TAO (Tabla 60) como en los establecidos en TAS (Tabla 61).

GRUPO DE ÍNDICE DE MASA CORPORAL	Nº DE CASOS (TAS)	Longitud telomérica relativa (Media \pm error estándar)	Test de Kruskal-Wallis
	46		
NORMOPESO	13	0.79 \pm 0.15	P = 0.845
SOBREPESO	16	0.67 \pm 0.08	
OBESIDAD	17	0.61 \pm 0.08	

Tabla 61. Asociación entre el IMC y las longitudes teloméricas relativas de tejidos adiposos subcutáneos en pacientes con cáncer colorrectal. IMC = Índice de masa corporal. TAS = Tejido adiposo subcutáneo.

Se procedió a continuación con el análisis en el grupo de sujetos no afectados de CCR, estableciendo relaciones entre los valores de longitud

Resultados

telomérica en tejidos adiposos y los datos de IMC. Las siguientes Tablas detallan los resultados obtenidos para TAO (Tabla 62) y para TAS (Tabla 63).

GRUPO DE ÍNDICE DE MASA CORPORAL	Nº DE CASOS	Longitud telomérica relativa (Media \pm error estándar)	P ; test Mann-Whitney U
	30		
NORMOPESO	0		
SOBREPESO	17	0.93 \pm 0.22	P = 0.414
OBESIDAD	13	0.98 \pm 0.32	

Tabla 62. Asociación entre el IMC y las longitudes teloméricas relativas de tejidos adiposos omentales de individuos sin cáncer colorrectal. IMC = Índice de masa corporal.

La asociación entre el IMC y la longitud telomérica en tejidos adiposos no presentó diferencias estadísticamente significativas ni en los TAO (Tabla 62) ni en los TAS (Tabla 63).

GRUPO DE ÍNDICE DE MASA CORPORAL	Nº DE CASOS	Longitud telomérica relativa (Media \pm error estándar)	P ; test Mann-Whitney U
	30		
NORMOPESO	0		
SOBREPESO	17	0.84 \pm 0.23	P = 0.754
OBESIDAD	13	0.86 \pm 0.29	

Tabla 63. Asociación entre el IMC y las longitudes teloméricas relativas de tejidos adiposos subcutáneos de individuos sin cáncer colorrectal. IMC = Índice de masa corporal.

3.4. Relación entre el Índice de Masa Corporal y la actividad telomerasa en tejidos adiposos.

Seguidamente, se llevaron a cabo análisis para detectar posibles asociaciones entre el IMC y la actividad telomerasa en tejidos adiposos de pacientes afectados de CCR. Para ello, se investigó la actividad telomerasa en TAO y TAS de pacientes con CCR (Tabla 64 y Tabla 65, respectivamente), considerando los grupos de IMC establecidos. En ninguno de los casos se detectaron diferencias con significación estadística.

GRUPO DE ÍNDICE DE MASA CORPORAL	ACTIVIDAD TELOMERASA EN TEJIDOS ADIPOSOS OMENTALES		P ; test de Chi cuadrado
	NEGATIVA	POSITIVA	
	35	15	
NORMOPESO	9	4	P = 0.623
SOBREPESO	14	4	
OBESIDAD	12	7	

Tabla 64. Asociación entre el IMC y la actividad telomerasa en tejidos adiposos omentales en pacientes con cáncer colorrectal. IMC = Índice de masa corporal.

GRUPO DE ÍNDICE DE MASA CORPORAL	ACTIVIDAD TELOMERASA EN TEJIDOS ADIPOSOS SUBCUTÁNEOS		P ; test de Chi cuadrado
	NEGATIVA	POSITIVA	
	43	7	
NORMOPESO	13	1	P = 0.144
SOBREPESO	16	1	
OBESIDAD	14	5	

Tabla 65. Asociación entre el IMC y la actividad telomerasa en tejidos adiposos subcutáneos en pacientes con cáncer colorrectal. IMC = Índice de masa corporal.

Se investigaron también posibles asociaciones entre la actividad telomerasa de los TAO (Tabla 66) y de TAS (Tabla 67) con los datos de IMC, en el grupo de sujetos no afectado de CCR. Los resultados obtenidos se detallan a continuación:

GRUPO DE ÍNDICE DE MASA CORPORAL	ACTIVIDAD TELOMERASA EN TEJIDOS ADIPOSOS OMENTALES		P ; test de Chi cuadrado
	NEGATIVA	POSITIVA	
	18	14	
NORMOPESO	0	0	
SOBREPESO	3	12	P < 0.001
OBESIDAD	15	2	

Tabla 66. Asociación entre el IMC y la actividad telomerasa en tejidos adiposos omentales en sujetos sin cáncer colorrectal. IMC = Índice de masa corporal.

A partir de estos resultados, se detectaron diferencias estadísticamente significativas, siendo el grupo de sujetos con sobrepeso el que mostró mayor tasa de positividad para telomerasa en el TAO (P < 0.001; test de Chi cuadrado). Por otro lado, no se detectaron diferencias significativas cuando este mismo análisis se realizó en TAS (Tabla 67).

GRUPO DE ÍNDICE DE MASA CORPORAL	ACTIVIDAD TELOMERASA EN TEJIDOS ADIPOSOS SUBCUTÁNEOS		P ; test de Chi cuadrado
	NEGATIVA	POSITIVA	
	24	4	
NORMOPESO	0	0	
SOBREPESO	8	3	P = 0.269
OBESIDAD	16	1	

Tabla 67. Asociación entre el IMC y la actividad telomerasa en tejidos adiposos subcutáneos en sujetos sin cáncer colorrectal. IMC = Índice de masa corporal.

4. ESTUDIOS PRONÓSTICO EN PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL.

4.1. Estudios pronóstico en relación con las variables clínico-patológicas.

En relación con los estudios pronóstico, como queda recogido en la sección de Material y Métodos de esta Tesis, los datos de supervivencia se consideraron a partir del Intervalo Libre de Enfermedad (ILE), eliminando del estudio los casos que presentaron metástasis en el momento de la cirugía y aquellos que fallecieron en el periodo postoperatorio.

En primer lugar se llevaron a cabo los análisis de supervivencia en función de las variables clínico-patológicas disponibles. Las características de los pacientes considerados en este estudio se detallan en la Tabla 68.

VARIABLE	CASOS
SEXO	54
Varón	29
Mujer	25
EDAD	54
≤ 77.5 años	35
> 77.5 años	19
ESTADIO	54
A	12
B	26
C	16
DESCRIPTOR T	54
T1	5
T2	13
T3	25
T4	11
DESCRIPTOR N	54
N0	39
N1	10
N2	5
RECURRENCIA	54
SÍ	43
NO	11

Tabla 68. Resumen de las variables clínico-patológicas de los casos de cáncer colorrectal incluidos en los análisis de supervivencia.

A través de la aplicación digital *Cutoff Finder*, se estableció un punto de corte considerando la edad de los pacientes afectados de CCR. De esta forma, se pudieron diferenciar los casos con pronóstico favorable y desfavorable (Figura 31). Se detectaron diferencias, en este caso, al borde de la significación estadística ($P = 0.060$; test Log-Rank). Los pacientes con una edad inferior o igual a 77.5 años mostraron mayores intervalos libres de recurrencia de la enfermedad.

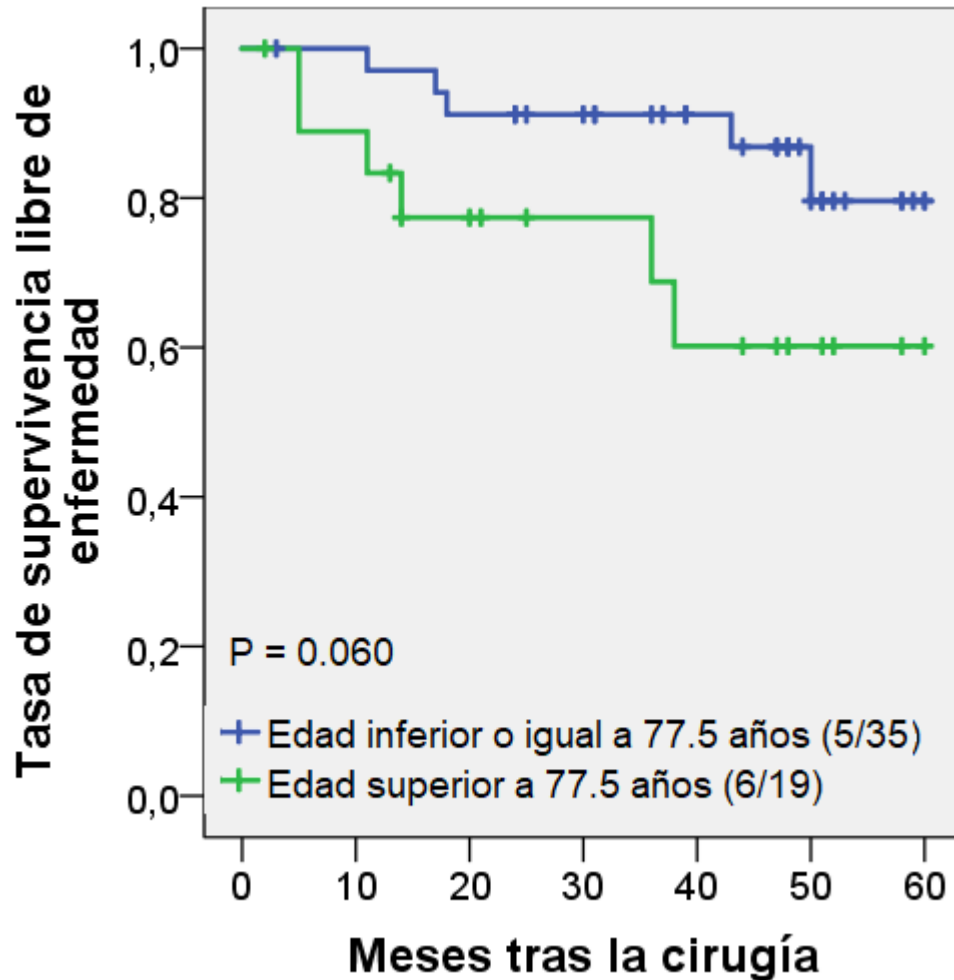


Figura 31. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier en función de la edad de los pacientes afectados de cáncer colorrectal. Entre paréntesis se incluye el número de casos con recurrencia tumoral frente al número total de casos en cada uno de los grupos.

Con respecto al estadio de Dukes, como era de esperar, el estudio mostró diferencias significativas entre los diferentes grupos de estudio. Los pacientes con mejor pronóstico (estadios A y B de Dukes) mostraron intervalos libres de enfermedad significativamente superiores a los de los pacientes con tumores de estadio C (Figura 32; $P = 0.015$; test Log-Rank).

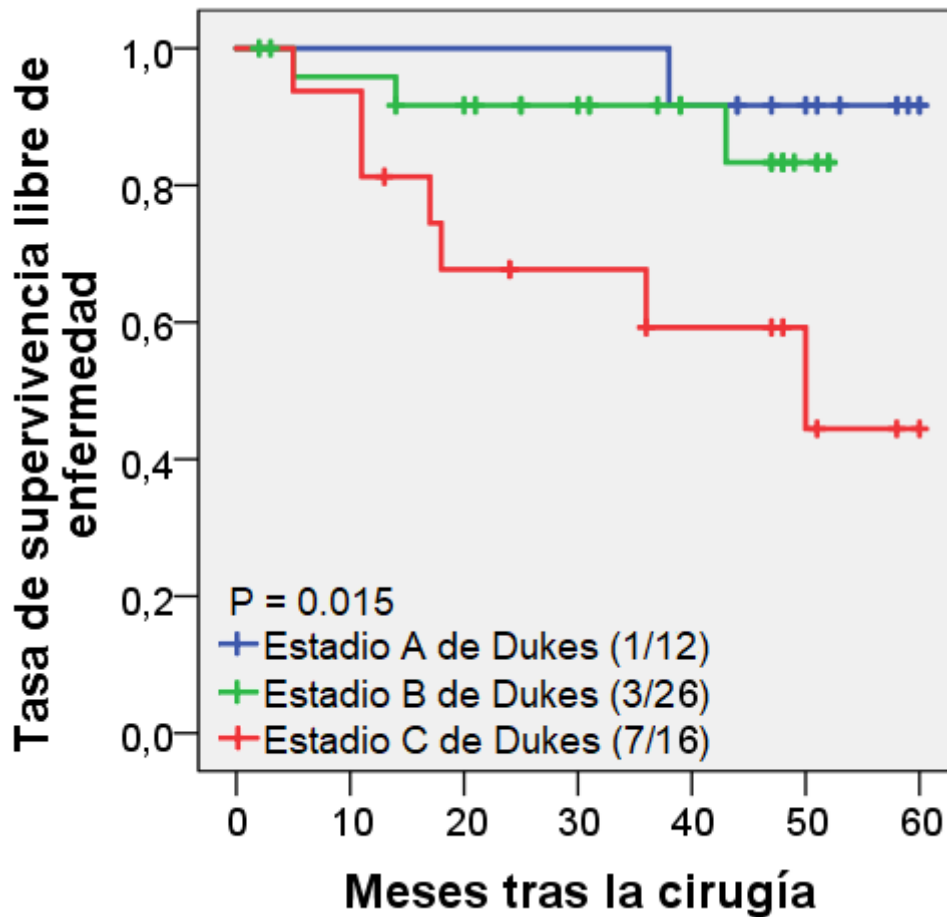


Figura 32. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier en función del estadio de Dukes. Entre paréntesis se incluye el número de casos con recurrencia tumoral frente al número total de casos en cada uno de los grupos.

El estudio pronóstico basado en el descriptor T se realizó agrupando los casos con menor invasión T1 y T2, por un lado, y los grupos T3 y T4 (con mayor grado de invasión local), por otro. Las diferencias fueron significativas, siendo el grupo con tumores T1 y T2 el que confirió mayores intervalos libres de enfermedad a los pacientes afectados, tras 60 meses de seguimiento (Figura 33; $P = 0.034$; test Log-Rank).

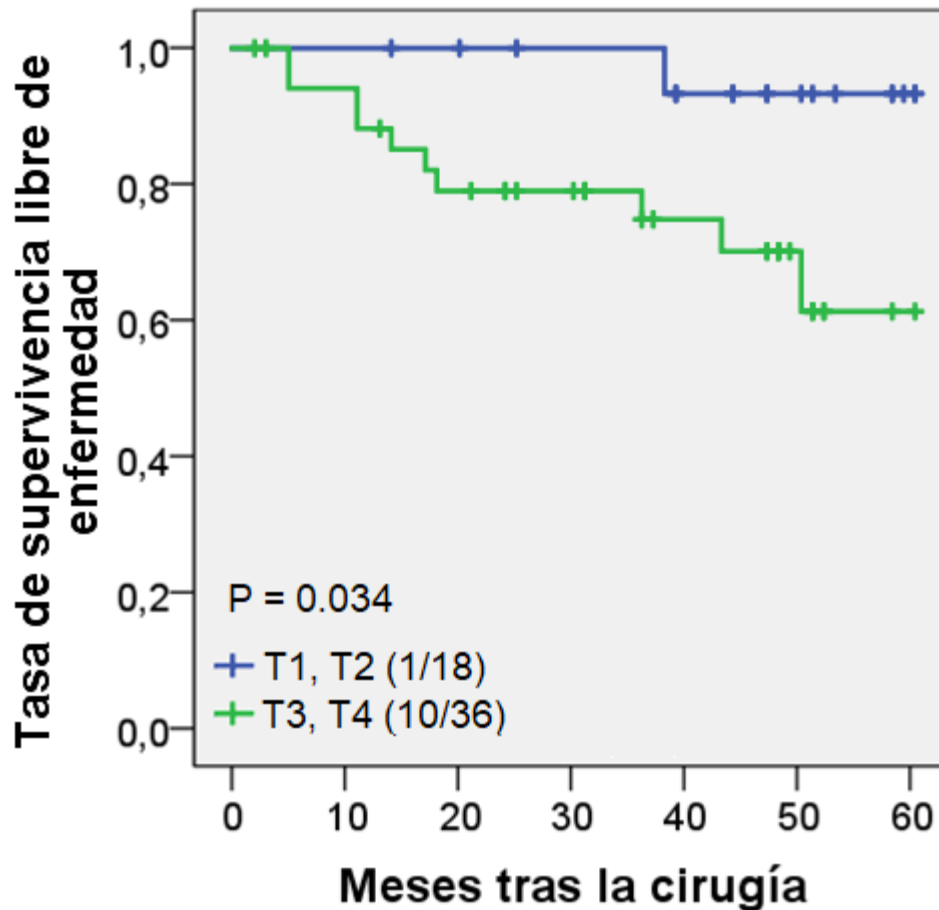


Figura 33. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier considerando el descriptor T. Entre paréntesis se incluye el número de casos con recurrencia tumoral frente al número total de pacientes en cada uno de los grupos establecidos.

A continuación, se realizaron los estudios pronóstico considerando el grado de invasión ganglionar (descriptor N). Para ello, se establecieron dos grupos, el primero con los casos que no mostraron invasión ganglionar (N0), y el segundo con los casos en los que se registró cualquier grado de invasión ganglionar (N1 y N2). El análisis reveló diferencias significativas entre los grupos objeto de estudio, siendo el grupo de pacientes con tumores N1 y N2 el que se asoció con un peor pronóstico (Figura 34; $P = 0.003$; test Log-Rank).

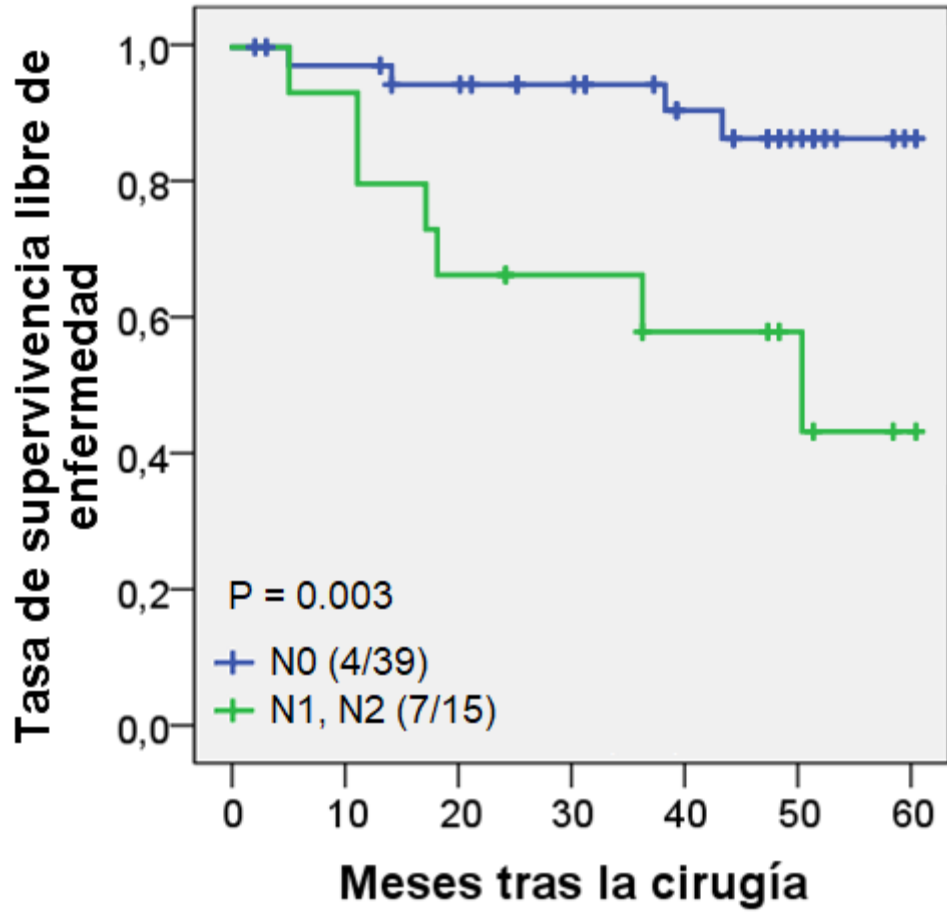


Figura 34. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier considerando el descriptor N. Entre paréntesis se indica el número de casos con recurrencia tumoral frente al número total de pacientes incluidos en cada grupo.

4.2. Estudios pronóstico en relación con los parámetros de función telomérica.

Los estudios pronóstico basados en la longitud telomérica relativa de los tejidos tumorales colorrectales, así como de los TAO y TAS, se realizaron mediante la búsqueda de puntos de corte que diferenciaron a las poblaciones con mejor y peor pronóstico, a través de la aplicación digital *Cutoff Finder* (Budezies et al, 2012). Los análisis, al igual que en el apartado anterior, se llevaron a cabo utilizando el método de Kaplan-Meier y el test de Log-Rank.

Para ello, se incluyeron los pacientes afectados de cáncer colorrectal de los que se tenían los datos de longitud telomérica (Tabla 69).

VARIABLE	Nº DE CASOS	LONGITUD TELOMÉRICA (MEDIA ± EE)
RATIO T/N TUMORAL	20	1.07 ± 0.24
RATIO T/S TAO	46	0.98 ± 0.19
RATIO T/S TAS	45	0.69 ± 0.06

Tabla 69. Longitudes teloméricas de tejidos adiposos omentales y subcutáneos, y grado de acortamiento telomérico relativo de los tejidos colorrectales tumorales con respecto a los controles no tumorales. TAO = Tejido adiposo omental. TAS = Tejido adiposo subcutáneo. EE = Error estándar de la media

Para los estudios pronóstico, dependiendo del grado de acortamiento telomérico tumoral, la aplicación *Cutoff Finder* determinó un punto de corte óptimo para el ratio T/N = 0.81. Este valor no reveló diferencias significativas entre el grupo de 5 pacientes con acortamiento telomérico tumoral, con mejor pronóstico, y el grupo de 10 pacientes con mantenimiento telomérico y pronóstico más adverso (Figura 35, P = 0.114; test Log-Rank), probablemente debido al reducido número de casos analizados.

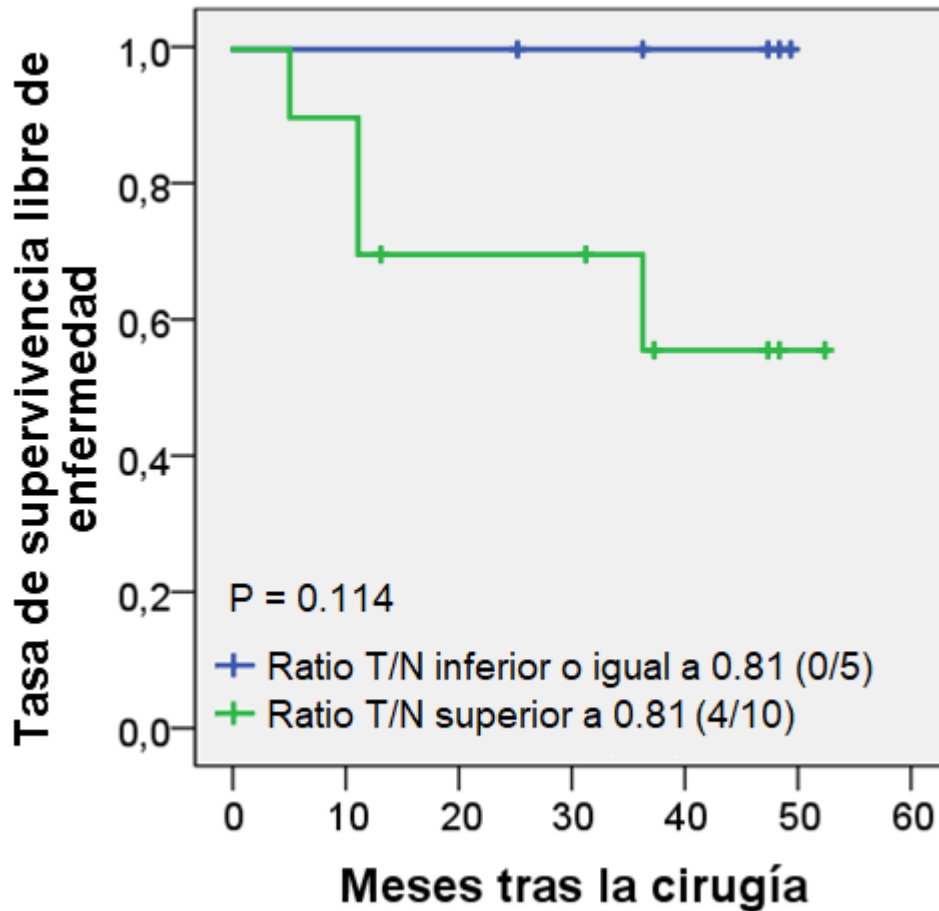


Figura 35. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier dependiendo del grado de acortamiento telomérico tumoral. Entre paréntesis se incluye el número de casos con recurrencia tumoral frente al número total de pacientes en cada uno de los grupos considerados.

En el caso de los estudios pronóstico con relación a los grupos de IMC establecidos, pudimos determinar con *Cutoff Finder* un punto de corte en IMC ≤ 25.26 kg/m². Los pacientes con menor IMC presentaron un pronóstico significativamente más favorable que los pacientes con índices superiores (P = 0.035; test Log-Rank; Figura 36).

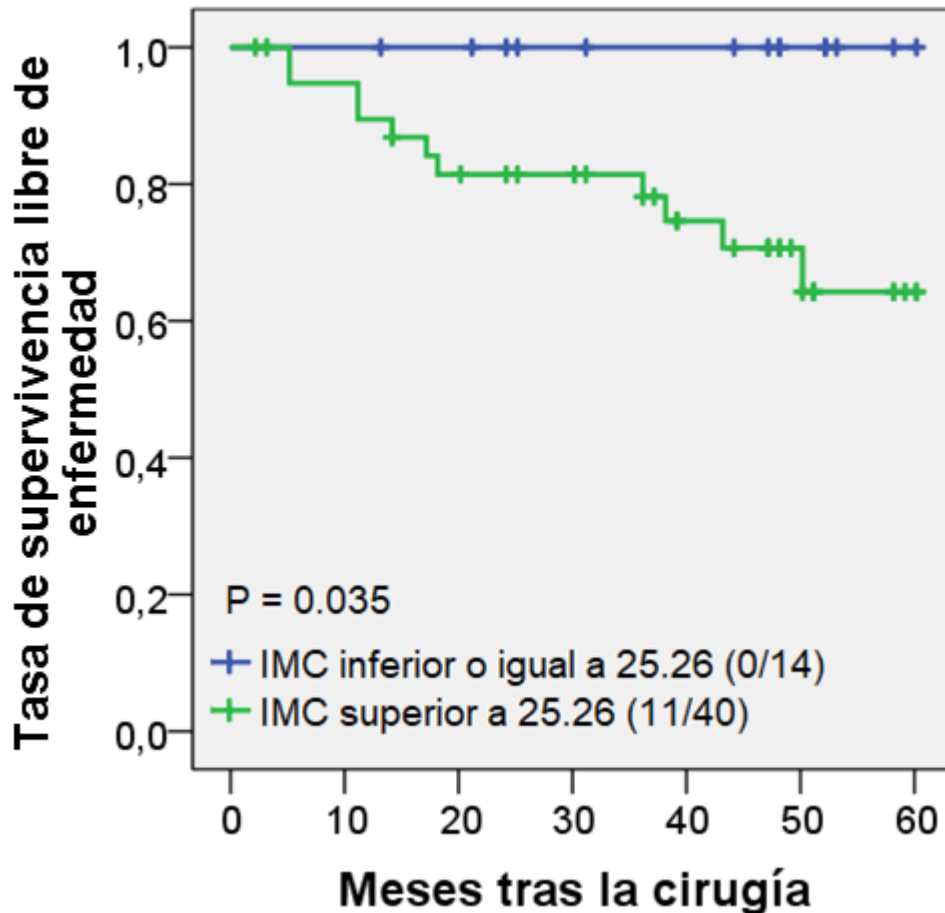


Figura 36. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier dependiendo del IMC. Entre paréntesis se incluye el número de casos con recurrencia tumoral frente al número total de pacientes en cada uno de los grupos considerados.

Seguidamente, se estudió el impacto de la longitud telomérica de los TAO y TAS en el pronóstico clínico de los pacientes afectados de cáncer colorrectal. También en este caso se empleó el programa *Cutoff Finder* para la determinación de los puntos de corte óptimos.

En el caso de los TAO, se estableció como punto de corte una longitud telomérica o ratio T/S de 1.1. El análisis no mostró diferencias de pronóstico entre individuos con una longitud telomérica superior o inferior a ese valor ($P = 0.540$; test Log-Rank). En el caso de los TAS, el análisis determinó como punto de corte una longitud telomérica o ratio T/S de 0.69, siendo los pacientes con longitudes teloméricas más cortas los que mostraron un pronóstico más adverso (Figura 37, $P = 0.026$; test Log-Rank).

Resultados

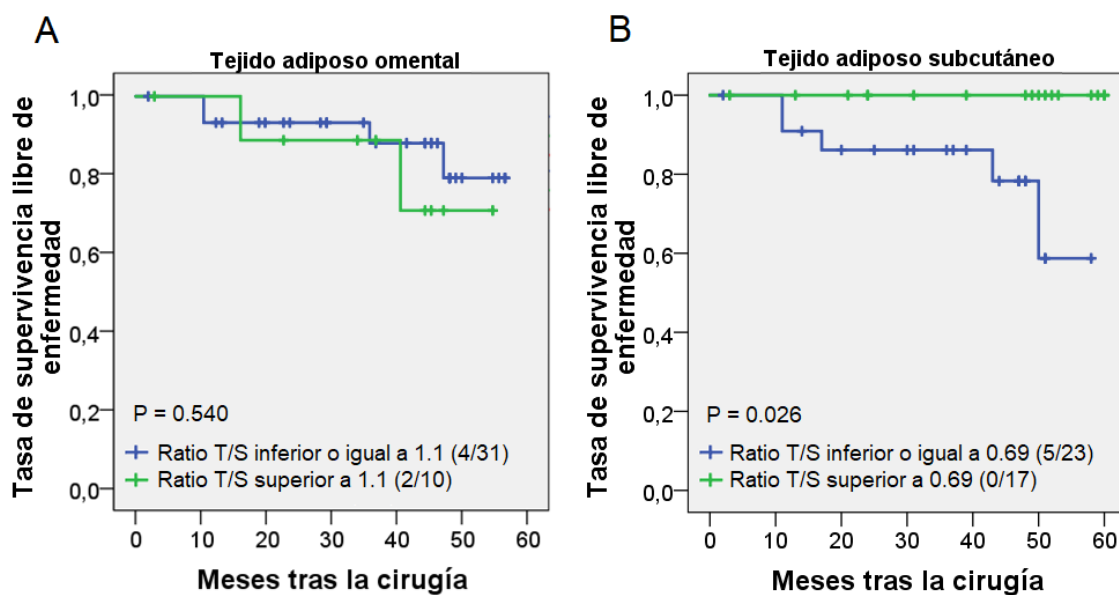


Figura 37. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier dependiendo de la longitud telomérica de los tejidos adiposos omentales (A) y subcutáneos (B). Entre paréntesis se incluye el número de casos con recurrencia tumoral frente al número total de pacientes en cada uno de los grupos considerados.

También, como parte de los estudio pronóstico dependientes de parámetros de función telomérica, se analizaron las posibles diferencias en relación con la actividad telomerasa (Figura 38). Para ello, se incluyeron hasta 49 pacientes, de los que se tenían resultados para la actividad telomerasa. Los datos de estos pacientes se detallan en la Tabla 70.

TEJIDO ADIPOSO	ACTIVIDAD TELOMERASA	
	NEGATIVA	POSITIVA
OMENTAL	31	13
SUBCUTÁNEO	37	7

Tabla 70. Resumen de casos para la actividad telomerasa en tejidos adiposos omentales y subcutáneos de los pacientes incluidos en los estudios de supervivencia.

El análisis de pronóstico dependiente de la actividad telomerasa en TAO y TAS no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos considerados en el presente estudio.

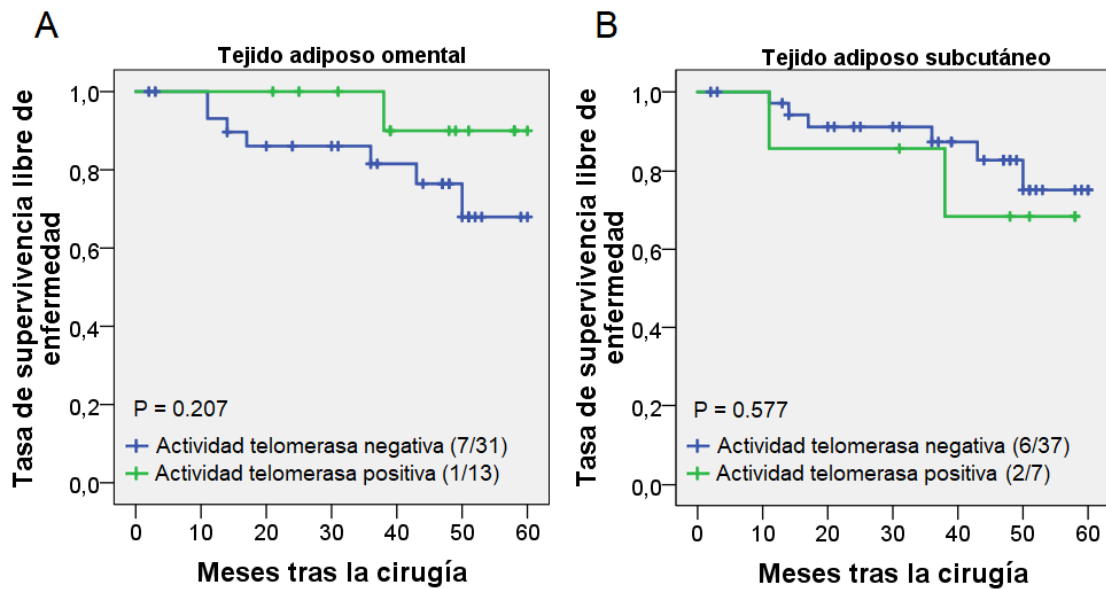


Figura 38. Curvas de supervivencia por Kaplan-Meier dependiendo de la actividad telomerasa en tejidos adiposos omentales (A) y subcutáneos (B). Entre paréntesis se incluye el número de casos con recurrencia tumoral frente al número total de pacientes considerados en cada grupo.

4.3. Estudios pronóstico en relación a la expresión de microARNs.

Finalmente, se realizaron los estudios pronóstico en pacientes con CCR considerando los niveles de expresión de los microARNs analizados en esta Tesis. El objetivo fue establecer la posible existencia de asociaciones entre la expresión de estos microARNs en sueros y tejidos con el pronóstico de pacientes afectados de CCR. Debido al reducido número de muestras, el programa *Cutoff Finder* no es capaz de determinar un punto de corte en el caso de las muestras de tejidos colorrectales, por lo que no se incluyen dichos análisis. La aplicación informática permitió, en las muestras de sueros, TAO y TAS, obtener puntos de corte para la expresión de los microARNs.

Al considerar los datos obtenidos en sueros de pacientes con CCR, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los microARNs estudiados (Figura 39). Los puntos de corte establecidos para los niveles de expresión de cada uno de los microARNs investigados fueron los siguientes: para el microARN 34a-5p, punto de corte 0.226 (P = 0.416; test Log-Rank); para el microARN 132-3p, punto de corte 0.25 (P = 0.157; test Log-Rank); para el microARN 143-3p, punto de corte 0.29 (P = 0.456; test Log-Rank); y para el microARN 181a-5p, punto de corte 1.56 (P = 0.156; test Log-Rank).

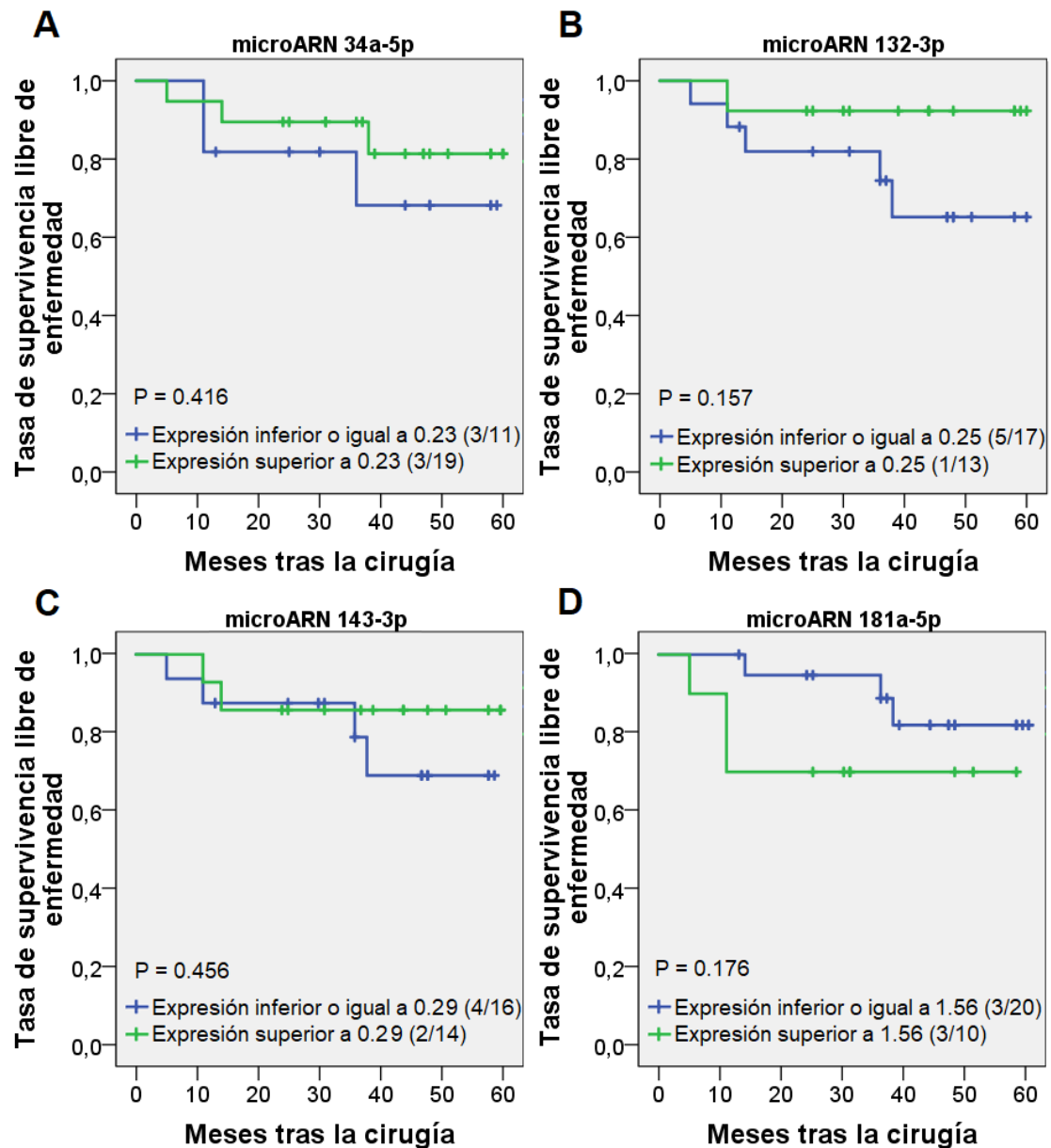


Figura 39. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier en función de los niveles de expresión de los microARNs 34a-5p (A), 132-3p (B), 143-3p (C) y 181a-5p (D) en suero. Entre paréntesis se incluye el número de casos con recurrencia tumoral frente al número total de pacientes en cada grupo.

A continuación, se realizaron estudios pronóstico considerando los niveles de expresión de los microARNs estudiados en TAO, sin encontrar diferencias significativas (Figura 40). En esta Figura quedan referenciados los puntos de corte obtenidos, en cada caso, a partir de la aplicación informática *Cutoff Finder*.

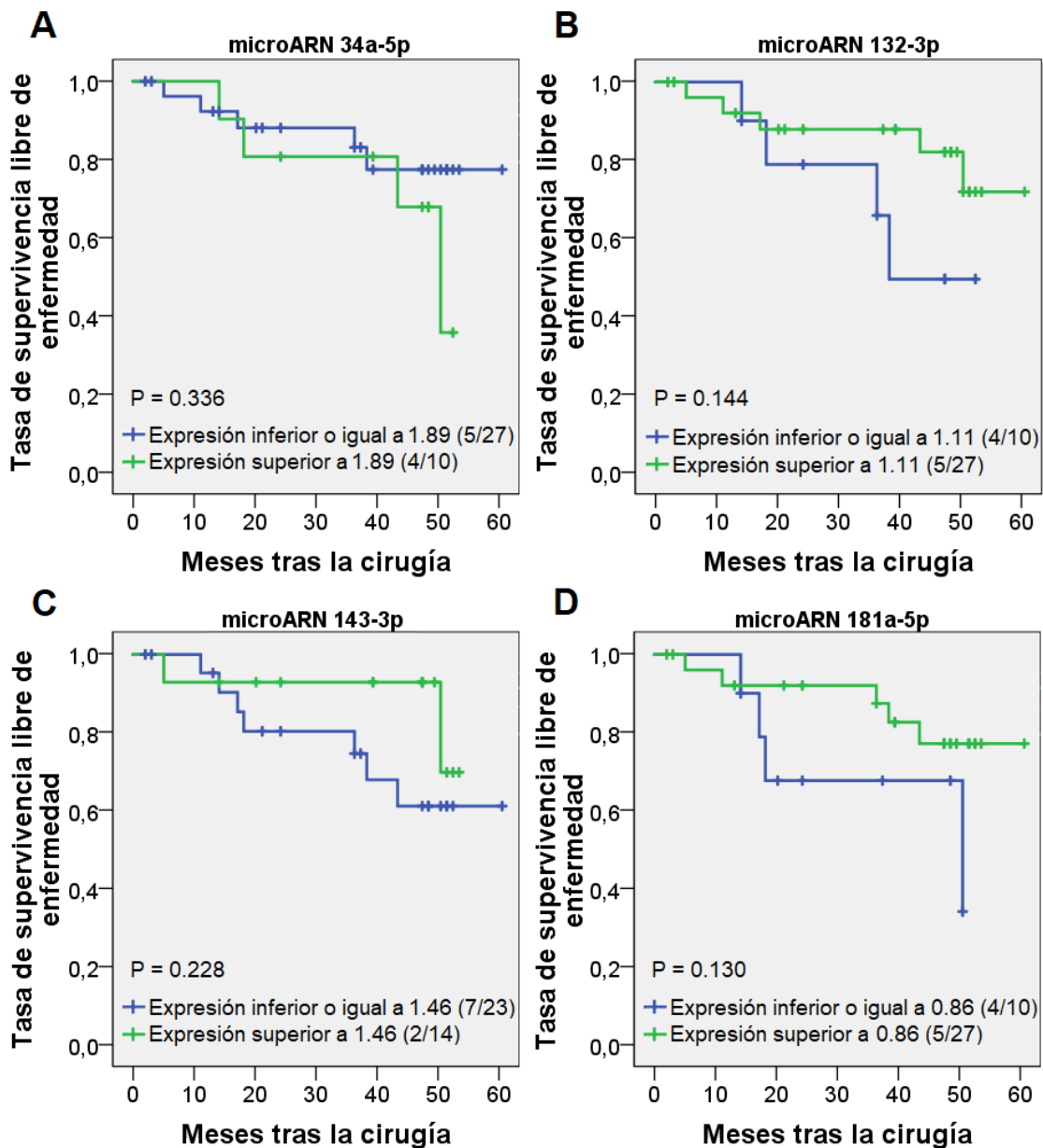


Figura 40. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier en función de la expresión de los microARNs 34a-5p (A), 132-3p (B), 143-3p (C) y 181a-5p (D) en tejidos adiposos omentales. Entre paréntesis se incluye el número de casos de recurrencia tumoral frente al número total de pacientes en cada grupo.

Finalmente, se llevaron a cabo estudios de pronóstico en pacientes afectados de CCR, considerando los niveles de expresión de los distintos microARNs investigados en esta Tesis en TAS. Los resultados obtenidos así como los puntos de corte establecidos por la aplicación *Cutoff Finder* quedan reflejados en la Figura 41. Pueden observarse diferencias significativas en el

caso de los niveles de expresión del microARN 143-3p ($P = 0.028$; test Log-Rank); el grupo de pronóstico más favorable correspondió a los casos con niveles de expresión en TAS respecto al *pool* superiores a 1.19. También en el caso del microARN 181a-5p los estudios realizados en TAS de pacientes afectados de CCR, mostraron diferencias significativas en el pronóstico clínico de los pacientes, siendo el grupo con niveles de expresión superior a 1.10 el que se asoció con una evolución clínica más favorable ($P = 0.045$; test Log-Rank). Además, se detectaron diferencias al borde de la significación estadística al analizar los niveles de expresión del microARN 132-3p ($P = 0.061$; test Log-Rank); en este caso, los niveles de expresión superiores a 0.74 con respecto al *pool* se correlacionaron con un pronóstico más favorable.

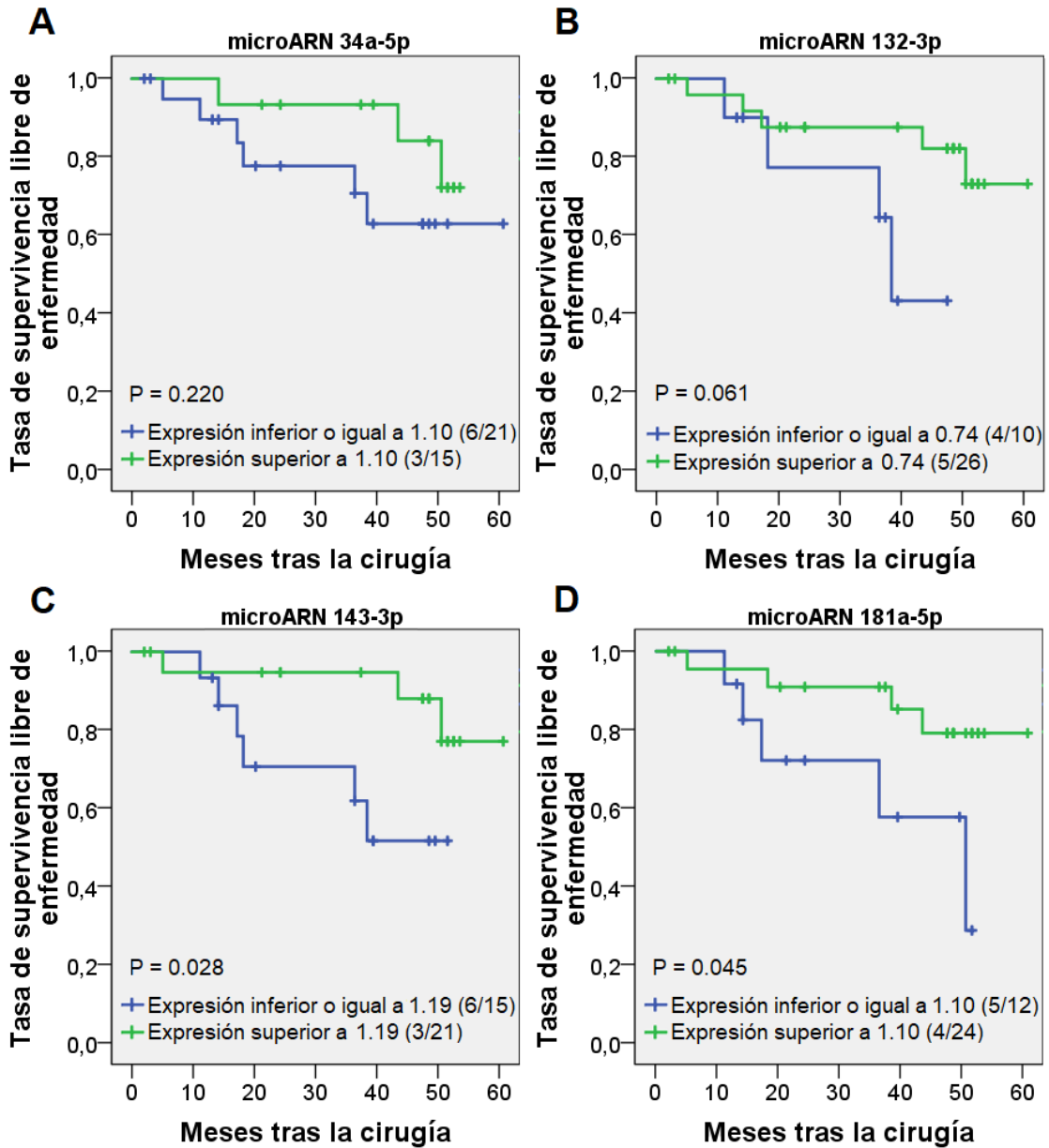


Figura 41. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier en relación con los niveles de expresión de los microARNs 34a-5p (A), 132-3p (B), 143-3p (C) y 181a-5p (D) en tejidos adiposos subcutáneos. Entre paréntesis se incluye el número de casos de recurrencia tumoral frente al número total de pacientes en cada grupo.

V. DISCUSIÓN

1. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE MICROARNs.

Durante la génesis tumoral resultan fundamentales las alteraciones, a distintos niveles, en células que terminan transformándose en cancerígenas. Concretamente, la evasión de las rutas de senescencia y muerte celular constituye un paso clave en la transformación tumorigénica de tejidos sanos, según la revisión de Wyld et al. (2020), por lo que su estudio es necesario para el desarrollo de terapias específicas en pacientes con cáncer y, más concretamente, del cáncer colorrectal (CCR). Entre las modificaciones que afectan a las células, pueden destacarse las que modifican la estructura o la secuencia del ADN genómico (Loeb y Loeb, 2000); las alteraciones en la expresión diferencial de ARNs, codificantes o no codificantes (Goodall y Wickramasinghe, 2021); y las alteraciones en la síntesis o en la secuencia de proteínas (Lazar et al., 2019). Dentro de la familia de los ARNs no codificantes alterados, existe un subgrupo denominado microARNs, de cadena corta, capaces de unirse específicamente a secuencias de ARNm diana, procediendo a su bloqueo o degradación (Catalanotto et al., 2016). Esta unión de los microARNs a secuencias de ARN es capaz de afectar *downstream* a rutas de señalización celular relacionadas con apoptosis (Bucur, 2016), senescencia (Suh, 2018), o carcinogénesis (Peng y Croce, 2016). Además, de acuerdo con lo expuesto en la revisión de O'Brien et al. (2018), los microARNs son capaces de mediar la regulación génica transcripcional y post-transcripcional en el núcleo. Sin embargo, los microARNs no sólo son capaces de efectuar su función en la propia célula, sino que se ha observado la presencia de estas moléculas en diversos fluidos biológicos como el plasma (Arroyo et al., 2011), el suero (Chen et al., 2008), el fluido cerebroespinal (Cogswell et al., 2008), la saliva (Yoshizawa et al., 2013) o la leche materna (Zhou et al., 2012), entre otros.

Aunque ya existen estudios y revisiones sobre la expresión diferencial de diferentes microARNs en pacientes afectados de cáncer colorrectal (Schetter et al., 2012, Chen et al., 2019), son muy escasos los trabajos en los que se relacionen los niveles de microARNs en sueros con los que se detectan en tejidos colorrectales tumorales y no tumorales y, especialmente, con los registrados en tejidos adiposos omentales (TAO) y subcutáneos (TAS). La investigación de los tejidos adiposos resulta prioritaria en la Obesidad, objeto de

estudio fundamental en esta Tesis. La determinación de posibles correlaciones a este respecto permitirá esclarecer la potencial utilidad de los microARNs como biomarcadores en CCR.

1.1. Expresión diferencial de microARNs en sueros y tejidos de pacientes con y sin cáncer colorrectal.

La relación del CCR con los niveles de expresión de los microARNs analizados en esta Tesis en sueros y en tejidos colorrectales tumorales ha sido previamente considerada por otros autores. De acuerdo con los resultados de nuestro trabajo, se ha podido observar que los análisis que se realizaron en sueros mostraron una disminución de los niveles del microARN 34a-5p en pacientes con CCR, tal y como otros autores habían publicado previamente (Badr et al., 2018). Dado que este microARN efectúa parte de su función a través de p53, molécula mutada en aproximadamente el 60% de los tumores colorrectales (Nakayama y Oshima, 2019), nuestros datos pueden explicarse considerando que el microARN 34a-5p haya perdido parte de su funcionalidad en aquellos tumores que presentan mutaciones en p53. Sin embargo, otros autores han demostrado en células de osteosarcoma que el microARN 34a-5p es capaz de ejercer parte de su actividad anti-proliferativa y pro-apoptótica con p53 mutado (He et al., 2009). En este contexto, es interesante destacar, además de las limitaciones inherentes a los sistemas “*in vitro*”, la amplia variedad de mutaciones que pueden afectar a p53, con consecuencias no necesariamente idénticas en todos los casos.

Al analizar los niveles séricos del microARN 132-3p, detectamos niveles inferiores en sueros de pacientes afectados de CCR, así como un descenso cercano a la significación estadística en tejidos tumorales frente a los no tumorales, lo cual coincidiría con los resultados publicados previamente por otros autores (Zhang et al., 2019). Algunos ensayos “*in vitro*” en modelos celulares de CCR ya han observado la capacidad del microARN 132-3p de inhibir la proliferación, invasión y metástasis, además de promover la apoptosis (Zhang et al., 2021); por otro lado, existen ensayos murinos con CCR “*in vivo*” en los que el incremento del microARN 132-3p inhibe el crecimiento tumoral, a través de la regulación del eje *SNHG16/miR-132-3p/USP22* (He et al., 2020). Esto apuntaría

a su posible uso como diana terapéutica, y a que la restauración de niveles de expresión normales del microARN 132-3p en pacientes afectados de CCR podría constituir un tratamiento eficaz contra esta enfermedad.

En el caso del microARN 143-3p, pudimos determinar una disminución de sus niveles de expresión, tanto en sueros de pacientes con CCR, como en los tejidos colorrectales tumorales frente a los no tumorales. Estos datos también coinciden con los recogidos en la bibliografía publicada sobre el tema (Shiosaki et al., 2020), así (Gmerek et al., 2019). Existen ensayos que muestran que el microARN 143-3p es capaz de inhibir la migración e invasión en modelos celulares “*in vitro*” (Guo et al., 2019). También en los ensayos murinos con CCR realizados “*in vivo*” se ha observado que la sobreexpresión del microARN 143-3p producía la inhibición del crecimiento tumoral a través del silenciamiento de catenin- $\delta 1$ (Ding et al., 2019). Esto parece indicar una posible utilidad del microARN 143-3p como diana terapéutica en pacientes afectados de CCR.

Al analizar la expresión del microARN 181a-5p, observamos una disminución, al borde de la significación estadística, en tejidos tumorales frente a sus parejas no tumorales. En este caso, la bibliografía sobre la función del microARN 181a-5p en el CCR es controvertida; algunos autores observan un incremento de la expresión de este microARN en tejidos tumorales (Pichler et al., 2014) y en tumores metastásicos (Ji et al., 2014), mientras que en otros casos se ha descrito un descenso de su expresión en los tejidos tumorales (Han et al., 2017). Así, las publicaciones con modelos de CCR establecidos “*in vitro*” parecen indicar, por un lado, que el microARN 181a-5p es capaz de inhibir la proliferación celular, migración e invasión de células tumorales de CCR (Shang et al., 2020). Sin embargo, por otro lado se ha visto en modelos de *plug* de Matrigel “*in vivo*” que el incremento del microARN 181a-5p es capaz de promover la angiogénesis (Sun et al., 2018). De esta manera, sería posible utilizar el microARN 181a-5p como diana terapéutica en tratamientos de CCR, teniendo en cuenta que parece tener efectos inhibitorios de la proliferación celular así como promotores de la angiogénesis.

Considerando estos resultados en su conjunto, podrían sugerir la posibilidad de utilizar los microARNs 34a-5p, 132-3p y 143-3p como biomarcadores séricos en cáncer colorrectal. Además, nuestros datos apoyan la

hipótesis de que algunos de los microARNs en estudio; 132-3p, 143-3p y 181a-5p, podrían ser analizados como dianas terapéuticas en el tratamiento del CCR.

En cuanto a la posible relación entre la expresión de los microARNs de interés en los TAO y TAS, y la afectación por CCR, previamente se ha observado que las células mesenquimales de tejidos adiposos secretan exosomas que son capaces de modular el proceso tumorigénico (Lin et al., 2013), si bien la relación de estos tejidos con el microambiente tumoral continúa a día de hoy sin conocerse por completo. El trabajo de Lin et al. (2013) observa que los exosomas secretados por las células mesenquimales son capaces de incrementar la migración celular en un modelo de cáncer de mama. Además, se han caracterizado diversos microARNs en exosomas de adipocitos asociados al desarrollo de la obesidad (Ferrante et al., 2015). También se ha observado la existencia de comunicación cruzada entre tejidos adiposos y tejidos tumorales. En la publicación de Di et al. (2021) se muestra que los exosomas derivados de células tumorales colorrectales son capaces de inducir la transformación de células de tejido adiposo blancas a marrones e inducir una lipólisis acelerada. Adicionalmente, la revisión de Rios-Colon et al. (2020) muestra la existencia de comunicación cruzada entre tejidos adiposos y tejido tumoral en tumores hepáticos, a través de la emisión de exosomas de adipocitos y de células tumorales, alterando las funciones de los tejidos adiposos y del tumor.

En nuestro grupo de pacientes no pudimos observar diferencias de expresión en TAO para ninguno de los microARNs estudiados, en relación con la afectación por cáncer colorrectal. En el caso de los TAS, el microARN 181a-5p presentó niveles de expresión incrementados en el grupo de pacientes con cáncer. Estos resultados por sí solos no permiten identificar qué significado tiene el mencionado microARN en el TAS, aunque se ha observado que un incremento en la expresión de esta molécula en tejidos adiposos puede prevenir la resistencia a la insulina en estos tejidos (Lozano-Bartolomé et al., 2018).

1.2. Asociaciones en la expresión de microARNs entre sueros y tejidos.

La presencia de microARNs en suero implica su necesaria secreción desde algún tejido o célula. Como se ha discutido en el apartado anterior, el

desarrollo de CCR afecta a los niveles de expresión séricos de varios microARNs. Por tanto, la búsqueda de correlaciones entre los niveles de expresión entre sueros y tejidos colorrectales y adiposos podría aportar información acerca de los microARNs estudiados en esta Tesis y su papel con relación al CCR y/o a la obesidad. También hemos considerado de interés estudiar las correlaciones que puedan existir entre tejidos colorrectales y tejidos adiposos.

El análisis del microARN 34a-5p mostró una correlación, al borde de la significación estadística, entre su expresión en sueros y TAO. El trabajo de Pan et al. (2019) detectó un incremento del microARN 34a-5p en exosomas secretados por adipocitos de ratones obesos, así como su papel en la polarización de macrófagos al fenotipo pro-inflamatorio M1. Este hecho reforzaría la hipótesis de que el TAO pueda actuar como tejido secretor del mencionado microARN a suero. Por otro lado, aunque pudimos determinar previamente una disminución en los niveles del microARN 34a-5p en sueros de pacientes con CCR, no observamos diferencias en las tasas de expresión en el TAO de los mismos pacientes. Por tanto, la relación entre los niveles de expresión en sueros y tejidos adiposos en relación con el CCR, no queda clara, de acuerdo con los resultados obtenidos en esta Tesis. Con respecto al microARN 34a-5p, nuestros datos confirman una correlación entre la expresión en tejidos colorrectales tumorales y no tumorales, que podría ser indicativa de que la expresión de este microARN no varía durante el proceso tumorigénico.

En el caso del microARN 132-3p, se pudo determinar la existencia de correlación entre sus niveles séricos y sus niveles de expresión en tejidos colorrectales no tumorales. Esto podría indicar un papel del tejido colorrectal no tumoral en la regulación de los niveles del microARN 132-3p séricos. En cambio, no se observaron correlaciones entre la expresión del microARN 143-3p sérico y su expresión en tejidos. Sí se pudo relacionar la expresión del microARN 181a-5p entre sueros y TAO. El grupo de Qu et al. (2017) pudo prevenir, en un modelo de células murinas, la fibrosis hepática aportando el microARN 181a-5p mediante exosomas derivados de células madre mesenquimales de tejidos adiposos. Nuestros resultados apuntarían a que el TAO puede funcionar como tejido secretor de dicho microARN.

En conjunto, las correlaciones de expresión de los microARNs 34a-5p y 181a-5p entre sueros y TAO podrían indicar que este tejido adiposo posee cierta relevancia en la secreción de determinados microARNs al suero.

Al analizar los datos obtenidos de los tejidos adiposos, se determinó la existencia de correlaciones en la expresión de todos los microARNs; 34a-5p, 132-3p, 143-3p y 181a-5p, entre TAO y TAS. Distintos autores han puesto de manifiesto las diferencias de expresión entre estos tejidos, reflejando las diferencias funcionales que poseen ambos (Arderiu et al., 2020; Korac et al., 2021). Por otro lado, se han identificado vías de señalización comunes en ambos tejidos, asociadas a enfermedades dermatológicas, inflamación, ciclo celular y proliferación, e iniciación y desarrollo tumoral (Gerhard et al., 2014). Por lo tanto, es posible que la correlación de la expresión de los microARNs 34a-5p, 132-3, 143-3p y 181a-5p entre TAO y TAS pueda encontrarse asociada a la regulación de algunas de las funciones comunes en estos tejidos.

1.3. Relación de la expresión de microARNs con las variables clínico-patológicas en pacientes afectados de CCR.

Para profundizar en la relación entre la expresión de microARNs y el CCR, buscamos establecer asociaciones con las variables clínico-patológicas en pacientes afectados de CCR.

De los análisis realizados en sueros, sólo pudimos observar una disminución en la expresión del microARN 143-3p en el suero de pacientes con tumores en estadios de Dukes C y D. Otros autores han publicado asociaciones entre los niveles de expresión en suero de este microARN y el tamaño del tumor y la presencia de metástasis a distancia, pero no con el estadio de Dukes (Sahami-Fard et al., 2019).

En los tejidos colorrectales tumorales, pudimos observar un incremento del microARN 132-3p en tumores en estadios de Dukes C y D, como también un incremento gradual de su expresión a medida que avanza el grado de invasión ganglionar. Considerando que la expresión de este microARN disminuye en sueros de pacientes con cáncer, así como en el tejido tumoral frente al no tumoral, es posible que el microARN 132-3p pueda ejercer un papel dual dependiendo

del momento del desarrollo tumoral. El grupo de Wang et al. (2021) observó que en cáncer no microcítico de pulmón el microARN 132-3p es capaz de promover la invasión y migración celular a través de la regulación de la vía de señalización IP3K/Akt. Una posible explicación a los resultados obtenidos es que una disminución en la expresión del microARN 132-3p favorezca el proceso tumorigénico inicial, mientras que la atenuación de este efecto permita una mayor capacidad invasiva en tumores colorrectales desarrollados.

Realizamos, a continuación, el análisis de las variables clínico-patológicas en relación con la expresión de microARNs en TAO y TAS. Se detectaron mayores niveles de expresión de los microARNs 34a-5p y 132-3p en TAO de pacientes con tumores de recto. Además, determinamos que el microARN 143-3p disminuía sus niveles de expresión en TAO de pacientes con tumores que presentaban mayor grado de invasión local o con metástasis.

En el caso de los TAS, se observaron disminuciones en la expresión de todos los microARNs en pacientes con tumores en los estadios de Dukes C y D, aunque las diferencias presentadas por los microARNs 132-3p y 181a-5p quedaron al borde de la significación estadística. También se detectó un descenso de la expresión, en TAS de pacientes con tumores que presentaron mayor grado de invasión ganglionar, de los microARNs 34a-5p y 132-3p, con diferencias al borde de la significación estadística. Además, observamos un incremento en los niveles del microARN 34a-5p en TAS de pacientes con tumores localizados en el recto.

En conjunto, estos resultados sugieren que la localización del tumor está relacionada con los niveles de expresión de microARNs en tejidos adiposos, dependiendo probablemente de las diferentes histologías y perfiles moleculares que presentan los tumores atendiendo a su localización (Hsu et al., 2018; Young y Goltzarian, 2018). No podemos descartar tampoco la relación entre el proceso tumoral y su progresión con la expresión de microARNs en tejidos adiposos. En este sentido, la revisión de Dumas y Brisson (2021) analiza diversos mecanismos conocidos de comunicación celular y de activación de vías de señalización entre los tejidos adiposos y diversos tipos de cáncer tales como; cáncer de mama, de pulmón, hepático, de ovario o de próstata.

2. LA LONGITUD TELOMÉRICA EN TEJIDOS COLORRECTALES Y ADIPOSOS: RELACIÓN CON LAS VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS Y CON LA EXPRESIÓN DE MICROARNS.

Previa realización de esta parte del trabajo, procedimos a la validación de la qRT-PCR como técnica para los análisis de longitud telomérica. El elevado número de repeticiones teloméricas podría presentar dificultades para la determinación de la longitud telomérica por esta técnica, por lo que consideramos pertinente una comparación con los datos obtenidos por Southern Blot. El ensayo por qRT-PCR se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito por Cawthon (2002), y nos permitió validar la técnica para su uso posterior.

La longitud telomérica desempeña un papel regulador fundamental durante el desarrollo tumorigénico, a través de la parada del ciclo celular cuando existe un acortamiento crítico de los telómeros, provocando la entrada en senescencia de las células (Herbig et al., 2004). Concretamente, en CCR está descrito que las células del tejido tumoral poseen telómeros más cortos que las del tejido adyacente no tumoral (Rampazzo et al., 2010), y nuestro laboratorio también ha observado previamente este acortamiento tumoral (Fernández-Marcelo et al., 2016). Hay autores que han detectado un incremento de la longitud telomérica en los estadios más avanzados del cáncer, con un papel fundamental de la actividad telomerasa en este proceso (Engelhardt et al., 1997).

Durante la realización de este trabajo determinamos, en sintonía con los resultados obtenidos por otros investigadores, la existencia de acortamiento telomérico en tumores en comparación a las parejas de tejidos colorrectales no tumorales, con diferencias al borde de la significación estadística. También pudimos observar longitudes teloméricas mayores en tumores T4, así como en tumores localizados en el colon derecho. El grupo de Jung et al. (2020) también detectó telómeros más largos en tumores T4 en comparación con tumores T3. Trabajos previos realizados en nuestro grupo de investigación habían puesto de manifiesto que el ratio de acortamiento telomérico, medido como ratio T/N, era un indicador con valor pronóstico en pacientes afectados de CCR (Fernández-Marcelo et al., 2016).

Si bien existe abundante información sobre la función telomérica y su relación con el cáncer colorrectal, y algunos autores han estudiado la relación

entre la expresión de los microARNs 34a-5p (Xu et al., 2015), 132-3p (Zhang et al., 2021), 143-3p (Bonifacio y Jarstfer, 2010) y 181a-5p (Gerasymchuk et al., 2020) y la función telomérica en algunos tipos tumorales, la relación entre la longitud telomérica en tejidos colorrectales, tumorales o no tumorales, y la expresión de estos microARNs no está establecida.

En las muestras tumorales de pacientes afectados de CCR analizadas, pudimos determinar la presencia de correlaciones inversas entre la longitud telomérica y la expresión de los microARNs 34a-5p, 132-3p y 181a-5p. Estos resultados parecen coincidir con el papel teórico relacionado con la senescencia celular que desempeñan los microARNs 34a-5p (Zhu et al., 2021; Raucci et al., 2021), 132-3p (Hadar et al., 2018) y 181a-5p (Rivetti di Val Cervo et al., 2012), teniendo los tumores con telómeros más cortos una mayor expresión de estos microARNs. Esta tendencia pudo ser observada también en los tejidos colorrectales no tumorales, aunque sólo en el caso del microARN 181a-5p se alcanzó la significación estadística, sugiriendo que la regulación de estos microARNs en tumores colorrectales podría tener un papel importante en los procesos de senescencia y parada del ciclo celular.

Dada la relevancia que tiene la función telomérica en los procesos tumorigénicos y en relación con la obesidad, consideramos que el estudio de la función telomérica en tejidos adiposos podría tener un especial interés para establecer conexiones entre la funcionalidad de los tejidos adiposos y el CCR, fundamentalmente en pacientes obesos. Se sabe que el acortamiento telomérico en tejidos adiposos está asociado con el desarrollo de la obesidad (Moreno-Navarrete et al., 2010) y se ha propuesto que es debido al desarrollo de hiperglicemia crónica (Lakowa et al., 2015), pero no queda claro qué efecto puede tener el desarrollo de cáncer con las longitudes teloméricas de los TAO y de los TAS.

Nuestros resultados no pudieron demostrar en ninguno de los tejidos adiposos estudiados diferencias de la longitud telomérica entre el grupo control sin cáncer y el grupo de pacientes afectado de CCR. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que el tejido adiposo posee una composición celular diversa, y algunos grupos han observado acortamiento telomérico de los adipocitos, pero no del conjunto del tejido adiposo, en mujeres con obesidad (el Bouazzaoui et

al., 2014). Al analizar la relación entre la longitud telomérica en tejidos adiposos y las variables clínico-patológicas de los tumores, sólo pudimos determinar que, en pacientes con tumores de recto, los TAO y los TAS presentaban telómeros más largos. Estas diferencias podrían deberse a los perfiles moleculares diferentes en estos tejidos (Young y Golzarian, 2018), que podría dar lugar a distintos grados de inflamación y acortamiento telomérico en los tejidos adiposos cercanos al tumor.

Como parte del estudio de la función telomérica en tejidos adiposos, intentamos asociar las longitudes teloméricas de estos tejidos con los niveles de expresión de los microARNs de interés. Detectamos que en TAS hubo correlación al borde de la significación estadística entre la expresión del microARN 143-3p y la longitud telomérica en el grupo de pacientes afectado de CCR. En este caso, a diferencia de lo observado en tumores, esta correlación fue positiva, lo que podría deberse a diferencias funcionales o de regulación atendiendo al tipo tisular estudiado.

En cuanto al papel que de la actividad telomerasa, otros autores han observado, en modelos de ratón, que la eliminación de la subunidad catalítica de la telomerasa TERT provoca el acortamiento telomérico en tejidos adiposos e induce hipertrofia en TAS y TAO, así como inflamación y fibrosis en TAS (Gao et al., 2020). En humanos se ha observado que la leptina, asociada a la disfunción de tejidos adiposos de pacientes con obesidad, promueve la síntesis de hTERT en tumores mamarios (Ren et al., 2010). Sin embargo, la relación que tiene la actividad telomerasa en estos tejidos con las variables clínico-patológicas en pacientes afectados de cáncer no es conocida. Nuestros datos mostraron que los miembros masculinos afectados de cáncer presentaron mayores tasas de activación de la enzima en TAO que el grupo de mujeres, lo que sugiere la presencia de mecanismos específicos asociados al sexo que regulan la actividad de esta enzima.

En cuanto a la actividad telomerasa y la expresión de microARNs en los tejidos adiposos, no se conoce hasta ahora la relación establecida. Como se ha discutido anteriormente, los microARNs 34a-5p, 132-3p y 181-5p correlacionan de forma inversa con la longitud telomérica en tejidos tumorales, mientras que en TAS el microARN 143-3p correlaciona de forma positiva con la longitud

telomérica de los TAS. Nuestra población objeto de estudio presentó un 30% de positividad en TAO y un 14% de positividad en TAS para la actividad telomerasa. Consideramos que podrían existir diferencias en los patrones de expresión de los microARNs en estos tejidos atendiendo a la positividad para la actividad telomerasa. Del grupo de 30 pacientes sin cáncer, los individuos con actividad telomerasa positiva en TAO presentaron menores niveles de expresión para todos los microARNs que el grupo sin activación de la enzima. Es posible que la activación de la actividad telomerasa en los TAO en un contexto libre de CCR prevenga el acortamiento telomérico y de las vías de señalización asociadas y, con ello, disminuya la expresión de los microARNs de estudio asociados a senescencia.

En los TAS, en cambio, estas diferencias no fueron significativas, aunque en este caso el grupo con actividad telomerasa positiva se componía sólo de 3 individuos, por lo que no es posible sacar aquí conclusiones. En el grupo de pacientes con cáncer, por otro lado, no se observaron diferencias en la expresión de los microARNs entre TAO y TAS.

En conjunto, los datos indican que los niveles de expresión de los microARNs objeto de estudio en los TAO, se encuentran asociados a la funcionalidad de la telomerasa, pero únicamente en los pacientes sin cáncer.

3. ÍNDICE DE MASA CORPORAL: RELACIÓN CON LA EXPRESIÓN DE MICROARNs Y CON PARÁMETROS DE FUNCIÓN TELOMÉRICA EN PACIENTES CON Y SIN CÁNCER COLORRECTAL.

3.1. Relación entre el Índice de Masa Corporal y la expresión de los microARNs en pacientes con y sin cáncer colorrectal.

La obesidad es un estado de inflamación crónica que se relaciona con el desarrollo de diversas enfermedades metabólicas (Monteiro y Azevedo, 2010), con la disfunción de los tejidos adiposos (Blüher, 2009) y con la génesis y el pronóstico clínico adverso de diversos tumores (Vucenik y Stains, 2012). Entre los tejidos especialmente afectados en individuos con obesidad, cabe destacar los TAO y los TAS, teniendo cada uno de ellos un comportamiento distinto ante dicha patología. Por lo tanto, el estudio de la obesidad, así como de la posible desregulación de la función de los mencionados tejidos adiposos, resulta de interés en el cáncer colorrectal. En el presente trabajo, pudimos observar que, en pacientes sin cáncer, la expresión del microARN 143-3p en TAO, así como de los microARNs 34a-5p y 143-3p en TAS, eran superiores en individuos con obesidad frente a los que presentaban sobrepeso. Estos datos coinciden con los resultados obtenidos por otros autores para el microARN 34a-5p, que se vio incrementado en tejidos adiposos subcutáneos de individuos con obesidad (Kurylowicz et al., 2016; Ortega et al., 2010). En relación con el papel del microARN 143-3p en tejidos adiposos, la bibliografía presenta resultados controvertidos, (Kilic et al., 2015; Zhang, Du et al., 2018); nuestros datos apoyarían la hipótesis de que el microARN 143-3p incrementa su expresión en tejidos adiposos de individuos con obesidad sin CCR. En cambio los datos de pacientes afectados de CCR mostraron que los pacientes con obesidad presentaron menores niveles de los microARNs 132-3p y 143-3p en TAO, así como del microARN 143-3p en TAS. El grupo de Klöting et al. (2009) asoció, de forma inversa, la expresión del microARN 132-3p con el área de TAO investigada, lo que parecería indicar que este microARN y su función reguladora de la glucemia a través de la modulación de los niveles de CREB (Vo et al., 2005), activando la expresión de genes asociados a la adipogénesis, podrían encontrarse alterados en CCR. El trabajo de Zhu et al. (2013) vincula la presencia de ácidos grasos libres, leptina y, en menor grado, la presencia de

citoquinas a la inhibición de la expresión del microARN 143-3p en adipocitos. Esto podría deberse a que el desarrollo de cáncer, a través de la liberación de moléculas circulantes como UBAP2 (Dai et al., 2020), o la alteración de la expresión celular de diversos tipos celulares asociados a tejidos adiposos como macrófagos (Cai et al., 2022) o adipocitos (Dirat et al., 2010), podría influir en la expresión del microARN 143-3p en los TAO. Tampoco se puede excluir la posibilidad de que los individuos con obesidad, con una mayor expresión de adipoquinas y citoquinas en TAO que inhiben la expresión del microARN 143-3p (Zhu et al., 2013), posean un mayor riesgo relativo de desarrollar CCR (Singh et al., 2020), explicando las diferencias de expresión del microARN 143-3p entre los grupos del Índice de Masa Corporal (IMC) con y sin cáncer.

Al analizar los tejidos colorrectales tumorales y no tumorales, pudimos detectar un incremento del microARN 181a-5p en los tejidos tumorales de los pacientes normopeso. Aunque la relación que tiene la obesidad y la expresión de este microARN en tejido colorrectal no se conoce, existen publicaciones que vinculan menores niveles del microARN 181a-5p en tejidos adiposos con la obesidad y con la resistencia a la insulina (Lozano-Bartolomé et al., 2018), sugiriendo que el IMC podría afectar a la regulación de la expresión de este microARN en tejidos colorrectales y a la función de estos.

3.2. Índice de Masa Corporal y la función telomérica.

Como ya se ha explicado previamente, la obesidad puede considerarse un estado de inflamación crónica de los tejidos adiposos, liberando en el proceso una serie de citoquinas pro-inflamatorias que pueden afectar de forma sistémica a todo el organismo, provocando envejecimiento celular, acortamiento telomérico y disfunción tisular. De esta manera, el mantenimiento de la homeostasis telomérica desempeñaría un papel clave en el proceso tumorigénico y en la disfunción de los tejidos adiposos. Diversos estudios llevados a cabo en poblaciones de leucocitos de sangre, para la determinación de la longitud telomérica, muestran que los pacientes con obesidad presentan leucocitos con longitudes teloméricas más cortas (Mangge et al., 2019), así como que este acortamiento telomérico es dependiente de la presencia de síndrome metabólico, en casos de mujeres con obesidad (Iglesias Molli et al., 2017).

Nuestros datos parecen indicar que en pacientes normopeso y sobrepeso el grado de acortamiento telomérico tumoral es más pronunciado que en pacientes con obesidad, medido este grado de acortamiento como ratios T/N de 0.75 ± 0.14 , 0.75 ± 0.09 y 1.84 ± 0.73 , respectivamente. Este fenómeno también fue observable al separar a las poblaciones de estudio atendiendo a si presentaban acortamiento telomérico tumoral, medido como ratio T/N < 1, o mantenimiento telomérico en las muestras con un ratio ≥ 1 . Resultados obtenidos previamente en este laboratorio en otra cohorte de pacientes afectados de CCR mostraron también mayor grado de acortamiento telomérico tumoral en el grupo sin obesidad (García-Martínez et al., 2021). Estos datos parecen apuntar a que en pacientes afectados de CCR, los individuos con obesidad presentan con mayor frecuencia un mantenimiento telomérico en los tejidos tumorales.

Además del estudio de función telomérica asociado al IMC realizado en los tejidos colorrectales de pacientes afectados de CCR, también llevamos a cabo este estudio en los tejidos adiposos. Previamente, otros autores han publicado que la longitud telomérica en el TAS de individuos con obesidad es inferior a la de sujetos sin obesidad (Moreno-Navarrete et al., 2010). Nuestros resultados en cambio no pudieron demostrar en TAO o TAS diferencias en las longitudes teloméricas entre los distintos grupos de IMC, tanto en pacientes afectados de CCR, como en el grupo sin CCR.

En cuanto a la actividad telomerasa en tejidos adiposos, sí observamos diferencias en los TAO del grupo de sujetos sin cáncer, en relación con el IMC. Concretamente, los individuos con obesidad presentaron una menor frecuencia de activación de la telomerasa. En ratones obesos se ha detectado una disminución de mTert en tejidos adiposos, asociada a una menor activación de la telomerasa (Bloom et al., 2020), lo que podría explicar también, en nuestro caso, los menores niveles de activación de la telomerasa en el TAO de individuos con obesidad. Este efecto en cambio no pudo ser observado en los tejidos adiposos de pacientes afectados de CCR.

4. ESTUDIOS PRONÓSTICO BASADOS EN VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS, FUNCIÓN TELOMÉRICA, ÍNDICE DE MASA CORPORAL Y EXPRESIÓN DE MICROARNS EN PACIENTES AFECTADOS DE CÁNCER COLORRECTAL.

A nivel clínico, las variables clínico-patológicas de la clasificación TNM de tumores colorrectales se emplean en el estudio del pronóstico de pacientes afectados de CCR. Las curvas de supervivencia que presentamos en esta Tesis, asociadas a los descriptores TNM y al estadio de Dukes, muestran como cabía esperar que los individuos con indicadores de buen pronóstico tienen intervalos libres de enfermedad superiores a los 60 meses tras la cirugía. Además, se conoce que la edad se puede asociar a comorbilidades y a un peor pronóstico en pacientes con CCR (McKay et al., 2014). En nuestro caso, pudimos observar que los pacientes con una edad inferior a 77.5 años tenían mejor pronóstico que el grupo con una edad superior a 77.5 años. Otros autores han observado también, en pacientes afectados de CCR, un peor pronóstico en el grupo de pacientes adultos con edades superiores a los 50 años, aunque indicando que los individuos entre 20 y 40 años presentaban tumores en estadios más avanzados y con características patológicas más agresivas (Wang y Wang, 2015).

A continuación, realizamos los análisis de supervivencia asociados a la función telomérica. La posibilidad de emplear a nivel clínico el estatus telomérico para establecer pronósticos de tumores sólidos es de gran importancia en el área de investigación de la oncología clínica, y ha sido estudiado previamente por otros autores en diversos tipos tumorales (Valls et al., 2011; Weischer et al., 2013). La función telomérica, aun desempeñando un papel fundamental en la biología de la iniciación y desarrollo tumoral, presenta desafíos a la hora de comprender su papel en los distintos tipos de cáncer, en las diferentes fases del proceso tumorigénico. La presencia de telómeros largos puede asociarse a pronósticos adversos en tumores de esófago (Lv et al., 2017), hepáticos (Oh et al., 2008) o colorrectales (García-Martínez et al., 2021), mientras que puede ser indicador de pronóstico menos adverso en tumores de células no microcíticas de pulmón (Fernández-Marcelo et al., 2015) o melanomas (Rachakonda et al., 2018).

Anteriormente, nuestro grupo ya había estudiado por Southern Blot una colección de 114 muestras de pacientes con cáncer colorrectal para los que se determinó que una longitud telomérica tumoral inferior a 6.4 Kb podía considerarse un factor de pronóstico favorable (García-Martínez et al., 2021). En principio, el acortamiento telomérico tumoral supone una barrera para la proliferación celular; sin embargo, dicha barrera puede ser superada en tumores colorrectales a través de la activación de la telomerasa. En el grupo de pacientes analizados en esta Tesis, hemos observado que el grupo afectado de tumores colorrectales con ratios T/N superiores a 0.81 tiene un pronóstico menos favorable, aunque sin alcanzar la significación estadística, posiblemente por el reducido tamaño muestral. En este caso, consideramos que una disminución significativa de la longitud telomérica tumoral respecto al tejido adyacente no tumoral, representaría una barrera fisiológica que provocaría la senescencia replicativa de las células tumorales, con el consiguiente efecto protector para los pacientes afectados de la patología objeto de estudio.

En cuanto al efecto del IMC en el pronóstico de pacientes afectados de CCR, previamente, otros investigadores observaron mayores tasas de mortalidad en relación con valores elevados de IMC (Daniel et al., 2016). En nuestro estudio se pudo establecer una evolución desfavorable en el caso de pacientes con CCR y con valores de IMC superiores a 25.26 Kg/m². Por tanto, en nuestra cohorte de pacientes parece detectarse una asociación entre incrementos leves de la adiposidad y el pronóstico clínico de sujetos con CCR. Otros autores han descrito a los pacientes sobrepeso afectados de CCR como el grupo con mejor pronóstico (Doleman et al., 2016; Aparicio et al., 2018). El grupo de Kuo et al. (2018) mostró que, en individuos normopeso con CCR, los que pierden masa corporal de forma involuntaria tienen peores indicadores de pronóstico. Algunas publicaciones incluso han sugerido que el IMC no es un buen indicador de exceso de adiposidad; analizando una cohorte de 13.600 pacientes en la que sólo el 21% de hombres y un 31% de mujeres podían ser considerados como individuos con obesidad acorde al análisis del IMC, el grupo de Romero-Corral et al. (2015) observó que mediante el análisis de bioimpedancia eléctrica hasta un 50% de hombres y un 62% de mujeres podían

ser considerados con obesidad acorde al análisis del porcentaje de grasa corporal.

Una vez analizado el papel del IMC en el pronóstico de pacientes con CCR, procedimos a evaluar el efecto de la función telomérica y de la expresión de microARNs en los TAO y en los TAS investigados, en relación con el pronóstico clínico de los pacientes incluidos en nuestros protocolos. Hasta la fecha, no se conoce qué relación directa existe entre la longitud telomérica de tejidos adiposos y el pronóstico clínico de pacientes con CCR.

La aplicación informática Cutoff Finder nos permitió diferenciar la existencia de un grupo de casos con mejor pronóstico clínico en relación con la longitud telomérica detectada en tejidos adiposos subcutáneos de pacientes afectados de CCR. Concretamente, este grupo se caracterizó por mostrar una longitud telomérica relativa, comparada frente al pool control, superior a 0.69. Es posible que la entrada en senescencia celular y la pérdida de funcionalidad de los tejidos adiposos subcutáneos tengan un papel relevante en el proceso tumorigénico y en el pronóstico de estos pacientes afectados de CCR. Aunque se suele asociar el TAO en mayor medida que el TAS a la expresión de genes pro-inflamatorios (O'Rourke et al., 2019; Spoto et al., 2014), todavía no se comprende en profundidad el efecto global que tienen ambos tejidos en la secreción de dichas moléculas. Nuestros datos, que muestran que el mantenimiento telomérico en TAS se asocia a mejores pronósticos clínicos en pacientes afectados de CCR, indican la relevancia del mantenimiento de la homeostasis telomérica en este tejido. Algunos autores previamente han asociado el acortamiento telomérico de TAS a la hipertrofia, inflamación y disfunción del tejido (Gao et al., 2020), y el grupo de Gucalp et al. (2016) indica algunos de los mecanismos moleculares por los que las alteraciones de los tejidos adiposos pueden afectar a la progresión y agresividad tumoral. De esta manera, un acortamiento crítico de los telómeros en TAS podría dar lugar a la alteración del perfil molecular de éste y a la modulación del comportamiento tumoral a distancia.

Además, no se pueden desvincular el análisis de la longitud telomérica y papel de la actividad telomerasa en el mantenimiento y elongación del ADN telomérico. En nuestra población, como se ha comentado en otros apartados de

esta Tesis, la proporción de TAO con actividad telomerasa fue superior a la proporción de TAS que resultaron positivos para dicha actividad.

El papel de la telomerasa en tejidos adiposos y su relación con el pronóstico clínico en el CCR no se ha investigado previamente. De acuerdo con nuestros resultados, el grupo de pacientes con CCR que mostraba actividad telomerasa positiva en TAO presentó una tendencia hacia un pronóstico clínico más favorable que el grupo con actividad telomerasa negativa; sin embargo, las diferencias no mostraron significación estadística.

Finalmente, en cuanto al pronóstico clínico de las series analizadas, cabe destacar que está descrito que determinados microARNs pueden jugar un papel importante en la iniciación, progresión y desarrollo tumoral, así como en el desarrollo de enfermedades metabólicas como la obesidad.

Existen algunas publicaciones que relacionan mayores niveles del microARN 34a-5p en el suero con pronósticos clínicos más favorable y mejores respuestas al tratamiento con quimioterapia en osteosarcomas (Wang et al., 2017). El meta-análisis elaborado por Li et al. (2018) indica que este microARN resulta indicador de pronóstico en tumores gástricos, y que su expresión reducida en estos tumores se asocia con un pronóstico. El grupo de Gao et al. (2015) pudo determinar en dos cohortes de 205 y 63 pacientes afectados de CCR, el papel pronóstico e independiente de los descriptores TNM del microARN 34a-5p tejidos tumorales. En nuestro caso, observamos que los niveles de expresión elevados del microARN 34a-5p en el TAS de pacientes afectados de CCR, mostró una tendencia a asociarse con un pronóstico clínico favorable. Sería interesante incrementar en el futuro el número de casos sometidos a análisis, con el fin de establecer el posible papel que como factor pronóstico en CCR puede presentar el microARN 34a-5p.

La expresión del microARN 132-3p ha sido analizada como posible como marcador pronóstico en diversos tipos tumorales. Así, en tumores de mama, se ha observado una disminución de sus niveles de expresión asociada a los casos con peor pronóstico clínico (Li, Xu, et al., 2019). También se ha observado, según los resultados publicados por Wang et al. (2018), que en pacientes afectados de carcinomas hepatocelulares, este microARN presenta menores niveles de expresión, tanto en tejidos tumorales como en suero pudiendo, además, los

niveles séricos ser considerados como marcadores pronóstico de este tipo de tumores, con una inferior expresión del microARN 132-3p en aquellos pacientes con menor supervivencia global. En tumores colorrectales, los niveles de expresión más reducidos del microARN 132-3p también se han asociado con pronósticos clínicos adversos (Mokutani et al., 2016). En nuestra serie de pacientes afectados de CCR, si bien aquellos que presentan mayores niveles de expresión de este microARN en suero y tejidos adiposos muestran un pronóstico clínico más favorable, no hemos podido establecer asociaciones significativas.

En el caso del microARN 143-3p, las publicaciones previas sobre su posible utilidad como marcador pronóstico en cáncer colorrectal son dispares. El trabajo de Ardila et al. (2019) detectó mayores niveles de expresión del microARN 143-3p en suero de pacientes con CCR. Además, en el meta-análisis realizado por Li, Ya, et al. (2019) se observó que bajos niveles de expresión de este microARN en tumores colorrectales son indicativos de buen pronóstico. En cambio, el trabajo de Ding et al. (2019) mostró que los pacientes afectados de CCR con mayores niveles de expresión del microARN 143-3p presentaban mayores periodos de supervivencia global tras la cirugía. Nuestros datos han permitido concluir que son los pacientes con elevados niveles de expresión de este microARN en TAS los que presentan un mejor pronóstico clínico, con mayores intervalos libres de la enfermedad tras la cirugía.

Por último, en el caso del microARN 181a-5p, el grupo de Gao et al. (2018) observó que una mayor expresión de este microARN en tumores colorrectales constituye un indicador de mal pronóstico. En nuestro grupo de pacientes con CCR, los individuos con mayores niveles de expresión de este microARN en suero mostraron también un pronóstico más desfavorable, aunque las diferencias no resultaron estadísticamente significativas. Además, pudimos observar en TAS, que los casos pacientes con mayor expresión del microARN 181a-5p presentaron un mejor pronóstico clínico. En el caso de los TAO, el grupo con mayor expresión de este microARN también mostró un mejor pronóstico clínico, cercano a la significación estadística.

VI. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones de la Tesis se enumeran seguidamente:

1. Los microARNs 34a-5p, 132-3-p y 143-3p muestran, en pacientes afectados de CCR frente al grupo control, unos niveles de expresión significativamente disminuidos en suero. Además, en el caso del microARN 143-3p, este descenso se asocia a tumores en estadios de Dukes avanzados (C y D). En pacientes afectados de CCR, la valoración de los niveles séricos del microARN 143-3p podría representar un marcador molecular de utilidad para detectar agresividad tumoral.

2. La expresión del microARN 143-3p en tejidos colorrectales tumorales se encuentra marcadamente reducida con respecto a la detectada en los tejidos colorrectales no tumorales.

3. Se observa correlación en la expresión de los microARNs 34a-5p y 181a-5p entre sueros y TAO, así como del microARN 132-3p entre sueros y tejidos colorrectales no tumorales.

4. Los niveles de expresión de todos los microARNs estudiados en esta Tesis, se correlacionan entre tejidos adiposos omentales y subcutáneos.

5. En los tejidos tumorales, los niveles del microARN 132-3p aumentaron en tumores en estadios de Dukes C y D, así como en aquellos con mayor grado de invasión ganglionar. Asimismo, se detectan asociaciones significativas en los niveles de expresión de los microARNs 34a-5p, 132-3p, 143-3p y 181a-5p en TAO y TAS con distintas variables clínico-patológicas, especialmente con el estadio de Dukes, el grado de invasión ganglionar y la localización tumoral.

6. La expresión tumoral de los microARNs 34a-5p, 132-3p y 181a-5p correlaciona de forma significativa e inversa con la longitud telomérica. En tejidos colorrectales no tumorales, se detecta una correlación inversa entre la expresión del microARN 181a-5p y la longitud telomérica.

Conclusiones

7. Se observa una marcada disminución en los niveles de expresión de los microARNs 34a-5p, 132-3p y 143-3p en los TAO de individuos control con actividad telomerasa, frente al grupo control sin actividad de la enzima.

8. Los niveles de expresión del microARN 181a-5p en tejidos tumorales de pacientes con CCR muestran una clara asociación con el IMC, disminuyendo conforme aumentan dichos valores.

9. Los pacientes del grupo control con obesidad presentan, frente a los controles con sobrepeso, un incremento en la expresión del microARN 143-3p en TAO y TAS, así como del microARN 34a-5p en TAS.

10. En el grupo de pacientes con CCR, los sujetos con normopeso presentan niveles de expresión incrementados de los microARNs 132-3p y 143-3p en TAO, y del microARN 143-3p en TAS, en comparación con los detectados en sujetos con sobrepeso u obesidad. Además, en el grupo normopeso con CCR se detectan mayores niveles de expresión del microARN 132-3p en suero y del microARN 181a-5p en tejido tumoral.

11. Los pacientes con obesidad muestran mayores tasas de mantenimiento telomérico tumoral, medido como ratio T/N, en comparación con los grupos con normopeso y sobrepeso.

12. Se observa una mayor frecuencia en la activación de la telomerasa en individuos control con sobrepeso frente al grupo control con obesidad.

13. El exceso de masa corporal constituye un indicador de pronóstico clínico desfavorable en pacientes afectados de CCR.

14. El mantenimiento telomérico en los TAS se comporta como un factor protector en el pronóstico clínico de los pacientes afectados de CCR.

15. Los niveles de expresión más elevados de los microARN 143-3p y 181a-5p en los TAS constituyen indicadores de pronóstico clínico favorable en pacientes afectados de CCR.

En resumen, los resultados de esta Tesis ponen de manifiesto la utilidad que, como biomarcadores en CCR, presentan los microARNs y los parámetros de función telomérica analizados, detectándose asociaciones interesantes con el IMC de los individuos incluidos en los diferentes protocolos.

BIBLIOGRAFÍA

- Ali, A. T., Hochfeld, W. E., Myburgh, R., & Pepper, M. S. (2013). Adipocyte and adipogenesis. *European journal of cell biology*, 92(6-7), 229–236. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2013.06.001>
- Aparicio, T., Ducreux, M., Faroux, R., Barbier, E., Manfredi, S., Lecomte, T., Etienne, P. L., Bedenne, L., Bennouna, J., Phelip, J. M., François, E., Michel, P., Legoux, J. L., Gasmi, M., Breysacher, G., Rougier, P., De Gramont, A., Lepage, C., Bouché, O., Seitz, J. F. for FFCD investigators (2018). Overweight is associated to a better prognosis in metastatic colorectal cancer: A pooled analysis of FFCD trials. *European journal of cancer (Oxford, England: 1990)*, 98, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.03.031>
- Arderiu, G., Lambert, C., Ballesta, C., Moscatiello, F., Vilahur, G., & Badimon, L. (2020). Cardiovascular Risk Factors and Differential Transcriptomic Profile of the Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue and Their Resident Stem Cells. *Cells*, 9(10), 2235. <https://doi.org/10.3390/cells9102235>
- Ardila, H. J., Sanabria-Salas, M. C., Meneses, X., Rios, R., Huertas-Salgado, A., & Serrano, M. L. (2019). Circulating miR-141-3p, miR-143-3p and miR-200c-3p are differentially expressed in colorectal cancer and advanced adenomas. *Molecular and clinical oncology*, 11(2), 201–207. <https://doi.org/10.3892/mco.2019.1876>
- Arroyo, J. D., Chevillet, J. R., Kroh, E. M., Ruf, I. K., Pritchard, C. C., Gibson, D. F., Mitchell, P. S., Bennett, C. F., Pogosova-Agadjanyan, E. L., Stirewalt, D. L., Tait, J. F., & Tewari, M. (2011). Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(12), 5003–5008. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019055108>
- Arroyo, J. D., Chevillet, J. R., Kroh, E. M., Ruf, I. K., Pritchard, C. C., Gibson, D. F., Mitchell, P. S., Bennett, C. F., Pogosova-Agadjanyan, E. L., Stirewalt, D. L., Tait, J. F., & Tewari, M. (2011). Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(12), 5003–5008. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019055108>

Bibliografia

- Artandi, S. E., & DePinho, R. A. (2010). Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis*, 31(1), 9–18. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp268>
- Ashktorab, H., & Brim, H. (2014). DNA Methylation and Colorectal Cancer. *Current colorectal cancer reports*, 10(4), 425–430. <https://doi.org/10.1007/s11888-014-0245-2>
- Badr, E., Ali Assar, M. F., Gohar, S. F., Badr, M. H., Hathout, R. M., & El-Kousy, S. M. (2018). The clinical impact of miRNA34a and P53 gene expression in colon cancer. *Biochemistry and biophysics reports*, 16, 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2018.10.002>
- Bai, J. W., Xue, H. Z., & Zhang, C. (2016). Down-regulation of microRNA-143 is associated with colorectal cancer progression. *European review for medical and pharmacological sciences*, 20(22), 4682–4687.
- Baker, R. G., Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2011). NF- κ B, inflammation, and metabolic disease. *Cell metabolism*, 13(1), 11–22. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.12.008>
- Bartel D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2), 281–297. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00045-5)
- Bernstein, E., Kim, S. Y., Carmell, M. A., Murchison, E. P., Alcorn, H., Li, M. Z., Mills, A. A., Elledge, S. J., Anderson, K. V., & Hannon, G. J. (2003). Dicer is essential for mouse development. *Nature genetics*, 35(3), 215–217. <https://doi.org/10.1038/ng1253>
- Bertorelle, R., Briarava, M., Rampazzo, E., Biasini, L., Agostini, M., Maretto, I., Lonardi, S., Friso, M. L., Mescoli, C., Zagonel, V., Nitti, D., De Rossi, A., & Pucciarelli, S. (2013). Telomerase is an independent prognostic marker of overall survival in patients with colorectal cancer. *British journal of cancer*, 108(2), 278–284. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.602>
- Beyerlein, A., Kusian, D., Ziegler, A. G., Schaffrath-Rosario, A., & von Kries, R. (2014). Classification tree analyses reveal limited potential for early targeted prevention against childhood overweight. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 22(2), 512–517. <https://doi.org/10.1002/oby.20628>

- Blin, N., & Stafford, D. W. (1976). A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic acids research*, 3(9), 2303–2308. <https://doi.org/10.1093/nar/3.9.2303>
- Bloom, S. I., Tuluca, A., Ives, S. J., & Reynolds, T. H. (2020). High-fat diet induced obesity and age influence the telomere shelterin complex and telomerase gene expression in mouse adipose tissue. *Physiological reports*, 8(11), e14461. <https://doi.org/10.14814/phy2.14461>
- Blüher M. (2009). Adipose tissue dysfunction in obesity. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*, 117(6), 241–250. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1192044>
- Blüher M. (2019). Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nature reviews. Endocrinology*, 15(5), 288–298. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0176-8>
- Boisen, M. K., Dehlendorff, C., Linnemann, D., Schultz, N. A., Jensen, B. V., Høgdall, E. V., & Johansen, J. S. (2015). MicroRNA Expression in Formalin-fixed Paraffin-embedded Cancer Tissue: Identifying Reference MicroRNAs and Variability. *BMC cancer*, 15, 1024. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-2030-2>
- Boland, C. R., & Goel, A. (2010). Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2073–2087.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.12.064>
- Bonifacio, L. N., & Jarstfer, M. B. (2010). MiRNA profile associated with replicative senescence, extended cell culture, and ectopic telomerase expression in human foreskin fibroblasts. *PloS one*, 5(9), e12519. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012519>
- Borchert, G. M., Lanier, W., & Davidson, B. L. (2006). RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nature structural & molecular biology*, 13(12), 1097–1101. <https://doi.org/10.1038/nsmb1167>
- Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye

binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248–254.
<https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>

- Bråkenhielm, E., Veitonmäki, N., Cao, R., Kihara, S., Matsuzawa, Y., Zhivotovsky, B., Funahashi, T., & Cao, Y. (2004). Adiponectin-induced antiangiogenesis and antitumor activity involve caspase-mediated endothelial cell apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(8), 2476–2481. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308671100>
- Bucur O. (2016). microRNA regulators of apoptosis in cancer. *Discoveries (Craiova, Romania)*, 4(1), e57. <https://doi.org/10.15190/d.2016.4>
- Cai, Z., Huang, Y., & He, B. (2022). New Insights into Adipose Tissue Macrophages in Obesity and Insulin Resistance. *Cells*, 11(9), 1424. <https://doi.org/10.3390/cells11091424>
- Calado, R. T., & Young, N. S. (2009). Telomere diseases. *The New England journal of medicine*, 361(24), 2353–2365. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0903373>
- Cao, D., Hou, M., Guan, Y. S., Jiang, M., Yang, Y., & Gou, H. F. (2009). Expression of HIF-1 α and VEGF in colorectal cancer: association with clinical outcomes and prognostic implications. *BMC cancer*, 9, 432. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-432>
- Catalanotto, C., Cogoni, C., & Zardo, G. (2016). MicroRNA in Control of Gene Expression: An Overview of Nuclear Functions. *International journal of molecular sciences*, 17(10), 1712. <https://doi.org/10.3390/ijms17101712>
- Cawthon R. M. (2002). Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic acids research*, 30(10), e47. <https://doi.org/10.1093/nar/30.10.e47>
- Cawthon R. M. (2002). Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic acids research*, 30(10), e47. <https://doi.org/10.1093/nar/30.10.e47>
- Cha, Y. H., Kim, N. H., Park, C., Lee, I., Kim, H. S., & Yook, J. I. (2012). MiRNA-34 intrinsically links p53 tumor suppressor and Wnt signaling. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 11(7), 1273–1281. <https://doi.org/10.4161/cc.19618>

- Chen, B., Xia, Z., Deng, Y. N., Yang, Y., Zhang, P., Zhu, H., Xu, N., & Liang, S. (2019). Emerging microRNA biomarkers for colorectal cancer diagnosis and prognosis. *Open biology*, 9(1), 180212. <https://doi.org/10.1098/rsob.180212>
- Chen, X., Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K., Guo, J., Zhang, Y., Chen, J., Guo, X., Li, Q., Li, X., Wang, W., Zhang, Y., Wang, J., Jiang, X., Xiang, Y., Xu, C., Zheng, P., Zhang, J., Li, R., Zhang, H., Shang, X., Gong, T., Ning, G., Wang, J., Zen, K., Zhang, J., Zhang, C. Y. (2008). Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell research*, 18(10), 997–1006. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.282>
- Chen, X., Guo, X., Zhang, H., Xiang, Y., Chen, J., Yin, Y., Cai, X., Wang, K., Wang, G., Ba, Y., Zhu, L., Wang, J., Yang, R., Zhang, Y., Ren, Z., Zen, K., Zhang, J., & Zhang, C. Y. (2009). Role of miR-143 targeting KRAS in colorectal tumorigenesis. *Oncogene*, 28(10), 1385–1392. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.474>
- Chen, X., Liang, H., Zhang, J., Zen, K., & Zhang, C. Y. (2012). Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication. *Trends in cell biology*, 22(3), 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.12.001>
- Chen, Y. (2019). The structural biology of the shelterin complex. *Biological Chemistry*, 400(4), 457-466. <https://doi.org/10.1515/hsz-2018-0368>
- Choi, S. E., & Kemper, J. K. (2013). Regulation of SIRT1 by microRNAs. *Molecules and cells*, 36(5), 385–392. <https://doi.org/10.1007/s10059-013-0297-1>
- Chuaire L. (2006). Telomere and Telomerase: Brief review of a history initiated by Hermann Müller and Barbara McClintock. *Colombia Médica*, 37(4), 332-335. Retrieved May 29, 2022, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1657-95342006000400014&lng=en&tlng=en.
- Cogswell, J. P., Ward, J., Taylor, I. A., Waters, M., Shi, Y., Cannon, B., Kelnar, K., Kempainen, J., Brown, D., Chen, C., Prinjha, R. K., Richardson, J. C., Saunders, A. M., Roses, A. D., & Richards, C. A. (2008). Identification of miRNA changes in Alzheimer's disease brain and CSF yields putative biomarkers

and insights into disease pathways. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 14(1), 27–41. <https://doi.org/10.3233/jad-2008-14103>

- Cong, L., Gasser, J., Zhao, J., Yang, B., Li, F., & Zhao, A. Z. (2007). Human adiponectin inhibits cell growth and induces apoptosis in human endometrial carcinoma cells, HEC-1-A and RL95 2. *Endocrine-related cancer*, 14(3), 713–720. <https://doi.org/10.1677/ERC-07-0065>

- Cong, Y. S., Wright, W. E., & Shay, J. W. (2002). Human telomerase and its regulation. *Microbiology and molecular biology reviews:MMBR*, 66(3), 407–425. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.407-425.2002>

- Counter, C. M., Meyerson, M., Eaton, E. N., Ellisen, L. W., Caddle, S. D., Haber, D. A., & Weinberg, R. A. (1998). Telomerase activity is restored in human cells by ectopic expression of hTERT (hEST2), the catalytic subunit of telomerase. *Oncogene*, 16(9), 1217–1222. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201882>

- Cusanelli, E., & Chartrand, P. (2015). Telomeric repeat-containing RNA TERRA: a noncoding RNA connecting telomere biology to genome integrity. *Frontiers in genetics*, 6, 143. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00143>

- Cust, A. E., Kaaks, R., Friedenreich, C., Bonnet, F., Laville, M., Lukanova, A., Rinaldi, S., Dossus, L., Slimani, N., Lundin, E., Tjønneland, A., Olsen, A., Overvad, K., Clavel-Chapelon, F., Mesrine, S., Joulin, V., Linseisen, J., Rohrmann, S., Pischon, T., Boeing, Trichopoulos, D., Trichopoulou, A., Benetou, V., Palli, D., Berrino, F., Tumino, R., Sacerdote, C., Mattiello, A., Quirós, J. R., Mendez, M. A., Sánchez, M. J., Larrañaga, N., Tormo, M. J., Ardanaz, E., Bueno-de-Mesquita, H. B., Peeters, P. H., van Gils, C. H., Khaw, K.T., Bingham, S., Allen, N., Key, T., Jenab, M., Riboli, E. (2007). Plasma adiponectin levels and endometrial cancer risk in pre- and postmenopausal women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 92(1), 255–263. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-1371>

- Dai, J., Zhuang, Y., Tang, M., Qian, Q., & Chen, J. P. (2020). CircRNA UBAP2 facilitates the progression of colorectal cancer by regulating miR-199a/VEGFA pathway. *European review for medical and pharmacological sciences*, 24(15), 7963–7971. https://doi.org/10.26355/eurrev_202008_22479

- Daniel, C. R., Shu, X., Ye, Y., Gu, J., Raju, G. S., Kopetz, S., & Wu, X. (2016). Severe obesity prior to diagnosis limits survival in colorectal cancer patients evaluated at a large cancer centre. *British journal of cancer*, 114(1), 103–109. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.424>
- Di, W., Zhang, W., Zhu, B., Li, X., Tang, Q., & Zhou, Y. (2021). Colorectal cancer prompted adipose tissue browning and cancer cachexia through transferring exosomal miR-146b-5p. *Journal of cellular physiology*, 236(7), 5399–5410. <https://doi.org/10.1002/jcp.30245>
- Ding, X., Du, J., Mao, K., Wang, X., Ding, Y., & Wang, F. (2019). MicroRNA-143-3p suppresses tumorigenesis by targeting catenin- δ 1 in colorectal cancer. *OncoTargets and therapy*, 12, 3255–3265. <https://doi.org/10.2147/OTT.S184118>
- Ding, X., Du, J., Mao, K., Wang, X., Ding, Y., & Wang, F. (2019). MicroRNA-143-3p suppresses tumorigenesis by targeting catenin- δ 1 in colorectal cancer. *OncoTargets and therapy*, 12, 3255–3265. <https://doi.org/10.2147/OTT.S184118>
- Dirat, B. A., Bochet, L., Escourrou, G., Valet, P., & Muller, C. (2010). Unraveling the obesity and breast cancer links: a role for cancer-associated adipocytes?. *Endocrine development*, 19, 45–52. <https://doi.org/10.1159/000316896>
- Doleman, B., Mills, K. T., Lim, S., Zelhart, M. D., & Gagliardi, G. (2016). Body mass index and colorectal cancer prognosis: a systematic review and meta-analysis. *Techniques in coloproctology*, 20(8), 517–535. <https://doi.org/10.1007/s10151-016-1498-3>
- Dumas, J. F., & Brisson, L. (2021). Interaction between adipose tissue and cancer cells: role for cancer progression. *Cancer metastasis reviews*, 40(1), 31–46. <https://doi.org/10.1007/s10555-020-09934-2>
- el Bouazzaoui, F., Henneman, P., Thijssen, P., Visser, A., Koning, F., Lips, M. A., Janssen, I., Pijl, H., Willems van Dijk, K., & van Harmelen, V. (2014). Adipocyte telomere length associates negatively with adipocyte size, whereas adipose tissue telomere length associates negatively with the extent of

fibrosis in severely obese women. *International journal of obesity* (2005), 38(5), 746–749. <https://doi.org/10.1038/ijo.2013.175>

- Elias, K. M., Fendler, W., Stawiski, K., Fiascone, S. J., Vitonis, A. F., Berkowitz, R. S., Frenzl, G., Konstantinopoulos, P., Crum, C. P., Kedzierska, M., Cramer, D. W., & Chowdhury, D. (2017). Diagnostic potential for a serum miRNA neural network for detection of ovarian cancer. *eLife*, 6, e28932. <https://doi.org/10.7554/eLife.28932>

- Engelhardt, M., Drullinsky, P., Guillem, J., & Moore, M. A. (1997). Telomerase and telomere length in the development and progression of premalignant lesions to colorectal cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 3(11), 1931–1941.

- Esau, C., Kang, X., Peralta, E., Hanson, E., Marcusson, E. G., Ravichandran, L. V., Sun, Y., Koo, S., Perera, R. J., Jain, R., Dean, N. M., Freier, S. M., Bennett, C. F., Lollo, B., & Griffey, R. (2004). MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *The Journal of biological chemistry*, 279(50), 52361–52365. <https://doi.org/10.1074/jbc.C400438200>

- Fabbri, M., Paone, A., Calore, F., Galli, R., Gaudio, E., Santhanam, R., Lovat, F., Fadda, P., Mao, C., Nuovo, G. J., Zanesi, N., Crawford, M., Ozer, G. H., Wernicke, D., Alder, H., Caligiuri, M. A., Nana-Sinkam, P., Perrotti, D., & Croce, C. M. (2012). MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(31), E2110–E2116. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209414109>

- Fearon, E. R., & Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61(5), 759–767. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90186-i](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90186-i)

- Fernández-Marcelo T, Sánchez-Pernaute A, Pascua I, De Juan C, Head J, et al. (2016) Clinical Relevance of Telomere Status and Telomerase Activity in Colorectal Cancer. *PLOS ONE* 11(2): e0149626. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149626>

- Fernández-Marcelo, T., Gómez, A., Pascua, I., de Juan, C., Head, J., Hernando, F., Jarabo, J. R., Calatayud, J., Torres-García, A. J., & Iniesta, P. (2015). Telomere length and telomerase activity in non-small cell lung cancer

prognosis: clinical usefulness of a specific telomere status. *Journal of experimental & clinical cancer research*: CR, 34(1), 78.

<https://doi.org/10.1186/s13046-015-0195-9>

- Ferrante, S. C., Nadler, E. P., Pillai, D. K., Hubal, M. J., Wang, Z., Wang, J. M., Gordish-Dressman, H., Koeck, E., Sevilla, S., Wiles, A. A., & Freishtat, R. J. (2015). Adipocyte-derived exosomal miRNAs: a novel mechanism for obesity-related disease. *Pediatric research*, 77(3), 447–454.

<https://doi.org/10.1038/pr.2014.202>

- Fuchs, C. S., Giovannucci, E. L., Colditz, G. A., Hunter, D. J., Speizer, F. E., & Willett, W. C. (1994). A prospective study of family history and the risk of colorectal cancer. *The New England journal of medicine*, 331(25), 1669–1674.

<https://doi.org/10.1056/NEJM199412223312501>

- Gallo, A., Tandon, M., Alevizos, I., & Illei, G. G. (2012). The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. *PloS one*, 7(3), e30679.

- Gao, J., Li, N., Dong, Y., Li, S., Xu, L., Li, X., Li, Y., Li, Z., Ng, S. S., Sung, J. J., Shen, L., & Yu, J. (2015). miR-34a-5p suppresses colorectal cancer metastasis and predicts recurrence in patients with stage II/III colorectal cancer. *Oncogene*, 34(31), 4142–4152.

- Gao, S., Zhao, Z. Y., Wu, R., Zhang, Y., & Zhang, Z. Y. (2018). Prognostic value of microRNAs in colorectal cancer: a meta-analysis. *Cancer management and research*, 10, 907–929.

<https://doi.org/10.2147/CMAR.S157493>

- Gao, Z., Daquinag, A.C., Fussell, C., Zhao, Z., Dai, Y., Rivera, A.R., Snyder, B.E., Eckel-Mahan, K.L., & Kolonin, M.G. (2020). Age-associated telomere attrition in adipocyte progenitors predisposes to metabolic disease. *Nature metabolism*, 2 12, 1482-1497.

<https://doi.org/10.1038/s42255-020-00320-4>

- Garcia-Aranda, C., de Juan, C., Diaz-Lopez, A., Sanchez-Pernaute, A., Torres, A. J., Diaz-Rubio, E., Balibrea, J. L., Benito, M., & Iniesta, P. (2006). Correlations of telomere length, telomerase activity, and telomeric-repeat binding

factor 1 expression in colorectal carcinoma. *Cancer*, 106(3), 541–551.
<https://doi.org/10.1002/cncr.21625>

- García-Martínez, S., González-Gamo, D., Fernández-Marcelo, T., Tesolato, S., De La Serna, S., Domínguez-Serrano, I., Cano-Valderrama, O., Barabash, A., De Juan, C., Torres-García, A., Iniesta, P. (2021). Obesity and telomere status in the prognosis of patients with colorectal cancer submitted to curative intention surgical treatment. *Molecular and Clinical Oncology*, 15, 184.
<https://doi.org/10.3892/mco.2021.2346>

- Geekiyanage, H., Rayatpisheh, S., Wohlschlegel, J. A., Brown, R., Jr, & Ambros, V. (2020). Extracellular microRNAs in human circulation are associated with miRISC complexes that are accessible to anti-AGO2 antibody and can bind target mimic oligonucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(39), 24213–24223.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2008323117>

- Gerasymchuk, M., Cherkasova, V., Kovalchuk, O., & Kovalchuk, I. (2020). The Role of microRNAs in Organismal and Skin Aging. *International journal of molecular sciences*, 21(15), 5281.
<https://doi.org/10.3390/ijms21155281>

- Gerhard, G. S., Styer, A. M., Strodel, W. E., Roesch, S. L., Yavorek, A., Carey, D. J., Wood, G. C., Petrick, A. T., Gabrielsen, J., Ibele, A., Benotti, P., Rolston, D. D., Still, C. D., & Argyropoulos, G. (2014). Gene expression profiling in subcutaneous, visceral and epigastric adipose tissues of patients with extreme obesity. *International journal of obesity* (2005), 38(3), 371–378.
<https://doi.org/10.1038/ijo.2013.152>

- Giner, M., Montoya, M.J., Vázquez, M.A., Miranda, C., Miranda, M.J., & Pérez-Cano, R.. (2016). ¿Qué son los microARNs?: posibles biomarcadores y dianas terapéuticas en la enfermedad osteoporótica. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, 8(1), 40-44.

- Gmerek, L., Martyniak, K., Horbacka, K., Krokowicz, P., Scierski, W., Golusinski, P., Golusinski, W., Schneider, A., & Masternak, M. M. (2019). MicroRNA regulation in colorectal cancer tissue and serum. *PLoS one*, 14(8), e0222013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222013>

- Goodall, G.J., Wickramasinghe, V.O. RNA in cancer. (2021). *Nat Rev Cancer* 21, 22–36. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-00306-0>
- Greider, C. W., & Blackburn, E. H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell*, 43(2 Pt 1), 405–413. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(85\)90170-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(85)90170-9)
- Griffith, J. D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R. M., Bianchi, A., Moss, H., & de Lange, T. (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell*, 97(4), 503–514. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80760-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80760-6)
- Gucalp, A., Iyengar, N. M., Hudis, C. A., & Dannenberg, A. J. (2016). Targeting obesity-related adipose tissue dysfunction to prevent cancer development and progression. *Seminars in oncology*, 43(1), 154–160. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2015.09.012>
- Guinney, J., Dienstmann, R., Wang, X., de Reyniès, A., Schlicker, A., Song, C., Marisa, L., Roepman, P., Nyamundanda, G., Angelino, P., Bot, B. M., Morris, J. S., Simon, I. M., Gerster, S., Fessler, E., De Sousa E Melo, F., Missiaglia, E., Ramay, H., Barras, D., Homiczko, K., Tejpar, S. (2015). The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nature medicine*, 21(11), 1350–1356. <https://doi.org/10.1038/nm.3967>
- Guo, L., Fu, J., Sun, S., Zhu, M., Zhang, L., Niu, H., Chen, Z., Zhang, Y., Guo, L., & Wang, S. (2019). MicroRNA-143-3p inhibits colorectal cancer metastases by targeting ITGA6 and ASAP3. *Cancer science*, 110(2), 805–816. <https://doi.org/10.1111/cas.13910>
- Guo, L., Fu, J., Sun, S., Zhu, M., Zhang, L., Niu, H., Chen, Z., Zhang, Y., Guo, L., & Wang, S. (2019). MicroRNA-143-3p inhibits colorectal cancer metastases by targeting ITGA6 and ASAP3. *Cancer science*, 110(2), 805–816. <https://doi.org/10.1111/cas.13910>
- Hadar, A., Milanesi, E., Walczak, M., Puzianowska-Kuźnicka, M., Kuźnicki, J., Squassina, A., Niola, P., Chillotti, C., Attems, J., Gozes, I., & Gurwitz, D. (2018). SIRT1, miR-132 and miR-212 link human longevity to Alzheimer's Disease. *Scientific Reports*, 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26547-6>

Bibliografia

- Han, P., Li, J. W., Zhang, B. M., Lv, J. C., Li, Y. M., Gu, X. Y., Yu, Z. W., Jia, Y. H., Bai, X. F., Li, L., Liu, Y. L., & Cui, B. B. (2017). The lncRNA CRNDE promotes colorectal cancer cell proliferation and chemoresistance via miR-181a-5p-mediated regulation of Wnt/ β -catenin signaling. *Molecular cancer*, 16(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0583-1>
- Hanahan D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer discovery*, 12(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hannafon, B. N., Carpenter, K. J., Berry, W. L., Janknecht, R., Dooley, W. C., & Ding, W. Q. (2015). Exosome-mediated microRNA signaling from breast cancer cells is altered by the anti-angiogenesis agent docosahexaenoic acid (DHA). *Molecular cancer*, 14, 133. <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0400-7>
- Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J., & Cardoso, F. (2019). Breast cancer. *Nature reviews. Disease primers*, 5(1), 66. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2>
- He, C., Xiong, J., Xu, X., Lu, W., Liu, L., Xiao, D., & Wang, D. (2009). Functional elucidation of MiR-34 in osteosarcoma cells and primary tumor samples. *Biochemical and biophysical research communications*, 388(1), 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.07.101>
- He, X., Ma, J., Zhang, M., Cui, J., & Yang, H. (2020). Long Non-Coding RNA SNHG16 Activates USP22 Expression to Promote Colorectal Cancer Progression by Sponging miR-132-3p. *OncoTargets and therapy*, 13, 4283–4294. <https://doi.org/10.2147/OTT.S244778>
- Henagan, T. M., Phillips, M. D., Cheek, D. J., Kirk, K. M., Barbee, J. J., & Stewart, L. K. (2011). The melanocortin 3 receptor: a novel mediator of exercise-induced inflammation reduction in postmenopausal women?. *Journal of aging research*, 2011, 512593. <https://doi.org/10.4061/2011/512593>
- Heneghan, H. M., Miller, N., McAnena, O. J., O'Brien, T., & Kerin, M. J. (2011). Differential miRNA expression in omental adipose tissue and in the circulation of obese patients identifies novel metabolic biomarkers. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 96(5), E846–E850. <https://doi.org/10.1210/jc.2010-2701>

- Herbig, U., Jobling, W. A., Chen, B. P., Chen, D. J., & Sedivy, J. M. (2004). Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Molecular cell*, 14(4), 501–513. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(04\)00256-4](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(04)00256-4)
- Hoda, M. R., Keely, S. J., Bertelsen, L. S., Junger, W. G., Dharmasena, D., & Barrett, K. E. (2007). Leptin acts as a mitogenic and antiapoptotic factor for colonic cancer cells. *The British journal of surgery*, 94(3), 346–354. <https://doi.org/10.1002/bjs.5530>
- Hsing, A. W., McLaughlin, J. K., Chow, W. H., Schuman, L. M., Co Chien, H. T., Gridley, G., Bjelke, E., Wacholder, S., & Blot, W. J. (1998). Risk factors for colorectal cancer in a prospective study among U.S. white men. *International journal of cancer*, 77(4), 549–553. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0215\(19980812\)77:4<549::aid-ijc13>3.0.co;2-1](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(19980812)77:4<549::aid-ijc13>3.0.co;2-1)
- Hsu, Y. L., Lin, C. C., Jiang, J. K., Lin, H. H., Lan, Y. T., Wang, H. S., Yang, S. H., Chen, W. S., Lin, T. C., Lin, J. K., Lin, P. C., & Chang, S. C. (2019). Clinicopathological and molecular differences in colorectal cancer according to location. *The International journal of biological markers*, 34(1), 47–53. <https://doi.org/10.1177/1724600818807164>
- Huang, Z., & Xu, H. (2019). MicroRNA-181a-5p Regulates Inflammatory Response of Macrophages in Sepsis. *Open medicine (Warsaw, Poland)*, 14, 899–908. <https://doi.org/10.1515/med-2019-0106>
- Hursting, S. D., & Berger, N. A. (2010). Energy balance, host-related factors, and cancer progression. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(26), 4058–4065. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.27.9935>
- Hursting, S. D., Digiovanni, J., Dannenberg, A. J., Azrad, M., Leroith, D., Demark-Wahnefried, W., Kakarala, M., Brodie, A., & Berger, N. A. (2012). Obesity, energy balance, and cancer: new opportunities for prevention. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)*, 5(11), 1260–1272. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-12-0140>
- Huxley, R. R., Ansary-Moghaddam, A., Clifton, P., Czernichow, S., Parr, C. L., & Woodward, M. (2009). The impact of dietary and lifestyle risk factors

on risk of colorectal cancer: a quantitative overview of the epidemiological evidence. *International journal of cancer*, 125(1), 171–180.

<https://doi.org/10.1002/ijc.24343>

- Hwang, H., Buncher, N., Opresko, P. L., & Myong, S. (2012). POT1-TPP1 regulates telomeric overhang structural dynamics. *Structure (London, England : 1993)*, 20(11), 1872–1880. <https://doi.org/10.1016/j.str.2012.08.018>

- Iglesias Molli, A. E., Panero, J., Dos Santos, P. C., González, C. D., Vilariño, J., Sereday, M., Cerrone, G. E., Slavutsky, I., & Frechtel, G. D. (2017). Metabolically healthy obese women have longer telomere length than obese women with metabolic syndrome. *PloS one*, 12(4), e0174945.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174945>

- Jafri, M. A., Ansari, S. A., Alqahtani, M. H., & Shay, J. W. (2016). Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies. *Genome medicine*, 8(1), 69. <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0324-x>

- Jansson, L. I., Hentschel, J., Parks, J. W., Chang, T. R., Lu, C., Baral, R., Bagshaw, C. R., & Stone, M. D. (2019). Telomere DNA G-quadruplex folding within actively extending human telomerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(19), 9350–9359.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1814777116>

- Ji, D., Chen, Z., Li, M., Zhan, T., Yao, Y., Zhang, Z., Xi, J., Yan, L., & Gu, J. (2014). MicroRNA-181a promotes tumor growth and liver metastasis in colorectal cancer by targeting the tumor suppressor WIF-1. *Molecular cancer*, 13, 86.

<https://doi.org/10.1186/1476-4598-13-86>

- Ji, D., Chen, Z., Li, M., Zhan, T., Yao, Y., Zhang, Z., Xi, J., Yan, L., & Gu, J. (2014). MicroRNA-181a promotes tumor growth and liver metastasis in colorectal cancer by targeting the tumor suppressor WIF-1. *Molecular cancer*, 13, 86.

<https://doi.org/10.1186/1476-4598-13-86>

- Johnson, C. M., Wei, C., Ensor, J. E., Smolenski, D. J., Amos, C. I., Levin, B., & Berry, D. A. (2013). Meta-analyses of colorectal cancer risk factors.

Cancer causes & control: CCC, 24(6), 1207–1222.

<https://doi.org/10.1007/s10552-013-0201-5>

- Jung, S. J., Seo, Y. R., Park, W. J., Heo, Y. R., Lee, Y. H., Kim, S., & Lee, J. H. (2020). Clinicopathological Characteristics of TZAP Expression in Colorectal Cancers. *OncoTargets and therapy*, 13, 12933–12942. <https://doi.org/10.2147/OTT.S274394>
- Kern, P. A., Ranganathan, S., Li, C., Wood, L., & Ranganathan, G. (2001). Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 280(5), E745–E751. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.2001.280.5.E745>
- Kilic, I. D., Dodurga, Y., Uludag, B., Alihanoglu, Y. I., Yildiz, B. S., Enli, Y., Secme, M., & Bostanci, H. E. (2015). MicroRNA -143 and -223 in obesity. *Gene*, 560(2), 140–142. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.01.048>
- Kim, A. Y., Lee, Y. S., Kim, K. H., Lee, J. H., Lee, H. K., Jang, S. H., Kim, S. E., Lee, G. Y., Lee, J. W., Jung, S. A., Chung, H. Y., Jeong, S., & Kim, J. B. (2010). Adiponectin represses colon cancer cell proliferation via AdipoR1- and -R2-mediated AMPK activation. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 24(7), 1441–1452. <https://doi.org/10.1210/me.2009-0498>
- Kim, W., Ludlow, A. T., Min, J., Robin, J. D., Stadler, G., Mender, I., Lai, T. P., Zhang, N., Wright, W. E., & Shay, J. W. (2016). Regulation of the Human Telomerase Gene TERT by Telomere Position Effect-Over Long Distances (TPE-OLD): Implications for Aging and Cancer. *PLoS biology*, 14(12), e2000016. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2000016>
- Klötting, N., Berthold, S., Kovacs, P., Schön, M. R., Fasshauer, M., Ruschke, K., Stumvoll, M., & Blüher, M. (2009). MicroRNA expression in human omental and subcutaneous adipose tissue. *PloS one*, 4(3), e4699. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004699>
- Knight, B. B., Oprea-Ilieș, G. M., Nagalingam, A., Yang, L., Cohen, C., Saxena, N. K., & Sharma, D. (2011). Survivin upregulation, dependent on leptin-EGFR-Notch1 axis, is essential for leptin-induced migration of breast carcinoma cells. *Endocrine-related cancer*, 18(4), 413–428. <https://doi.org/10.1530/ERC-11-0075>
- Korac, A., Srdic-Galic, B., Kalezic, A., Stancic, A., Otasevic, V., Korac, B., & Jankovic, A. (2021). Adipokine signatures of subcutaneous and

visceral abdominal fat in normal-weight and obese women with different metabolic profiles. *Archives of medical science : AMS*, 17(2), 323–336.

<https://doi.org/10.5114/aoms/92118>

- Kordinas, V., Ioannidis, A., & Chatzipanagiotou, S. (2016). The Telomere/Telomerase System in Chronic Inflammatory Diseases. Cause or Effect?. *Genes*, 7(9), 60. <https://doi.org/10.3390/genes7090060>

- Körner, A., Pazaitou-Panayiotou, K., Kelesidis, T., Kelesidis, I., Williams, C. J., Kaprara, A., Bullen, J., Neuwirth, A., Tseleni, S., Mitsiades, N., Kiess, W., & Mantzoros, C. S. (2007). Total and high-molecular-weight adiponectin in breast cancer: in vitro and in vivo studies. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 92(3), 1041–1048.

<https://doi.org/10.1210/jc.2006-1858>

- Kosaka, N., Iguchi, H., Yoshioka, Y., Takeshita, F., Matsuki, Y., & Ochiya, T. (2010). Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *The Journal of biological chemistry*, 285(23), 17442–17452.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.107821>

- Kroupa, M., Rachakonda, S. K., Liska, V., Srinivas, N., Urbanova, M., Jiraskova, K., Schneiderova, M., Vycital, O., Vymetalkova, V., Vodickova, L., Kumar, R., & Vodicka, P. (2019). Relationship of telomere length in colorectal cancer patients with cancer phenotype and patient prognosis. *British journal of cancer*, 121(4), 344–350. <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0525-3>

- Kühnen, P., Wiegand, S., & Biebermann, H. (2020). Pharmacological treatment strategies for patients with monogenic obesity. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM*, /j/jpem.ahead-of-print/jpem-2020-0129/jpem-2020-0129.xml. Advance online publication.

<https://doi.org/10.1515/jpem-2020-0129>

- Kuo, Y. H., Shi, C. S., Huang, C. Y., Huang, Y. C., & Chin, C. C. (2018). Prognostic significance of unintentional body weight loss in colon cancer patients. *Molecular and clinical oncology*, 8(4), 533–538.

<https://doi.org/10.3892/mco.2018.1582>

- Kurylowicz, A., Owczarż, M., Polosak, J., Jonas, M. I., Lisik, W., Jonas, M., Chmura, A., & Puzianowska-Kuznicka, M. (2016). SIRT1 and SIRT7 expression in adipose tissues of obese and normal-weight individuals is regulated

by microRNAs but not by methylation status. *International journal of obesity* (2005), 40(11), 1635–1642. <https://doi.org/10.1038/ijo.2016.131>

- Laforest, S., Labrecque, J., Michaud, A., Cianflone, K., & Tchernof, A. (2015). Adipocyte size as a determinant of metabolic disease and adipose tissue dysfunction. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 52(6), 301–313. <https://doi.org/10.3109/10408363.2015.1041582>
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Meyer, J., Borkhardt, A., & Tuschl, T. (2003). New microRNAs from mouse and human. *RNA (New York, N.Y.)*, 9(2), 175–179. <https://doi.org/10.1261/rna.2146903>
- Lakowa, N., Trieu, N., Flehmig, G., Lohmann, T., Schön, M. R., Dietrich, A., Zeplin, P. H., Langer, S., Stumvoll, M., Blüher, M., & Klötting, N. (2015). Telomere length differences between subcutaneous and visceral adipose tissue in humans. *Biochemical and biophysical research communications*, 457(3), 426–432. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.12.122>
- Larsson, S. C., Orsini, N., & Wolk, A. (2005). Diabetes mellitus and risk of colorectal cancer: a meta-analysis. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(22), 1679–1687. <https://doi.org/10.1093/jnci/dji375>
- Lazar, I. M., Karcini, A., Ahuja, S., & Estrada-Palma, C. (2019). Proteogenomic Analysis of Protein Sequence Alterations in Breast Cancer Cells. *Scientific reports*, 9(1), 10381. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46897-z>
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H., & Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal*, 23(20), 4051–4060. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600385>
- Lei, M., Zaug, A. J., Podell, E. R., & Cech, T. R. (2005). Switching human telomerase on and off with hPOT1 protein in vitro. *The Journal of biological chemistry*, 280(21), 20449–20456. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502212200>
- Li, C., Yan, G., Yin, L., Liu, T., Li, C., & Wang, L. (2019). Prognostic roles of microRNA 143 and microRNA 145 in colorectal cancer: A meta-analysis. *The International journal of biological markers*, 34(1), 6–14. <https://doi.org/10.1177/1724600818807492>

Bibliografia

- Li, H., Cao, Y., Berndt, M.C., Funder, J.W., & Liu, J. (1999). Molecular interactions between telomerase and the tumor suppressor protein p53 in vitro. *Oncogene*, 18, 6785-6794.
- Li, H., Zhao, L., Yang, Z., Funder, J. W., & Liu, J. P. (1998). Telomerase is controlled by protein kinase Calpha in human breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry*, 273(50), 33436–33442. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.50.33436>
- Li, S., Xu, J. J., & Zhang, Q. Y. (2019). MicroRNA-132-3p inhibits tumor malignant progression by regulating lysosomal-associated protein transmembrane 4 beta in breast cancer. *Cancer science*, 110(10), 3098–3109. <https://doi.org/10.1111/cas.14164>
- Li, Z., Liu, Z. M., & Xu, B. H. (2018). A meta-analysis of the effect of microRNA-34a on the progression and prognosis of gastric cancer. *European review for medical and pharmacological sciences*, 22(23), 8281–8287. https://doi.org/10.26355/eurrev_201812_16525
- Lim, C.J., Cech, T.R. (2021) Shaping human telomeres: from shelterin and CST complexes to telomeric chromatin organization. *Nat Rev Mol Cell Biol* 22, 283–298. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00328-y>
- Lin, R., Wang, S., & Zhao, R. C. (2013). Exosomes from human adipose-derived mesenchymal stem cells promote migration through Wnt signaling pathway in a breast cancer cell model. *Molecular and cellular biochemistry*, 383(1-2), 13–20. <https://doi.org/10.1007/s11010-013-1746-z>
- Liu, K., Hodes, R. J., & Weng Np (2001). Cutting edge: telomerase activation in human T lymphocytes does not require increase in telomerase reverse transcriptase (hTERT) protein but is associated with hTERT phosphorylation and nuclear translocation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 166(8), 4826–4830. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.8.4826>
- Liu, Z., Brooks, R. S., Ciappio, E. D., Kim, S. J., Crott, J. W., Bennett, G., Greenberg, A. S., & Mason, J. B. (2012). Diet-induced obesity elevates colonic TNF- α in mice and is accompanied by an activation of Wnt signaling: a mechanism for obesity-associated colorectal cancer. *The Journal of nutritional biochemistry*, 23(10), 1207–1213. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2011.07.002>

- Loeb, K. R., & Loeb, L. A. (2000). Significance of multiple mutations in cancer. *Carcinogenesis*, 21(3), 379–385. <https://doi.org/10.1093/carcin/21.3.379>
- Loebig, M., Klement, J., Schmoller, A., Betz, S., Heuck, N., Schweiger, U., Peters, A., Schultes, B., & Oltmanns, K. M. (2010). Evidence for a relationship between VEGF and BMI independent of insulin sensitivity by glucose clamp procedure in a homogenous group healthy young men. *PloS one*, 5(9), e12610. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012610>
- Lonergan, P. E., & Tindall, D. J. (2011). Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression. *Journal of carcinogenesis*, 10, 20. <https://doi.org/10.4103/1477-3163.83937>
- Lozano-Bartolomé, J., Llauradó, G., Portero-Otin, M., Altuna-Coy, A., Rojo-Martínez, G., Vendrell, J., Jorba, R., Rodríguez-Gallego, E., & Chacón, M. R. (2018). Altered Expression of miR-181a-5p and miR-23a-3p Is Associated With Obesity and TNF α -Induced Insulin Resistance. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 103(4), 1447–1458. <https://doi.org/10.1210/jc.2017-01909>
- Lozano-Bartolomé, J., Llauradó, G., Portero-Otin, M., Altuna-Coy, A., Rojo-Martínez, G., Vendrell, J., Jorba, R., Rodríguez-Gallego, E., & Chacón, M. R. (2018). Altered Expression of miR-181a-5p and miR-23a-3p Is Associated With Obesity and TNF α -Induced Insulin Resistance. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 103(4), 1447–1458. <https://doi.org/10.1210/jc.2017-01909>
- Lumeng, C. N., Bodzin, J. L., & Saltiel, A. R. (2007). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *The Journal of clinical investigation*, 117(1), 175–184. <https://doi.org/10.1172/JCI29881>
- Lv, Y., Zhang, Y., Li, X., Ren, X., Wang, M., Tian, S., Hou, P., Shi, B., & Yang, Q. (2017). Long telomere length predicts poor clinical outcome in esophageal cancer patients. *Pathology, research and practice*, 213(2), 113–118. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2016.11.010>
- Ma, J., Giovannucci, E., Pollak, M., Leavitt, A., Tao, Y., Gaziano, J. M., & Stampfer, M. J. (2004). A prospective study of plasma C-peptide and

colorectal cancer risk in men. *Journal of the National Cancer Institute*, 96(7), 546–553. <https://doi.org/10.1093/jnci/djh082>

- Mangge, H., Renner, W., Almer, G., Gruber, H. J., Zelzer, S., Moeller, R., Horejsi, R., & Herrmann, M. (2019). Subcutaneous adipose tissue distribution and telomere length. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 57(9), 1358–1363. <https://doi.org/10.1515/cclm-2018-0801>

- Margetis, N., Kouloukoussa, M., Pavlou, K., Vrakas, S., & Mariolis-Sapsakos, T. (2017). K-ras Mutations as the Earliest Driving Force in a Subset of Colorectal Carcinomas. *In vivo* (Athens, Greece), 31(4), 527–542. <https://doi.org/10.21873/invivo.11091>

- Mauer, J., Chaurasia, B., Goldau, J., Vogt, M. C., Ruud, J., Nguyen, K. D., Theurich, S., Hausen, A. C., Schmitz, J., Brönneke, H. S., Estevez, E., Allen, T. L., Mesaros, A., Partridge, L., Febbraio, M. A., Chawla, A., Wunderlich, F. T., & Brüning, J. C. (2014). Signaling by IL-6 promotes alternative activation of macrophages to limit endotoxemia and obesity-associated resistance to insulin. *Nature immunology*, 15(5), 423–430. <https://doi.org/10.1038/ni.2865>

- McKay, A., Donaleshen, J., Helewa, R. M., Park, J., Wirtzfeld, D., Hochman, D., Singh, H., & Turner, D. (2014). Does young age influence the prognosis of colorectal cancer: a population-based analysis. *World journal of surgical oncology*, 12, 370. <https://doi.org/10.1186/1477-7819-12-370>

- McLaughlin, T., Lamendola, C., Liu, A., & Abbasi, F. (2011). Preferential fat deposition in subcutaneous versus visceral depots is associated with insulin sensitivity. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 96(11), E1756–E1760. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-0615>

- Mellekjær, L., Olsen, J. H., Frisch, M., Johansen, C., Gridley, G., & McLaughlin, J. K. (1995). Cancer in patients with ulcerative colitis. *International journal of cancer*, 60(3), 330–333. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910600309>

- Mender, I., & Shay, J. W. (2015). Telomerase Repeated Amplification Protocol (TRAP). *Bio-protocol*, 5(22), e1657. <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.1657>

- Meng, X., Xue, M., Xu, P., Hu, F., Sun, B., & Xiao, Z. (2017). MicroRNA profiling analysis revealed different cellular senescence mechanisms

in human mesenchymal stem cells derived from different origin. *Genomics*, 109(3-4), 147–157.

<https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2017.02.003>

- Miele, C., Rochford, J. J., Filippa, N., Giorgetti-Peraldi, S., & Van Obberghen, E. (2000). Insulin and insulin-like growth factor-I induce vascular endothelial growth factor mRNA expression via different signaling pathways. *The Journal of biological chemistry*, 275(28), 21695–21702.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M000805200>

- Minafra, M., Laforgia, R., Sederino, M. G., Fedele, S., Delvecchio, A., Lattarulo, S., Carbotta, G., & Fabiano, G. (2017). Study of the role of telomerase in colorectal cancer: preliminary report and literature review. *Il Giornale di chirurgia*, 38(5), 213–218.

<https://doi.org/10.11138/gchir/2017.38.5.213>

- Miyoshi, Y., Funahashi, T., Kihara, S., Taguchi, T., Tamaki, Y., Matsuzawa, Y., & Noguchi, S. (2003). Association of serum adiponectin levels with breast cancer risk. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 9(15), 5699–5704.

- Moghaddam, A. A., Woodward, M., & Huxley, R. (2007). Obesity and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of 31 studies with 70,000 events. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 16(12), 2533–2547.

<https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-07-0708>

- Mokutani, Y., Uemura, M., Munakata, K., Okuzaki, D., Haraguchi, N., Takahashi, H., Nishimura, J., Hata, T., Murata, K., Takemasa, I., Mizushima, T., Doki, Y., Mori, M., & Yamamoto, H. (2016). Down-Regulation of microRNA-132 is Associated with Poor Prognosis of Colorectal Cancer. *Annals of surgical oncology*, 23(Suppl 5), 599–608. <https://doi.org/10.1245/s10434-016-5133-3>

- Monteiro, R., & Azevedo, I. (2010). Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome. *Mediators of inflammation*, 2010, 289645.

<https://doi.org/10.1155/2010/289645>

- Moreno-Navarrete, J. M., Ortega, F., Sabater, M., Ricart, W., & Fernández-Real, J. M. (2010). Telomere length of subcutaneous adipose tissue

cells is shorter in obese and formerly obese subjects. *International journal of obesity* (2005), 34(8), 1345–1348. <https://doi.org/10.1038/ijo.2010.49>

- Moreno-Navarrete, J. M., Ortega, F., Sabater, M., Ricart, W., & Fernández-Real, J. M. (2010). Telomere length of subcutaneous adipose tissue cells is shorter in obese and formerly obese subjects. *International journal of obesity* (2005), 34(8), 1345–1348. <https://doi.org/10.1038/ijo.2010.49>

- Morris, P. G., Hudis, C. A., Giri, D., Morrow, M., Falcone, D. J., Zhou, X. K., Du, B., Brogi, E., Crawford, C. B., Kopelovich, L., Subbaramaiah, K., & Dannenberg, A. J. (2011). Inflammation and increased aromatase expression occur in the breast tissue of obese women with breast cancer. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)*, 4(7), 1021–1029. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-11-0110>

- Moyzis, R. K., Buckingham, J. M., Cram, L. S., Dani, M., Deaven, L. L., Jones, M. D., Meyne, J., Ratliff, R. L., & Wu, J. R. (1988). A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(18), 6622–6626. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.18.6622>

- Murphy, C. C., Sandler, R. S., Sanoff, H. K., Yang, Y. C., Lund, J. L., & Baron, J. A. (2017). Decrease in Incidence of Colorectal Cancer Among Individuals 50 Years or Older After Recommendations for Population-based Screening. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, 15(6), 903–909.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2016.08.037>

- Nakayama, M., & Oshima, M. (2019). Mutant p53 in colon cancer. *Journal of molecular cell biology*, 11(4), 267–276. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjy075>

- Nandakumar, J., Bell, C. F., Weidenfeld, I., Zaug, A. J., Leinwand, L. A., & Cech, T. R. (2012). The TEL patch of telomere protein TPP1 mediates telomerase recruitment and processivity. *Nature*, 492(7428), 285–289. <https://doi.org/10.1038/nature11648>

- NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC) (2016). Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. *Lancet*

(London, England), 387(10026), 1377–1396. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30054-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30054-X)

- NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC) (2017). Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128.9 million children, adolescents, and adults. *Lancet* (London, England), 390(10113), 2627–2642. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32129-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32129-3)

- Neville, M. J., Collins, J. M., Gloyn, A. L., McCarthy, M. I., & Karpe, F. (2011). Comprehensive human adipose tissue mRNA and microRNA endogenous control selection for quantitative real-time-PCR normalization. *Obesity* (Silver Spring, Md.), 19(4), 888–892. <https://doi.org/10.1038/oby.2010.257>

- Nguyen, H. T., & Duong, H. Q. (2018). The molecular characteristics of colorectal cancer: Implications for diagnosis and therapy. *Oncology letters*, 16(1), 9–18. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8679>

- Nguyen, L. H., Goel, A., & Chung, D. C. (2020). Pathways of Colorectal Carcinogenesis. *Gastroenterology*, 158(2), 291–302. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.08.059>

- Nojadedh, J. N., Behrouz Sharif, S., & Sakhinia, E. (2018). Microsatellite instability in colorectal cancer. *EXCLI journal*, 17, 159–168. <https://doi.org/10.17179/excli2017-948>

- Norat, T., Bingham, S., Ferrari, P., Slimani, N., Jenab, M., Mazuir, M., Overvad, K., Olsen, A., Tjønneland, A., Clavel, F., Boutron-Ruault, M. C., Kesse, E., Boeing, H., Bergmann, M. M., Nieters, A., Linseisen, J., Trichopoulou, A., Trichopoulos, D., Tountas, Y., Berrino, F., ... Riboli, E. (2005). Meat, fish, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into cancer and nutrition. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(12), 906–916. <https://doi.org/10.1093/jnci/dji164>

- O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in endocrinology*, 9, 402. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>

- Ochoa, M. C., Azcona, C., Biebermann, H., Brumm, H., Razquin, C., Wermter, A. K., Martínez, J. A., Hebebrand, J., Hinney, A., Moreno-Aliaga, M.

Bibliografía

J., Marti, A., Patiño, A., Chueca, M., Oyarzabal, M., Pelach, R., & Grupo de Estudio Navarro de la Obesidad Infantil (GENOI) (2007). A novel mutation Thr162Arg of the melanocortin 4 receptor gene in a Spanish children and adolescent population. *Clinical endocrinology*, 66(5), 652–658. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2007.02788.x>

- Oh, B. K., Kim, H., Park, Y. N., Yoo, J. E., Choi, J., Kim, K. S., Lee, J. J., & Park, C. (2008). High telomerase activity and long telomeres in advanced hepatocellular carcinomas with poor prognosis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 88(2), 144–152. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700710>

- Olovnikov A. M. (1973). A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *Journal of theoretical biology*, 41(1), 181–190. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(73\)90198-7](https://doi.org/10.1016/0022-5193(73)90198-7)

- O'Rourke, R. W., Metcalf, M. D., White, A. E., Madala, A., Winters, B. R., Maizlin, I. I., Jobe, B. A., Roberts, C. T., Jr, Slifka, M. K., & Marks, D. L. (2009). Depot-specific differences in inflammatory mediators and a role for NK cells and IFN-gamma in inflammation in human adipose tissue. *International journal of obesity (2005)*, 33(9), 978–990. <https://doi.org/10.1038/ijo.2009.133>

- Ortega, F. J., Moreno-Navarrete, J. M., Pardo, G., Sabater, M., Hummel, M., Ferrer, A., Rodriguez-Hermosa, J. I., Ruiz, B., Ricart, W., Peral, B., & Fernández-Real, J. M. (2010). MiRNA expression profile of human subcutaneous adipose and during adipocyte differentiation. *PloS one*, 5(2), e9022. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009022>

- Ortega, F. J., Moreno-Navarrete, J. M., Pardo, G., Sabater, M., Hummel, M., Ferrer, A., Rodriguez-Hermosa, J. I., Ruiz, B., Ricart, W., Peral, B., & Fernández-Real, J. M. (2010). MiRNA expression profile of human subcutaneous adipose and during adipocyte differentiation. *PloS one*, 5(2), e9022. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009022>

- Pan, Y., Hui, X., Hoo, R., Ye, D., Chan, C., Feng, T., Wang, Y., Lam, K., & Xu, A. (2019). Adipocyte-secreted exosomal microRNA-34a inhibits M2 macrophage polarization to promote obesity-induced adipose inflammation. *The*

Journal of clinical investigation, 129(2), 834–849.
<https://doi.org/10.1172/JCI123069>

- Pandžić Jakšić, V., & Grizelj, D. (2016). Under the Surface of Subcutaneous Adipose Tissue Biology. *Acta dermatovenerologica Croatica : ADC*, 24(4), 250–260.
- Park, H., Park, H., Pak, H. J., Yang, D. Y., Kim, Y. H., Choi, W. J., Park, S. J., Cho, J. A., & Lee, K. W. (2015). miR-34a inhibits differentiation of human adipose tissue-derived stem cells by regulating cell cycle and senescence induction. *Differentiation; research in biological diversity*, 90(4-5), 91–100.
<https://doi.org/10.1016/j.diff.2015.10.010>
- Park, J., Euhus, D. M., & Scherer, P. E. (2011). Paracrine and endocrine effects of adipose tissue on cancer development and progression. *Endocrine reviews*, 32(4), 550–570.
<https://doi.org/10.1210/er.2010-0030>
- Pedersen, B. K., Steensberg, A., & Schjerling, P. (2001). Muscle-derived interleukin-6: possible biological effects. *The Journal of physiology*, 536(Pt 2), 329–337. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.0329c.xd>
- Pedram, M., Sprung, C. N., Gao, Q., Lo, A. W., Reynolds, G. E., & Murnane, J. P. (2006). Telomere position effect and silencing of transgenes near telomeres in the mouse. *Molecular and cellular biology*, 26(5), 1865–1878.
<https://doi.org/10.1128/MCB.26.5.1865-1878.2006>
- Peltier, H. J., & Latham, G. J. (2008). Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA (New York, N.Y.)*, 14(5), 844–852. <https://doi.org/10.1261/rna.939908>
- Peng, Y., & Croce, C. M. (2016). The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal transduction and targeted therapy*, 1, 15004.
<https://doi.org/10.1038/sigtrans.2015.4>
- Péqueux, C., Raymond-Letron, I., Blacher, S., Boudou, F., Adlanmerini, M., Fouque, M. J., Rochaix, P., Noël, A., Foidart, J. M., Krust, A., Chambon, P., Brouchet, L., Arnal, J. F., & Lenfant, F. (2012). Stromal estrogen receptor- α promotes tumor growth by normalizing an increased angiogenesis.

Bibliografia

Cancer research, 72(12), 3010–3019. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3768>

- Pfaffl M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Pichler, M., Winter, E., Ress, A. L., Bauernhofer, T., Gerger, A., Kiesslich, T., Lax, S., Samonigg, H., & Hoefler, G. (2014). miR-181a is associated with poor clinical outcome in patients with colorectal cancer treated with EGFR inhibitor. *Journal of clinical pathology*, 67(3), 198–203. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2013-201904>
- Pino, M. S., & Chung, D. C. (2010). The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2059–2072. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.12.065>
- Pollak M. (2008). Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nature reviews. Cancer*, 8(12), 915–928. <https://doi.org/10.1038/nrc2536>
- Qu, Y., Zhang, Q., Cai, X., Li, F., Ma, Z., Xu, M., & Lu, L. (2017). Exosomes derived from miR-181-5p-modified adipose-derived mesenchymal stem cells prevent liver fibrosis via autophagy activation. *Journal of cellular and molecular medicine*, 21(10), 2491–2502. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13170>
- Rachakonda, S., Srinivas, N., Mahmoudpour, S. H., Garcia-Casado, Z., Requena, C., Traves, V., Soriano, V., Cardelli, M., Pjanova, D., Molven, A., Gruis, N., Nagore, E., & Kumar, R. (2018). Telomere length and survival in primary cutaneous melanoma patients. *Scientific reports*, 8(1), 10947. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29322-9>
- Rampazzo, E., Bertorelle, R., Serra, L. *et al.* Relationship between telomere shortening, genetic instability, and site of tumour origin in colorectal cancers. *Br J Cancer* 102, 1300–1305 (2010). <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605644>
- Raucci, A., Macrì, F., Castiglione, S., Badi, I., Vinci, M. C., & Zuccolo, E. (2021). MicroRNA-34a: the bad guy in age-related vascular diseases. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 78(23), 7355–7378. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03979-4>

- Ren, H., Zhao, T., Wang, X., Gao, C., Wang, J., Yu, M., & Hao, J. (2010). Leptin upregulates telomerase activity and transcription of human telomerase reverse transcriptase in MCF-7 breast cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 394(1), 59–63. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.02.093>
- Rene Gonzalez, R., Watters, A., Xu, Y., Singh, U. P., Mann, D. R., Rueda, B. R., & Penichet, M. L. (2009). Leptin-signaling inhibition results in efficient anti-tumor activity in estrogen receptor positive or negative breast cancer. *Breast cancer research : BCR*, 11(3), R36. <https://doi.org/10.1186/bcr2321>
- Rios-Colon, L., Arthur, E., Niture, S., Qi, Q., Moore, J. T., & Kumar, D. (2020). The Role of Exosomes in the Crosstalk between Adipocytes and Liver Cancer Cells. *Cells*, 9(9), 1988. <https://doi.org/10.3390/cells9091988>
- Rivetti di Val Cervo, P., Lena, A. M., Nicoloso, M., Rossi, S., Mancini, M., Zhou, H., Saintigny, G., Dellambra, E., Odorisio, T., Mahé, C., Calin, G. A., Candi, E., & Melino, G. (2012). p63-microRNA feedback in keratinocyte senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(4), 1133–1138. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112257109>
- Roger, L., Jones, R. E., Heppel, N. H., Williams, G. T., Sampson, J. R., & Baird, D. M. (2013). Extensive telomere erosion in the initiation of colorectal adenomas and its association with chromosomal instability. *Journal of the National Cancer Institute*, 105(16), 1202–1211. <https://doi.org/10.1093/jnci/djt191>
- Romero-Corral, A., Somers, V. K., Sierra-Johnson, J., Thomas, R. J., Collazo-Clavell, M. L., Korinek, J., Allison, T. G., Batsis, J. A., Sert-Kuniyoshi, F. H., & Lopez-Jimenez, F. (2008). Accuracy of body mass index in diagnosing obesity in the adult general population. *International journal of obesity* (2005), 32(6), 959–966. <https://doi.org/10.1038/ijo.2008.11>
- Rosenow, A., Noben, J. P., Bouwman, F. G., Mariman, E. C., & Renes, J. (2013). Hypoxia-mimetic effects in the secretome of human preadipocytes and adipocytes. *Biochimica et biophysica acta*, 1834(12), 2761–2771. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.10.003>

Bibliografia

- Sahami-Fard, M. H., Sheikhha, A., & Hasan, M. (2109). Expression Levels of miR-143-3p and -424-5p in Colorectal Cancer and Their Clinical Significance. *Cancer Biomarkers*, 24(3), 291-297.
- Sanjoaquin, M. A., Appleby, P. N., Thorogood, M., Mann, J. I., & Key, T. J. (2004). Nutrition, lifestyle and colorectal cancer incidence: a prospective investigation of 10998 vegetarians and non-vegetarians in the United Kingdom. *British journal of cancer*, 90(1), 118–121. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601441>
- Saxena, N. K., Vertino, P. M., Anania, F. A., & Sharma, D. (2007). leptin-induced growth stimulation of breast cancer cells involves recruitment of histone acetyltransferases and mediator complex to CYCLIN D1 promoter via activation of Stat3. *The Journal of biological chemistry*, 282(18), 13316–13325. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609798200>
- Schetter, A. J., Okayama, H., & Harris, C. C. (2012). The role of microRNAs in colorectal cancer. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)*, 18(3), 244–252. <https://doi.org/10.1097/PPO.0b013e318258b78f>
- Shang, A., Wang, W., Gu, C., Chen, W., Lu, W., Sun, Z., & Li, D. (2020). Long non-coding RNA CCAT1 promotes colorectal cancer progression by regulating miR-181a-5p expression. *Aging*, 12(9), 8301–8320. <https://doi.org/10.18632/aging.103139>
- Sharma, D., Saxena, N. K., Vertino, P. M., & Anania, F. A. (2006). Leptin promotes the proliferative response and invasiveness in human endometrial cancer cells by activating multiple signal-transduction pathways. *Endocrine-related cancer*, 13(2), 629–640. <https://doi.org/10.1677/erc.1.01169>
- Shiosaki, J., Tiirikainen, M., Peplowska, K., Shaeffer, D., Machida, M., Sakamoto, K., Takahashi, M., Kojima, K., Machi, J., Bryant-Greenwood, P., & Kuwada, S. K. (2020). Serum micro-RNA Identifies Early Stage Colorectal Cancer in a Multi-Ethnic Population. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 21(10), 3019–3026. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2020.21.10.3019>
- Simmonds, M., Burch, J., Llewellyn, A., Griffiths, C., Yang, H., Owen, C., Duffy, S., & Woolacott, N. (2015). The use of measures of obesity in childhood for predicting obesity and the development of obesity-related diseases in adulthood: a systematic review and meta-analysis. *Health technology*

assessment (Winchester, England), 19(43), 1–336.
<https://doi.org/10.3310/hta19430>

- Sindhu, S., Thomas, R., Shihab, P., Sriraman, D., Behbehani, K., & Ahmad, R. (2015). Obesity Is a Positive Modulator of IL-6R and IL-6 Expression in the Subcutaneous Adipose Tissue: Significance for Metabolic Inflammation. *PloS one*, 10(7), e0133494. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133494>

- Singh, R. K., Kumar, P., & Mahalingam, K. (2017). Molecular genetics of human obesity: A comprehensive review. *Comptes rendus biologiques*, 340(2), 87–108. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2016.11.007>

- Singh, S., Mayengbam, S. S., Chouhan, S., Deshmukh, B., Ramteke, P., Athavale, D., & Bhat, M. K. (2020). Role of TNF α and leptin signaling in colon cancer incidence and tumor growth under obese phenotype. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1866(5), 165660. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.165660>

- Slabáková, E., Culig, Z., Remšík, J., Souček, K. (2017). Alternative mechanisms of miR-34a regulation in cancer. *Cell Death Dis* 8, e3100. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.495>

- Soriano-Arroquia, A., McCormick, R., Molloy, A.P., McArdle, A. and Goljanek-Whysall, K. (2016), Age-related changes in miR-143-3p:Igfbp5 interactions affect muscle regeneration. *Aging Cell*, 15: 361-369. <https://doi.org/10.1111/accel.12442>

- Spoto, B., Di Betta, E., Mattace-Raso, F., Sijbrands, E., Vilardi, A., Parlongo, R. M., Pizzini, P., Pisano, A., Vermi, W., Testa, A., Cutrupi, S., D'Arrigo, G., Lonardi, S., Tripepi, G., Cancarini, G., & Zoccali, C. (2014). Pro- and anti-inflammatory cytokine gene expression in subcutaneous and visceral fat in severe obesity. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD*, 24(10), 1137–1143. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2014.04.017>

- Spoto, B., Di Betta, E., Mattace-Raso, F., Sijbrands, E., Vilardi, A., Parlongo, R. M., Pizzini, P., Pisano, A., Vermi, W., Testa, A., Cutrupi, S., D'Arrigo, G., Lonardi, S., Tripepi, G., Cancarini, G., & Zoccali, C. (2014). Pro- and anti-inflammatory cytokine gene expression in subcutaneous and visceral fat in severe obesity. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD*, 24(10), 1137–1143. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2014.04.017>

Bibliografia

- Staiano, A. E., & Katzmarzyk, P. T. (2012). Ethnic and sex differences in body fat and visceral and subcutaneous adiposity in children and adolescents. *International journal of obesity* (2005), 36(10), 1261–1269. <https://doi.org/10.1038/ijo.2012.95>
- Strum, J. C., Johnson, J. H., Ward, J., Xie, H., Feild, J., Hester, A., Alford, A., & Waters, K. M. (2009). MicroRNA 132 regulates nutritional stress-induced chemokine production through repression of SirT1. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md.), 23(11), 1876–1884. <https://doi.org/10.1210/me.2009-0117>
- Suh N. (2018). MicroRNA controls of cellular senescence. *BMB reports*, 51(10), 493–499. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2018.51.10.209>
- Sun, W., Wang, X., Li, J., You, C., Lu, P., Feng, H., Kong, Y., Zhang, H., Liu, Y., Jiao, R., Chen, X., & Ba, Y. (2018). MicroRNA-181a promotes angiogenesis in colorectal cancer by targeting SRCIN1 to promote the SRC/VEGF signaling pathway. *Cell death & disease*, 9(4), 438. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0490-4>
- Sun, W., Wang, X., Li, J., You, C., Lu, P., Feng, H., Kong, Y., Zhang, H., Liu, Y., Jiao, R., Chen, X., & Ba, Y. (2018). MicroRNA-181a promotes angiogenesis in colorectal cancer by targeting SRCIN1 to promote the SRC/VEGF signaling pathway. *Cell death & disease*, 9(4), 438. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0490-4>
- Suzuki, H. I., Yamagata, K., Sugimoto, K., Iwamoto, T., Kato, S., & Miyazono, K. (2009). Modulation of microRNA processing by p53. *Nature*, 460(7254), 529–533. <https://doi.org/10.1038/nature08199>
- Szostak, J. W., & Blackburn, E. H. (1982). Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors. *Cell*, 29(1), 245–255. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90109-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90109-x)
- Tejpar, S., & Van Cutsem, E. (2002). Molecular and genetic defects in colorectal tumorigenesis. *Best practice & research. Clinical gastroenterology*, 16(2), 171–185. <https://doi.org/10.1053/bega.2001.0279>
- Tian, T., Zhu, Y. L., Zhou, Y. Y., Liang, G. F., Wang, Y. Y., Hu, F. H., & Xiao, Z. D. (2014). Exosome uptake through clathrin-mediated endocytosis

and macropinocytosis and mediating miR-21 delivery. *The Journal of biological chemistry*, 289(32), 22258–22267. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.588046>

- Turnbull, R. B., Jr, Kyle, K., Watson, F. R., & Spratt, J. (1967). Cancer of the colon: the influence of the no-touch isolation technic on survival rates. *Annals of surgery*, 166(3), 420–427. <https://doi.org/10.1097/00000658-196709000-00010>
- Ulaner, G. A., Hu, J. F., Vu, T. H., Oruganti, H., Giudice, L. C., & Hoffman, A. R. (2000). Regulation of telomerase by alternate splicing of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in normal and neoplastic ovary, endometrium and myometrium. *International journal of cancer*, 85(3), 330–335.
- Ulrich L. S. (2011). Endometrial cancer, types, prognosis, female hormones and antihormones. *Climacteric : the journal of the International Menopause Society*, 14(4), 418–425. <https://doi.org/10.3109/13697137.2010.550974>
- Valls, C., Piñol, C., Reñé, J. M., Buenestado, J., & Viñas, J. (2011). Telomere length is a prognostic factor for overall survival in colorectal cancer. *Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland*, 13(11), 1265–1272. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1318.2010.02433.x>
- Vickers, K. C., Palmisano, B. T., Shoucri, B. M., Shamburek, R. D., & Remaley, A. T. (2011). MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nature cell biology*, 13(4), 423–433. <https://doi.org/10.1038/ncb2210>
- Vo, N., Klein, M. E., Varlamova, O., Keller, D. M., Yamamoto, T., Goodman, R. H., & Impey, S. (2005). A cAMP-response element binding protein-induced microRNA regulates neuronal morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(45), 16426–16431. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508448102>
- Vucenik, I., & Stains, J. P. (2012). Obesity and cancer risk: evidence, mechanisms, and recommendations. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1271(1), 37–43. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06750.x>
- Wang, D., Liu, Q., Ren, Y., Zhang, Y., Wang, X., & Liu, B. (2021). Association analysis of miRNA-related genetic polymorphisms in miR-143/145

and KRAS with colorectal cancer susceptibility and survival. *Bioscience reports*, 41(4), BSR20204136. <https://doi.org/10.1042/BSR20204136>

- Wang, F., Wang, J., Ju, L., Chen, L., Cai, W., & Yang, J. (2018). Diagnostic and prognostic potential of serum miR-132/212 cluster in patients with hepatocellular carcinoma. *Annals of clinical biochemistry*, 55(5), 576–582. <https://doi.org/10.1177/0004563218755815>

- Wang, N., Xu, Y., Guo, Q., Zhu, C., Zhao, W., Qian, W., & Zheng, M. (2021). Effects of miR-132-3p on progress and epithelial mesenchymal transition of non-small cell lung cancer via regulating KLF7. *Journal of thoracic disease*, 13(4), 2426–2436. <https://doi.org/10.21037/jtd-21-353>

- Wang, R., Wang, M. J., & Ping, J. (2015). Clinicopathological Features and Survival Outcomes of Colorectal Cancer in Young Versus Elderly: A Population-Based Cohort Study of SEER 9 Registries Data (1988-2011). *Medicine*, 94(35), e1402. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000001402>

- Wang, T., Wu, J., Liu, X., & Li, S. (2017). Serum miR-34a is a potential diagnostic and prognostic marker for osteosarcoma. *International journal of clinical and experimental pathology*, 10(9), 9683–9689.

- Wang, Y., Medvid, R., Melton, C., Jaenisch, R., & Blelloch, R. (2007). DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nature genetics*, 39(3), 380–385. <https://doi.org/10.1038/ng1969>

- Watson J. D. (1972). Origin of concatemeric T7 DNA. *Nature: New biology*, 239(94), 197–201. <https://doi.org/10.1038/newbio239197a0>

- Wei, F., Ma, C., Zhou, T., Dong, X., Luo, Q., Geng, L., Ding, L., Zhang, Y., Zhang, L., Li, N., Li, Y., & Liu, Y. (2017). Exosomes derived from gemcitabine-resistant cells transfer malignant phenotypic traits via delivery of miRNA-222-3p. *Molecular cancer*, 16(1), 132. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0694-8>

- Weischer, M., Nordestgaard, B. G., Cawthon, R. M., Freiberg, J. J., Tybjaerg-Hansen, A., & Bojesen, S. E. (2013). Short telomere length, cancer survival, and cancer risk in 47102 individuals. *Journal of the National Cancer Institute*, 105(7), 459–468. <https://doi.org/10.1093/jnci/djt016>

- Weisenberger, D. J., Siegmund, K. D., Campan, M., Young, J., Long, T. I., Faasse, M. A., Kang, G. H., Widschwendter, M., Weener, D., Buchanan, D., Koh, H., Simms, L., Barker, M., Leggett, B., Levine, J., Kim, M., French, A. J., Thibodeau, S. N., Jass, J., Haile, R., Laird, P. W. (2006). CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nature genetics*, 38(7), 787–793. <https://doi.org/10.1038/ng1834>
- World Health Organization (2010): A healthy lifestyle - WHO recommendations. Disponible en: <https://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/nutrition/a-healthy-lifestyle/body-mass-index-bmi>
- Wright, W. E., Piatyszek, M. A., Rainey, W. E., Byrd, W., & Shay, J. W. (1996). Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Developmental genetics*, 18(2), 173–179. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6408\(1996\)18:2<173::AID-DVG10>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6408(1996)18:2<173::AID-DVG10>3.0.CO;2-3)
- Wyld, L., Bellantuono, I., Tchkonja, T., Morgan, J., Turner, O., Foss, F., George, J., Danson, S., & Kirkland, J. L. (2020). Senescence and Cancer: A Review of Clinical Implications of Senescence and Senotherapies. *Cancers*, 12(8), 2134. <https://doi.org/10.3390/cancers12082134>
- Xihua, L., Shengjie, T., Weiwei, G., Matro, E., Tingting, T., Lin, L., Fang, W., Jiaqiang, Z., Fenping, Z., & Hong, L. (2019). Circulating miR-143-3p inhibition protects against insulin resistance in Metabolic Syndrome via targeting of the insulin-like growth factor 2 receptor. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*, 205, 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2018.09.006>
- Xu, X. T., Xu, Q., Tong, J. L., Zhu, M. M., Huang, M. L., Ran, Z. H., & Xiao, S. D. (2011). Meta-analysis: circulating adiponectin levels and risk of colorectal cancer and adenoma. *Journal of digestive diseases*, 12(4), 234–244. <https://doi.org/10.1111/j.1751-2980.2011.00504.x>
- Xu, X., Chen, W., Miao, R., Zhou, Y., Wang, Z., Zhang, L., Wan, Y., Dong, Y., Qu, K., & Liu, C. (2015). miR-34a induces cellular senescence via modulation of telomerase activity in human hepatocellular carcinoma by targeting

Bibliografia

FoxM1/c-Myc pathway. *Oncotarget*, 6(6), 3988–4004.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.2905>

- Xu, X., Chen, W., Miao, R., Zhou, Y., Wang, Z., Zhang, L., Wan, Y., Dong, Y., Qu, K., & Liu, C. (2015). miR-34a induces cellular senescence via modulation of telomerase activity in human hepatocellular carcinoma by targeting FoxM1/c-Myc pathway. *Oncotarget*, 6(6), 3988–4004.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.2905>

- Yamaji, T., Iwasaki, M., Sasazuki, S., & Tsugane, S. (2010). Interaction between adiponectin and leptin influences the risk of colorectal adenoma. *Cancer research*, 70(13), 5430–5437. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0178>

- Yamakuchi, M., & Lowenstein, C. J. (2009). MiR-34, SIRT1 and p53: the feedback loop. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 8(5), 712–715.
<https://doi.org/10.4161/cc.8.5.7753>

- Yang, M., Chen, J., Su, F., Yu, B., Su, F., Lin, L., Liu, Y., Huang, J. D., & Song, E. (2011). Microvesicles secreted by macrophages shuttle invasion-potentiating microRNAs into breast cancer cells. *Molecular cancer*, 10, 117.
<https://doi.org/10.1186/1476-4598-10-117>

- Yoshizawa, J. M., & Wong, D. T. (2013). Salivary microRNAs and oral cancer detection. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 936, 313–324.
https://doi.org/10.1007/978-1-62703-083-0_24

- Young, S., & Golzarian, J. (2018). Primary Tumor Location in Colorectal Cancer: Comparison of Right- and Left-Sided Colorectal Cancer Characteristics for the Interventional Radiologist. *Cardiovascular and interventional radiology*, 41(12), 1819–1825. <https://doi.org/10.1007/s00270-018-2014-0>

- Zhang, J., Zhou, W., Liu, Y., Liu, T., Li, C., & Wang, L. (2018). Oncogenic role of microRNA-532-5p in human colorectal cancer via targeting of the 5'UTR of RUNX3. *Oncology letters*, 15(5), 7215–7220.
<https://doi.org/10.3892/ol.2018.8217>

- Zhang, L., Huang, D., Wang, Q., Shen, D., Wang, Y., Chen, B., Zhang, J., & Gai, L. (2014). MiR-132 inhibits expression of SIRT1 and induces pro-inflammatory processes of vascular endothelial inflammation through

blockade of the SREBP-1c metabolic pathway. *Cardiovascular drugs and therapy*, 28(4), 303–311. <https://doi.org/10.1007/s10557-014-6533-x>

- Zhang, M., Li, Y., Wang, H., Yu, W., Lin, S., & Guo, J. (2019). LncRNA SNHG5 affects cell proliferation, metastasis and migration of colorectal cancer through regulating miR-132-3p/CREB5. *Cancer biology & therapy*, 20(4), 524–536. <https://doi.org/10.1080/15384047.2018.1537579>
- Zhang, M., Li, Y., Wang, H., Yu, W., Lin, S., & Guo, J. (2019). LncRNA SNHG5 affects cell proliferation, metastasis and migration of colorectal cancer through regulating miR-132-3p/CREB5. *Cancer biology & therapy*, 20(4), 524–536. <https://doi.org/10.1080/15384047.2018.1537579>
- Zhang, P., Du, J., Wang, L., Niu, L., Zhao, Y., Tang, G., Jiang, Y., Shuai, S., Bai, L., Li, X., Wang, J., Zhang, S., & Zhu, L. (2018). MicroRNA-143a-3p modulates preadipocyte proliferation and differentiation by targeting MAPK7. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 108, 531–539. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.080>
- Zhang, W., Wang, Z., Cai, G., & Huang, P. (2021). Circ_DOCK1 regulates USP11 through miR-132-3p to control colorectal cancer progression. *World journal of surgical oncology*, 19(1), 67. <https://doi.org/10.1186/s12957-021-02173-x>
- Zhang, X., Ai, F., Li, X., Tian, L., Wang, X., Shen, S., & Liu, F. (2017). MicroRNA-34a suppresses colorectal cancer metastasis by regulating Notch signaling. *Oncology letters*, 14(2), 2325–2333. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6444>
- Zhang, Y., Fan, M., Zhang, X., Huang, F., Wu, K., Zhang, J., Liu, J., Huang, Z., Luo, H., Tao, L., & Zhang, H. (2014). Cellular microRNAs up-regulate transcription via interaction with promoter TATA-box motifs. *RNA (New York, N.Y.)*, 20(12), 1878–1889. <https://doi.org/10.1261/rna.045633.114>
- Zhao, P., & Zhang, Z. (2018). TNF- α promotes colon cancer cell migration and invasion by upregulating TROP-2. *Oncology letters*, 15(3), 3820–3827. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.7735>
- Zheng, Y. B., Luo, H. P., Shi, Q., Hao, Z. N., Ding, Y., Wang, Q. S., Li, S. B., Xiao, G. C., & Tong, S. L. (2014). miR-132 inhibits colorectal cancer

Bibliografia

invasion and metastasis via directly targeting ZEB2. *World journal of gastroenterology*, 20(21), 6515–6522. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i21.6515>

- Zhou, Q., Li, M., Wang, X., Li, Q., Wang, T., Zhu, Q., Zhou, X., Wang, X., Gao, X., & Li, X. (2012). Immune-related microRNAs are abundant in breast milk exosomes. *International journal of biological sciences*, 8(1), 118–123. <https://doi.org/10.7150/ijbs.8.118>

- Zhu, H., Sun, B., Zhu, L., Zou, G., & Shen, Q. (2021). N6-Methyladenosine Induced miR-34a-5p Promotes TNF- α -Induced Nucleus Pulposus Cell Senescence by Targeting SIRT1. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 642437. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.642437>

- Zhu, L., Shi, C., Ji, C., Xu, G., Chen, L., Yang, L., Fu, Z., Cui, X., Lu, Y., & Guo, X. (2013). FFAs and adipokine-mediated regulation of hsa-miR-143 expression in human adipocytes. *Molecular biology reports*, 40(10), 5669–5675. <https://doi.org/10.1007/s11033-013-2668-2>