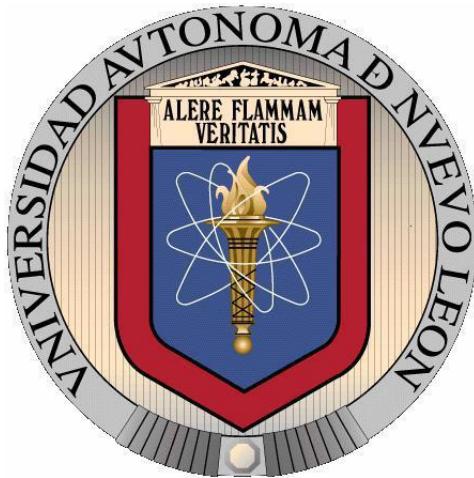


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA DE CÉLULAS MADRE DE
ADENOCARCINOMA COLORRECTAL RESISTENTES A
5-FLUOROURACILO, OXALIPLATINO Y LEUCOVORINA**

PRESENTA

M.C. ELSA NANCY GARZA TREVIÑO

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR E
INGENIERÍA GENÉTICA**

NOVIEMBRE, 2017

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y MEDICINA MOLECULAR**



**ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA DE CÉLULAS MADRE DE
ADENOCARCINOMA COLORRECTAL RESISTENTES A
5-FLUOROURACILO, OXALIPLATINO Y LEUCOVORINA**

PRESENTA
M.C. ELSA NANCY GARZA TREVIÑO

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR E
INGENIERÍA GENÉTICA**

NOVIEMBRE, 2017

Esta investigación se llevó a cabo en:

**ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA DE CÉLULAS MADRE DE
ADENOCARCINOMA COLORRECTAL RESISTENTES A 5-FLUOROURACILO,
OXALIPLATINO Y LEUCOVORINA**

González, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Laboratorio de Terapia Celular y Licitación de Bicenassos de la Unidad de Diagnóstico Molecular

Aprobación de la tesis:

Con la colaboración de las siguientes dependencias:

Servicio de Anatomía Patológica

Departamento de Histología

Centro Universitario DR. C. SALVADOR LUIS SAID Y FERNÁNDEZ

Servicio de Cirugía Director de tesis:

Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDS)
Unidad de Biología Molecular

DRA. C. HERMINIA GUADALUPE MARTÍNEZ RODRÍGUEZ

Co-Directora de la tesis:

Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)

Unidad de Altas Especialidades

Departamento de Gastroenterología

Servicio de Cirugía Oncológica

Departamento de Patología

Centro Médico Nacional Siglo XXI (CMNXXI)

Hospital de Oncología

Servicio de Cirugía

DR. C. AUGUSTO ROJAS MARTÍNEZ

Miembro de la Comisión de Tesis

Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Campus Monterrey

Facultad de Medicina

Grupo de Enfocaje de Sistematización

DR. C. ADOLFO SOTO DOMÍNGUEZ

Miembro de la Comisión de Tesis

DR. med. FELIPE ARTURO MORALES MARTÍNEZ
Subdirector de Estudios de Posgrado

Esta investigación se llevó a cabo en la

**Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL),
Facultad de Medicina y Hospital Universitario “José Eleuterio González”, Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular,** Laboratorio de Terapia Celular y Laboratorio de Bioensayos de la Unidad de Diagnóstico Molecular

Con la colaboración de las siguientes dependencias:

Servicio de Anatomía Patológica

Departamento de Histología

Centro Universitario contra el Cáncer

Servicio de Cirugía

Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS)

Unidad de Biología Molecular, Genómica y Secuenciación

Con la colaboración de las siguientes Instituciones:

Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)

Unidad de Altas Especialidades (UMAE) 25

Departamento de Gastroenterología

Servicio de Cirugía Oncológica

Departamento de Patología

Centro Médico Nacional Siglo XXI,

Hospital de Oncología

Servicio de Colon y Recto

Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores (ITESM), Campus Monterrey

Facultad de Medicina

Grupo de Enfoque de Bioinformática

COLABORADORES

De la UANL

Facultad de Medicina y Hospital Universitario “José Eleuterio González”

Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular

Dr. Salvador L. Said y Fernández (Director)

Dra. Herminia G Martínez Rodríguez (Co-directora)

Dra. Paulina Delgado González

Dr. Gerardo R. Padilla Rivas

M.C. Martha Sofía Rodríguez González

M.C.P Marco A. Román Montalvo

M.C.P. Emiliano Michele Sánchez

Est. M.C.P Yesenia Alonso Cruz

Departamento de Anatomía Patológica

Dr. Juan Pablo Flores Gutiérrez

Departamento de Histología

Dr. Roberto Montes de Oca Luna

Dr. Adolfo Soto-Domínguez (Miembro de la comisión)

Centro Universitario contra el Cáncer

Dr Juan Francisco González Guerrero

Departamento de Cirugía

Dr. Gerardo Muñoz Maldonado

Dr. Marco Antonio Treviño Lozano

Del CIDICS

Unidad de Biología Molecular, Genómica y Secuenciación

Dra. Rocío Ortiz López (Miembro de la comisión)

Dr. Augusto Rojas Martínez (Miembro de la comisión)

LBG José Ramón Bárcenas Walls

M.C. Luis Ernesto Osuna Rosales

De la UMAE 25, IMSS

Departamento de Gastroenterología, UMAE 25, IMSS

Dra. Norma Edith Mar Villegas

Departamento de Oncología

Dra. Irma Sandra García González
Servicio de Cirugía De la UMAE 25

Dra. Yazmín del Ángel
Del Departamento de Patología, UMAE 25
Dr. Edmundo Castelán Maldonado

Del Centro Médico Nacional Siglo XXI
Hospital de Oncología, Servicio de Colon y Recto
Dr. Saúl Rodríguez Ramírez

Del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey
(ITESM), campus Monterrey
Grupo de enfoque de Bioinformática de la Escuela de Medicina
Dr. Víctor Manuel Treviño Alvarado

**Este trabajo de investigación fue autorizado por el
Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la UANL
con el número de registro
BI14-009
y financiado por el
Fondo Sectorial para la Investigación Básica, SEP/CONACYT
Registro
CB-2012-01-178641
y por el Programa de apoyo a la investigación Científica y
Tecnológica de la UANL (PAICYT-UANL)
Registro
SA15-15**

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
Agradecimientos.....	x
Lista de tablas.....	xii
Lista de figuras.....	xiii
Lista de abreviaturas.....	xiv
Resumen.....	xvii
Abstract.....	xviii
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	6
2.1. Epidemiología del CCR en el mundo.....	3
2.2. Epidemiología del CCR en México.....	3
2.3. Epidemiología del CCR en habitantes jóvenes de México.....	3
2.4. Epidemiología del CCR en Nuevo León.....	4
2.5. Factores de riesgo del CCR.....	4
2.6. Histología del colon.....	4
2.7. Carcinogénesis.....	5
2.8. Diagnóstico del CCR.....	7
2.9. Tratamiento del CCR.....	8
2.10. Células madre de tumor (CMT).....	8
2.11. Transición celular de epitelial a mesenquimal.....	10
2.12. Mecanismos moleculares de fármacoresistencia (FR).....	12
2.13. Marcadores de células madre de tumor.....	13
2.14. CD133.....	13
2.15. CD44.....	14
2.16. CD24.....	15
2.17. Otros marcadores de CMT.....	16
2.18. Características biológicas de las CMT.....	17
2.19. Genes de las CMT involucrados en FR	18
2.20. Mecanismos y genes de resistencia a fármacos.....	18
2.21. Determinación <i>ex vivo</i> de FR de neoplasias.....	20
2.22. Análisis de la expresión génica en células malignas.....	21
2.23. Antecedentes directos.....	22
2.23.1. Quimiosensibilidad de ACCRs previamente evaluados...	22
3. Justificación.....	23
4. Hipótesis.....	24

5. Objetivo.....	25
5.1 Objetivo general.....	25
5.2 Objetivos específicos.....	25
6. Estrategia experimental.....	26
7. Material y métodos.....	30
7.1. Población de estudio.....	30
7.2. Material biológico.....	30
7.3. Colo 320DM.....	32
7.4. Caracterización de muestras de colon o recto y ACCRs.....	32
7.4.1 Inmunofluorescencia con doble marcaje.....	32
7.5. Cultivos primarios de ACCR.....	34
7.6. Determinación de viabilidad celular.....	35
7.7. Aislamiento y expansión de las CMT.....	35
7.8. Determinación de resistencia a 5FUOL de las CMT.....	36
7.9. Caracterización de las CMT.....	36
7.10. Obtención y análisis de RNA total	37
7.11. Calidad e integridad del RNA.....	38
7.12. Cuantificación de RNA y de cDNA	38
7.13. Análisis de los exomas.....	39
7.13.1. Preparación <i>Gel-Dye Mix</i>	40
7.13.2. Preparación del <i>Chip</i>	41
7.13.3. Marcaje de las muestras.....	41
7.13.4. Preparación de librerías de cDNA.....	43
7.13.5 Diseño de los <i>primers</i> (oligonucléotidos).....	45
7.13.6. Hibridación del cDNA con los <i>primers</i>	48
7.13.7. Ligación y extensión de cDNA.....	49
7.13.8. Amplificación-PCR-Index.....	51
7.13.9. Limpieza-post PCR.....	52
7.13.10 Genes analizados.....	54
7.13.11 Secuenciación de cDNA y análisis de resultados.....	54
7.13.12. Identificación de los genes diferencialmente expresados.....	55
7.13.13. Análisis de los resultados.....	57
7.13.14. Interpretación de los resultados.....	57
8. Aspectos éticos	57
9. Resultados.....	58
9.1. Quimiosensibilidad de tejidos obtenidos de colon sano.....	58
9.2. Quimiosensibilidad de ACCR sensibles y resistentes.....	59
9.3. Quimiosensibilidad de colon y recto adyacentes a tumores.....	61
9.4. Porcentaje de células madre de tumor CD44 ⁺ /CD24 ⁺ en los ACCRs.	63
9.5. Aislamiento de CMT de ACCR y Colo320DM.....	65
9.6. Expresión de CD44 ⁺ y CD24 ⁺ en los aislados de CMT de ACCR	67
9.7. Porcentaje de células CD44 ⁺ /CD24 ⁺ en Colo320.....	69
9.8. Quimiosensibilidad de las CMT derivadas de ACCR.....	69

9.9. Quimiosensibilidad de las CMT derivadas de cultivos celulares de Colo320.....	71
9.10. Expresión génica diferencial de ACCRs.....	71
9.11. Expresión génica diferencial de las CMT derivadas de ACCRs.....	74
9.12. Perfil de expresión génica de Colo320 y CMT-Colo320DM.....	75
9.13. Mecanismo integrado de la resistencia a 5FUOL de las CMT de ACCRs	75
10. Discusión.....	79
11. Conclusiones.....	88
12. Perspectivas	90
13. Referencias.....	91
Anexo 1. Reactivos.....	106
Anexo 2. Consumibles.....	108
Anexo 3. Equipo.....	109
Anexo 4. Soluciones.....	110
Resumen biográfico.....	112
Producción científica de la autora	113

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Herminia G. Martínez-Rodríguez por alentarme a seguir creciendo profesionalmente. Por la oportunidad que me ha brindado en estos últimos 7 años de mi vida al aceptarme en el Laboratorio de Terapia Celular. Por sus consejos, paciencia, apoyo y confianza para realizar este proyecto. Gracias por ser tan buena conmigo a veces y estricta cuando es necesario.

Al Dr. Salvador L. Said y Fernández por compartir conmigo sus valiosos conocimientos, críticas y darse el tiempo de revisar todo lo relacionado con el proyecto. Por depositar en mi un poco más de confianza y alentar mi formación profesional. Muchas gracias.

A la Dra. Rocío Ortiz López y el Dr. Augusto Rojas Martínez por ser parte de mi comisión y apoyarme en la realización de la secuenciación. Además, por su asesoría y con ésto ayudarme a superar los retos que se fueron presentando durante la realización de dicho protocolo.

Al Dr. Adolfo Soto Domínguez por su apoyo para la realización de las inmunohistoquímicas, por enseñarme a escoger los anticuerpos a utilizar, la colaboración entre Departamentos para usar el Microscopio de Fluorescencia y todas sus recomendaciones que ayudaron a enriquecer mi proyecto.

Al Dr. Julio Sepúlveda Saavedra, exjefe del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la UANL, por enseñarme a procesar las muestras de cáncer colorrectal para cortes histológicos. Él lamentablemente falleció un año después de colaborar con nuestro proyecto. QEPD.

Al Dr. Gerardo Padilla-Rivas por su apoyo en el análisis estadístico. Se lo agradezco mucho.

A los LBG's José Ramos Bárcenas Walls y Ernesto Osuna del CIDICS que me apoyaron con la parte técnica de preparar librerías para la secuenciación

A todo el personal del IMSS Clínica #25, en especial a la Dra. Irma Sandra González por permitirnos tomar una parte de la pieza quirúrgica de CCR para la realización del proyecto. Además, acceso a la historia clínica de cada participante.

Al Departamento de Medicina Forense porque amablemente colaboraron con nosotros. En especial al Dr. med. Mario Alberto Hernández Ordóñez y a todos sus trabajadores quienes nos dieron acceso a las muestras control usadas en este estudio.

A todos los compañeros del Laboratorio de Terapia Celular en especial a Dra. Paulina Delgado González, Dr. Mario Simental, M.C. Florencia Pedraza, M.C. Carlos González, M.C. Selene Jacobo, M.C. Gysela López, M.C Jesús Borrego, MCP Orlando Solís, MCP Emiliano Michel. También a los estudiantes de la carrera de MCP Carlos Valencia y Yesenia Alonso. A todos ellos les agradezco por hacer del laboratorio un lugar ameno y por su amistad.

A todos mis amigos por su apoyo en especial a mi comadre Candy Sepúlveda y compadre Mario Camargo. También a Soraya, Huerta, Yaya, Chacho, Cecy, Alex, Paty, Aracely, Adrián y Prospero por ser como una segunda familia para mí.

A mi mamá, Elsa Nora Treviño, papá Gerardo Garza Garza y hermanos Gerardo y Myrna por apoyarme siempre a realizar este proyecto de vida.

A mi esposo, Alexander León Milaszenko y mi hija Kayla Ninochka León por creer en mí y apoyarme siempre. Por quererme y cuidarme se los agradezco siempre. Ya saben que este logro es por ustedes.

A todas aquellas personas que me acompañaron durante la realización de la tesis se los agradezco mucho.

A las autoridades de la Facultad de Medicina de la UANL por las facilidades que me dieron para realizar mi programa de doctorado, siendo yo empleada de la UANL.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Frecuencia de células portadoras de marcadores de superficie empleados para la identificar CMT en tumores sólidos	16
Tabla 2. Genes asociados con resistencia a 5FU u Oxa y sus funciones	28
Tabla 3. Características clínicas de la población de estudio	31
Tabla 4. Procedimiento para dasparafinar los cortes histológicos de interés	33
Tabla 5. Soluciones utilizadas en la curva estándar de Picogreen.....	39
Tabla 6. Secuencia de pasos durante la creación de la librería de cDNA de los transcriptomas de las CMT.....	43
Tabla 7. Reactivos para la RT-PCR	44
Tabla 8. Temperaturas y tiempos empleados para realizar la RT-PCR	44
Tabla 9. Diseño de los <i>primers</i> para el análisis de expresión.....	45
Tabla 10. Condiciones de hibridación del cDNA con los primers	48
Tabla 11.Temperatura y tiempos de hibridación de cDNA con los primers	49
Tabla 12. Mezcla de amplificación de las muestras de cDNA -primer-etiquetado .	52
Tabla 13.Condiciones de corrida de la PCR reversa.....	52
Tabla 14.Resultados que arrojó el Basespace después de cada corrida de secuenciación TruSeq Target RNA	54
Tabla 15. Comparaciones de expresión génica realizadas	56
Tabla 16. Quimiosensibilidad de colon sano	58
Tabla 17. Quimiosensibilidad de cultivos primarios de ACCR.....	60
Tabla 18. Quimiosensibilidad de colon y recto adyacentes a los tumores	62
Tabla 19. Incremento de CMT CD44 y CD24 despues de su cultivo en medio selectivo	69
Tabla 20. Comparación de la expresión diferencial de ACCRs y ACCRr.....	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Histología de una cripta de Lieberkühn.....	5
Figura 2. Carcinogénesis de colon.....	7
Figura 3. Origen de las células madre de tumor.....	9
Figura 4. Transición epitelial a mesenquimal.	11
Figura 5. Estrategia experimental.....	29
Figura 6. Reactivos, equipos y consumibles utilizados para Agilent RNA 6000....	40
Figura 7. DNA chip o RNA chip.	41
Figura 8. Integridad y Calidad del RNA.	42
Figura 9. Soporte magnético para placa MIDI.	50
Figura 10. Placa MIDI y Equipo Hybrex.	50
Figura 11. Sensibilidad a la mezcla de medicamentos en ACCR , colon y recto adyacentes a las neoplasias	63
Figura 12. Tinción con anticuerpos monoclonales anti-CD44 y anti-CD24.	65
Figura 13. Porcentaje de células CD44 ⁺ y CD24 ⁺ en cortes de biopsias de ACCR sensibles o resistentes a 5FUOL.....	66
Figura 14. Esferoides típicos formados por las CMT.....	67
Figura 15. Doble marcaje de CMT en ACCRs sensibles y resistentes a 5FUOL .	68
Figura 16. Expresión de CD44 y CD24 en células madre de tumor	70
Figura 17. Quimiosensibilidad de las CMT derivadas de ACCRs.	71
Figura 18. Expresión génica de ACCR sensibles y resistentes.....	72
Figura 19. Mapa de calor de expresión genética de las CMT aisladas de ACCR resistentes a 5FUOL	74
Figura 20. Mapa de calor de línea celular Colo320..	77
Figura 21. Genes involucrados en FR de ACCR relacionados entre si.....	786
Figura 22. Genes involucrados en la resistencia de las CMT.....	77
Figura 23. Mecanismo propuesto de resistencia asociado a 5FU y oxaliplatino y las CMT.	78

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCB1	Miembro 1 transportador dependiente de la unión de ATP (adenosin trifosfato)
ABCG2	Miembro 2 transportador dependiente de la unión de ATP (adenosin trifosfato)
ACCR	Adenocarcinoma colorrectal
ANOVA	Análisis de varianza (<i>analysis of variance</i>)
ALDH3B2	Miembro 2 de la familia 3 de aldehído deshidrogenasa
AM1	Buffer de lavado 1
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin trifosfato
ATP-CRA	<i>Adenosin triphosphate-based chemotherapy response assay</i>
Bcl-2	Familia de proteínas, esenciales para la apoptosis.
Bcl-XL	Linfoma de células B – extra largo y MCL-1
BMP	Proteína morfogénica de hueso
BNIP3	Proteína de interacción <i>con Bcl-2</i>
BNIP3L	Proteína BCI-2 / adenovirus E1B que interactúa con la proteína tipo 3
BSA	Albúmina de suero bovino
CA3	Antígeno de clon 3 (<i>colon antigen 3</i>)
CCR	Cáncer colorrectal
CD, por sus siglas en Inglés:	<i>Cluster of differentiation, cluster of designation o classification determinant</i>
cDNA	DNA complementario
CEA	Antígeno carcinoembrionario (<i>carcinoembryonic antigen</i>)
CIN	Inestabilidad cromosómica
CMT	Células madre de tumor
CSAp	Antígeno-p específico de colon (<i>colon-specific antigen-p</i>)
CTPS2	Citidina 5'-trifosfato sintetasa 2
d	Días
DAPI	4 ',6-diamino-2-fenilindol
dATP	Desoxiadenosina 5' trifosfato
DcR2	Receptores señuelo 2
Dctp	Desoxicitidina 5' trifosfato
DE	Desviación estándar
dGTP	Desoxiguanosina 5' trifosfato
dNTPs	Desoxinucleótidos
DPDY	Dihidropirimidina deshidrogenasa
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxitimidina 5' trifosfato
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
ELM4	Extensión y ligación mezcla 4
ENTPD5	Ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa 5

EMT	Transición epitelial mesenquimal
ERCC1	Gen de reparación por escisión de grupo de complementación cruzada 1
FGFBP1	Factor de crecimiento de fibroblastos
FGFR4	Receptor 4 del factor de crecimiento de fibroblastos
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (<i>fluorescein isothiocyanate</i>)
FSP-1	Proteína específica de fibroblastos
5FUOL	5-Fluorouracilo, Oxaliplatino y Leucovorina
G	Fuerza centrífuga angular, expresada en número de atmósferas
GST	Glutation S-transferasa
H	Hora(s)
HH	Hedgehog
HGD	Ácido homogentísico oxidasa
HIF-1 α	Subunidad <i>alfa</i> del factor 1 inducible por hipoxia
HT1	Buffer de hibridación
HYE	Hematoxilina y eosina
INEGI	Instituto Nacional de Geografía y Estadística
IGF-IR	Receptor del factor de crecimiento de insulina
ITPA	Pirofosfatasa de nucleósido trifosfato
KRT18	Citoqueratina 18
LGR5	Receptor 5 acoplado a proteínas G que contiene repeticiones ricas en leucina
LPAR3	Receptor de ácido lisofosfatídico 3
M	Molar
MAP quinasas	Proteína-quinasas activadas por mitógenos
MCL-1	Proteína que induce diferenciación de leucemia mieloide
mg	milígramo(s)
min	minuto(s)
mL	mililitro(s)
μ m	micrómetro(s) o micra(s)
μ l	microlitro(s)
mm	milímetro(s)
MTHFR	Metil-tetrahidrofolato reductasa
MLH1	MutL homólogo 1
MSI	Inestabilidad de microsatélites
N	Concentración normal de una solución
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucléotido fosfato
ng	Nanogramos
nM	Nanomolar
NME6	Nucleósido difosfato quinasa 6
OB1	Perlas paramagnéticas de estreptavidina
PARP1	Poli-ADP-ribosa polimerasa 1
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (amortiguador de fosfatos)

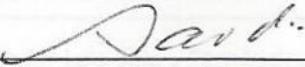
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE-CY7	Ficoeritrina-cianina 7 (<i>Phycoerythrin-cyanine 7</i>)
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PG	Picogreen®
PIK3CA	Fosfatidil-inositol-3-quinasa
PKM2	Piruvato quinasa de músculo 2
PMC	Porcentaje de muerte celular
PMM2	PCR Master Mix 2
qPCR	PCR cuantitativa o en tiempo real (<i>quantitative PCR</i>)
qRT-PCR	Retro-transcriptasa qPCR
RIN	número de integridad de RNA
RNAm	Ácido ribonucleico mensajero
Rpm	Revoluciones por minuto
RRM1	Ribonucleótido reductasa M1
RSB	Buffer de re-suspensión
rTSbeta	Gen complementario a la timidilato sintasa
SAB	albúmina bovina serica
s	segundo(s)
Seq	Secuenciación
SIRP α	Alfa-proteína reguladora de señal
SMA α	Actina de músculo liso alfa
SFB	Suero bovino fetal
SNC	Sistema nervioso central
SPARC	Proteína secretada ácida y rica en cisteína
TA	Tejido adyacente
TBST	Tris-buffer salino + Tween 20
TDP1	TruSeq DNA polimerasa 1
TE	Tris-buffer con EDTA
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
TOP	<i>Primers</i> diseñados con la ayuda de la plataforma Illumina®
TYMS	Timidilato sintasa
TRS	Solución de recuperación de antígenos
UCK1	Uridina-citidina quinasa 1
UB1	Buffer de lavado 2
VEGF	Factor de crecimiento epidérmico vascular

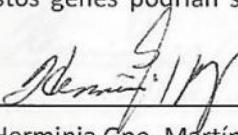
RESUMEN
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina
Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular

Análisis del transcriptoma de células madre de adenocarcinoma colorrectal resistentes a 5-fluorouracilo, oxaliplatino y leucovorina

M.C. Elsa Nancy Garza Treviño

Introducción. El cáncer colorrectal (CCR) es una de las principales causas de muerte por cáncer en el mundo. Más del 90% de los pacientes desarrolla resistencia a los esquemas convencionales de quimioterapia y el 50-60% de los que responden al tratamiento presenta recurrencia. **Antecedentes.** No se conoce cabalmente el mecanismo de fármaco resistencia (FR) de las células malignas a los agentes anti-CCR. Sin embargo, se sabe que las células madre de tumor (CMT) están involucradas en FR y que el inicio y crecimiento de los tumores y las metástasis son promovidos por CMT. Entonces, las CMT se perfilan como el blanco principal para controlar el CCR. **El problema.** Además de la respuesta insatisfactoria a la quimioterapia de los pacientes con adenocarcinoma colorrectal (ACCR) avanzado (etapas III o IV), existe una enorme variabilidad en la respuesta clínica al efecto combinado de 5-FU, oxaliplatino y leucovorina (5-FUOL) — medicamentos del régimen llamado FOLFOX-6, el cual se utiliza en el Hospital Universitario “José Eleuterio González” de la UANL. **Justificación.** Aunque no se sabe con exactitud a que se debe la respuesta insatisfactoria y variable del CCR a 5FUOL, una de las causas más fuertemente relacionadas con este fenómeno es la expresión diferencial de genes involucrados con diversas funciones celulares. Uno de los enfoques más adecuados para analizar esta posibilidad es la caracterización del exoma de las CMT. La ventaja de identificar a aquellos genes que se expresan diferencialmente en presencia de 5FUOL es que ésto permitirá utilizar los elementos moleculares responsables de esa FR como nuevos blancos terapéuticos; y así, controlar más eficazmente al CCR. Se han reportado 66 genes asociados a resistencia a 5FU o a oxaliplatino; sin embargo, existen muy pocos trabajos en el mundo donde se haya analizado la expresión génica de CMT resistentes a 5FUOL. **Objetivo.** Identificar los genes diferencialmente expresados en CMT de ACCR, con respecto a los de colon sano o biopsias de ACCR. **Material y métodos.** Caracterizamos, mediante inmunocitoquímica, el porcentaje de CMT que contiene el tejido tumoral. Obtuvimos 51 muestras de tumores de ACCR, 6 aislados de CMT de ACCR y 10 muestras de colon sano. Aislamos las CMT-FR, cultivándolas en un medio suplementado con factores de crecimiento y 5FUOL, a concentraciones equivalentes a las máximas alcanzadas en el plasma sanguíneo por cada uno de los fármacos de 5-FUOL. En todos los especímenes mencionados evaluamos la citotoxicidad de 5FUOL, utilizando el ATP-CRA (*adenosin triphosphate-based chemotherapy response assay*). Además, con el sistema Illumina RNATruSeq Target, analizamos la expresión de los 66 genes implicados en FR de ACCR y la correlación entre la FR con la sobreexpresión de genes entre los grupos mediante pruebas de ANOVA, con la ayuda del software SPSS. **Resultados y conclusiones.** La expresión de los genes ABCB1, ABCG2, ALDH3B2, BNIP3, EGF, HGD y KRT18 fue significativamente mayor en las CMT-FR que en biopsias de colon y recto sanos y su correlación con FR fue estadísticamente significativa ($p < 0.01$). Las responsables de la resistencia a 5FUOL son las CMT. La condición de resistencia o sensibilidad a 5FUOL depende del porcentaje de CMT en los tumores. Los genes ABCB1, KRT18 y BNIP3 están directamente relacionados con resistencia a 5FUOL; mientras que ABCG2, ALDH3B2, EGF y HGD están involucrados en mantenimiento *in situ* de las CMT. **Discusión.** La sobreexpresión de todos los genes que identificamos aquí, podría ser la responsable, al menos en parte, de la resistencia a 5-FUOL de las CMT, y la diferencia de cada aislado de CMT en los niveles de expresión de estos genes podría explicar la variabilidad clínica y la respuesta insatisfactoria generalizada a FOLFOX-6. Por otro lado, todos estos genes podrían ser útiles, tanto como biomarcadores de CMT de CCR como blancos terapéuticos.


Dr. Salvador Luis Said y Fernández
Director de tesis


Dra. Herminia Gpe. Martínez Rodríguez
Co-directora de tesis

1. Introducción

ABSTRACT

University of Nuevo León, Mexico
Medicine School

Department of Biochemistry and Molecular Medicine

Analysis of colorectal adenocarcinoma stem cell transcriptomes resistant to 5-fluorouracil, oxaliplatin y leucovorin

M.C. Elsa Nancy Garza Treviño

Introduction. Colorectal cancer (CRC) is one of the world's main causes of death. More than 90% of CRC patients develop resistance to conventional chemotherapy schemes and 50-60% of patients, who respond to their treatment present recurrence. **Antecedents.** The resistance mechanism of malignant cells against anti-CRC agents is not fully understood. Notwithstanding, it is well known that the tumor stem cells (TSC) are involved in drug-resistance (DR) and that metastasis onset and tumor growth are promoted by TSC. Therefore, TSC are profiling as the main target to control CRC. **The problem.** Besides of an unsatisfactory response to chemotherapy of patients having an advanced CRC (stages III or IV), there is a great variability in the clinical response to the combined effect of 5-fluorouracil (5-FU), oxaliplatin y leucovorin (5-FUOL) — medications used in FOLFOX-6 therapeutic scheme —. This treatment is used in the University Hospital "José Eleuterio González", UANL. **Justification.** Even though the unsatisfactory and variable response to 5FUOL is not fully understood, the differential expression of those genes devoted to diverse cell functions has been pointed out as one of the more strongly causes related to with DR. One of the approaches more adequate for analyze this possibility is to characterize the TSC exome. The advantage of identify those genes which are differentially expressing in the 5FUOL presence is that this knowledge will allow using the molecular elements responsible for this DR as new molecular targets and to control CRC in a more efficacious manner. At date, 66 genes associated to 5FU or oxaliplatin resistance have been reported. Nevertheless, there are very few studies, around the world, were gene expression of FUOL-TSC resistant had been analyzed. **Objective.** Identify those genes differentially expressed by TSC derived from colorectal adenocarcinoma (CRAC) with respect to healthy colon and rectum or CRA. **Material and methods.** By means of immunocytochemistry, we determined the TSC percentage contained in CRAC. We obtained 51 CRACs, 6 TSC isolates and 5 samples of healthy-colon and 5 -rectum. We isolated TSC derived from CRACs, resistant to 5FUOL, by cultivating them in a culture medium supplemented with growth factors and 5FUOL; which components had concentrations equivalent to those maxim reached in human blood plasma. In all mentioned specimens, we evaluated the 5FUOL toxicity, using the ATP-CRA (*adenosin triphosphate-based chemotherapy response assay*). In addition, we analyzed the expression of 66 genes involved in FR of CRAC, and the CRAC cell-line Colo 320DM; as well as their TSC, using a variance analysis (ANOVA), with the help of the SPSS software. **Results.** The expression of ABCB1, ABCG2, ALDH3B2, BNIP3, EGF, HGD y KRT18 was significant higher ($p < 0.01$) than healthy colon and rectum. **Conclusions and discussion.** TSC are responsible for 5FUOL-resistance. 5FUOL-resistance o -sensitivity depends on TSC percentage into tumors. Genes ABCB1, KRT18 y BNIP3 are directly related with 5FUOL-resistance and ABCG2, ALDH3B2, EGF y HGD are involved in STC maintenance *in situ*. **Discussion.** Over-expression of all genes, here identified, are responsible, at least partially, in TSC 5-FUOL-resistance, and, the variability of the expression-levels of genes differentially expressed could explain the clinical unevenness and the unsatisfactory response to FOLFOX-6. On the other hand, all these genes could be useful tools, as TSC biomarkers and as therapeutic targets.

Dr. Salvador Luis Said y Fernández
Thesis director

Dra. Herminia Gpe. Martínez Rodríguez
Thesis Co-director

1. Introducción

Desde el año 2015, el cáncer colorrectal (CCR) ha ocupado, en el ámbito mundial, el tercer lugar en incidencia, con aproximadamente 1,000,000 de nuevos casos y una mortalidad de más de 500,000 casos anuales¹. En los países en desarrollo, como México, la detección de CCR se realiza usualmente en estadios avanzados²; por lo que a la mayoría de los pacientes se les somete a un régimen quimioterapéutico; usualmente FOLFOX-6 o XELOX y extirpación quirúrgica del tumor primario^{3,4}. FOLFOX-6 se utiliza normalmente en el Hospital Universitario “José Eleuterio González”, de la UANL y los medicamentos que se utilizan son 5-fluorouracilo (5FU), oxaliplatino y leucovorina (5FUOL). XELOX se basa en la prescripción de capecitabina — un profármaco de 5FU —, y se utiliza en la UMAE 25 del IMSS. Sólo el 30-50% de los pacientes responde a alguno de los tratamientos en comento, y lo hace en forma heterogénea. Además, estos pacientes eventualmente presentan recidivas y la mayoría de ellos muere en un término de 20 meses, después de iniciado el tratamiento⁵. Actualmente, no se conocen cabalmente los mecanismos de resistencia a 5-FUOL y aún no se explica la razón por la que los pacientes responden en forma tan heterogénea y no satisfactoria al tratamiento⁶.

En años recientes, se ha asociado la variabilidad de la progresión tumoral con la habilidad de las células malignas de evadir el control del sistema immune y de transitar de una estirpe epitelial a una mesenquimal (EMT). Esta transición está involucrada en el mantenimiento *in situ* de las células madre de tumor (CMT). Además, las CMT están implicadas en la iniciación de los tumores primarios, la fármacoresistencia (FR) y la formación de metástasis. Entonces, es prioritario estudiar exhaustivamente a las CMT; sin embargo, una de las dificultades que existen en el estudio de su biología celular y molecular es que estas células se encuentran distribuidas en los tumores de CCR en un porcentaje muy bajo⁷. Además, muy pocos grupos de investigadores han logrado aislar y expandir *in vitro* a las CMT para estudiarlas adecuadamente^{8,9}. Es por ello, que hasta la fecha no se cuenta con un marcador específico para identificar a las CMT y tampoco se dispone

ni de marcadores moleculares específicos de CMT de CCR ni de blancos terapéuticos dirigidos, precisamente, contra estas células. Sin embargo, se sabe que algunos genes asociados con resistencia pueden estar sobre-expresados en las CMT; lo cual podría explicar la capacidad del CCR de resistir a los tratamientos convencionales¹⁰.

Por todas las razones expuestas, en el presente trabajo aislamos, expandimos y caracterizamos CMT de tumores primarios de CCR y analizamos el exoma de estas células, con énfasis en los genes que, previo al inicio del presente trabajo, habían sido publicados como sobre-expresados en células resistentes a 5FU o a oxaliplatino¹¹. Además de las CMT de CCR, incluimos en nuestro estudio biopsias y cultivos primarios de tumores y tejidos adyacentes a los tumores de CCR resistentes o sensibles a 5FUOL, CMT, cultivos completos de la línea Colo 320DM –de adenocarcinoma colorrectal (ACCR)– y muestras de colon sano. Para realizar las pruebas de sensibilidad a 5FUOL utilizamos el método llamado ATP-CRA (*adenosin triphosphate-based chemotherapy response assay*); el cual fue previamente estandarizado por la M.C. Martha Sofía González, como parte de su proyecto de tesis de Maestría en Ciencias, siendo ella, miembro de nuestro grupo de investigación.

2. Antecedentes

2.1. Epidemiología del CCR en el mundo

Desde el año 2015, el cáncer colorrectal (CCR) ha ocupado, en el ámbito mundial, el tercer lugar en incidencia, con aproximadamente 1,000,000 de nuevos casos y una mortalidad de más de 500,000 casos anuales¹. El CCR tiene una prevalencia variable en diferentes partes del mundo, e inclusive, dentro de un mismo país. Las tasas de incidencia de CCR más altas se encuentran en Estados Unidos. Se estima que en el 2011 se presentaron, en ese país, 141,210 nuevos casos¹². A Estados Unidos le siguen en incidencia los países de Europa Occidental, Australia y Nueva Zelanda. En todos esos países se estima una tasa promedio anual de 45 casos por cada 100,000 habitantes; mientras que en Asia y África la tasa anual es de 10 casos por cada 100,000 habitantes. En los países en desarrollo, el CCR generalmente se detecta en estadios avanzados (III o IV), mientras que en los países desarrollados, esta enfermedad se diagnostica en estadios más tempranos (I o II); lo cual permite iniciar un tratamiento específico de forma más oportuna y lograr un mayor porcentaje de éxito¹³.

2.2 Epidemiología del CCR en México

En el año 2012 se reportaron 74,685 muertes por cáncer; 5.4% de estas defunciones se debieron a CCR¹⁴. Se estima que, el CCR ocupa el décimo lugar entre las neoplasias y el segundo lugar entre los diferentes tipos de cáncer gastrointestinal, los cuales usualmente son diagnosticados en etapas clínicas avanzadas¹⁵.

2.3. Epidemiología del CCR en habitantes jóvenes de México

Además de la alta incidencia de CCR en personas mayores de 51 años, en México, dicha enfermedad está presentando un incremento en la incidencia en personas menores de 50 años¹⁸.

2.4 Epidemiología del CCR en Nuevo León

En Nuevo León, el CCR ocupa el segundo lugar en incidencia en tumores de tubo digestivo, con aproximadamente 550 casos anuales. En general, se acepta que el CCR afecta a hombres y mujeres en la misma proporción. Sin embargo, en Nuevo León predomina en el sexo masculino (68.1%) entre los pacientes con CCR^{16,17}.

2.5. Factores de riesgo del CCR

Los factores de riesgo están clasificados como no-modificables y ambientales (modificables)¹⁸. Entre los factores no modificables que incrementan el riesgo de desarrollar CCR se encuentra la edad y una historia familiar de cáncer. Más del 90% de estas neoplasias se presentan en personas mayores de 50 años y la incidencia aumenta conforme se incrementa la edad. Sin embargo, EL CCR es frecuente entre los hombres y mujeres entre 20 y 49 años¹⁸. Entre los factores ambientales de riesgo para contraer CCR está el consumo excesivo de carnes rojas, carne industrializada o grasa animal, baja ingesta de fibras vegetales, disminución de la ingesta de micronutrientes protectores (vitamina A, C y E), diabetes tipo I, obesidad, alcoholismo, tabaquismo y una vida sedentaria¹⁹. Además, una historia personal de pólipos adenomatosos y enfermedades inflamatorias del intestino (colitis ulcerativa y enfermedad de Crohn) incrementan el riesgo de desarrollar cáncer de colon^{20,21}.

2.6. Histología del colon

La pared del colon está formada por cuatro capas: mucosa, submucosa, muscular externa y serosa. La superficie más externa es la mucosa y está recubierta por un epitelio columnar simple; el cual desempeña funciones de absorción y secreción. El epitelio del colon se pliega sobre sí mismo y forma invaginaciones incrustadas en el tejido conectivo. Estas estructuras, en forma de tubo de ensayo, llamadas criptas de Lieberkühn, representan la unidad funcional del colon²². El colon humano normal contiene millones de criptas. En cada cripta hay unas 2,000 células epiteliales²³. En general, los principales linajes de células epiteliales que conforman una cripta incluyen a los colonocitos, las células secretoras de mucina o células caliciformes,

las células endocrinas y las células de Paneth^{24,25}. El recambio de estas células es un proceso constante que ocurre cada 2-7 días. En circunstancias normales y sin daño en el tejido²⁶, este complejo proceso está regulado por células madre adultas (CMA), ubicadas dentro de la cripta. Su localización exacta aún sigue siendo tema de debate²²; aunque algunos reportes las ubican en la base de la cripta como se muestra en la Figura 1.

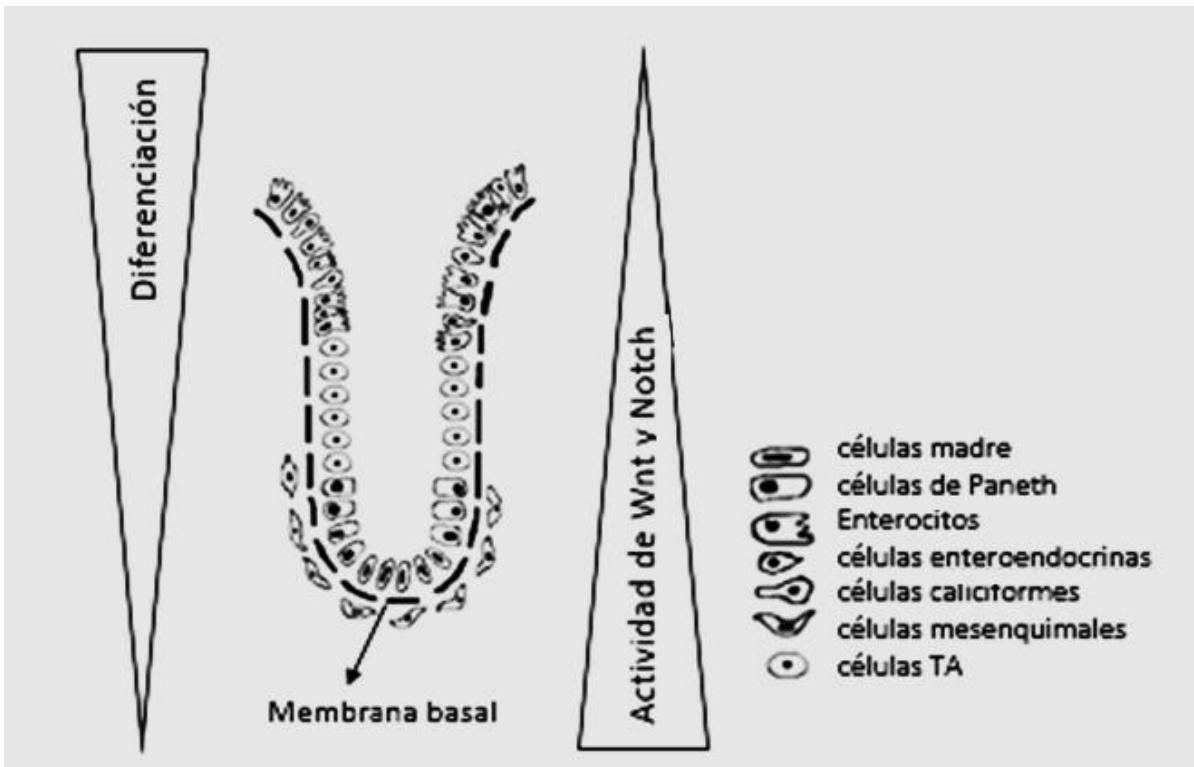


Figura 1. Histología de una cripta de Lieberkühn. Se observan las diferentes poblaciones celulares y la localización propuesta de las células madre.

2.7. Carcinogénesis

El CCR se divide en esporádico y familiar (hereditario). Entre 5-10% de los casos de CCR tiene antecedentes genéticos. Los genes responsables de estas formas de CCR hereditario están asociadas a mutaciones en los genes implicados en la vía de reparación del DNA (MLH1 y MSH2)²⁷. El resto (75-80%) de los tumores tienen un origen esporádico²⁶.

Los cambios moleculares involucrados en el desarrollo del adenocarcinoma colorrectal (ACCR) esporádico incluyen dos mecanismos importantes: uno de ellos

se denomina vía "canónica" (secuencia adenoma-carcinoma) o "supresor" e implica inestabilidad cromosómica. El ACCR, debido a una inestabilidad cromosómica, se caracteriza por pérdidas alélicas en el cromosoma 5q (APC), 17p (p53) y 18q (DCC/SMAD4)²⁸. La segunda vía de carcinogénesis colorrectal implica inestabilidad de microsatélites, y se llama vía *mutator*. La vía de inestabilidad de microsatélites se presenta en aproximadamente 15–20% de los casos de CCR esporádico. El CCR por inestabilidad de microsatélites se origina generalmente en las estructuras epiteliales de la mucosa del intestino grueso del colon o recto²⁹.

La carcinogénesis de colon comienza con un aumento de la expresión de la β-catenina intracelular en el tejido epitelial; lo que resulta en la activación prolongada de la vía Wnt, la estabilización de la β-catenina y la proteína C-terminal 1 (CtBP1). Además, la inactivación de APC contribuye a la iniciación del adenoma. Este pólipos adenomatosos es el resultado de anomalías en la maduración o la arquitectura de la mucosa o de un proceso de inflamación³⁰. En el CCR se encuentran una mezcla de células epiteliales, fibroblastos, miofibroblastos, inmunocitos (linfocitos T, linfocitos B, NK) y células endoteliales. La interacción entre estos diferentes tipos celulares juega un rol esencial en el desarrollo, crecimiento y propagación del CCR³¹. Además, la activación de KRAS y β-catenina actúa sinéricamente, a nivel nuclear, para promover la progresión de adenoma a carcinoma³². La pérdida de p53 y la heterocigosis del cromosoma 18q³³ se observan frecuentemente en el cáncer colorrectal avanzado. Se ha propuesto que la mutación TP53 ocurre en el momento de la transición de un adenoma a cáncer. Las mutaciones en los genes del receptor del factor de crecimiento transformante beta (TGFBR) y de la fosfatidil-inositol-3-quinasa (PIK3CA) son factores implicados en la progresión tumoral³⁴. Además, estudios recientes han indicado que el origen de la iniciación del CRC podría implicar a las células madre normales del intestino, en lugar de progenitores o células diferenciadas. Se ha planteado la hipótesis de que las células madre transformadas progresan a adenomas intestinales (Figura 2), ya que son capaces de dividirse, renovarse durante largos períodos de tiempo y diferenciarse a células especializadas, que finalmente culminan en la formación del tumor³⁵.

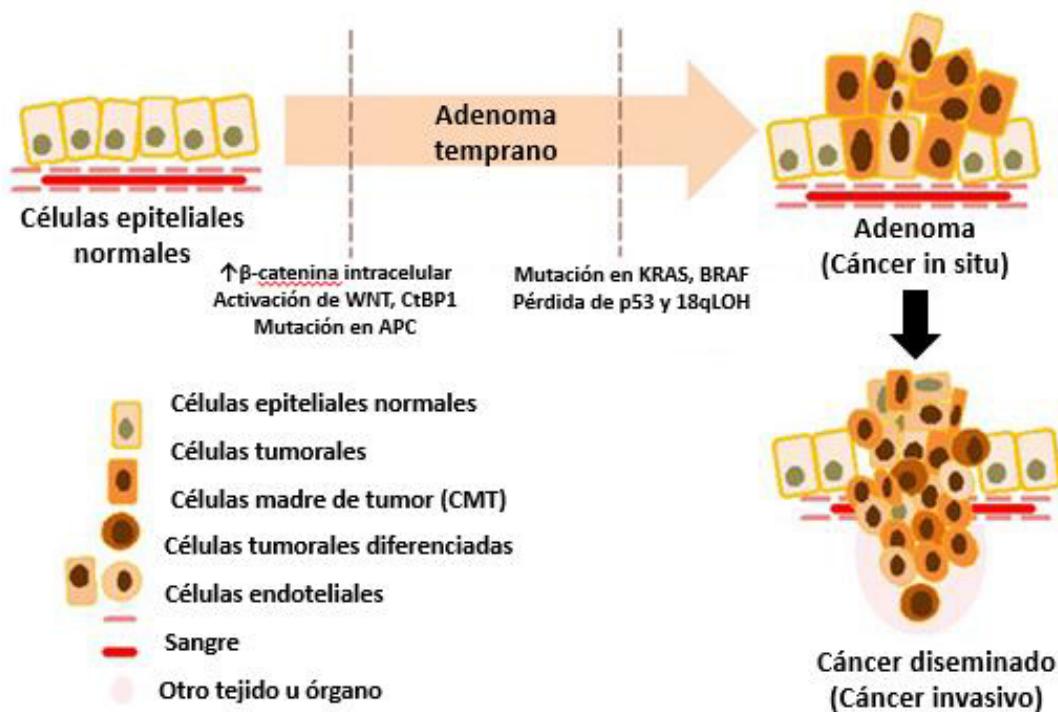


Figura 2. Carcinogénesis de colon. La progresión del epitelio normal del colon a carcinoma invasivo pasa por varias etapas; La fase de carcinoma invasivo implica que las células epiteliales pierden su polaridad y se separan de la membrana basal, alterando las interacciones célula-ECM y las redes de señalización que producen cambios en las células madre mesenquimales normales (CMMs); las cuales se transforman en células madre tumorales (CMT). La fase maligna de crecimiento del tumor puede progresar desde esta etapa hasta cáncer metastásico, implicando también la invasión de las células malignas al torrente sanguíneo.

2.8. Diagnóstico del CCR

Entre los métodos de diagnóstico clásicos del CCR está la identificación de sangre oculta en las heces fecales. Este es uno de los procedimientos más utilizados porque no es invasivo. Después, se encuentra la colonoscopía o sigmoidoscopía, procedimientos que permiten observar directamente las lesiones. Aunque la colonoscopía es costosa e incómoda para los pacientes, este procedimiento permite realizar una detección oportuna de la masa tumoral y, en consecuencia, prescribir su remoción quirúrgica, también, oportunamente; lo que disminuye el riesgo de muerte por CCR³⁶. A pesar de que la morbi-mortalidad del CCR ha mostrado una ligera disminución, en el ámbito mundial la prevalencia de esta enfermedad sigue

siendo muy alta. Esto se debe a que un 70% de los casos de CCR son diagnosticados en etapas III y IV. En estos casos, el pronóstico es desfavorable³⁷.

2.9 Tratamiento del CCR

El CCR se trata principalmente mediante remoción quirúrgica, cuando su diagnóstico se realiza en etapas tempranas. Cuando esta neoplasia se detecta en etapas tardías, la cirugía combinada con quimioterapia resulta ser la única alternativa. Uno de los esquemas quimioterapéuticos de primera línea más utilizados es el FOLFOX-6; el cual incluye la prescripción de 5-fluorouracilo (5-FU), oxaliplatino y leucovorina. Este esquema y otros, también utilizados ampliamente como el XELOX y el XELODA –que utilizan capecitabina, un profármaco de 5FU– presentan una tasa de respuesta a la terapia sistémica no mayor del 50%. Esto resulta en un rango de sobrevida de 17 a 20 meses, después de iniciado el tratamiento. Sin embargo, la mayoría de los pacientes mueren debido al CCR. Estos resultados catastróficos se deben principalmente a la FR de las células malignas. La FR es responsable del 90% de los casos de recurrencia³⁸. Recientemente, la FR y la recurrencia del CCR han sido asociadas con la presencia de una población celular, que forma parte integral de los tumores, conocida como células madre de tumor (CMT) y células malignas asociadas del estroma. Entre estas células desatacan, por su importancia en la patogénesis del cáncer; los fibroblastos asociados al tumor³⁹.

2.10. CMT

Las CMT o células iniciadoras del cáncer, son una subpoblación de células genotípica y fenotípicamente distintas de las otras estirpes celulares que habitan en el tumor. Las CMT promueven directamente el desarrollo y progresión del CCR⁴⁰. Las CMT representan aproximadamente entre 1-10% del número total de células que constituyen el tumor. Se considera que su frecuencia es muy variable entre cada tumor⁴¹. Además, conociendo que esta población de CMT representa las únicas células que se propagan en los tumores y que sobreviven después de ser

tratadas con quimioterapia, se ha propuesto que las CMT son responsables de la formación de metástasis⁴².

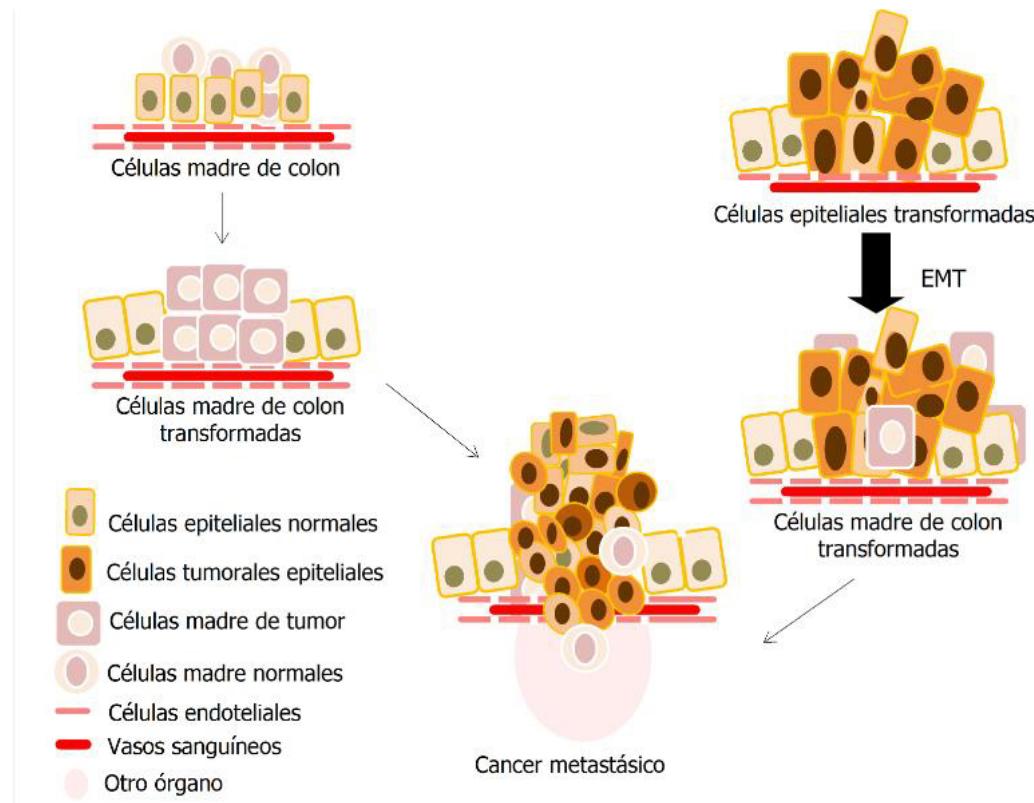


Figura 3. Origen de las células madre de tumor. Se ha propuesto que las células madre de tumor (CMT) pueden originarse a partir de células madre mesenquimales (CMMs) normales o de células diferenciadas transformadas; las cuales sufren una transición de epitelial a mesenquimal, originando un fenotipo parecido a células madre; las cuales pueden migrar a sitios distantes, donde nuevamente pueden sufrir una transición de mesenquimal a epitelial y promover el crecimiento de un tumor metastásico.

El origen de las CMT aún no se conoce. Sin embargo, se ha postulado que, en general, las CMT se originan en un órgano o tejido dado, como consecuencia de una transformación de las células madre mesenquimales (CMM), células madre hematopoyéticas (CMH) o células progenitoras (CP) normales; las cuales, después adquieren características de células parecidas a las células madre mediante la transición epitelial a mesenquimal (EMT). La figura 3 muestra este proceso, en el caso particular del CCR.

2.11. Transición epitelial a mesenquimal

La transición, normal, de las células de la mucosa del colon o recto, de epitelial a mesenquimal (EMT) regula la arquitectura intestinal sana y además define el equilibrio entre proliferación y diferenciación mediada por la vía Wingless/Int (WNT). En CCR las mutaciones en el gen APC (presente en el 80% del cáncer esporádico), resulta en una activación constante de la vía Wnt (β -catenina), promoviendo la transición hacia el fenotipo mesenquimal. Se considera que durante este proceso se activa un mecanismo donde las células tumorales (epiteliales) pierden la polaridad, así como la adhesión mediada por E-cadherina; y que ese cambio produce la reorganización del citoesqueleto⁴³. Durante este proceso se destruyen la membrana basal y la matriz extracelular, haciendo que las células pasen de un fenotipo epitelial adherente a uno mesenquimal no adherente. Por ello, el fenotipo de células no-adherentes se asocia con su invasión a los tejidos adyacentes y con la formación de metástasis. Las metástasis se originan porque las células no-adherentes pueden circular por los sistemas linfático y vascular sanguíneo; lo que, en última instancia, contribuye a la intra- o extravasación de las células transformadas⁴⁴. El proceso de EMT está regulado por el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), esta señal induce la expresión de otros factores de crecimiento como la proteína específica de fibroblastos (FSP1), la alfa actina de músculo liso (SMA α), el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y las citocinas IL-6, IL-23 y/o IL-1 β (pro-inflamatorias) provenientes de linfocitos T CD4+, que participan en mantener un microambiente para que se promueva este complejo proceso como se muestra en la Figura 4⁴⁵. Además, ocurre la activación de vías como Wnt, Hedgehog (HH), proteína morfogénica de hueso (BMP), Notch, y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)⁴⁶. Todas estas vías están involucradas en la proliferación descontrolada y en el cambio de la división simétrica a la división asimétrica.

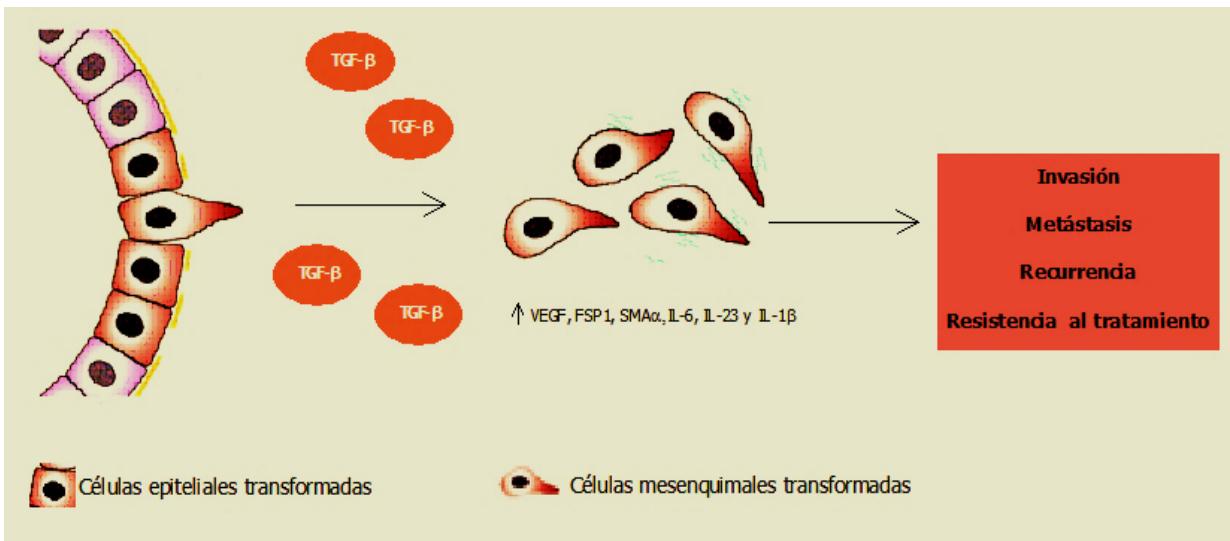


Figura 4. Transición epitelial a mesenquimal. El factor de crecimiento transformante beta (TGF β) es liberado por las células epiteliales transformadas y éste activa rutas mitogénicas y de supervivencia celular, tales como la ruta de Ras/MAPK, la PI3-K/Akt y WNT; las cuales actúan directamente o mediante la transactivación de otros receptores que promueven el fenotipo mesenquimal.

Recientemente se han establecido líneas celulares de cáncer de colon con propiedades de CMT. Estas células permanecen genéticamente estables durante su expansión *ex vivo* (6-8 semanas). Contrario a lo que sucede con las células epiteliales malignas —las cuales son sensibles a la quimioterapia y tienen ciclos de vida cortos—. Las células con propiedades de CMT son resistentes a los agentes quimioterapéuticos y pueden separarse de su tumor primario, invadir otros tejidos, acceder a la circulación sanguínea, sobrevivir en ella y, de esta manera, llegar a sitios distantes, migrando a través del revestimiento endotelial de los capilares y formar tumores secundarios (metástasis)⁴⁷. A diferencia de lo que ocurre con las CMT, las células cancerosas diferenciadas de epitelio intestinal tienen un tiempo de vida corto, cuando se les cultiva bajo condiciones estándar (7-10 días, en DMEM-F12 suplementado con 10-20% de suero fetal bovino [SFB])⁴⁸. Se ha propuesto que el breve tiempo de supervivencia *in vitro* de las células cancerosas diferenciadas se debe a que el SFB posee ciertos factores que inhiben su replicación⁴⁹. Otra característica de suma importancia de las CMT es su habilidad para entrar en un estado de reposo (quiescencia), durante todo el tiempo que estén expuestas a un microambiente desfavorable. Cuando las CMT-FR están quiescentes, éstas no

proliferan. Al retirarse la presión de los agentes antineoplásicos, las CMT-FR recuperan su actividad metabólica y secretan proteínas con actividades promotoras de tumores que promueven mitosis anormales^{50,51}. La habilidad de las CMT para entrar en un estado de quiescencia es uno de los múltiples mecanismos de FR que se han descrito en el cáncer⁵¹.

2.12. Mecanismos moleculares de FR

Las CMT son muy heterogéneas desde el punto de vista genético; lo que puede reflejarse en la variabilidad histológica reconocida desde hace tiempo dentro de tumores clasificados como iguales. Es ahí donde radica la importancia de clasificar correctamente las distintas estirpes celulares que constituyen un tumor y orientar mejor el esquema de tratamiento⁵². Solamente se ha estudiado la activación del receptor del factor de crecimiento de insulina (IGF-IR) en CMT-FR⁵³ de cáncer de colon obtenidas de la línea celular HT29. Las CMT-FR HT29 se cultivaron en presencia de 5FU y Oxa. Por otro lado, las CMT derivadas de cultivos primarios de tumores de CCR, que expresaban la proteína LGR5 (*Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5* [LGR5⁺]), mostraron perfiles de expresión, notablemente diferentes entre sí, de los siguientes factores: i) proteína de unión al factor de crecimiento de fibroblastos (FGFBP1), ii) receptor 4 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR4), iii) receptor de ácido lisofosfatídico 3 (LPAR3), iv) proteína FZD2 (receptor involucrado en la vía WNT), v) subunidad catalítica de la enzima telomerasa (TERT) y vi) HLA-DMA (*HLA class II histocompatibility antigen, DM alpha chain*)⁵¹. Kobayashi et al., reportaron en 2012⁵⁰, que las CMT-LGR5⁺ de colon, entraron en un estado de resistencia cuando se les cultivaron en presencia de irinotecan o de 5FU/Oxa y se convirtieron en CMT-LGR5⁻, y cuando se les retiró el irinotecan o el 5FU, estas células regresaron a su fenotipo original, LGR5⁺. Para explicar este fenómeno, se ha propuesto que en el colon residen al menos dos tipos de células madre (LGR5⁺ y BMIL-1⁺ (*lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog*). BMIL-1 es un oncogén que regula a otros dos genes (p16 y p19), que son inhibidores del ciclo celular. En el epitelio intestinal normal y en condiciones

homeostáticas, las células madre LGR5⁺ y BMIL-1⁺ mantienen la capacidad del epitelio intestinal para regenerarse⁵⁴. En el CCR, ocurre el mismo mecanismo de autorrenovación, pero en este caso lo realizan las CMT⁵¹. Sin embargo, esto es sólo una especulación, ya que las redes de señalización que participan en este complejo proceso aún no se conocen cabalmente⁵⁵.

Es importante hacer notar, que hasta ahora, el aislamiento de la poblaciones de CMT CD44^{+/CD24⁺ provenientes de tejidos sensibles o resistentes a los fármacos 5FU y oxaliplatino no se había reportado y por lo tanto tampoco se habían descrito los perfiles de expresión génica de estas poblaciones celulares. Por lo tanto, nuestro trabajo es pionero, en el mundo, en ese campo de estudio.}

2.13 Marcadores de células madre de tumor

Las CMT humanas se aislaron por primera vez de diferentes tipos de cáncer hematológico. Estos aislados de CMT consistían en una pequeña población de células tumorales que mostraban una capacidad de autorrenovación ilimitada⁵⁶. Éstas CMT, identificadas por ser portadoras de marcadores clonales (CD, por sus siglas en inglés: *cluster of differentiation*, *cluster of designation* o *classification determinant*) de células madre, proporcionaron la primera evidencia convincente de la existencia de CMT en la leucemia mieloide aguda. Más recientemente se descubrieron en tumores sólidos, incluyendo los cánceres del SNC (glioblastomas, meduloblastomas y ependimomas)⁵⁷, melanoma⁵⁸, cáncer de próstata⁵⁹, cáncer de páncreas⁶⁰ y cáncer de colon⁶¹ entre otros⁶². Unos de los marcadores típicos de CMT son el CD133, CD44 y CD24.

2.14 CD133

CD133 es una proteína glucosilada de 120 kDa, con cinco dominios transmembrana y dos grandes bucles extracelulares. *In vitro*, las células CD133⁺ pueden diferenciarse en múltiples linajes y recobrar el fenotipo del tumor original *in vivo*, a diferencia de las CMT CD133⁻. Las células CD133⁺ a menudo se asocian con

resistencia a la quimioterapia tradicional⁶³. Además, en cáncer de colon, se han observado diferencias significativas entre las CMT-CD133⁺ y las CMT-CD133⁻, en co-cultivos con fibroblastos primarios derivados de tejidos de cáncer de colon; especialmente en co-cultivos con fibroblastos CD10⁺. Los resultados sugieren que células de cáncer de colon CD133⁺ son más invasivas en presencia de fibroblastos, y que estas poblaciones celulares pueden ser dianas prometedoras para la inhibición de la metástasis y la recurrencia del tumor⁶⁴. Las CMT obtenidas de cultivos primarios de cáncer de colon con fenotipo CD133⁺ pueden ser expandidas *in vitro* usando un medio de cultivo sin suero, específicamente diseñado para este propósito. Bajo estas condiciones, se produce un incremento gradual en la resistencia de las CMT a irinotecan⁶⁵. Recientemente en la línea celular LoVo de cáncer de colon, se observó que las células CD133⁻ son más resistentes al 5-FU que las CD133⁺⁶⁴. Hasta la fecha, estudios del genoma de CMT de la línea HCT-116 de cáncer de colon, han revelado 4,351 genes diferencialmente expresados en CMT-CD133⁺, comparados contra células de la línea HCT-116 CD133⁻. Dicha expresión diferencial consistió en una sobre-expresión de los genes responsables de la resistencia a la apoptosis, la regulación del ciclo celular, la proliferación, el fenotipo mesenquimal y las vías implicadas en el desarrollo tumoral⁶⁶. Por ello, a pesar de que algunos estudios usan el marcador CD133⁺ como medio para purificar a esta estirpe celular; se ha mencionado que solamente una de cada 262 células CD133⁺ es CMT en el cáncer de colon⁶⁷. Otra limitación que tiene el uso de CD133 como marcador de CMT es que CD133 parece expresarse en forma variable en tumores de CCR. Además, la expresión de CD133 por las CMT es independiente de la resistencia clínica a los medicamentos anti-neoplásicos utilizados para tratar el CCR⁶⁸. Por lo tanto, este solo marcador no es suficiente para aislar y clasificar a las CMT de CCR.

2.15 CD44

CD44 es una glicoproteína transmembranal, que puede actuar como un receptor del ácido hialurónico de la matriz extracelular, y como tal, CD44 es un activador de la vía Wnt/β-catenina⁶⁹. CD44 fue el primer marcador de CMT en tumores sólidos,

identificado en cáncer de mama⁷⁰. Este marcador, tiene importancia funcional para el CCR⁶⁸, debido a que CD44 activa e induce la expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K/Akt) y glutatión sintetasa quinasa (GSK-3β). Además, reduce la expresión de E-cadherina, y sobre-expresa N-cadherina, α-actina, vimentina, fibronectina y MT1-MMP; las cuales son señales de la EMT. CD44 también inhibe la formación de la membrana asociada al complejo E-cadherina-β-catenina, lo que promueve la invasión y migración celulares⁷¹.

2.16. CD24

CD24 es una proteína de superficie celular anclada por glicosil-fosfatidil-inositol, encontrada en una amplia variedad de células, incluyendo las CMT. CD24 fue descubierto en ratones y se utilizó como un marcador para diferenciar las células hematopoyéticas y células neuronales⁷². Debido a su particular estructura glicosilada (O-glicosilación o N-glicosilación), CD24 actúa como un ligando versátil en diversas células. La N-glicosilación le permite a CD24 desempeñar funciones importantes en el sistema nervioso central, el sistema inmune (células pre-B, queratinocitos), epitelio tubular renal. CD24 se expresa ampliamente en cáncer de ovario, mama, próstata, vejiga y renal⁷³. Con respecto al CCR, se ha demostrado que CD24 participa en las interacciones célula-célula, la adhesión celular, la proliferación celular y la invasión tumoral de los tejidos adyacentes. Funcionalmente, se identifica como un ligando alternativo para la P-selectina, un receptor de adhesión en las plaquetas y células endoteliales⁷⁴, a través del cual su interacción facilita el paso de las células tumorales en el torrente sanguíneo durante la metástasis.

Investigaciones recientes encontraron que CD24 coexiste con CD44, CD29 y CD31 en diversos cánceres y por ello ganó interés como marcador de CMT. Estudios recientes en líneas celulares de cáncer colorrectal mostraron que 0,5% – 1% de células CD44+/CD24+ dieron origen a la mayor proporción de megacolonias formadoras de criptas y se diferenciaron a todas las estirpes celulares que se

encuentran en el colon⁷⁵. Además, las células CD44⁺ y CD24⁺ pueden auto-renovarse después de varias rondas de selección y continuar produciendo células CD44⁺ CD24⁺ en una forma más eficiente y participando en la formación de tumores en ratones NOD/SCID⁷⁶.

2.17. Otros marcadores de CMT

Hasta ahora, se ha identificado una gran variedad de marcadores de CMT (CD166, EpCAM, CD133, CD24, CD44 y CD26) pero estos marcadores presentan varias desventajas; por ejemplo, existe una gran variabilidad de expresión entre neoplasias que tienen la misma clasificación histopatológica (Tabla 1), o que también son expresados CMMs normales. Por lo tanto, estos marcadores tienen un muy escaso valor para aislar y clasificar a CMT.⁷⁷

Tabla 1. Frecuencia de células portadoras de marcadores de superficie empleados para la identificar CMT en tumores sólidos¹

Tipo de cáncer	CD133 ⁺	CD44 ⁺	CD24 ⁺	CD26 ⁺
Glioblastoma	50% (1/2)	43.7% (16/37) ⁷⁸	80% (95/118) ⁷⁹	NR
Mama	46% (47/102) ⁸⁰	51.2% (237/463)	84.6% (170/201) ⁸¹ 88.7% (411/463)	NR
Colorrectal	27% (135/501) ⁸²	75% (6/8) ⁶⁸ 4% (21/523)	85.7 (126/147) ⁸³	100% ⁸⁴ (10/10)
Pancreático	60% (48/80) ⁸⁵	42.5% (34/80) ⁸⁶	NR ²	NR
Vejiga	78% (39/50) ⁸⁷	NR	61.5% (83/135) ⁸⁸	NR

¹Los superíndices indican el número de referencia en la lista correspondiente; NR no reportado

2.18. Características biológicas de las CMT

Las principales propiedades de las CMT son las siguientes: a) autorrenovación ilimitada, b) capacidad para diferenciarse en las diversas poblaciones de células que conforman un tumor y c) control homeostático.

La auto-renovación se refiere a la capacidad de las CMT de formar nuevas CMT con un potencial idéntico e intacto para proliferar y diferenciarse; manteniendo, así, un porcentaje de CMT de reserva. Los mecanismos de auto-renovación que permiten que las CMT persistan implican el concurso sistemático de vías proto-oncogénicas, como Wnt/β-catenina y Notch. Otro regulador de la auto-renovación en el contexto de la embriogénesis es la vía de señalización HH (*sonic hedgehog*), que juega un papel esencial en la organogénesis de vertebrados; aunque poco se sabe acerca de su función en las CMMs normales y en las CMT³¹. La señalización HH es esencial para el crecimiento, recurrencia y metástasis del CCR, así como para la expansión de las CMT. La evidencia de que la vía HH se activa de forma aberrante puede explicarse a través de la activación constante por parte de las células epiteliales transformadas (señal autocrina) ya que estas células son capaces de activar la vía HH, a través de la proteína efectora Gli-1. Lo cual es contrario a lo que sucede en el estroma del epitelio intestinal, donde no se expresa esta proteína³³.

Diferenciación es la capacidad de las CMT de generar una progenie heterogénea de células; las cuales, se diversifican progresivamente y se especializan de acuerdo con un proceso jerárquico. La diferenciación y la autorrenovación de las CMMs normales permiten una constante reposición de los tejidos con elementos maduros de corta duración⁸⁹. Un proceso similar ocurre en los tumores, sólo que las CMT producen células malignas diferenciadas o pobemente diferenciadas, en vez de células normales. Por ello, se ha sugerido que los tumores pobemente diferenciados pueden contener mayores proporciones de CMT que los tumores más diferenciados^{90, 30}.

El control homeostático se define como la capacidad de las CMT para modular y equilibrar la diferenciación y la auto-renovación de las células²⁵. En las criptas del epitelio intestinal residen al menos dos tipos de CMMs normales: LGR5⁺ y BMIL-1⁺; las cuales mantienen las capacidades regenerativas del epitelio intestinal en condiciones de homeostasis⁹¹. Las células LGR5⁺ son el fenotipo de células madre más activas y las más afectadas por el estrés ambiental. Por otro lado, las células BMIL-1⁺ se ven menos afectadas por el estrés ambiental. Las células BMIL-1 suelen reservarse para ocasiones especiales⁹². Por ejemplo, la homeostasis de los tejidos epiteliales se basa en un programa complejo de expresión, que es controlado, a su vez, por un microambiente específico denominado "nicho", así como por la transcripción intracelular y redes de señalización en el tejido que aún son pobremente conocidas.

2.19. Genes de las CMT involucrados en FR

Se ha identificado un gran número de genes involucrados en la respuesta al tratamiento. Estos genes están agrupados en las siguientes cinco categorías, de acuerdo con su función: 1) disminuir la entrada del fármaco a las células; 2) eliminar de las células los fármacos anti-neoplásicos, en su mayor parte expulsándolos mediante bombas de eflujo. Estas bombas pertenecen a la superfamilia de ATP-asas, llamada ABC (*ATP-binding cassettes*); 3) reparar el ADN; 4) modificar la actividad metabólica, 5) destoxicificar a las células, degradando las moléculas citotóxicas e 6) inactivar las vías de apoptosis, mediante la activación de mecanismos anti-apoptóticos de defensa⁹³. Nosotros identificamos 66 genes que están implicados en la resistencia a 5-fluorouracilo (5FU) y oxaliplatino, los cuales describimos en la sección de antecedentes directos.

2. 20. Mecanismos y genes de resistencia a fármacos

Un mecanismo directamente relacionado con la FR de las CMT es el siguiente: los agentes quimioterapéuticos inducen un daño oxidativo en las CMT; lo cual incrementa la producción intracelular de nicotinamida adenina dinucléotido fosfato (NADPH, un antioxidante); que, a su vez, el NADPH induce un aumento intracelular

de ATP⁹⁴. El aumento de ATP intracelular activa a las bombas de eflujo; las cuales expulsan de las células a los fármacos antineoplásicos. Además, el daño oxidativo activa a la subunidad alfa del factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1α). Esta subunidad, a su vez, induce la expresión de genes que promueven la supervivencia de las CMT; lo cual ocurre mediante la señalización de los genes anti-apoptóticos survivina, Bcl-XL (linfoma de célula B extra-largo) y MCL-1 (proteína que induce la diferenciación de células de leucemia mieloide). También se induce autofagia; en cuyo mecanismo intervienen los genes BNIP3 (que codifica para la proteínas de interacción con Bcl-2 [Bcl-2 es una familia formada por aproximadamente 25 proteínas que regulan procesos de permeabilización mitocondrial y constituyen un punto clave en la vía intrínseca de apoptosis celular]) y BNIP3L (proteína BCL2/adenovirus E1B que interactúa con la proteína tipo 3)^{95,96}. Además, la expresión de HIF-1α disminuye la señalización pro-apoptótica, mediante la inducción de la expresión de receptores señuelo 2 (DcR2), que compiten por factores de señalización pro-apoptóticos. Esta atenuación de la señalización pro-apoptótica permite que las células toleren una mayor concentración del agente quimioterapéutico antes de la inducción de vías de apoptosis.

Otro de los mecanismos de resistencia en las CMT a los fármacos es la activación preferencial de la señalización de pro-supervivencia. Esta señal se logra a través de la expresión de un receptor en la célula tumoral, proporcionándole a la célula una señal anti-fagocítica. Este mecanismo, por tanto, favorece la evasión del sistema inmunológico por las células malignas. Por ejemplo CD44 —el cual ya mencionamos como un marcador importante para tipificar a las CMT-CD44⁺— es capaz de activar al EGFR⁹⁷ y las proteína-quinasas activadas por mitógenos (MAP quinasas); así como otras vías de señalización celular que conducen a la resistencia de tratamientos antineoplásicos (cisplatino, metotrexato, andriamicina y anticuerpos monoclonales como anti-EGFR)⁹⁸. Otro ejemplo incluye la expresión de la proteína transmembrana CD47; la cual se une al receptor trombospondina; la cual activa a la alfa-proteína reguladora de señal (SIRPα). La interacción

CD47/SIRP α se ha propuesto como un mecanismo que proporciona a las células cancerosas una señal que inhibe la fagocitosis producida por los macrófagos y neutrófilos en algunos tumores hematopoyéticos (leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, linfoma no-Hodgkin) y en tumores sólidos; como mieloma múltiple, cáncer de vejiga⁹⁹.

2.21. Determinación *ex vivo* de FR de neoplasias

Se han publicado diferentes estrategias para conocer la sensibilidad de los tumores a medicamentos probados o en desarrollo, con el objetivo de pronosticar la respuesta clínica de los pacientes a un régimen quimioterapéutico dado, o como un instrumento para profundizar en el conocimiento de los mecanismos de FR de las células malignas. Uno de los enfoques más utilizadas para alguno de estos fines, es la determinación de quimio-sensibilidad de cultivos primarios de células tumorales o de líneas celulares a los agentes anti-neoplásicos, ya probados o en desarrollo, mediante ensayos de viabilidad celular¹⁰⁰. Existen varios bioensayos para evaluar la sensibilidad o resistencia de las células tumorales a los agentes anti-neoplásicos. Algunos de ellos el de azul alamar, el de azul tripán y el ATP-CRA (*adenosine triphosphate-based chemotherapy response assay*). El método que nosotros seleccionamos para realizar el presente estudio fue es el ATP-CRA. Este método se basa en la medición de los niveles intracelulares de ATP, mediante luminiscencia del par luciferina-luciferasa¹⁰¹. ATP-CRA es un método de medición de la viabilidad celular más sensible que otros bioensayos con usos similares. Además, ATP-CRA requiere sólo una mínima cantidad de células (2,000 a 20,000) por pozo; lo cual ofrece una enorme ventaja en bioensayos donde se utilizan biopsias humanas; las cuales usualmente son muy pequeñas¹⁰². El ATP-CRA ha mostrado una buena correlación entre la respuesta de susceptibilidad *ex vivo* de cultivos primarios y en pacientes con cáncer de ovario, pulmón¹⁰³, colon¹⁰⁴, recto, mama¹⁰⁵, tracto intestinal gástrico¹⁰⁶ y gliomas¹⁰⁷. En estos bioensayos, las células neoplásicas se exponen a los agentes quimioterapéuticos por 48 h. En ningún caso se habían caracterizado las células neoplásicas antes de someterlas al efecto de los agentes

quimioterápicos y tampoco se habían determinado si las células sobrevivientes a los agentes anti-neoplásicos eran transformadas o no. Nosotros hicimos ambas cosas en este trabajo.

2.22. Análisis de la expresión génica en células malignas

Los métodos para analizar diferencias en la expresión génica entre poblaciones celulares fármaco-resistentes y -sensibles incluyen microarreglos, la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) en tiempo real o cuantitativo (qPCR, por sus siglas en inglés (*quantitative PCR*) y secuenciación génica. Uno de los métodos más usados para evaluar el perfil de expresión diferencial entre las diferentes poblaciones de células que conforman un tumor y las CMT es el análisis de microarreglos. Sin embargo, recientemente, surgió en el mercado un nuevo sistema de análisis llamado Illumina RNA-Seq®. Illumina RNA-Seq permite identificar los genes expresados diferencialmente entre grupos de muestras biológicas similares, pero con características fenotípicas diferentes. En un trabajo publicado en 2013, Xu X et al.¹⁰⁸ compararon la plataforma de Illumina RNA-Seq y la de microarreglos de Affymetrix®, utilizando como objeto de estudio a la línea celular de cáncer de colon (HT-29). Xu et al. incubaron células de HT-29 en presencia de 5-aza-desoxi-citidina (un agente antineoplásico) y detectaron la supresión de la proteína secretada ácida y rica en cisteína (SPARC), utilizando el sistema RNA-Seq o retro-transcriptasa RT-PCR (qRT-PCR), pero no detectaron este importante cambio en la expresión génica de sus células utilizando microarreglos. SPARC tiene efectos antiinflamatorios y anti-angiogénicos y por ello puede evitar la propagación de los tumores o la formación de metástasis¹⁰⁸. El reporte de Xu et al. demostró que el sistema RNA-Seq es más sensible que el análisis de microarreglos para identificar genes expresados diferencialmente. Por otro lado, MiSeq es menos costoso, entrega resultados más rápido que la qPCR o los microarreglos y requiere una mínima manipulación de la muestra; lo cual disminuye el riesgo de obtener resultados dudosos. También es importante destacar, que no es necesario ser experto para interpretar resultados como ocurre en el caso de los microarreglos y se obtiene una mayor concordancia de los resultados obtenidos con cambios de expresión

entregados por Miseq y por qPCR que con los microarreglos. Por todas estas razones, y por la fortuna de contar con el equipo y el personal experto en el CIDICS, nosotros seleccionamos para realizar nuestro estudio al sistema Miseq de Ilumina.

2.23. Antecedentes directos

2.23.1. Quimiosensibilidad de ACCRs previamente evaluados. Evaluamos, mediante ATP-CRA, la sensibilidad o resistencia a 5FUOL de 40 cultivos primarios de ACCR¹⁰⁹. En dicho estudio, observamos que el 80% de los tejidos analizados era resistente a la combinación de 5FU, oxaliplatino y leucovorina (cada compuesto fue evaluado a concentraciones equivalentes a los niveles máximos que cada medicamento alcanza en plasma [5FUOL]).

En este trabajo se eligieron los genes GSTM1, GSTT1, GSTP1, BTG1, ANRDD4, HYAL-1, CDK14, IL-23R, BST-1, SCL4A4, DNER, SOD, BNIP3, MLH1, CLEC4E, HGD, PROM2, ALDH3B2, CYPC18, VEPH1, RNF-180, ERAP2, GABRR1, STK17A, RESP1, C7orf44 , ERCC1 ya que éstos forman parte de una firma (genes diferencialmente expresados) entre pacientes respondedores y no respondedores a 5FU¹⁰⁶. Por otro lado, los siguientes genes se seleccionaron para el presente estudio porque están implicados en la resistencia a oxaliplatino^{112,113}: dihidropirimidina deshidrogenasa (DPYD), la timidilato sintasa (TYMS), la ribonucleótido reductasa M1 (RRM1), la metil-tetrahidrofolato reductasa (MTHFR)¹⁰⁷, el gen rTSbeta (es un gen complementario a la timidilato sintasa que se conoce como miembro de la familia enolasa, (ENOSF1), (citidina 5'-trifosfato sintetasa 2) CTPS2, pirofosfatasa de nucleósido trifosfato (ITPA), nucleósido difosfato quinasa 6 (NME6), (ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa 5) ENTPD5, (mutL homólogo 1) MLH1, (poli-ADP-ribosa polimerasa 1) PARP1, (uridina-citidina quinasa 1) UCK1 están fuertemente ligados al metabolismo de resistencia del 5-fluoracilo (5-FU)¹⁰⁸. La uridina-citidina quinasa 1 (UCK1) se sobre-expresa en tejidos resistentes frente a tejidos xenoinjertados sensibles¹⁰⁹, queratina 18 (KRT18)¹¹⁰, piruvato quinasa de músculo 2 (PK-M2)¹¹¹ y el gen de reparación por escisión de grupo de complementación cruzada 1 (ERCC1).

3. Justificación

Los esquemas estandarizados para tratar el CCR en estadios III o IV incrementan la sobrevida de la mayoría de los pacientes hasta por 20 meses. Sin embargo, estos tratamientos, junto con el cáncer, deterioran significativamente la calidad de vida de los pacientes. Y lo ideal sería que los pacientes se curen y mientras tanto gocen de una buena calidad de vida. Con base en lo anterior, es necesario desarrollar nuevos y mejores tratamientos. Una estrategia que podría ayudar a avanzar en este sentido es analizar exhaustivamente la biología celular y molecular de las CMT de CCR para entender mejor los mecanismos de FR de estas células, así como identificar los elementos moleculares claves para usarlos como nuevos blancos terapéuticos. Además, la identificación de genes diferencialmente expresados por CMT podrían ser buenos marcadores de estas células, lo cual significaría un enorme avance en el estudio de la biología celular y molecular de las CMT de CCR. Por ello, nosotros nos enfocamos en aislar, expandir y caracterizar CMT y analizar, en estas células y en biopsias de tumores primarios de CCR, la expresión de 66 genes involucrados en resistencia a 5-FU y oxaliplatino y comparar estos resultados con las firmas de los exomas de muestras de colon sano, de colon o recto adyacentes a los tumores y de CMT y cultivos completos de la línea COLO 320DM, de cáncer colorrectal.

4. Hipótesis

La identificación del grupo de genes expresados diferencialmente por CMT de ACCR permitirá dilucidar el mecanismo de resistencia a 5FUOL de estas células.

5. Objetivo

5.1 Objetivo general

Identificar los genes diferencialmente expresados en CMT aisladas de biopsias de CCR resistentes a 5FUOL y dilucidar su función en el mecanismo de fármacoresistencia.

5.2 Objetivos específicos

1. Investigar si las CMT conservan su fenotipo de resistencia después de pasar por el proceso de aislamiento y expansión *in vitro*.
2. Identificar los genes diferencialmente expresados por las CMT, resistentes o sensibles a 5FUOL.
3. Dilucidar la función de los genes diferencialmente expresados en el mecanismo de resistencia a 5FUOL en los aislados de CMT.

6. Estrategia experimental

Los pacientes, sin tratamiento previo, fueron sometidos a cirugía para extirparles, a cada uno de ellos, el tumor primario y una muestra de colon o de recto adyacente al tumor. Además, obtuvimos del Departamento Forense del Hospital Universitario (UANL) 10 piezas de colon, sin signos patológicos (control), las cuales utilizamos como estándares de expresión génica. Por otro lado, incluimos en el estudio a la línea celular Colo 320DM como control y como fuente de CMT. Las piezas anatomo-patológicas fueron analizadas por el patólogo del Hospital Universitario “José Eleuterio González” de la UANL o por los Servicios de Patología de la UMAE 25 o del Hospital de Oncología, CMN Siglo XXI, IMSS, quienes clasificaron todos los tumores como ACCR. Inmediatamente después de llegar las piezas anatomo-patológicas al Departamento de Patología correspondiente a cada institución, nosotros recibimos una muestra fresca de cada tumor y de colon o recto adyacente a cada tumor. Todas estas muestras fueron procesadas inmediatamente en nuestro laboratorio. Obtuvimos los cultivos primarios de las muestras de ACCR, de colon y recto contiguas a los tumores, de colon y recto sanos y cultivos de Colo 320DM, estando al 80% de confluencia. Ensayamos cada muestra mediante ATP-CRA y clasificamos los tumores y el resto de las muestras como sensibles o resistentes. De cada una de las muestras previamente descritas obtuvimos una parte del tejido; el cual sumergimos en RNA-*later* por al menos 48 h, antes de realizar la extracción del RNA total. Posteriormente, el RNA extraído se guardó a -80°C hasta su uso. Además, con una parte de cada una de las muestras de tumores de colon o recto y tejido control obtuvimos cortes histológicos; los cuales analizamos mediante inmunofluorescencia, utilizando anticuerpos monoclonales anti-CD44 marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC, *fluorescein isothiocyanate*) y anti-CD24, marcados con ficoeritrina-cianina 7 (PECY7). Realizamos el análisis de las muestras de ACCRs por inmunofluorescencia para determinar el porcentaje de CMT presente en los cortes histológicos. A partir de cada uno de los tejidos que presentaron un alto porcentaje de CMT, células epiteliales y poca contaminación con tejido normal, aislamos y expandimos a las CMT, presentes en cada una de las

muestras. Este procedimiento se hizo, por separado, con cada muestra. Aislamos las CMT de las muestras de tumor después de haber disgregado los tejidos tumorales y mediante condiciones de cultivo de baja adherencia, usando DMEM-F12 suplementado con factores especiales para aislar y expandir a las CMT. Incubamos las células aisladas de los tumores o de Colo 320DM por 30 a 37°C, en atmósfera de CO₂ y dividimos los cultivos en dos partes. De una de esas partes obtuvimos el RNA total; el cual conservamos a -80°C hasta su uso. Fijamos el resto de las CMT con metanol/acetona (1:1 v/v) para caracterizarlas por inmunocitoquímica, utilizando anticuerpos monoclonales anti-CD44-PECY7 y anti-CD24-FITC. A partir de 250 ng de RNA, de cada muestra, obtuvimos cDNA; con el cual evaluamos la expresión génica de los 66 genes asociados con resistencia (Tabla 2), mediante el sistema MiSeq (RNAseq-Illumina). Analizamos los exomas de todas las muestras arriba mencionadas e identificamos los genes sobre-expresados en cultivos primarios de ACCRs, colon o recto adyacente a los tumores y aislados de CMT, sensibles o resistentes a 5FUOL y en un cultivo completo de Colo 320 DM o en un aislado de CMT y como controles, muestras de colon o recto sano. Identificamos los genes diferencialmente expresados en las muestras mencionadas, comparando la expresión de los 66 genes seleccionados en las muestras experimentales con la expresión de dichos genes en las muestras de colon o recto sanos. Aplicamos un análisis de varianza (ANOVA) para conocer la significancia ($p<0.05$) entre la expresión de los genes de interés en las muestras experimentales contra la expresión de esos mismos genes en las muestras utilizadas como controles. Analizamos la literatura respecto a la función normal y el papel que desempeñan en el CCR los genes diferencialmente expresados, identificados en este trabajo. Con toda esta información, propusimos el papel que juegan los genes diferencialmente expresados, que nosotros identificamos, en el mecanismo de resistencia al 5FUOL del ACCR de nuestros pacientes. La figura 5 (página 29) muestra esquemáticamente la estrategia experimental que acabamos de describir.

Tabla 2. Genes asociados con resistencia a 5FU u Oxa¹ y sus funciones

Genes	Función	Genes	Función
GSTM1/ GSTT1 GSTP1	Enzimas de desintoxicación	HGD CTPS2	Catabolismo de aminoácidos
BTG1/ANKRDD/AN KRDD4/HYAL1/CD K14/ IL-23R/BST1/ EGF/EGFR	Regula el crecimiento y la diferenciación celular	PROM2/ ALDH3B2 CYP2C18/ PSAP/VEPH1	Metabolismo lípidos
SCL4A4	Regulador del bicarbonato de sodio/(pH celular)	RNF- 180	Degradación de proteínas
DNER	Activa Notch-1	ERAP2	MHC Clase II
SOD/ VNN1	Rescate daño oxidativo	GABRR1	Inhibidor de receptor GABA
BNIP3	Anti-apoptosis	STK17A	Promueve apoptosis
MLH1	Mutado en CCR familiar	REPS1/ KRT-18	Renovación citoesqueleto
ABCB1/ABCG2	Bomba de transporte	DYPD/ TYMS	Metabolismo de los fármacos
CLEC4E	Adhesión celular, señalización cel-cel	C7orf44	Interactúa con COX
MMRN1	Adhesión componentes de la matriz extracelular	PKM2 / ENTPD5	Metabolismo ATP
ALDH3B2	Metabolismo xenobióticos	RRM1	Ciclo celular
Bcl-2	Regulador de apoptosis	TERT	Senescencia/ Inmortalidad
HIF1	Regulador de la homeostasis	APC/ KRAS/ MYC/ BRAF/ MTHFR/ AKT/	Diferenciación, crecimiento celular y apoptosis
TP53	Supresor de tumor	MEG3	Inhibe proliferación
ITPA	Previene la incorporación de daño en RNA y DNA	NFKB	Inflamación y crecimiento celular
CINP/ PARP1/ UCK1/ERCC1	Daño al DNA	WNT1/NOTCH1/ TGFB1	Diferenciación celular y apoptosis

¹5FU, 5-fluorouracilo, Oxa, oxaliplatino.

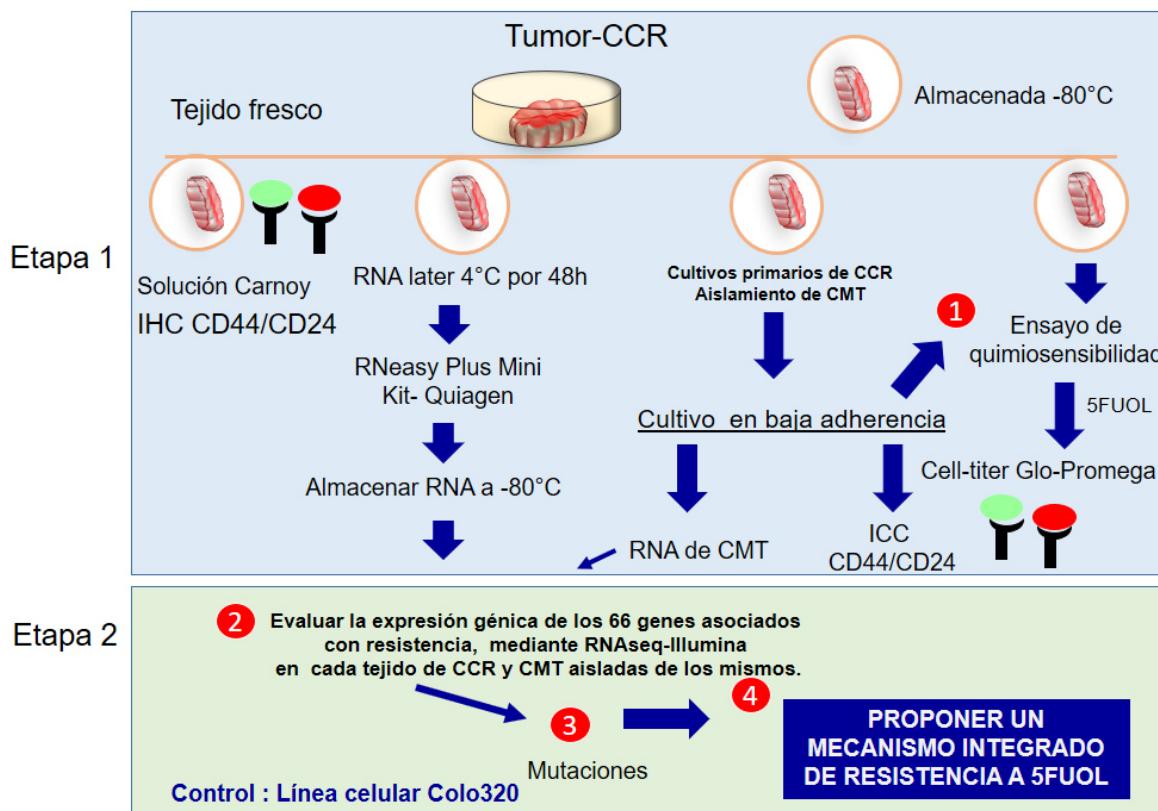


Figura 5. Estrategia experimental. Se resumen los pasos más importantes de cada una de las Etapas. La Etapa 1 consistió en trabajar con el tejido tumoral fresco y dividirlo en cuatro partes. Un fragmento del tejido se utilizó para evaluar la sensibilidad al 5FUOL, otra parte para aislar a las CMT, otra parte del tejido para realizar la extracción del RNA y, mediante inmunohistoquímica, determinar el porcentaje de células CD44⁺/CD24⁺ que tenía cada tejido analizado. La Etapa 2 corresponde al análisis del exoma de los genes asociados con resistencia a 5FUOL, utilizando los RNAs obtenidos de tejidos tumorales, controles y aislados de CMT.

7. Material y métodos

Con el propósito de simplificar la lectura de esta sección, agregamos al final del texto como anexos el grado de pureza de los reactivos, el nombre de los fabricantes de los reactivos y del material consumible, el nombre de la ciudad, del estado y del país donde están ubicadas las oficinas principales de los fabricantes (anexo III). Presentamos los datos descriptivos de los equipos utilizados en este estudio, en el anexo II y la descripción detallada de las soluciones en el anexo se describen en el anexo I.

7.1. Población de estudio

Todos los pacientes participantes tenían diagnóstico de ACCR, sin tratamiento quimioterapéutico previo; a los cuales se les extirpó quirúrgicamente el tumor intestinal primario. El rango de edad del grupo participante era de 50-69 años, con una media de 60 años y una mediana de 60 años. La Tabla 3, describe las principales características clínicas del grupo de estudio.

7.2. Material biológico

En estos análisis incluimos muestras de cada uno de los tumores, de colon y recto sano o adyacente a los tumores y de Colo 320DM. Las muestras incluidas en este trabajo fueron colectadas de enero de 2014 a diciembre de 2016. Las biopsias de ACCR y de colon o recto, obtenidas de una región adyacente a cada uno de los tumores extirpados. Todos los especímenes nos fueron entregados para su análisis inmediatamente después de haber sido extirpados quirúrgicamente y clasificados por el patólogo del Hospital Universitario, de la UMAE 25 o del Centro Médico Nacional (CMN), Siglo XXI del IMSS, según la adscripción de los pacientes. Las muestras proporcionadas por el CMN siglo XXI fueron colocadas en recipientes de poliuretano conteniendo nieve carbónica, inmediatamente después de su obtención y enviadas, vía aérea, al Aeropuerto Internacional Mariano Escobedo, de Ciudad de Monterrey, y de ahí inmediatamente transportadas al Laboratorio de Terapia Celular, en el Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, de la Facultad de Medicina, UANL. Las muestras de colon sano, de origen cadavérico, nos fueron

proporcionadas por el Departamento de Medicina Forense del Hospital Universitario “José Eleuterio González” de la UANL. Todas las muestras fueron recolectadas en menos de 6 h, posteriores al acto quirúrgico o de la muerte de los sujetos (según el tipo de muestra). Analizamos 51 biopsias de ACCR, 10 muestras de colon o recto sanos, 6 aislados de CMT, y la línea Colo 320DM de ACCR.

Tabla 3. Características clínicas de la población de estudio

Población de estudio (n=51)	Número de pacientes (%)
Sexo	
Femenino	17 (33%)
Masculino	34 (67%)
Rango de edad (años)	
30-49	8 (16%)
50-59	7 (33%)
60-69	15 (29%)
≤70	11 (22%)
Adscripción de los pacientes	
IMSS, (CMN) ² Siglo XXI	3 (6%)
IMSS, UMAE 25 ³	38 (69%)
UANL ⁴ , HU ⁵	10 (25%)
Localización del tumor	
Recto	18 (35%)
Colon	33 (65%)
Diagnóstico histopatológico	
ACN	51 (100%)
ACN moderadamente diferenciado	46 (66%)
ACN poco diferenciado	4 (8%)
Clasificación (TNM) y número de casos ⁶	
T2N0M0 ⁷	01
T2N1M0	06
T3N0M0	31
T3N1M0	04
T4N0M0	09

¹IMSS, Instituto Mexicano del Seguro Social, ²CMN, Centro Médico Nacional (Hospital de Oncología, Servicio de Colon y Recto); ³Unidad de Altas Especialidades No. 25; ⁴UANL, Universidad Autónoma de Nuevo León; ⁵HU, Hospital Universitario “José Eleuterio González”; ACN, adenocarcinoma, ⁶TNM, son las siglas del tamaño del tumor (T), la (N) describe la diseminación del cáncer hasta los ganglios linfáticos y la (M) describe las metástasis. El *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) y la *International Union Against Cancer* (IUAC) propusieron la clasificación TNM. La columna de la izquierda se refiere al número de casos correspondientes a la clasificación de la columna de la derecha; ⁷T1-T4 se refiere al tamaño y extensión del tumor principal: mientras más grande sea el número después de la T, mayor será el tumor o tanto más haya crecido en los tejidos cercanos. Las T pueden dividirse todavía más para proveer más detalle; por ejemplo, T3a o T3b. N1-N3 se refiere al número y ubicación de los ganglios linfáticos que tienen cáncer. Mientras más grande sea el número después de la N, mayor será el número de ganglios linfáticos que tienen cáncer. M0 significa que el cáncer aún no se ha diseminado a otras partes del cuerpo y M1 indica que ya hay metástasis.

7.3. Colo 320DM

Adquirimos la línea celular Colo 320DM (ATCC, CCL-220TM) de la *American Type Culture Collection* (ATCC). Ésta proviene de una mujer de 55 años de edad con adenocarcinoma de colon. Esta línea es negativa para antígeno carcinoembrionario (CEA, *carcinoembryonic antigen*), antígeno-p específico de colon (CSAp *colon-specific antigen P*) y antígeno de colon 3 (CA3, *colon antigen 3*). Las células son débilmente positivas para queratinas y vimentina. La línea contiene células adherentes y no adherentes a la placa de cultivo, redondas y de forma irregular.

7.4. Caracterización de muestras de colon o recto sano y de ACCRs

El patólogo del Hospital Universitario de la UANL certificó que las muestras de colon o recto que utilizamos como controles no-cancerosos no presentaban ningún signo patológico. Por otro lado, cada uno de los patólogos adscritos a las tres instituciones arriba comentadas, analizó las muestras que les correspondían, y en conjunto, el 100% de los tumores intestinales analizados en el presente estudio fueron clasificados como adenocarcinomas colorrectales (ACCR).

7.4.1. Inmunofluorescencia con doble marcaje

Se tomó una pieza de cada ACCR, teniendo un volumen menor a 1 mm³ de cada una de las muestras de ACCR y se fijaron por 48 h en solución de Carnoy (etanol: cloroformo: ácido acético; 6:3:1 v/v) a temperatura ambiente (TA). Las muestras se procesaron en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la UANL, siguiendo una técnica histológica convencional y se incluyeron en bloques de parafina. De estas muestras se obtuvieron 2 cortes histológicos, cada una con 4 µm de espesor. Uno de esos cortes se tiñó con hematoxilina y eosina (HyE) y el otro se usó para el análisis mediante inmunofluorescencia de los marcadores de CMT. Los cortes se montaron en un portaobjetos tratado con poli-L-lisina (dos cortes por laminilla) inmediatamente antes de procesarlos. Con los cortes teñidos con HyE se verificó que los tejidos de interés estaban orientados adecuadamente, para observar el epitelio, donde se localizan las CMT o las CMMs normales, según el tipo de muestra.

Los cortes histológicos marcados mediante inmunofluorescencia se utilizaron para determinar el porcentaje de CMT que se encontraban en cada uno de los ACCR. Para ello, en jarras coplin de vidrio, desparafinamos e hidratamos los cortes a TA, sumergiéndolas sucesivamente en las soluciones y por los tiempos indicados en la Tabla 4.

Tabla 4. Procedimiento para desparafinar los cortes histológicos de interés	
Solución	Tiempo de inmersión (min)
Xilol (2 cambios)	5 (cada cambio)
Etanol absoluto	3
Etanol 95%	3
Etanol 70%	3
Agua destilada	3
TBST ¹	3

¹TBST, Tris-buffer saline (TBS) + Tween 20

Colocamos las laminillas en la solución de recuperación de antígenos (TRS precalentada 20 min a 60-100°C) durante 20 a 100°C y 20 min a TA. Técnicamente se llama “recuperación de antígenos” al procedimiento para romper las uniones cruzadas entre proteínas. Por lo tanto, este procedimiento ayuda a exponer los antígenos del tejido embebido en parafina, mejorando, así, la intensidad de tinción de los anticuerpos. Después de tratar a cada una de las preparaciones con TRS, lavamos las preparaciones, sumergiéndolas en Tris-buffer salino/Tween 20 (TBST) por 5 min a TA; bloqueamos los antígenos irrelevantes para reducir al mínimo el ruido de fondo; para lo cual colocamos una gota de la solución de bloqueo de proteínas del kit llamdo *Mouse and Rabbit specific HRP/DAB ABC Detección IHC* sobre cada preparación; la cual incubamos a 37°C por 30 min en una cámara húmeda. Secamos las laminillas con una gasa y a cada una le añadimos, sucesivamente, 50 µL de CD44-FITC y 50µL de CD24 PECY7, diluidos 1:100 (v/v) —con respecto a la concentración original en los productos suministrados por el fabricante— con diluyente para anticuerpos Dako. Incubamos las preparaciones

toda la noche a 4°C; lavamos las laminillas con TBST (4 veces por 5 min) y agregamos, a cada tejido, 7 µl de 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) mezclado con medio de montaje, y sellamos los bordes de los cubreobjetos con esmalte para uñas. Incluimos como controles negativos del experimento cortes de cerebro y de colon, sin haberlos marcado con anticuerpos primarios. En cada preparación, contamos todas las células, en general, y en particular, las células CD44⁺, CD24⁺ y CD44^{+/}CD24⁺, presentes en 5 campos, observándolas con un microscopio de epifluorescencia. Interpretamos los resultados de la siguiente manera: las células CD24⁺ (PECY7) se observaron de color rojo intenso, las CD44⁺ (FITC) se veían de color verde y las células CD44^{+/}CD24⁺ mostraron un color amarillo. El núcleo de las células se observó de color azul intenso por la tinción con DAPI. Determinamos el porcentaje de células CD44⁺, CD24⁺ y CD44^{+/}CD24⁺ con respecto al total de las células observadas (cuyos núcleos estaban marcados con DAPI).

7.5. Cultivos primarios de ACCR

Aislamos las CMT de las muestras de interés siguiendo el método de Cammareri et al.⁶⁵. Brevemente: lavamos un fragmento (~3.0 mm³) de cada muestra de ACCR 3 veces con PBS estéril y lo descontaminamos, sumergiéndolo en etanol al 70% por 1 min (agitando suavemente por inversión). Desechamos el líquido y lavamos la muestra 3 veces con PBS adicionado con anfotericina B (2.5 µg/mL) y gentamicina (100 µg/mL). Cortamos la muestra con tijeras estériles, en trozos de aproximadamente 0.5-1.0 mm³, mezclamos el tejido picado con 1 volumen de una solución de colagenasa tipo I (2.0 µg/mL) y 2 volúmenes de medio para CMT -RPMI adicionado con 1% de seroalbúmina bovina (SAB), 100 µg de gentamicina/mL y 2.5 µg de anfotericina B/mL. Incubamos las preparaciones a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% por 2 h, centrifugamos las preparaciones a 730 × g por 10 min. Lavamos el paquete celular 3 veces con PBS adicionado con gentamicina y anfotericina B (a las concentraciones arriba señaladas) y resuspendimos el botón celular en 1mL de medio para aislar CMT. Contamos las células obtenidas y determinamos el porcentaje de viabilidad celular con azul tripán, utilizando un hemocitómetro. Clasificamos las biopsias de ACCR y las muestras de colon sanos, colon y recto

adyacentes a los tumores y Colo 320DM como sensibles, cuando determinamos un porcentaje de muerte celular (PMC) $>20 \pm 5$ y resistentes, cuando el PMC $<30 \pm 5$.

7.6. Determinación de viabilidad celular

Determinamos el porcentaje de viabilidad celular, en todas las preparaciones de interés, mediante ATP-CRA, utilizando el Kit Cell-titer-Glo, PROMEGA. Este kit fue diseñado para cuantificar el ATP intracelular, mediante la medición de la quimioluminiscencia dependiente de la concentración de ATP intracelular, emitida por el par luciferina/luciferasa, incluido en el kit. Realizamos dichos análisis siguiendo las instrucciones del fabricante del kit. Brevemente: En una microplaca para cultivo de 96 pozos, blanca, se mezclaron 100 μL de cada una de las suspensiones celulares de interés con 100 μL de la solución de lisis — que está incluida en el kit CellTiter-Glo®—. Incubamos la microplaca a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% por 10 min y leímos la luminiscencia de cada pozo, utilizando el programa informático Gen5 para luminiscencia, versión 2.06 del equipo Cyvation 3. Convertimos los resultados de luminiscencia en porcentaje de muerte celular, mediante la siguiente ecuación:

$$\text{PMC} = \left[1 - \frac{\text{LCT}}{\text{PLCST}} \right] \times 100$$

Donde:

PMC es porcentaje de muerte celular.

LCT es luminiscencia del sobrenadante de las células tratadas, equivalente a la concentración de ATP intracelular.

PLCST es promedio de luminiscencia del sobrenadante de los controles no tratados, equivalente al 100% de la concentración intracelular de ATP promedio de luminiscencia de células sin tratamiento.

7.7. Aislamiento y expansión de las CMT

Inmediatamente después de disgregar los tumores de ACCR, ajustamos cada preparación a una densidad de 1×10^6 células/mL, utilizando como diluyente medio para aislar y expandir CMT. Hicimos lo mismo con los cultivos de Colo 320DM. De cada una de estas suspensiones sembramos 5×10^4 células (50 μL de la suspensión) en placas de 96 pozos de baja adherencia. Incubamos las placas a 37°C en atmósfera de CO₂, agregando, cada tercer día, 50 μl de medio fresco para

CMT. Mantuvimos los cultivos celulares bajo dichas condiciones por 15 a 20 días, hasta que se observaron los esferoides típicos de CMT⁶⁵.

7.8. Determinación de resistencia a 5FUOL de las CMT

Analizamos la FR de todas las muestras de ACCR y de Colo 320DM que se mantuvieron viables por al menos 15 d, bajo las condiciones de aislamiento y expansión de CMT, explicadas en el párrafo anterior. Dividimos dichos cultivos en dos alícuotas. Una alícuota se mezcló con 5FUOL y la otra alícuota no se trató y se dejó como testigo. Incubamos todas estas preparaciones a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% por 48 h. En estas preparaciones determinamos el porcentaje de viabilidad celular, en cada uno de los pares de cultivo celular analizado — tratado con 5FUOL o testigo no tratados —. Clasificamos los cultivos tratados que analizamos con ATP-CRA como sensibles o resistentes a 5FUOL. El criterio que seguimos para realizar esta clasificación fue el siguiente: clasificamos los cultivos celulares que alcanzaron densidades inferiores o iguales a su par no tratado como sensibles a 5FUOL y a los cultivos que alcanzaron densidades superiores a sus respectivos pares no tratados los consideramos como resistentes a 5FUOL.

7.9. Caracterización de las CMT

Después de 48 h de cultivo en presencia de 5FUOL y 3 d adicionales de cultivo en ausencia de 5FUOL realizamos la caracterización de las CMT. Para ello usamos anticuerpos monoclonales anti-CD44-PECY7 y anti-CD24-FITC. Además, purificamos las CMT mediante perlas magnéticas acopladas a anticuerpos monoclonales anti-CD44, siguiendo el protocolo de Miltenyi. Para ello determinamos la concentración de células viables, utilizando una cámara de Neubauer y azul de Tripán. Sedimentamos las células a 300 x g por 10 min y descartamos el medio de cultivo. Resuspendimos el botón celular en 80 µL de PBS, agitando la preparación suavemente, con una pipeta Pasteur. A cada preparación le agregamos 20 µL de la suspensión de perlas magnéticas acopladas al anticuerpo anti-CD44 y la incubamos a 4°C por 15 min. Eliminamos los anticuerpos unidos inespecíficamente a las células, lavándolas 2 veces con 3 mL de PBS estéril y se centrifugándolas a 300 x g

por 10 min en cada ocasión. Resuspendimos el botón celular en 500 μ L de PBS. Aislamos las CMT de la siguiente manera: colocamos una columna de separación de células en un soporte magnético. Debajo de la columna colocamos un tubo de ensayo de vidrio de 15 mL de capacidad para recolectar el líquido contenido el material no deseado. Lavamos la columna de separación con 3 mL de PBS estéril. Inmediatamente después, pasamos la suspensión celular a través de la columna; lavamos 3 veces la columna de separación con 3 mL de PBS; removimos el magneto y pasamos 5 mL del PBS a través de la columna, teniendo colocado en su sitio el tubo colector de material no deseado. En este paso aplicamos presión sobre el interior de la columna de separación, empujando el émbolo de la columna. Centrifugamos el líquido eluido de la columna a 5×10^3 g por 10 min, y resuspendimos las células sedimentadas en RNA-*later*. El tubo con las células y RNA-*later* se colocó a 4°C por 48 h y trajimos el RNA total de las células presentes en cada preparación, el cual almacenamos a -80°C, hasta su uso.

7.10. Obtención y análisis de RNA total

Suspendimos o sumergimos (según el caso) a todas las muestras de interés en RNA-*later* por 48 h a 4°C, para evitar que el RNA se degradara. Extrajimos el RNA utilizando el sistema *RNeasy Plus Mini Kit- Quiagen*, como describimos a continuación: en tubos Eppendorf de 1.5 mL de capacidad, colocamos, por separado, las muestras de colon sano o de colon y recto adyacentes a los tumores. Agregamos a cada tubo 700 μ L de buffer de lisis RLT® adicionado con 1% (v/v) de β-mercaptoetanol. Agitamos los tubos con un vórtex por 5.0 min y centrifugamos a $8,000 \times g$ por 5 min, a TA. Inmediatamente después, colocamos, en un tubo de 2 mL de capacidad, una columna® diseñada para eliminar contaminación con DNA genómico. Pasamos cada uno de los lisados, previamente preparados, a través de esta columna. Centrifugamos las muestras a $8,000 \times g$ por 15 s para eluir el líquido de la columna. Precipitamos el RNA contenido en el líquido eluido de la columna con 700 μ L de etanol al 70%. Inmediatamente después, lavamos 2 veces con 500 μ L del buffer RPE® la columna donde inmovilizamos el RNA y centrifugamos a $8,000 \times g$ por 1 min a TA. Eluimos de la columna el RNA con 15 μ L de agua libre de

nucleasas. Colectamos todo el líquido eluido en un tubo Eppendorf de 2 mL de capacidad y lo centrifugamos a $8.000 \times g$, por 1 min a TA. Inmediatamente después, cuantificamos el RNA, con un espectófotómetro NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific), utilizando 1- μL del RNA recién extraído. Almacenamos el resto del RNA a -80°C hasta su uso.

7.11. Calidad e integridad del RNA

Evaluamos la calidad del RNA total mediante un equipo llamado *RNA Bioanalyzer 6000 Nano Assay, Agilent 2100* (Agilent Technologies) y cuantificamos el RNA total mediante Ribogreen (R11490). Llevamos a cabo este procedimiento en cada una de las muestras, una semana antes de iniciar la preparación de la librería. A continuación, describimos cada uno de dichos procedimientos.

7.12 Cuantificación de RNA y de cDNA

Como paso inicial, hicimos una curva de calibración para cuantificar el RNA total en cada una de las muestras de interés. Construimos cada una de esas curvas midiendo la intensidad de fluorescencia (expresadas como unidades relativas de fluorescencia (URF) de nueve concentraciones, por triplicado, de una muestra estándar de RNA, incluida en el kit comercial para cuantificar RNA llamado *Quant-iT® PicoGreen® dsDNA Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific). La tabla 5 muestra la composición de las nueve concentraciones utilizadas en cada una de las curvas estándar que construimos. El reactivo Picogreen® (PG) se diluyó 200X, mezclando 15 μL de PG con 2,985- μL de TE (buffer Tris-EDTA, pH 7). De esta solución de trabajo (1X) preparamos la serie de soluciones indicadas en la Tabla 5 para elaborar la curva estándar.

Tabla 5. Soluciones utilizadas en la curva estándar de Picogreen®

Tubos	TE1X (μL)	Diluciones de RNA	PG ² (1X) (μL)	Concentración final (ng/μL)
1	0.0	330	330	1.00
2	165	165	330	0.500
3	247.5	82.5	330	0.25
4	297	330	330	0.10
5	313.5	16.5	330	0.05
6	321.75	8.25	330	0.025
7	326.7	3.30	330	0.010
8	329.67	0.33	330	0.001
9	330	0.0	330	0.00

¹TE, Tris-buffer con EDTA; ²PG, Picogreen®

Una vez que preparamos todas las diluciones, incubamos los tubos, en condiciones de oscuridad, a TA por 5 min y leímos la fluorescencia en cada tubo mediante un fluorómetro. Descargamos los resultados obtenidos en un archivo de Excel (Microsoft Company). Graficamos los promedios ± desviaciones estándar (DE) de las unidades relativas de fluorescencia (URF) propios de cada concentración de RNA. Con esa información, calculamos la ecuación correspondiente con ayuda de del paquete estadístico Excel (Microsoft). Con esta ecuación calculamos la concentración de RNA total en cada muestra de interés. Cuando una muestra de RNA rebasó los límites de detección del sistema empleado, la diluimos hasta llevarla a una concentración adecuada para que se ajustara dentro de los límites de la curva estándar. Con los resultados obtenidos hicimos los ajustes necesarios, para partir de la misma concentración de RNA en todas las muestras, al llevar a cabo el procedimiento de secuenciación.

7.13. Análisis de los exomas

Para este procedimiento utilizamos el sistema *Agilent RNA 6000 Nanokit-2100 Bioanalyzer System*, siguiendo las instrucciones del fabricante. Todos los productos

que utilizamos en el procedimiento que se describe a continuación fueron nombrados por el fabricante y estaban incluidos en el kit que forma parte del sistema Agilent RNA 6000 como se muestra en la Figura 6.



Figura 6. Reactivos, equipos y consumibles utilizados para Agilent RNA 6000 Nanokit-2100 Bioanalyzer System. A) Se muestran todos los reactivos utilizados para la elaboración del Chip. B) Se muestra una imagen representativa de cómo se cargaban las muestras en el RNA-chip. C) Se muestran los equipos utilizados en este sistema: el Bioanalyzer en color blanco, el vórtex utilizado en la preparación del Chip de color azul y la estación de cebado (*priming station*) que corresponde a la jeringa que se observa en la imagen.

Los nombres de cada producto se mencionan, en cursivas, como están descritos en las instrucciones del fabricante. Los pasos que se siguieron se describen a continuación.

7.13.1. Preparación *Gel-Dye Mix*

Antes de usarlos, sacamos los reactivos del refrigerador y los mantuvimos a TA por 30 min. Agitamos con vórtex al *Dye Mix*. Agregamos 1 μ L de este producto a 65 μ L al *gel*. Filtramos la mezcla *gel-Dye Mix* y la agitamos con un vórtex (Figura 6) por 10 min a TA.

7.13.2. Preparación del *Chip*

Colocamos el *RNA-chip* (Figura 6) en la estación cebadora (*priming station*). Adicionamos 9 µl del *mix gel-dye* en el pozo del RNA chip marcado como “G”. Instalamos el *RNA-chip* en la *priming station* (Figura 6) para que el *gel* se distribuyera uniformemente en el *RNA-chip* (Figura 7). Aplicamos vacío con la jeringa® en la *priming station*; el cual sostuvimos por 30 s. Liberamos paulatinamente la presión negativa, lo cual duró unos 5 s. Inmediatamente después, abrimos la *priming station* y, al pozo marcado como “G” le adicionamos 9 µl de *mix gel-dye*. Nos cercioramos de que ninguno de los pozos del RNA-chip tuviera burbujas. Para ello, observábamos el microchip contra la luz y cuando observamos burbujas, eliminamos éstas con una micropipeta. Además, verificamos que todos los pozos estuvieran llenos, aunque no se fueran a utilizar.



Figura 7. DNA chip o RNA chip. Se muestra como están distribuidos los pozos en el chip.

7.13.3. Marcaje de las muestras

En cada uno de los 12 pozos del *RNA-chip* colocamos 5 µl del marcador de peso molecular. Agregamos 1 µl del *RNA ladder* en el pozo marcado con un dibujo de una escalera. Calentamos las muestras a 70°C por 2 min (volumen por muestra 3 µL) para desnaturizar el RNA y las colocamos en hielo mientras las cargamos en el *Chip-RNA*. Cargamos cada uno de los pozos del *RNA-chip* 1 µl de la muestra de

RNA que había sido desnaturizada y agitamos el *RNA-chip* con vórtex por 1 min. Por otro lado, antes y después de usar el Bioanalyzer de Agilent lavamos los electrodos de este instrumento con un chip lleno con agua (aproximadamente 12 μ l por pozo). Después analizamos el RNA contenido en el *RNA-Chip*, utilizando el Bioanalyzer de Agilent. Analizamos la integridad de cada muestra de RNA con la ayuda del software llamado 2100 Expert Software; el cual nos proporcionó una escala de valores correspondiente al número de integridad del RNA (RIN). El valor mínimo para aceptar una muestra y continuar con su análisis fue ≥ 6.0 . Este valor permitió aceptar para su análisis muestras con RNA degradado para preparar librerías y secuenciarlas. Por otro lado, de acuerdo con el protocolo que seguimos, descartamos para su secuenciación las muestras de RNA con valores < 6.0 , como se muestra en la figura 8.

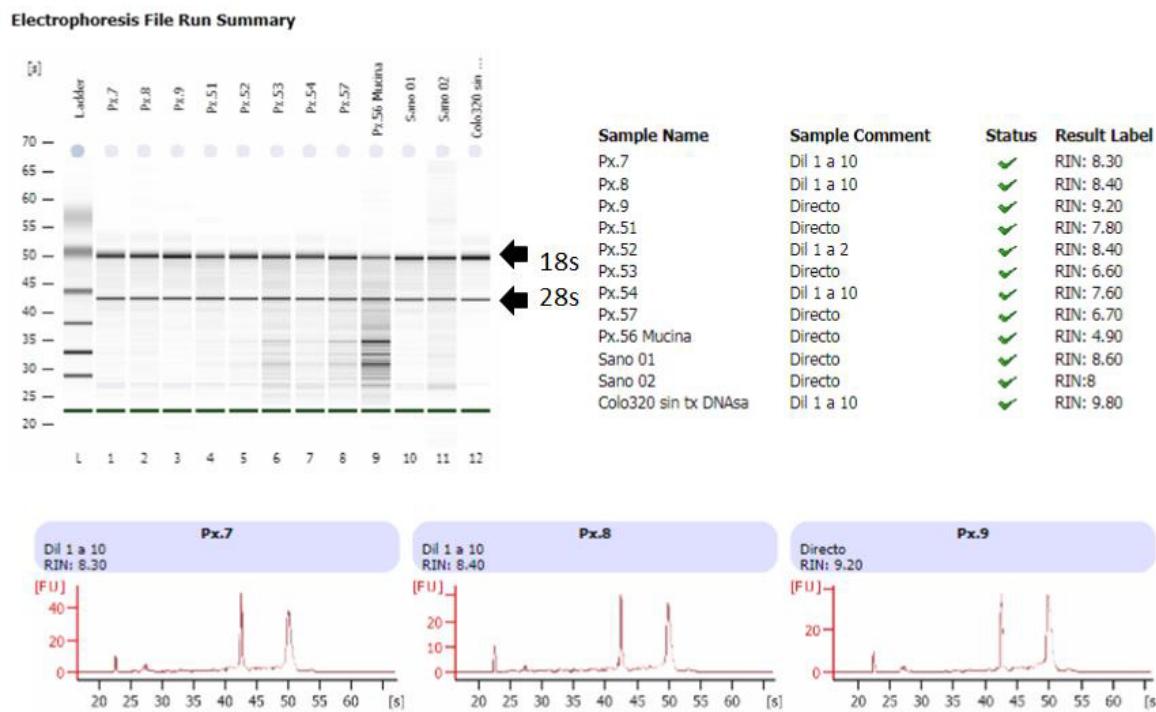


Figura 8. Integridad y calidad del RNA. Se observa el reporte del sistema RNA -chip Bioanalyzer de muestras representativas. Se observa como en todos los casos se obtienen valores de RIN > 6.0 además de observarse en el gel virtual las bandas de 28 y 18s.

7.13.4. Preparación de librerías de cDNA

Realizamos la construcción de las librerías de cDNA de los exomas de interés utilizando el sistema TruSeq®RNA Access Library Prep, de Illumina. En la tabla 6 resumimos las acciones que se llevaron a cabo para la preparación de la librería

Tabla 6. Secuencia de pasos durante la creación de la librería de cDNA de los transcriptomas de las CMT

Paso	Acción
1	Retrotranscripción (cDNA)
2	Hibridación de <i>primers</i> con los genes de interés
3	Ligación-extensión (genes de interés)
4	Ligación de los índices (etiquetado de muestras)
5	Primera amplificación mediante PCR
6	Purificación con perlas Ampure®
7	Lavados con etanol
8	Verificación librería mediante Bioanalyzer (tamaño promedio)
9	Cuantificación de librería y cálculos a nM ¹
10	Ajustar el pool a 10pM y secuenciar con 0.1% PhiX ²

¹nM (nanomolar); PhiX (DNA viral usado como control interno de la secuenciación que permite darles una mayor variabilidad a las corridas y con esto evitar que el equipo pudiera a leer de manera consecutiva la misma base en todas las secuencias

Enseguida describimos cada uno de los pasos mencionados en la Tabla 6, mediante el sistema *TruSeq®RNA Access Library Prep, de Illumina Inc*, convertimos el RNA total en una librería de moléculas que utilizamos como templado de una hebra de DNA de origen conocido, para realizar la secuenciación de los genes de interés. Esta librería sirvió para capturar las regiones codificantes del transcriptoma (*cluster*) de las muestras incluidas en este estudio, utilizando los reactivos suministrados por Illumina (*Illumina® TruSeq® RNA Access Library Prep*). En adelante, presentamos en cursivas los nombres de los componentes del kit. Descongelamos a TA los reactivos llamados *Protoscript II* y el *RCS1*, cada uno contenido en un tubo. Ambos tubos se agitaron con un vórtex por 5 s. La mezcla de

reacción se realizó de la siguiente manera en un tubo Eppendorff de 1.7 mL de capacidad.

Tabla 7. Reactivos para la RT-PCR

1x

Reactivos	Volumen (μ L)
RCS1	4.4
ProtoScript II Reverse Transcriptase	2.2
10 X ¹ DTT ² (0.1-M)	1.1
Volumen total p/muestra	5.5

¹10X es la concentración original del producto. 10X indica la concentración con respecto a la concentración de la solución de trabajo (1X); DTT² Dithiothreitol; es un antioxidante usado para estabilizar enzimas y otras proteínas que contienen grupos sulfhidrilo

A la mezcla que contenía el *Protoscript II* y el *RCS1* le agregamos 1.1 μ L de dithiothreitol (DTT) por muestra y la homogeneizamos, invirtiendo los tubos 10 veces. La Tabla 7 resume los componentes y proporciones de la mezcla de reacción, por muestra. Después, en un tubo nuevo, agregamos 7 μ L de la mezcla *RCS1/Protoscript/DTT* y 3 μ L (250 ng) de cada una de las muestras de RNA de interés. Agitamos las preparaciones con un vórtex por 20 s. Sometimos cada una de estas mezclas al proceso de síntesis de cDNA, utilizando un termociclador de punto final, en el cual corrimos el programa *cDNASYN2*, bajo las condiciones mostradas en la Tabla 8.

Tabla 8. Temperaturas y tiempos empleados para realizar la RT-PCR

Temperatura (°C)	Tiempo de duración del ciclo (min)
25.0	10
42.0	30
95.0	10

7.13.5. Diseño de los *primers* (oligonucleótidos)

Diseñamos los *primers* para amplificar, en regiones específicas de los 66 genes de interés (Tabla 2, página, 26), usando la plataforma de Illumina *Basespace*, dicha plataforma permite seleccionar cualquier región del gen para evaluar el nivel de expresión. En nuestro caso tratamos de elegir en la mayoría de los genes regiones que ya habían sido validadas previamente mediante qPCR por otros investigadores (debido a que la plataforma lo recomienda). El archivo que diseñamos para este procedimiento fue verificado por expertos de Illumina en este tema, para que corroboraran los sitios elegidos. A nuestro proyecto se le asignó el número de identificación (ID) 40581.

La Tabla 9 muestra la secuencia de los *primers* y la localización de cada gen analizado. Todas las regiones de los genes de interés que seleccionamos para amplificar se localizaron en sus respectivas regiones codificantes.

Tabla 9. Diseño de los *primers* para el análisis de expresión

Genes	Región ¹	Primer 5' ²	Primer 3' ²
VEPH1	chr3	CTTGAGCAAATTAAGATAATTAGCTCA	AACATGACCAGGCAGTAGTTGAAATC
ERCC1	chr19	GCTGGGCCAGAGCACCTGTGCCCTGTT	ACAACTGCACCCAGACTACATCCAT
SLC4A4	chr4	GATGGGCAGGAGATGGAGTGGAAAGGAAA	AGAAAAAGTGGAACAGGGTGGGAAA
HYAL1	chr3	TTCTATGACACGACAAACCACTTCTGC	TGGAGCACAGCCTGGGGAGAGT
VNN1	chr6	AGTAAACTGGATCCCCGTAAATAATCG	CCAGTACAAGAAAGACTCAGCTGCCT
ANKRD44	chr2	TGCTCATCCATAAAACTGAAGATGTGA	ACCCCTCTTCATGTGGCCGCATTTCT
PROM2	chr2	CCTCTCGGTGGTGCAGCTAACCTTT	GTTGGTAAAGGCCCTACTGAATGAGCT
DNER	chr2	AGAAAGTTGTAGAAATGAAATGGATCAAG	GGGAATGCCAGTTCTAACAGCTC
BTG1	chr12	TCCTGCCGCCTCTGTCGAAAATAA	TCTAAAGAAAGAAAGACAAAGTAGTCGTC
CTPS2	ChrX	TCGATGCTGGCACTTTTACCTT	GTCTAAATGATGGTGGAGAAGTTGAT

ITPA	chr20	TCTGGAGAACGTTAAAGCCTGAAGGTC	GCCGGGTTCGAGGACAAGTCAGCCTAT
ENTPD5	chr14	GGTGCTGTTAGGTAGGACTTGTATCCA	AAAGGAACCAAGGAGAAAATTCAA
MLH1	chr3	ATCTGAGGAGTCGACCCCTCTCAG	CCAAACTCCTGGAAGTGGACTGT
PARP1	chr1	TGGGTGTGAATGACACCTCTACT	TATTGCTCAGGTAATCTGAAGTATCTGC
UCK1	chr9	CCTGATAGGGGTGAGCGGCCGACT	TGTGTGAGAAGATCATGGAGTTGCTG
DPYD	chr1	TAAATCATTCACTACAAGTATTGCAAACA	CTGCTAAGATGATATTTCTGACAACCCAC
TYMS	chr18	TATTTACCTGAATCACATCGAGCCACTG	CCAGACCTTCCCAAAGCTCAGGATT
IL23R	chr1	TGGAATTATGTGCTTCAAACAGGTTGA	GGAAACAGTCTTCTGCTTCCAGA
RNF180	chr5	GTTTTATGGAGTATCTTGAGAATCAAGTG	ATGATTCAAGTGTGCTCAAATATTTGTC
C7orf44	chr7	ATTTCAAGAGAGTTGTGCTATGATGTGG	GCAGGAAGCAGGCGGTCAATGCCTCT
GABRR1	chr6	ATTCAGCATGAGGCCTGGCTT	TGTGGATGTGCAGGTGGAGAGTTT
CYP2C18	chr10	TTCCAGTGGCTAAAAAGTTAACAAAGG	ATGGAAAGAGATGGAAGGAGATCCG
ALDH3B2	chr11	GACGTGCTGGCCCAGGACCTGCATAA	TCTGAGCTCATCCTTGCCAGAA
HGD	chr3	ACACATAGAGGAGAGAGAAAATGGCTG	ACATTTCTGGATTTGGGAATGAGTGTTC
CLEC4E	chr12	ATTCACTAAATCATCTGAAACACAATGC	GAGAGGATGCTCTCTTCCCAAATGT
ERAP2	chr5	TTATAAAAGCACATACAGAACTCTGGTGG	TGAGCCAACCCAGGCACGCATG
MTHFR	chr1	CGAGCGTTCTGAGTCACCCGGGACT	CCCAGCCATGGTGAACGAAGCCA
GSTP1	chr11	CAGGGAGGCAAGACCTTCATTGT	TACAAACCTGCTGGACTTGCTGCTGAT
GSTT1	chr22	TGAAGGACGGGGACTTCACCTTGA	CTACCTGACGCGCAAATATAAGGTC
GSTM1	chr1	CAGCTGGCATGATCTGCTACAAT	CAAAGTACTTGGAGGAACCTCCCTGAA
MMRN1	chr4	TACCAAAATCAAATTCGAAACAACTAG	TGTACATACCAGGTTATCTCCACAGTG
CINP	chr14	AGGAACATGCAGGCCACCTGGAT	CCAAAATACAGGTGAAATGGAAAAGCTG
BRAF	chr7	GGCCTCTCGGCTGCGGACCCCTGCCATT	TGGAATATCAAACAAATGATTAAGTTGACA

ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA DE CMT RESISTENTES A 5-FLUOROURACILO, OXALIPLATINO Y LEUCOVORINA

KRAS	chr12	AGCGGCTCCCAGGTGCGGGAGAGA	GAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCT
BNIP3	chr10	TCTCTCATTGCTGCCATCGGATT	GATCTATATTGGAAGGCCTGACAACC
PSAP	chr10	CTTCCTCCTGCCAGCCTCTG	TCCTTGGACTGAAAGAACGCACCAG
APC	chr5	CTGGACAGATTGATTATTAGAGCGTC	GCTTAACCTAGATAGCAGTAATTCCCTGG
ABCG2	chr4	AATGCAACAGGAAACAATCCTGTAAC	TGTACTGGCGAAGAACATTGGTAAAGC
ABCB1	chr7	TGAAGCCACGTCAGCTCTGGATACAGAAA	CCCTGGACAAAGCCAGAGAAGG
NFKB1	chr4	ACTGCTGGACCCAAGGGACATGGT	AACCTGGGTATACTTCATGTGACAAAG
AKT1	chr14	GTGAGGCTCCCCTCAACAACTTCTCT	GTGCCAGCTGATGAAGACGGAG
TGFB1	chr19	TACATTGGAGCCTGGACACGCAGTA	ACAACCAGCATAACCCGGCGC
TERT	chr5	ACAAGCTGTTGCGGGGATTG	CTGCTCCTGCGTTGGTGGATGATT
BST1	chr4	GCGCACTGCTGAGTCCCGAGCA	CAAGAACTGCACAGCCATCTGGAA
STK17A	chr7	ACGGCTACAGCCTGTGCCCCGG	CAGTGGTGAGAAAATGTATAAGAAAGAT
NOTCH1	chr9	AGAACGGGGCTAACAAAGATATGCAG	AGGAGACACCCCTGTTCTGGC
MEG3	chr14	GGGCGCCCACGAGAGGGATCCCTCA	GGTCTCCTCAGGGATGACATCAT
TP53	chr17	ACCATCATCACACTGGAAGACTCCA	AATCTACTGGGACGGAACAGCTTG
PKM2	chr15	TGATGGGCTTATTCTCTCCAGGTGA	TGCCGACTTCCTGGTACGGAGGTGGAAAA
WNT1	chr12	GGCCCCACCTCTCGGCAAGATCGTCAA	CGAGAACGGCGTTATCTCGCTAT
RRM1	chr11	ATGCACTTCTACGGCTGGAAGCA	GGTTTGAAGACTGGGATGTATTATTAAG
KRT18	chr12	CTTCAAGATCATCGAGGACCTGAGG	AATGCCCGCATCGTTCTGCAGAT
EGF	chr4	GCTGGTGAGGATGCCAGGCAGCAGAT	AATGCAACCAACTTCATGGAGGCA
HIF1A	chr14	TATTTGCGTGTGAGGAAACTCTGGA	ATATTGAAGATGACATGAAAGCACAGATG
REPS1	chr6	CGCAGCTGCCAACGACGTGGTCCTA	ATGGAGCTTGTGGTGCACAAAGA
MYC	chr8	TGAGGAGACACCGCCCACCA	AGGAACAAGAACATGAGGAAGAAATCG

CDK14	chr7	AGCCCGGTTACTCTGCCCTCGT	TGTGTCACAAAGATGTCTACACGGAAC
EGFR	chr7	CTGCCC GGCGAGTCGGGCTCTGGAGGAAAA	CAAGCTCACGCAGTTGGGCACTTT
BCL2	chr18	TTGACAGAGGATCATGCTGTACT	CAGAGGAAGTAGACTGATATTAACAATACT
SOD1	chr21	ACCATTGCATCATTGCCGCACA	CAGATGACTTGGCAAAGGTGGAAAT
GUSB	chr7	GAGGAGCAGTGGTACCGGCGGC	GACATGCCAGTTCCCTCCAGCTTCAAT
GAPDH	chr12	TCAACGACCACTTGTCAAGCTCA	CAGCAACAGGGTGGTGGACCTCA
FBXL12	chr19	GCGACATGTCGACCTGACGCTCTACA	GCGACCTAAAGTCATGTGGCACCT
RNF7	chr3	ATGTCAAGCTGAAAACAAACAAGAGGAC	TCTGGGGAGAATGTAATCATTCCCTCC
SRP72	chr4	TGAATGTCATCAATACTCACACCAAAGTG	TTTGAAAAGGCATATTGCGAGTACAGG
NUBP1	chr16	GGCGACGGAATGGAGGAGGTGCCTCA	TGTCCAGGGGCCGACAGCGCCCA

¹Chr significa cromosoma; ² El rango de longitud esperado para amplicones de cDNA fue de 150 a 200 pb

7.13.6. Hibridación del cDNA con los primers

Antes de su uso, descongelamos a TA los reactivos OB1 (perlas paramagnéticas de estreptavidina) y TOP (pool de *primers* diseñados- Custom amplicon -Plataforma Illumina) y los agitamos con un vórtex por 5 s. Con estos reactivos preparamos la mezcla de reacción descrita en la Tabla 10, en un tubo de 1.7 mL de capacidad; el cual agitamos, invirtiéndolo una 10 veces.

Tabla 10. Condiciones de hibridación del cDNA con los *primers*

Reactivo	Volumen (μ L) ¹ 1X
TOP ¹	5.5
TE ² buffer	5.5
Volumen total por muestra ³	11

¹TOP, *primers* diseñados con la ayuda de la plataforma Illumina; ²TE, Tris-buffer con EDTA

De esta mezcla le agregamos 10 µl a cada uno de los tubos que contenían el cDNA y los agitamos con vórtex por 20 s e incubamos los tubos a TA por 1 min. Por otro lado, homogeneizamos el reactivo OB1 con un vórtex por 5 s y a cada tubo con la mezcla de reacción arriba descrita le agregamos 30 µL de este reactivo. Agitamos, con un vórtex, los tubos con la mezcla completa de reacción por 60 s y corrimos el protocolo de alineamiento, utilizando un termociclador, programado para aplicar un gradiente de temperatura en los tiempos mencionados en la Tabla 11.

Tabla 11. Temperatura y tiempos de hibridación de cDNA con los *primers*¹

Temperatura (°C)	Tiempo de incubación (min)
70	5
68	1
65	2.5
60	2.5
55	4
50	4
45	4
40	4
35	4
30	4

¹Inmediatamente después de la hibridación, realizamos la ligación y extensión del cDNA.

7.13.7. Ligación y extensión de cDNA

Colocamos las muestras, ya alineadas con los *primers*, en un tubo Eppendorf de 1.6 mL de capacidad, en el soporte magnético para tubos o placas de 96 pozos (Figura 9), y las dejamos a TA por 2 min o hasta que observamos que el líquido contenido en cada tubo estaba claro y se había formado un botón del complejo cDNA-perlas magnéticas en el fondo —el líquido claro nos indicó que el cDNA ya se había sedimentado completamente en el fondo del tubo—. Descartamos el sobrenadante de cada tubo y reservamos el botón de cDNA en el mismo tubo donde sedimentamos el DNA con las perlas magnéticas. Lavamos 3 veces el cDNA-*primers*, de la siguiente manera: retiramos los tubos con las muestras de cDNA alineado con los *primers* del soporte magnético y a cada tubo le agregamos las siguientes soluciones y volúmenes: en el primer lavado, 100 µL de buffer de lavado

AM1 y volvimos a colocar los tubos en el soporte magnético a TA, por unos 2 min o hasta que se aclaró el medio y se formó el botón de cDNA-*primers* y descaramos el sobrenadante.



Figura 9. Soporte magnético para placa MIDI 24 pozos marca Ambion. El soporte magnético está diseñado de una base de acrílico y en lugares correctamente posicionados, imanes fuertes que permiten realizar lavados con perlas magnéticas de las librerías, durante el protocolo de TruSeq Target RNA.

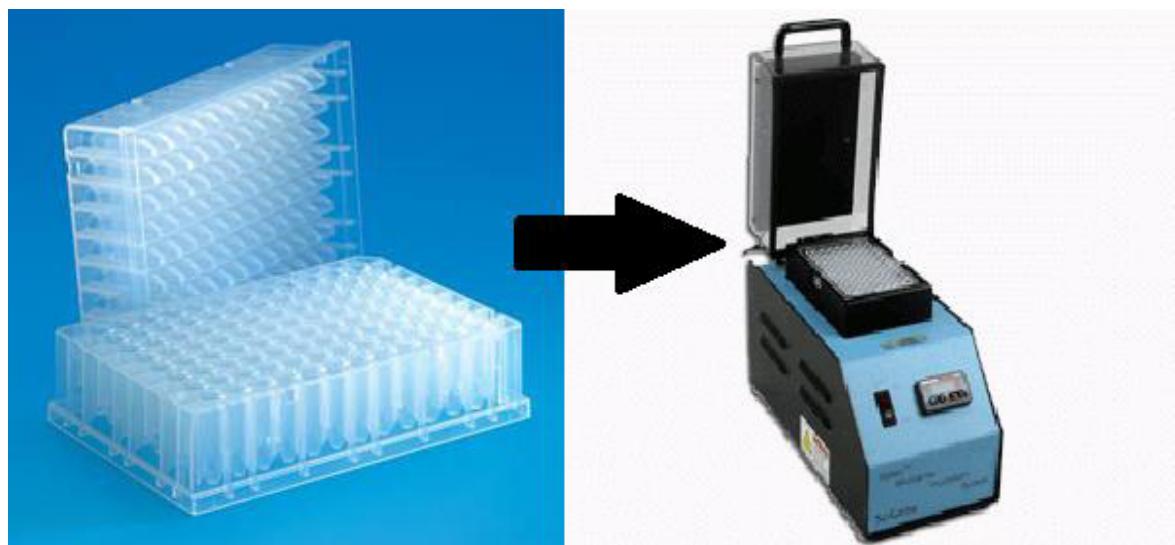


Figura 10. Placa MIDI y equipo Hybrex. La placa MIDI está diseñada para que el fondo de cada uno de los pozos alcance la temperatura óptima en el equipo Hybrex. Realizamos este procedimiento con el objetivo de que se lleve a cabo el proceso de ligación-extensión, este consiste en que después de que son alineados los *primers* a las secuencias complementarias de interés, se agregan los nucleótidos complementarios a la secuencia blanco mediante la extensión obteniendo de esta manera el tamaño de fragmento esperado para cada gen.

En el segundo y tercer lavados repetimos el proceso de re-suspensión (agitando con vórtex por 2 min) y sedimentación de *cDNA-primers* en el soporte magnético, agregando, sucesivamente, 75 µL de UB1 y 40 µL de ELM4. Todo el volumen de cada pozo se transfirió a una placa MIDI y esta placa se colocó en el equipo Hybrex precalentado a 37°C. Dejando los tubos durante 45 min para que se llevara a cabo el proceso de ligación-extensión. La Figura 10 muestra las placas y el instrumento que utilizamos.

7.13.8. Amplificación-PCR-Index

Sedimentamos las muestras después del proceso de ligación-extensión con el soporte magnético, como describimos arriba y descartamos el sobrenadante. Agregamos a cada tubo 50 µL de UB1 y los mantuvimos en el soporte magnético hasta terminar de preparar los índices. Para preparar los índices (secuencias complementarias que permiten distinguir cada una de las muestras) usamos tubos nuevos, a los cuales les agregamos 4 µL de los índices A50x o A70x (—A50x está diseñado para flanquear el lado izquierdo de los híbridos *cDNA-primers* y A70x es para flanquear el lado derecho de dichos híbridos). Realizamos este procedimiento, teniendo cuidado de no repetir los índices en la misma corrida; y así, asignar correctamente cada una de las secuencias obtenidas al momento de colectar y analizar los resultados. Después de preparar los índices, descartamos el sobrenadante UB1 y sepáramos el *cDNA-primer*-etiquetado de las perlas magnéticas. Para realizar este paso, colocamos los tubos en el soporte magnético y a cada tubo le agregamos 22.5 µL de NaOH 2 N (HP3 componente del kit) —al alcalinizar la preparación se rompieron los enlaces entre el cDNA y las perlas paramagnéticas, las cuales quedaron inmovilizadas por el magneto y el *cDNA-primer* se liberó. Los tubos con las preparaciones de *cDNA-primer*-etiquetado se agitaron con un vórtex y se incubaron por 5 min a TA. Mientras se incubaron las preparaciones, arriba mencionadas, preparamos la mezcla de amplificación del *cDNA-primer*-etiquetado como se describe en la tabla 12.

Tabla 12. Mezcla de amplificación de las muestras de cDNA-primer-etiquetado¹

Número de muestras	Reactivos	Reactivos
Muestra n=20	TDP1 (μ L) ²	PMM2 (μ L) ³
	11.5	575

¹Estas mezclas se usaron para cada una de las muestras de interés, por separado, y se agitaron con vórtex, inmediatamente antes de usarse. ²TDP1, TruSeq DNA Polimerasa 1; ³PMM2, PCR Master Mix 2.

Agregamos 22 μ l del mix (mezcla) de amplificación a los tubos que contenían los adaptadores (índices). Colocamos los tubos que contenían la muestra en el soporte magnético y transferimos el sobrenadante de cada pocillo (20 μ l) al tubo con el mix de amplificación y adaptadores. Agitamos la mezcla de amplificación, los adaptadores y la muestra de cDNA-*primers*-etiquetado, con un vórtex por 30 s y corrimos el programa para amplificación por RT-PCR-amplificación en un termociclador, como se describe en la Tabla 13.

Tabla 13. Condiciones de corrida de la RT-PCR

Temperatura (°C)	Tiempo
95 ¹	2 min
35 ciclos	
98	30 s
62	30 s
72	60 s
72	5 min

7.13.9. Limpieza-post PCR

Realizamos este procedimiento con el fin de eliminar cualquier unión inespecífica de dímeros de *primers* o entre los índices y *primers* al producto amplificado. Para ello, agregamos 85 μ L de perlas *Ampure*® a los tubos donde realizamos la amplificación por PCR punto final. Agitamos las preparaciones por 2 min con vórtex y las incubamos a TA por 15 min. Colocamos los tubos en el soporte magnético para precipitar el material genético y descartamos el sobrenadante. Lavamos las perlas-libreria 2 veces con 200 μ l de etanol al 80% (recién preparado) y secamos las perlas-libreria por 15 min a TA. Adicionamos a cada tubo 15 μ l de buffer de resuspensión (RSB) y lo agitamos con vórtex por 2 min. Colocamos los tubos en el soporte magnético y recuperamos 12.5- μ l de cada sobrenadante; el cual contenía la

librería de cDNA. De los 12.5 μ L recuperados, utilizamos 2 μ L para cuantificar, con *Picogreen*®, el cDNA en cada librería y 2 μ L para certificar que el tamaño de los fragmentos obtenidos correspondía a lo esperado. Transformamos la concentración de las muestras, originalmente expresada de ng/ μ L a concentración nM. Para ello utilizamos las siguientes ecuaciones:

$$M = \frac{(g)}{(PM)(L)} = \frac{(g)}{ng/mol} \left(1 \times 10^{-6} L\right) = \frac{(ng)}{(TPL) \left(660 \times 1 \times 10^{-9} \frac{ng}{mol}\right) \left(1 \times 10^{-6} L\right)}$$

Donde, M significa concentración molar, g, gramos, PM, peso molecular y TPL, tamaño promedio de la longitud de los fragmentos de cDNA

Ajustamos cada librería a la una concentración de 20 nM y mezclamos 3 μ L de cada una de éstas en un tubo, para obtener un *pool* de librerías; el cual tenía una concentración de cDNA final de 20 nM. Nos cercioramos de que el *pool* de librerías de cDNA tuviera la concentración estipulada, cuantificándola nuevamente mediante *Picogreen*®. Ajustamos la concentración del *pool* de librerías, diluyéndolo con agua libre de nucleasas, y ajustando sucesivamente la concentración de cDNA, primero a 10 nM y luego a 4 nM. Confirmamos la concentración de las librerías de cDNA mediante con el sistema *Picogreen*® y un *DNA-Chip*. Desnaturalizamos el cDNA contenido en 5 μ L de la solución 4 nM de librerías, agregándole 5 μ L de NaOH 0.2 N. Incubamos la preparación a TA por 5 min y la diluimos con 990 μ L de HT1, para ajustar la concentración de cDNA a 20 pM. A su vez, diluimos esta solución con 500 μ L de HT1 para ajustarla a 10 pM. A la preparación de librerías a 10 pM le agregamos 0.1% de DNA de PhiX —PhiX es un virus, cuyo DNA es utilizado como control interno de la secuenciación que permite darles una mayor variabilidad a las corridas y con esto evitar que el equipo pudiera leer de manera consecutiva la misma base y con esto detuviera la corrida—. Ajustamos la concentración original de PhiX (que es suministrada por el fabricante a una concentración de 20 pM), mezclando 10 μ L de PhiX con 990 μ L de HT1. A su vez, diluimos la solución 20 pM de cDNA a 10 pM, mezclando 500 μ L de la librería con 500 μ L de HT1. Después a la librería (*pool*) a 10 pM que estaba en 1ml se le retiraron 10 μ L y se agregaron 10

μ l de PhiX (10 pM) para estar al 0.1%. El 1ml se usó para llevar a cabo la secuenciación en el equipo *MiSeq de Illumina*.

7.13.10 Genes analizados

En este trabajo analizamos algunos de los genes involucrados en la resistencia al 5FU u oxaliplatino , como se describe en la Tabla 2 (66 genes).

7.13.11. Secuenciación de cDNA de los ACCRs y CMT

El protocolo de la corrida de secuenciación del cDNA que utilizamos consistió en 101 ciclos. Usamos para este propósito el sistema *MiSeq-ReagentKitV3-150* ciclos de Illumina. La secuenciación se llevó a cabo por síntesis. Este procedimiento consiste en colocar el cDNA en un portaobjetos (*flowcell*) con los cuatro dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) que están marcados con un fluoróforo con un color particular para cada uno (G, amarillo; C, azul; A, rojo y T, verde). Se excitaron los fluorocromos con un láser de diodos (530 y 660nm) y se capturó una imagen de emisión de luz por colores de cada uno de los nucleótidos incorporados, conforme se fue agregando cada uno de los nucleótidos a la cadena complementaria.

La Tabla 14 muestra el número de lecturas y porcentajes de lectura que pasaron el filtro que se obtuvieron en cada corrida. Fueron secuenciadas al menos 16 muestras (librerías) por corrida tal como recomienda el protocolo de TruSeq Target RNA.

Tabla 14. Resultados que entregó el Basespace después de cada corrida de secuenciación TruSeq Target RNA

Corrida	Lecturas obtenidas ¹	Lecturas que pasaron el filtro ² (%)
1 ^a	18,974,812	94.4%
2 ^a .	21,526,019	93.3%
3 ^a .	26,987,046	89.3%
4 ^{a-}	17,970,168	88.8%

¹Número total de lecturas obtenidas de todos los clusters secuenciados con el equipo MiSeq (Illumina).

²Lecturas que son mayores a Q30 (lecturas que poseen 1 error cada 1000 pb).

7.13.12. Identificación de los genes diferencialmente expresados

El número de conteos fue normalizado por muestra para hacer el análisis de los genes que estaban sobre-expresados (> número de lecturas) o sub-expresados (< número de lecturas). El número de lecturas por gen corresponde al número de veces que se tiene la secuencia blanco (secuencia de interés a secuenciar) para cada gen en cada muestra y este normalmente varía de acuerdo a las muestras analizadas. Es decir, el número de lecturas reportado por el sistema es un parámetro indirecto del número de copias de RNAm producido por las células de nuestras muestras, cada una bajo sus condiciones biológicas y de análisis particulares.

Para normalizar las muestras, primeramente, ordenamos en una hoja de Excel, por columna los genes analizados (66, Tabla 2,) y en cada fila correspondía a cada muestra secuenciada. Con esta base de datos se sacaron primeramente el número total de conteos por gen en todas las muestras y el número total de conteos entre todos los genes. Después de aplico la siguiente fórmula para normalizar:

$$NVDE = \frac{NTC}{NTL} (NTMS)$$

Donde:

NVDE = al número de veces que un gen estaba sobre-o sub-expresado en una muestra dada; *NTC*, Número total de conteos por gen; *NTL*, número total de lecturas por muestra, *NTMS*, número total de lecturas realizadas con todas las muestras secuenciadas.

La tabla 15, muestra las comparaciones que hicimos entre las muestras biológicas que fueron obtenidas.

Tabla 15. El análisis de expresión se realizó entre los diferentes tipos de muestras biológicas de la siguiente manera:

Tejido de colon sano	<i>Vs</i> ¹	ACCR-resistente a 5FUOL
		ACCR-sensible a 5FUOL
		CMT
ACCR-resistente a 5FUOL	<i>Vs</i>	ACCR-sensible a 5 FUOL
CMMn ³	<i>VS</i>	CMT-ACCR CMT-Colo 320

¹*Vs*, versus, ²ACCRs, adenocarcinomas colorrectales, ³CMMn, células madre mesenquimales normales humanas de tejido adiposo.

Elegimos aquellos genes que podrían constituir una firma de genes diferencialmente expresados. Para visualizar con mayor claridad las diferencias de expresión génica de interés, elaboramos mapas de calor con la ayuda del programa *GraphPad prism 6.0*. Para ello consideramos el número de lecturas normalizadas de cada una de las muestras de tejidos sensibles, resistentes y tejidos control (sano) y las graficamos. Además, se realizaron las pruebas estadísticas necesarias para filtrar el número de genes con el fin de encontrar solamente los implicados en la resistencia en ACCR.

7.13.13. Análisis de los resultados.

La expresión génica de las CMT contra los tejidos sanos, contra los tejidos adyacentes a los tumores y las CMT y cultivos completos de Colo 320DM se comparó usando las pruebas estadísticas Kruskal–Wallis (ANOVA-medias y rangos) mediante el paquete estadístico SPSS. Consideramos como diferencias significativas cuando el valor de $p<0.05$ * $p<0.01$ ** $p<0.001$ ***, según explicamos en los pasajes pertinentes de esta tesis.

7.13.14. Interpretación de los resultados

Una vez que identificamos las mutaciones y las diferencias en la expresión de los genes de interés en las CMT de ACCR resistentes a 5-FU y oxaliplatino, muestras de colon sano y tejido adyacente a los tumores y CMT y cultivos completos de Colo 320DM, analizamos en la literatura para conocer la función de cada gen diferencialmente expresado y con ello ofrecer una explicación sobre los aspectos más relevantes de la resistencia a 5FUOL de las CMT y de las otras muestras de interés: CMT-sensibles a FUOL y oxaliplatino, CMT de Colo 320 y tejidos adyacentes a los tumores.

8. Aspectos éticos

En este proyecto no participaron pacientes. Las muestras humanas que se analizaron en este estudio provenían de un bio-banco de tumores sólidos de ACCR que tenemos en el Laboratorio de Terapia Celular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina, UANL o del Departamento Forense del Hospital Universitario, UANL. Las muestras de ACCRs se colectaron en un estudio previo titulado “Detección individualizada *in vitro* de la sensibilidad de tumores colorrectales a la quimioterapia”. Además, la utilización de las muestras para estudios posteriores, como es el caso del presente protocolo, fue autorizada mediante la firma de una carta de consentimiento informado, por los pacientes que participaron en el proyecto anteriormente mencionado. Este estudio fue autorizado por la Comisión de Ética de la Facultad de Medicina, UANL, con el número de registro BI14-009.

9. Resultados

9.1. Quimiosensibilidad de tejidos obtenidos de colon sano.

En la tabla 16, pueden observarse los resultados de quimiosensibilidad determinados en las muestras de colon sano. Utilizamos los resultados de estos análisis como controles de quimiosensibilidad de los ACCRs y de Colo 320DM. Aunque estos resultados de quimiosensibilidad a 5FUOL fueron muy variables, éstos cayeron dentro del rango de sensibilidad seleccionado por nosotros (PMC > 25% ± 5%), considerando sus promedios y ± DE. Entre las muestras de colon obtenidas de los mismos tejidos ensayados con 5FUOL, hubo 5 resistentes a oxaliplatino/capecitabina (Folios Sano (S)04, S06, S02, S01 y S09), y 6 resistentes a capecitabina sola (S07, S08, S04, S06, S02 y S09).

Tabla 16. Quimiosensibilidad de colon sano¹

Folio	Colon sano ²		
	5FUOL ⁴	Oxaliplatino/capecitabina ⁵	Capecitabina ⁶
Sano (S)05	99.86 ± 00.01	91.89 ± 13.10	60.02 ± 00.97
S07	99.69 ± 00.05	64.40 ± 09.58	06.47 ± 04.35
S11	99.18 ± 00.09	56.00 ± 02.13	29.98 ± 09.19
S08	97.93 ± 01.95	01.89 ± 00.32	02.56 ± 00.92
S10	47.00 ± 23.98	30.71 ± 35.45	26.20 ± 06.20
S12	32.22 ± 03.11	21.42 ± 12.22	14.54 ± 09.25
S03	24.25 ± 03.33	25.64 ± 04.13	19.26 ± 12.78
S04	11.45 ± 10.57	09.19 ± 14.12	09.07 ± 06.75
S06	22.07 ± 21.92	01.85 ± 25.87	05.64 ± 15.79
S02	11.86 ± 19.18	00.70 ± 06.50	13.27 ± 02.94
S01	02.35 ± 10.28	11.24 ± 08.89	11.59 ± 16.33
S09	05.70 ± 14.59	04.90 ± 06.54	09.60 ± 10.45
Promedio	46.13±40.9	26.60±29.40	17.4±15.7

¹Realizamos los análisis de citotoxicidad de los fármacos anti-CCR mediante el método de ATP-CRA con 12 muestras de colon sanos. ²Las piezas quirúrgicas de colon sano nos fueron donadas por el Departamento Forense del Hospital Universitario, UANL. Estas piezas anatómicas eran productos de necropsias de personas recién fallecidas por suicidio (asfixia) o accidente vehicular, sin signos clínicos de infecciones o cáncer intestinal;³PMC, porcentaje de muerte de celular ⁴5FUOL es una mezcla de 5-fluorouracilo (10.0-μg/ml), oxaliplatino (2.9-μg/μL) y leucovorina (0.5-μg/μL); ⁵Fármacos utilizados en el régimen quimioterapéutico llamado XELOX (capecitabina (4mg/mL); oxaliplatino (2.9-μg/μL). ⁶Fármaco utilizado en el régimen llamado XELODA (capecitabina (4mg/ml). Todas las concentraciones utilizadas en estas determinaciones son las alcanzadas en plasma por cada fármaco. Los datos corresponden a los promedios ± DE del triplicado y se obtuvieron bajo las mismas condiciones experimentales utilizadas en los ensayos de quimiosensibilidad de los cultivos primarios de ACCRs

9.2 Quimiosensibilidad de ACCRs sensibles y resistentes

La tabla 17, muestra una gran variabilidad en la respuesta de los cultivos primarios de ACCR a 5FUOL, capecitabina/oxaliplatino y capecitabina. Sin embargo, se nota claramente que hubo dos grupos de ACCRs, de acuerdo con su quimiosensibilidad a los fármacos mencionados. Entre los 51 cultivos primarios de ACCR que analizamos, el 41% (n=21) resultó sensible y el 59% (n=30), resistente a 5FUOL. El 54% fue sensible a capecitabina/oxaliplatino y el 94% fue resistente a capecitabina sola.

Entre los cultivos resistentes a 5FUOL (ACCRr) hubo cuatro que presentaron un aparente PMC negativo (folios Px.72, Px.55, Px.56, Px.57 y Px.63). Puede notarse, además, que entre los ACCRs sensibles a 5FUOL; 10 de estos cultivos primarios resultaron resistentes a capecitabina (folios Px.58, Px.73, Px.74, Px.79, Px.81, Px.75, Px.76, Px.77, Px.53 y Px.71). Además, entre estos 10 cultivos, hubo cuatro con PMCs negativos (Px.58, Px.73, Px.79 y Px.77). Por otro lado, entre este mismo grupo hubo dos cultivos primarios resistentes a oxaliplatino/capecitabina (Px.58 y Px.71). Respecto al grupo clasificado como resistente a 5FUOL, encontramos también cultivos primarios con PMC aparentemente negativos. Estos cultivos tenían los siguientes folios: Px.72, Px.55, Px.56, Px.57, Px.63. Entre este mismo grupo de cultivos resistentes a 5FUOL, encontramos 9 cultivos incubados en presencia de capecitabina con PMC aparentemente negativos (Px.66, Px.52, Px.60, Px.72, Px.55, Px.57, Px.61, Px.63 y Px.67). En este mismo grupo, pero expuesto a oxaliplatino/capecitabina encontramos tres cultivos con PMC aparentemente negativos (folios Px.57, Px.61 y Px.63). Este fenómeno no se observó ni en Colo 320 ni en colon sano. Colo 320 resultó muy sensible a 5FUOL y a oxaliplatino/capecitabina; sin embargo, capecitabina sola no mostró actividad citotóxica contra Colo 320. Los rangos de PMC negativos en el grupo de cultivos de ACCR sensibles a 5FUOL fueron los siguientes: expuestos 5FUOL, no hubo PMC negativos, entre los cultivos primarios resistentes a capecitabina; -0.01 a -267.09 y entre los expuestos a oxaliplatino/capecitabina, -0.2.7 a -26.65. Entre el grupo de

ACCR resistentes, expuestos a capecitabina sola 0.3.83 a -267.09 y expuestos a oxaliplatino/capecitabina -15.99 a -56.89.

Tabla 17. Quimiosensibilidad de cultivos primarios de ACCR¹

PMC ² determinado en los cultivos sensibles a 5FUOL			
Folio ³	5FUOL ⁴	Capecitabina ⁵	Oxaliplatino/ capecitabina ⁶
Px.07	99.9±0.04	37.11±05.22	89.90±17.20
Px.54	99.6±0.06	44.90±25.10	72.60±05.90
Px.83	78.99±1.67	FR ⁷	74.39±03.75
Px.59	30.62±14.7	28.93±09.68	23.01±02.72
Px.64	17.5±13.22	53.20±10.10	67.33±04.91
Px.58	93.25±0.96	FR	02.70±06.70
Px.58	82.28±1.66	FR	66.60±03.57
Px.73	44.10±4.25	FR	41.20±06.74
Px.74	75.05±03.56	FR	66.83±02.83
Px.79	55.62±07.43	FR	54.06±08.49
Px.84	43.89±13.78	FR	62.11±13.77
Px.80	46.33±05.94	FR	62.3± 10.20
Px.81	34.02±06.86	FR	61.95±08.87
Px.75	56.00±08.22	FR	57.22±06.00
Px.76	41.10±10.40	FR	34.58±13.02
Px.77	34.01±9.08	FR	45.88±09.43
Px.53	21.70±18.64	63.4±02.74	77.16±12.59
Px.71	36.24±07.21		25.65±12.23
Promedio ± DE	55.01± 26.61	45.50± 13.46	54.74±22.08
PMC ⁶ determinado en cultivos resistentes			
Px.66	15.73±06.58	-126.74±09.08	20.00±04.78
Px.52	11.33±03.76	-83.7±22.60	29.19±12.90
Px.09	06.25±02.65	01.76±02.70	09.91±02.79
Px.60	10.05±00.86	-03.5±08.56	03.36±15.24
Px.70	05.28±9.67	15.76±07.94	00.53±09.35
Px.51	07.47±09.44	05.03±01.05	07.08±05.05
Px.50	04.10±02.33	00.40±04.06	01.27±06.09
Px.08	03.05±18.19	00.52±02.70	0.50±09.189
Px.68	04.64±06.58	09.1±05.48	11.28±09.27
Px.72	-35.92±44.83	-08.55±08.29	16.95±08.88
Px.55	-13.23±10.11	-24.25±31.07	07.88±09.18
Px.56	-16.83±21.04	07.41±00.50	20.24±07.88
Px.57	-101.82±10.34	-96.02.±10.22	-56.89±08.48
Px.61	10.79±28.23	-35.89±16.24	-15.99±10.25
Px.63	-103.84±30.48	-267.09±25.70	-50.04±50.20
Px.67	00.61±13.43	-03.85±13.60	06.23±11.66
Px.69	00.16±05.79	08.42±07.25	05.09±06.94
Px.78	00.13±08.99	11.58±05.72	05.22±16.51
Px.83	FS ⁸	05.12±07.45	FS
Px.58	FS	-07.69±9.32	02.70±06.70
Px.73	FS	-01.30±5.69	FS
Px.74	FS	01.85±10.52	FS
Px.79	FS	-87.09±173.65	FS
Px.84	FS	17.57±07.21	FS
Px.80	FS	15.44±08.30	FS
Px.81	FS	05.5±04.21	FS

Px.75	FS	5.56±23.50	FS
Px.76	FS	2.87±05.72	FS
Px.77	FS	-7.89±33.60	FS
Px.53	FS	4.01±00.20	FS
Px.71	FS	5.05±05.94	FS
Px.59	FS		23.01±02.72
Promedio ± DE	-10.66±35.65	-14.72±59.97	1.44±21.71
COLO 320DM	92.70±00.22	05.8±02.96	94.93±0.61

¹Todos los análisis de citotoxicidad se realizaron utilizando el método ATP-CRA con 35 muestras. Promedios ± DE del triplicado. ²PMC, porcentaje de muerte celular. ³Folio, número otorgado a la muestra de ACCR donada por cada paciente (Px), registrada en nuestra base de datos. ⁴Mezcla de 5-fluorouracilo (5FU [10.0-μg/mL]), oxaliplatino (2.9-μg/μL) y leucovorina (0.5-μg/μL), utilizada en el régimen quimioterapéutico llamado FOLFOX-6.

⁵Capecitabina (4mg/mL) y oxaliplatino (2.9 μg/μL), mezcla de fármacos utilizada en el régimen quimioterapéutico llamado XELOX. ⁶Capecitabina (4mg/mL) fármaco utilizado en el régimen quimioterapéutico llamado XELODA. Todas las concentraciones utilizadas en estas determinaciones son las máximas alcanzadas en plasma por cada fármaco ^{110,111,112}. ⁷FR, fármaco-resistente, ⁸FS, fármaco-sensible.

Un análisis de varianza de los datos arriba comentados mostró que la quimiosensibilidad de los cultivos primarios de ACCR resistentes a 5FUOL, capecitabina/oxaliplatino y capecitabina fue estadísticamente diferente a la quimiosensibilidad de los cultivos primarios del conjunto de muestras de colon sano (Tabla 16) ($p <0.005$, contra las 3 combinaciones de fármacos). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas entre los cultivos de ACCR sensibles 5FUOL o colon sano ($p= 0.38$), pero sí entre los cultivos tratados con oxaliplatino/capecitabina o con capecitabina ($p>0.01$, en ambos casos).

9.3. Quimiosensibilidad de colon y recto adyacentes a los tumores

En la tabla 18 pueden observarse los promedios ± DE de los PMC de todos los cultivos primarios de colon y recto adyacentes a los tumores. En forma similar a lo que ocurrió con los cultivos primarios de los ACCRs, en la Tabla 18 se nota claramente que hubo dos grupos de muestras de intestino, de acuerdo con su quimiosensibilidad a las tres combinaciones de fármacos ensayadas. Además, en estas muestras puede observarse que hubo 5 cultivos primarios de colon o recto sano, tratados con 5FUOL (folios, Px.53, Px.57, Px.66, Px.68 y Px.72); ocho cultivos tratados con capecitabina (folios Px.53, Px.57, Px.60, Px.66, Px.68, Px.72 y Px.79) y 5 con oxaliplatino/capecitabina (Px.57, Px.60, Px.66, Px.68 y Px.77) que presentaron un aparente PMC negativo (folios Px.57, Px.61 y Px.63).

Tabla 18. Quimisensibilidad de colon y recto adyacentes a los tumores¹

Colon y recto adyacentes a los ACCRs ²			
Folio	5FUOL ³	Capecitabina ⁴	Oxaliplatino/capecitabina
Px.51	14.94±12.64	00.00±12.68	00.00±10.45
Px.52	04.76±14.69	12.48±22.77	01.91±04.32
Px.53	-41.10±23.04	-163.8±37.16	00.50±07.08
Px.54	99.80±00.05	18.67±32.33	83.42±04.00
Px.57	-209.6 ±20.47	-149.13±51.63	-82.68±05.71
Px.58	45.21±05.33	57.48±07.95	00.00±16.04
Px.59	11.91±18.94	19.27±10.05	00.00±10.45
Px.60	09.12±26.65	-16.23±14.82	-13.72±7.34
Px.61	41.80±26.98	34.48±08.47	03.46±26.11
Px.63	45.25±04.64	26.47±12.07	01.80±11.89
Px.64	91.85±00.51	57.01±04.49	96.60±00.36
Px.65	47.66±02.48	26.01±04.77	69.37±04.71
Px.66	-63.75±13.54	-126.74±09.08	-25.59±18.21
Px.68	-19.48±06.16	-04.41±16.41	-15.82±18.54
Px.71	36.24±07.21	00.03±08.91	25.65±12.23
Px.72	-12.52±03.33	-04.3±32.17	10.03±21.63
Px.73	32.29±05.81	18.0± 08.50	39.92±09.39
Px.74	44.10±04.26	01.85±10.52	41.21±06.74
Px.77	95.20± 00.57	-69.17±142.03	-15.22± 22.03
Px.78	05.13± 33.49	02.85±07.25	18.70±10.09
Px.79	49.12± 07.15	-06.25±05.24	48.07±03.05
Px.80	19.38± 05.13	29.71±06.29	20.11±04.98
Px.81	57.79± 08.29	14.99±08.40	66.83±05.80
Px.83	51.89±23.64	9.85±23.98	40.00±23.63
Px.84	79.83±01.32	00.00±0 2.20	81.64±03.89

¹ Ensayamos la quimiosensibilidad de muestras de colon o recto adyacentes a los tumores mediante ATP-CRA. ²Las piezas quirúrgicas de colon o recto fueron extirpadas junto con los tumores intestinales y a una distancia aproximada de 15 cm (recto) y 60 cm (colon) de las neoplasias. Las muestras que analizamos tenían un peso aproximado de 100 mg. ³5FUOL es una mezcla de 5-fluorouracilo (10.0-μg/ml), oxaliplatino (2.9-μg/μl) y leucovorina (0.5-μg/μl); ⁴capecitabina (4mg/mL). ³ oxaliplatino (2.9-μg/μL) y capecitabina (4mg/mL). Todas las concentraciones utilizadas en estas determinaciones son las alcanzadas en plasma por cada fármaco ^{110,111,112}.

La figura 11, muestra, por parejas, resultados representativos (25 parejas) de la respuesta del tejido intestinal extirpado junto con los ACCRs, alejado unos 60 cm del colon y unos 15 cm del recto. En esta gráfica puede observarse que el 56% de las muestras de colon o recto eran sensibles y el 44% eran resistentes a 5FUOL. La mayoría de las parejas intestino/ACCRs mostraron una sensibilidad o resistencia a 5FUOL similar (comparada la resistencia o sensibilidad de cada uno de los ACCRs contra la sensibilidad o resistencia a 5FUOL del segmento de intestino que lo acompañaba $p>0.50$). Una vez más, encontramos PMC aparentemente negativos

en la pareja ACCR/intestino, sólo en el ACCR o sólo en el intestino. Un análisis de varianza (ANOVA) no mostró, diferencias significativas ($p=0.82$) entre las sensibilidad o resistencia a 5FUOL de las muestras de intestino adyacente a los ACCRs y los propios ACCR sensibles o resistentes a 5FUOL.

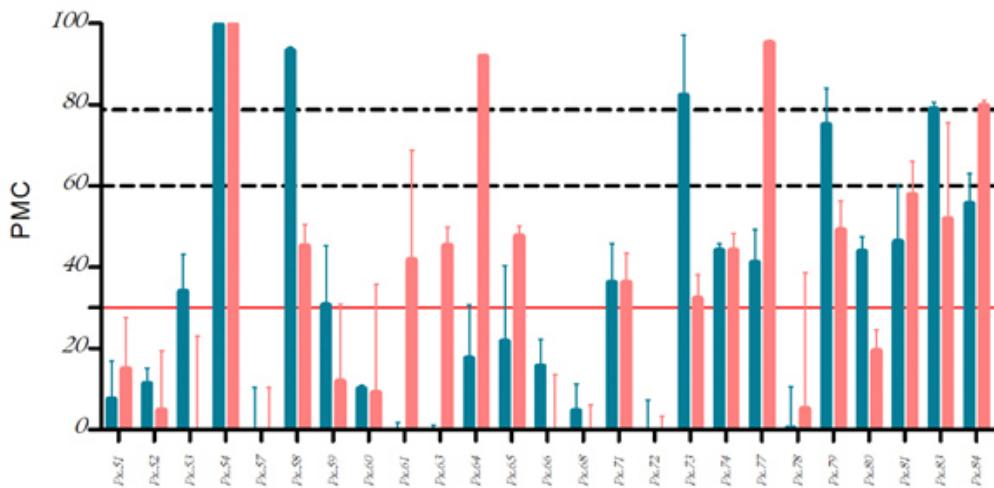


Figura 11. Sensibilidad a la mezcla de medicamentos que se usan en el régimen quimioterapéutico FOLFOX-6 en ACCRs y colon y recto sanos adyacentes a las neoplasias. Mediante el bioensayo llamado ATP-CRA, analizamos la quimiosensibilidad a 5FUOL (mezcla de 5-fluorouracilo [10 μ g/mL], oxaliplatino [2.9 μ g/mL] y leucovorina [0.5 μ g/mL]. Las concentraciones de los medicamentos que componen a 5FUOL corresponden a los niveles máximos alcanzados en plasma por cada uno de dichos medicamentos. Las barras azules indican el promedio \pm DE de tres determinaciones (por triplicado) realizadas con cada uno de los cultivos primarios de ACCR. Las barras rojas indican el promedio \pm DE de tres determinaciones (por triplicado) realizadas con cada uno de los cultivos de colon o recto adyacente a los tumores. Los letreros en la abscisa de la gráfica corresponden a los números de folio que otorgamos a cada uno de los pacientes que donaron las muestras de tejido adyacente al tumor de ACCR y los números en la ordenada indican el porcentaje de muerte celular (PMC). La línea roja indica el punto de corte de sensibilidad y resistencia a 5FUOL; y las líneas punteadas que señalan el 60% indica el valor promedio de la línea Colo320 a XELOX y el 80 % de muerte celular indica el valor promedio a 5FUOL.

9.4. Porcentaje de células madre de tumor CD44⁺/CD24⁺ en los ACCRs

La figura 12, muestra imágenes típicas de células CD44⁺ y CD24⁺ en cortes de ACCR, sensibles y resistentes a 5FUOL. En esta imagen puede observarse la positividad de estas células a los marcadores de CMT más utilizados actualmente (arriba referidos). También puede observarse que el corte histológico de ACCR resistente a 5 FUOL contiene más células CD44⁺ y CD24⁺. En la figura 13, puede observarse la gran variabilidad en el porcentaje de CMT contenido en los cortes

analizados. En los cortes de ACCRs sensibles a 5FUOL —que mostraron un rango de PMC entre el 20-30%— la proporción de células CD44⁺ fue $4.80 \pm 2.84\%$ y la de CD24⁺ fue $3.85 \pm 1.48\%$. El promedio ± DE CD44⁺/CD24⁺ (CMT) fue de 2.70 ± 2.075

En cambio, el porcentaje ± DE de células CD44⁺ en los cortes de tumores resistentes (PMC entre 0-20%) a 5FUOL fue 11.75 ± 13.12 y de CD24⁺ 9.86 ± 9.18 respectivamente. El promedio del porcentaje de células CD44⁺/CD24⁺ no fue significativamente mayor en los cortes de tumores resistentes (3.024 ± 2.32) que en los cortes de tumores sensibles (2.70 ± 2.075) a 5FUOL ($p=0.22$). Sin embargo, cuando se compararon las medias de los valores de CD44⁺ y CD24⁺ de tejidos sensibles o resistentes con la prueba de t student, sí se encontraron diferencias significativas ($p<0.05$) entre estos dos grupos.

La figura 13, muestra el análisis de los resultados entre ACCRs sensibles o resistentes a 5FUOL analizando como parámetro el porcentaje de células CD44⁺ y CD24⁺. Se observa una elevada DE en estos análisis, sin embargo, estas diferencias fueron estadísticamente significativas, entre los cortes sensibles y resistentes a 5FUOL. En adelante, consideramos como CMT a las células CD44+/CD24+

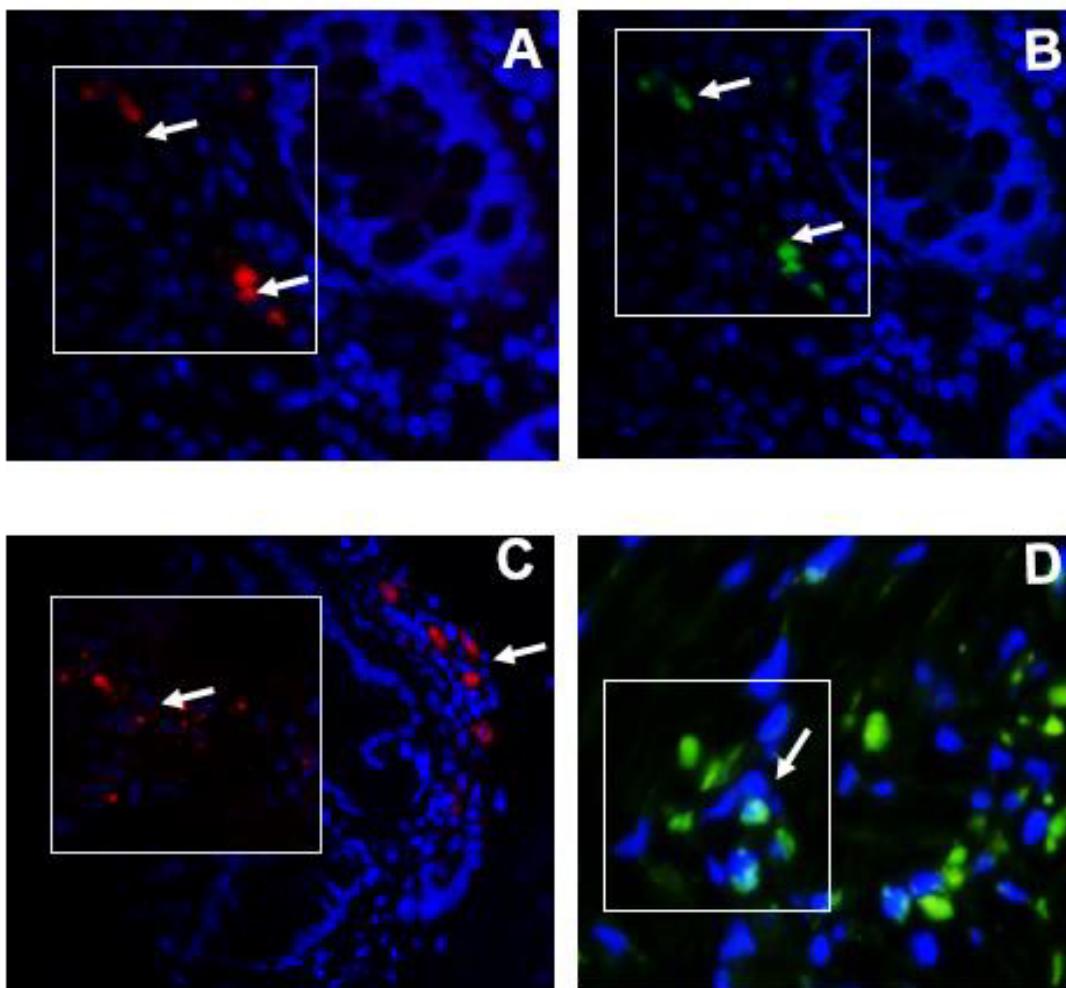


Figura 12. Tinción de ACCRs con anticuerpos monoclonales anti-CD44 y anti-CD24. La figura muestra imágenes representativas de cortes histológicos de adenocarcinomas colorrectales (ACCR) sensibles (recuadros A y B) y resistentes a 5FUOL (recuadros C y D). Los cortes se marcaron, mediante inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales de ratón anti-CD44 acoplado a PECY7 o anti-CD24 acoplados a FITC. Las laminillas se observaron con un microscopio de epifluorescencia. Las imágenes fueron tomadas a una amplificación de 40X. Los recuadros blancos, dentro de cada una de las imágenes enmarcan a células positivas a los marcadores fluorescentes. Se observan claramente los núcleos de todas las células teñidas con DAPI (de color azul), las células CD44⁺ (con señal de color rojo) y CD24⁺ (con señal de color verde). Las células positivas a los marcadores se indican con flechas. Obsérvese que los cortes de ACCR resistentes a 5FUOL contienen, a simple vista, mayor cantidad de CMT (positivas a CD44⁺ y CD24⁺).

9.5. Aislamiento de CMT de ACCR y Colo 320DM

De 51 cultivos de ACCRs obtuvimos 6 aislados de CMT (11.8 % de éxito) y de un cultivo de Colo 3020 DM obtuvimos un aislado de CMT (100 % de éxito). Los

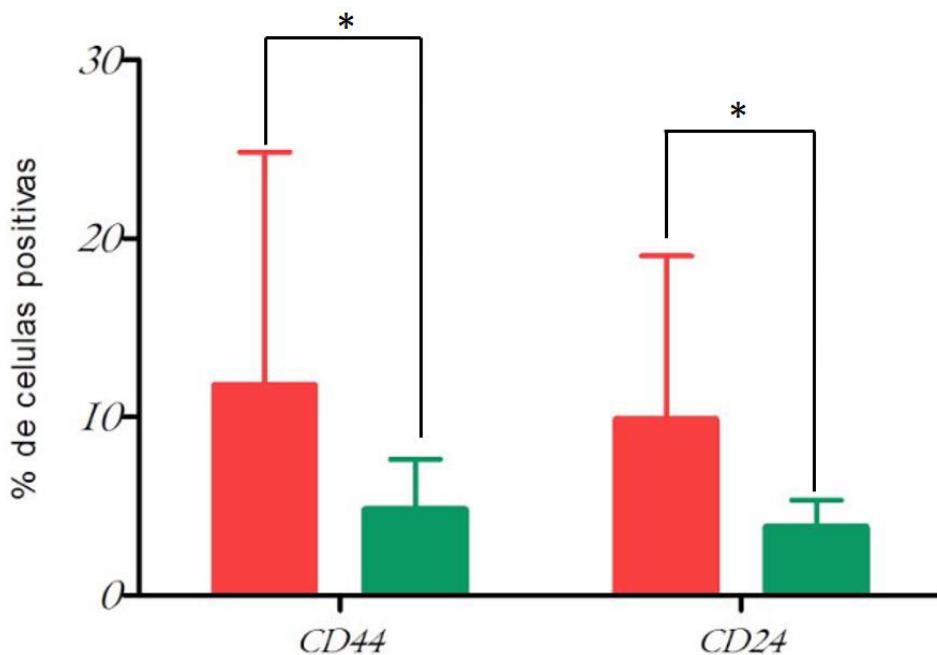


Figura 13. Porcentaje de células CD44+ y CD24+ en cortes de biopsias de ACCR sensibles o resistentes a 5FUOL. Las barras verdes corresponden al promedio \pm DE del porcentaje de células CD44⁺ o de CD24⁺ de ACCR sensibles a 5FUOL y las barras rojas corresponden al promedio \pm DE del porcentaje de células CD44⁺ y CD24⁺ de cortes histológicos de ACCR resistentes a 5FUOL. Los asteriscos indican diferencias significativas en el porcentaje de células CD44⁺ y CD24⁺ entre los cortes sensibles y resistentes a 5FUOL. Calculamos la significancia estadística de las diferencias que encontramos entre las poblaciones de estudio (*) con una prueba de *t* de student. Consideramos que existía significancia estadística con una $p < 0.05$.

aislados de CMT se obtuvieron de 3 cultivos de ACCRs resistentes a 5 FUOL y 3 aislados de cultivos sensibles a 5FUOL. La figura 14, muestra imágenes típicas de la morfología que CMT de biopsias de tumor de ACCR y de Colo 320DM adquirieron después de 15 días de cultivo en medio selectivo para CMT, en condiciones de baja adherencia. Las CMT de los seis aislados presentaron los esferoides típicos que se forman bajo el uso de medio selectivo para CMT.

Estos esferoides estaban formados por aproximadamente 100 células aglutinadas unas con otras.

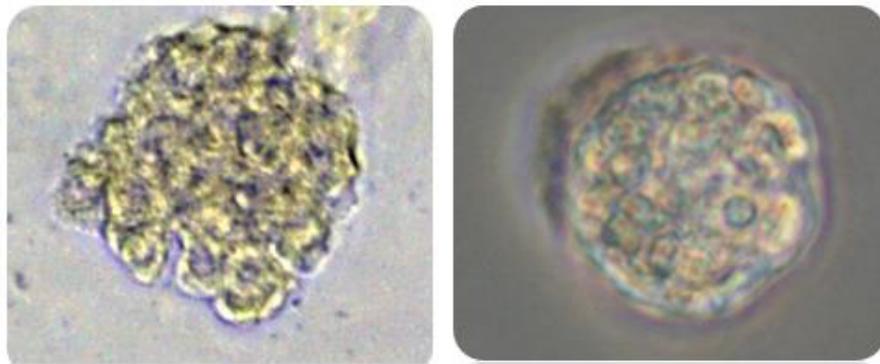


Figura 14. Esferoides típicos formados por las CMT. En medio selectivo (conteniendo 5FUOL) para CMT incubamos 51 cultivos de ACCR y uno de Colo 320DM. Hicimos las incubaciones a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%, en placas para cultivo de baja adherencia, por 15 días. En las imágenes mostradas en esta figura observan esferoides típicos, formados por unas 100 CMT. La imagen de la izquierda corresponde a un esferoide de CMT aisladas de un cultivo de ACCR y la imagen de la derecha es un esferoide formado por CMT aisladas de la línea Colo 320DM. Ambas imágenes se tomaron con un microscopio invertido. La imagen de la izquierda en campo claro y la de la derecha en contraste de fases a una amplificación de la imagen de 40X.

9.6. Expresión de CD44 y CD24 en los aislados de CMT de ACCR

La figura 15 se muestra que los CMT de ACCR sensibles y resistentes que expresan los marcadores típicos de células madre CD44⁺ y CD24⁺.

Un análisis de las imágenes derivadas de los ACCR antes y después del aislamiento de las CMT se resume en la tabla 19. Como se puede observar, mediante el cultivo selectivo para CMT aumentó significativamente el porcentaje de células CD44⁺ y CD24⁺. El promedio de CMT CD44⁺ que determinamos en los ACCRs fue 12.38 ± 4.02 y después del cultivo selectivo para CMT este porcentaje se incrementó a 70.15 ± 10.3 (5.9 veces). Por otro lado, inicialmente, el porcentaje de CMT CD24 + fue 9.88 ± 7.42 y éste subió a 70.15 ± 10.3 (7 veces). Respecto al doble marcaje, el porcentaje de CMT CD44⁺/CD24⁺ en los ACCRs fue 7.95 ± 5.20 y después del cultivo selectivo, éste se incrementó a 63.9 ± 7.8 (8 veces).

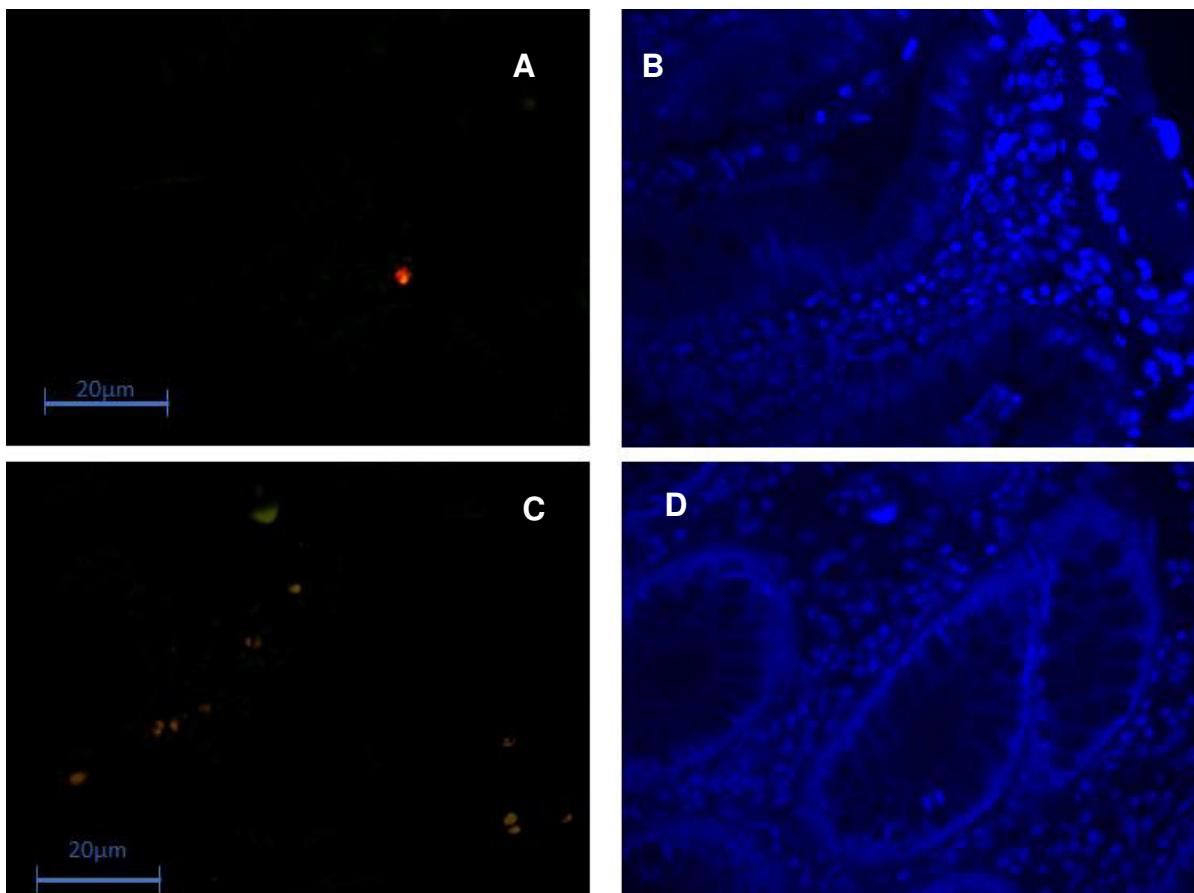


Figura 15. Doble marcaje de CMT en ACCRs sensibles o resistentes a 5FUOL. La figura muestra imágenes representativas de cortes de ACCRs sensibles (recuadros A y B) y resistentes a 5FUOL (recuadros C y D), mostrando células color naranja; color indicativo de que estas células están expresando ambos marcadores, CD44 y CD24. Las preparaciones se marcaron mediante inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales de ratón anti-CD44 acoplado a PECY7 y anti-CD24 acoplados a FITC. Las laminillas se observaron con un microscopio de epifluorescencia. Las imágenes fueron tomadas a una amplificación de 40X. Se observan claramente los núcleos de todas las células teñidas con DAPI (de color azul), las células CD44⁺/CD24⁺ (color naranja). Los ACCRs resistentes a 5FUOL muestran una aparente mayor densidad de células CD44⁺/CD24⁺ que los cortes de ACCRs sensibles a 5FUOL

Tabla 19. Incremento de CMT CD44⁺ y CD24⁺ después su cultivo en medio selectivo

Folio	% CMT en ACCRs ¹			% en aislados de CMT ²		
	CD44 ⁺	CD24 ⁺	CD44 ⁺ /CD24 ⁺	CD44 ⁺	CD24 ⁺	CD44 ⁺ /CD24 ⁺
Px.23	11.4±4.63	8.6±5.0	6.31±3.0	79.4±23.1	54.4±12.7	74.7±22.8
Px.26	12.6±6.49	5.8±2.98	4.94±1.59	58.9±39.6	80.3±13.2	61.75±13.6
Px.46	7.8±4.26	4.4±3.03	4.87±2.12	63.8±10.2	68.8±12.5	56.1±8.64
Px.47	17.6±16.8	20.7±19.0	15.7±6.9	78.3±00.8	66.3±6.9	63.4±7.8

¹CMT en ACCRs, célula madre de tumor cuantificadas en cortes histológicos de adenocarcinomas frescos, mediante inmuno fluorescencia con anticuerpos monoclonales anti-CD44+ y antiCD24+ marcados con colorantes fluorescentes de distinto color y observados con un microscopio de epifluorescencia equipado con un objetivo 40X. Hicimos las determinaciones tres veces, por triplicado, contando 5 campos en cada laminilla.

²CMT, células madre de ACCRs. Estos cultivos se obtuvieron después de 15-30 días de cultivo en medio selectivo para CMT, después de este tiempo se mantuvieron las células por 24h en presencia de 5FUOL y posteriormente de 3 días en medio selectivo en ausencia de 5FUOL. Después se evaluaron los marcadores CD44 y CD24.

9.7. Porcentaje de células CD44⁺/CD24⁺ en Colo 320DM

En Colo 320DM la proporción de células CD44⁺ fue 3.33% ± 3.28 y de células CD24⁺ fueron 6.67% ± 3.67 (promedio ± DE). Sin embargo, después, de mantener el cultivo de la línea por 30 días en el medio para aislar a las CMT en condiciones de baja adherencia observamos que el porcentaje de células CD44⁺ y CD24⁺ se incrementó en el aislado de las CMT; encontrando un porcentaje positivo para las células CD44⁺ de 97.05 ± 2.94 y para las células CD24⁺ de 93.34 ± 4.57 como se puede observar en la figura 16 (recuadros A, B y C).

9.8. Quimiosensibilidad de las CMT derivadas de ACCR

La figura 16 (recuadros D, E y F), muestra una imagen representativa de los aislados de CMT derivadas de ACCR resistentes a 5FUOL. Un análisis de los resultados obtenidos con estas células demostró que el promedio de PMC ± DE de los aislados de CMT de ACCRs incubados en presencia de 5FUOL fue 19.47 ± 7.27 y el promedio ± DE de PMC de aislados de CMT incubados bajo las mismas condiciones que sus pares, pero en ausencia de 5FUOL; el cual fue usado como control de 100% de viabilidad. No hubo diferencias significativas entre los PMC de grupos de cultivos.

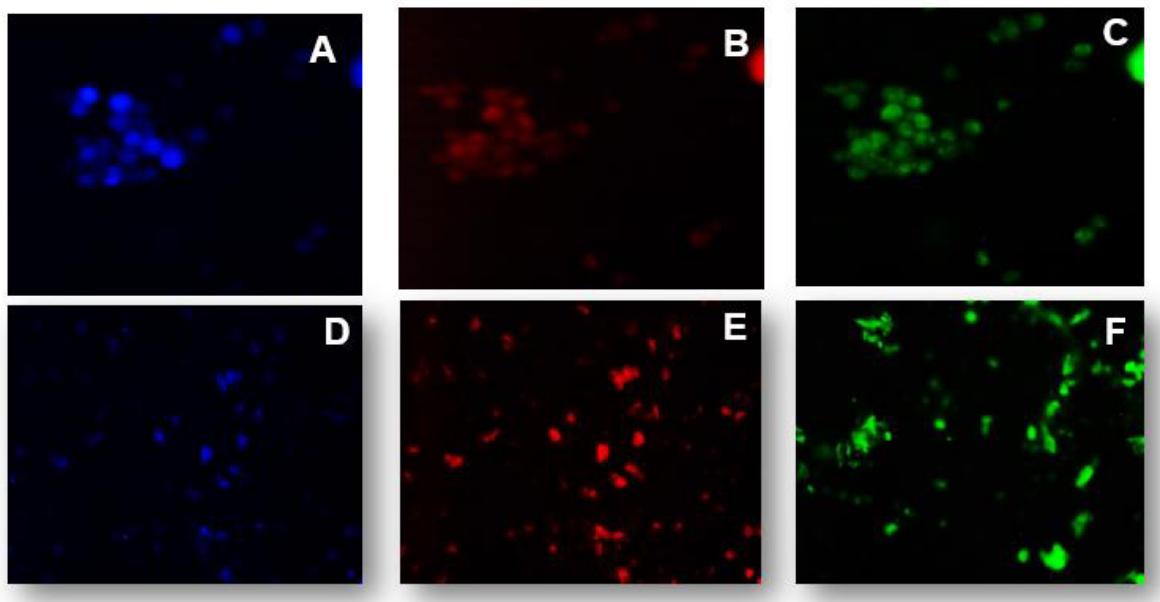


Figura 16. Expresión de CD44 y CD24 en células madre de tumor (CMT). Una vez aisladas las CMT de ACCR y Colo320, éstas se tipificaron mediante inmunofluorescencia. En todas las imágenes se observan los núcleos de las células, teñidos con DAPI (en color azul). Las imágenes A, B y C corresponden a la CMT aisladas de Colo 320 DM y las imágenes D, E y F corresponden a CMT aisladas de tumores de ACCR. Las células CD44⁺ (de color rojo) y CD24⁺ (de color verde). Las imágenes fueron tomadas con un microscopio de epifluorescencia a una amplificación de 40X.

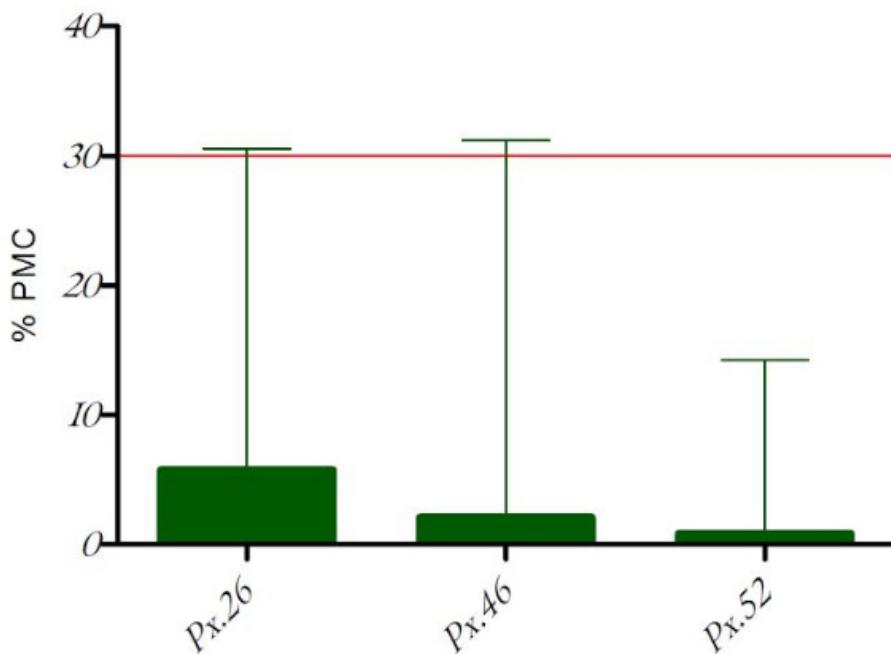


Figura 17. Quimiosensibilidad de las CMT derivadas de ACCRs. Las barras verdes representan los promedios ± DE de los PMC determinados en las CMT derivadas de ACCRs incubadas en presencia de 5FUOL. Todos los cultivos fueron mantenidos en medio selectivo para CMT, a 37°C, en atmósferas de CO₂ al 5% por 15 días. Cada barra representa los promedios ± DE de tres determinaciones.

9.9. Quimiosensibilidad de las CMT derivadas de cultivos celulares de Colo 320

El PMC de CMT-Colo 320 DM fue = 72.36 ± 4.78 en presencia de 5FUOL, usando como control de 100% de viabilidad CMT no tratadas. La resistencia en los aislados de CMT a 5FUOL se incrementó significativamente (aproximadamente un 18%) con respecto a los cultivos completos de Colo 320DM (inicialmente el PMC = 88.43 ± 7.17) como se muestra en la figura 17.

9.10. Expresión génica diferencial de ACCRs

La figura 18, muestra la distribución de la expresión de los 66 genes relacionados con resistencia a 5FU o a oxaliplatino, expresados por todas las células que conformaban cada uno de los ACCRs sensibles (A) o resistentes (B) a 5FUOL. La gráfica muestra una enorme dispersión entre las lecturas de los genes de ACCR

sensibles y resistentes a 5FUOL. Entre estos dos grupos (ACCR sensibles y resistentes) no se observaron diferencias significativas ($p = 0.80$).

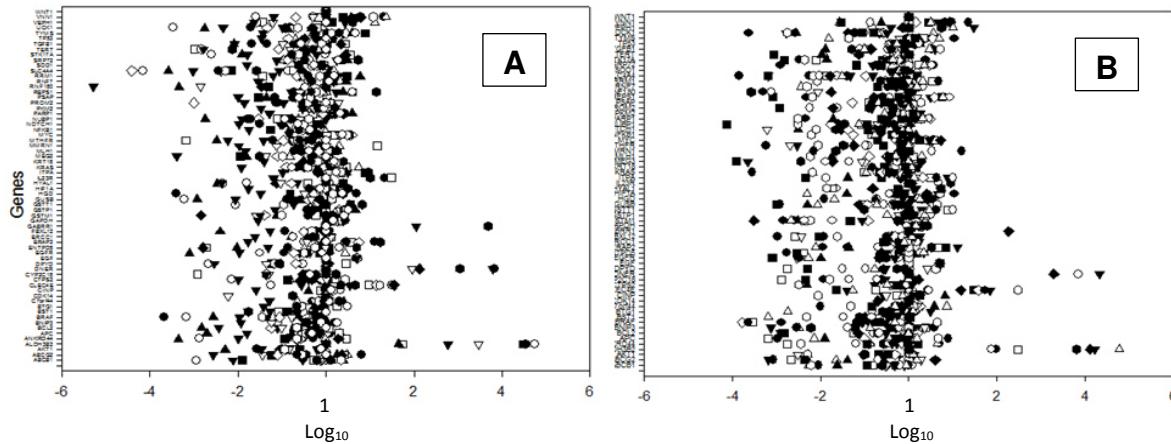


Figura 18. Expresión génica de ACCR sensibles y resistentes. Estas gráficas fueron generadas por el programa informático *Graph Pad Prism 7.02*. En cada una de ellas se observa la expresión génica de cada una de las muestras de ACCR sensible (recuadro A) o resistente (recuadro B) a 5FUOL. Cada punto representa el Log₁₀ de lecturas (equivalente al número de copias de RNAm) determinado por el sistema *Basespace* de Illumina. Cada símbolo corresponde a un ACCR en particular. Las columnas de la izquierda de los recuadros A y B corresponden a cada uno de los genes analizados.

Sin embargo, se analizó la frecuencia de sobre-expresión y sub-expresión de los genes por paciente como se observa en la tabla 20, donde muestra el nombre de los genes diferencialmente expresados en magnitudes de ≥ 2 ó ≥ 4 logaritmos con respecto a las muestras de intestino recto sano, los números de folio (correspondientes a los expedientes de los pacientes participantes), tanto en ACCR sensibles como resistentes a 5FUOL. Como se puede observar la mayoría de los ACCRs resistentes posee una alta expresión de los genes ALDH3B2, C7orf44, RESP1, RRM1, GSTT1 y VNN1. Los genes que se encuentran en una baja expresión en los ACCRs sensibles fueron BTG1, CLEC4E, GABRR1 y PROM2. Además, mediante un análisis de varianza, encontramos que, entre los 66 genes analizados, 5 estaban sobre-expresados en los ACCRs con respecto a la expresión génica de las muestras de colon y recto sano ($p < 0.01$). Dichos genes fueron los siguientes: BST1, MTHFR, NOTCH1, NUBP1 y AKT.

Gen	ACCRs ²		ACCRr ³		Gen	ACCRs ²		ACCRr ³	
	SE ⁴	SuE ⁵	SE	SuE		SE ⁴	SuE ⁵	SE	SuE
ABCB1	1	2	1	2	HGD	4	0	1	0
ABCG2	3	0	4	0	HIF1A	4	2	1	0
ALDH3B2	0	0	8	0	HYAL1	1	0	4	0
ANKRD44	1	1	2	0	IL23R	4	0	2	0
APC	0	0	2	2	ITPA	6	0	7	0
BCL2	0	1	0	3	KRAS	1	0	1	0
BNIP3	0	1	2	0	KRT18	2	0	0	0
BRAF	0	3	0	2	MEG3	0	2	0	0
BST1	0	0	1	0	MLH1	0	0	0	0
BTG1	2	0	0	0	MMRN1	1	0	3	0
C7orf44	0	0	4	0	MTHFR	0	3	0	0
CDK14	0	1	0	0	MYC	9	0	7	0
CINP	5	0	5	0	NOTCH1	0	0	0	1
CLEC4E	7	0	2	0	NUBP1	0	0	0	1
CTPS2	1	1	0	0	PARP1	2	0	3	0
CYP2C18	0	0	0	1	PROM2	5	0	0	0
DNER	6	0	3	0	REPS1	0	0	5	1
DPYD	1	2	3	0	RNF180	0	2	0	3
EGF	8	0	10	0	RNF7	0	0	4	0
EGFR	1	0	1	3	RRM1	0	0	5	0
ENTPD5	2	1	1	2	SLC4A4	0	6	0	5
ERAP2	6	0	6	0	SRP72	0	0	6	0
FBXL12	0	0	0	1	STK17A	0	0	2	0
GABRR1	4	0	0	0	TERT	0	5	0	0
GAPDH	7	0	4	0	TGFB1	1	0	2	1
GSTM1	1	1	0	2	TYMS	7	0	9	0
GSTP1	4	0	7	0	UCK1	0	2	1	3
GSTT1	1	1	7	0	VEPH1	1	0	3	0
GUSB	0	2	1	3	VNN1	0	0	12	0

¹ACCR, adenocarcinoma colorrectal; ²ACCRs, adenocarcinoma colorrectal sensible a 5FUOL; ³ACCRr, adenocarcinoma colorrectal resistente; ⁴SE, Sobre-expresión; ⁵SuE Sub-expresión. Se consideró una expresión diferencial como un número de lecturas $\geq 2 \text{ Log}_{10}$, menor (SuE) o mayor (SE) que el número de lecturas determinado en las muestras de intestino sano. Los números en todas las casillas indican el número de ACCRs que expresaron diferencialmente el gen anotado en la columna de la izquierda. Los códigos de color en las casillas iluminadas indica lo siguiente: el rojo, el mayor número de ACCRs que expresaron diferencialmente uno de los genes evaluados y el verde genes fueron expresados por un número importante, pero menor que los genes señalados en rojo.

9.11. Expresión génica diferencial de las CMT derivadas de ACCRs

La figura 19 muestra la expresión génica diferencial de genes expresados por aislados de CMT. Los genes con alta y media expresión diferencial ($4-8 \times 10^9$

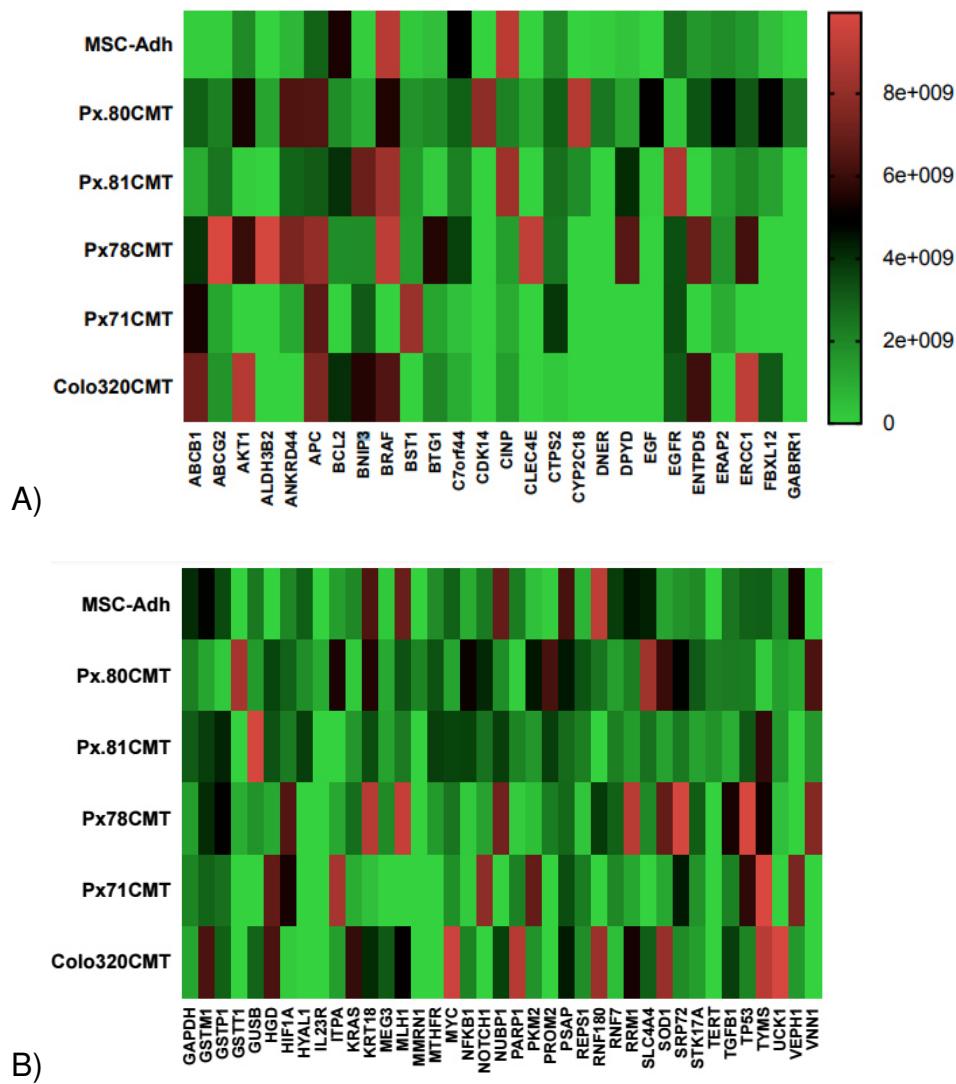


Figura 19. Mapa de calor de expresión génica diferencial de las CMT aisladas de ACCRs resistentes a 5FUOL. Presentamos, el número de lecturas que obtuvimos entre las distintas muestras de CMT aisladas. En el margen izquierdo colocamos los folios de los expedientes de los pacientes donadores de los ACCRs (Px), las células madre de tumor (CMT) aisladas de la línea Colo 320DM de adenocarcinoma de colon y células madre mesenquimales de tejido adiposo humano (CMM-Adh). En el margen derecho aparece un código de colores, indicando la cantidad de lecturas obtenidas en valores exponenciales. Las barras rojas representan a los genes que tuvieron un número de lecturas altas, las barras negras un número de lecturas intermedio y las barras verdes representan a los genes tuvieron un bajo número de lecturas.

lecturas) fueron los siguientes: ABCB1 (2 aislados), ABCG2 (1), AKT1, (3), ALDH3B2 (1), ANKRD44 (2), APC (3) BNIP3 (2), BST1 (1), BTG1 (1), CDK14, (1), KRT-18 (3).

9.12. Perfil de expresión génica de Colo 320 y CMT-Colo 320DM

El aislado de CMT-Colo 320DM sobre-expresó los genes ERCC1, PARP1, TGF β 1, ABCB1 ITPA y MYC y sub-expresó KRT18 con respecto a cultivos Colo320 progenitores. La figura 20 muestra un mapa de calor donde pueden observarse gráficamente las diferencias en la expresión génica de Colo320, bajo diferentes condiciones de cultivo.

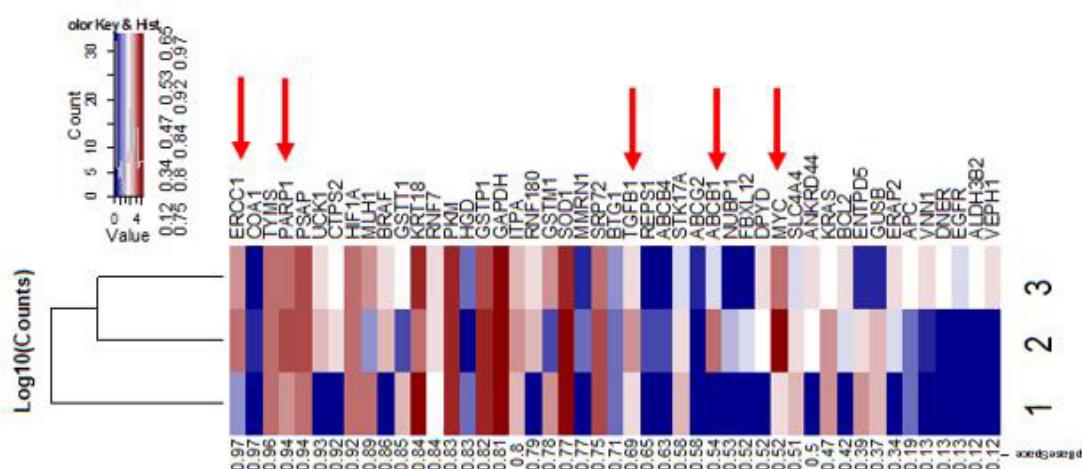


Figura 20. Mapa de calor de línea celular Colo320. Este mapa de calor se obtuvo con la ayuda del software *Graph prism versión 7.0*; con el cual comparamos el número de lecturas obtenidos entre línea Colo 320DM cultivada en el medio normal RPMI (carril 1), aislado de CMT de la línea Colo 320, cultivada 30 días en medio selectivo para CMT (carril 2) y el RNA control marca Agilent (carril 3). Los letreros de la parte superior de esta imagen indican los nombres de los genes analizados. Las horquillas en el extremo izquierdo de la imagen indican que existen dos tipos de muestras (Colo320 y CMT con Agilent) que ambas están relacionadas en cuanto a su nivel de expresión génica. Los colores de las barras indican lo siguiente: diferentes tonos de azul corresponden a una baja expresión génica, diferentes tonos de rojo indican una alta expresión génica.

9.13 Mecanismo integrado de la resistencia a 5FUOL de las CMT de ACCRs

Re-analizamos las muestras de ACCR-resistentes contra sensibles agrupando a los tejidos como resistentes cuando tuvieran un porcentaje de CMT > 5% en el tejido. Después realizamos la prueba de Kruskal-Wallis, y encontramos una sobre-

expresión de los genes ABCB1, BCL2, BST1, GAPDH, KRT18, MTHFR, PROM2 ($p<0.05$), con respecto a la expresión de los genes correspondientes en los ACCRs sensibles a 5FUOL. Para confirmar estos datos, utilizamos otra prueba estadística Mann–Whitney, y obtuvimos una diferencia en la expresión entre ALDH3B2, CLE4E, EGF, ENTPD5, ERAP2, GAPDH, GSTM1, MEG3, MTHFR, MYC, NOTCH1, NUBP1, SOD1, UCK1, VNN1, ABCB1, KRT18, MTHFR, SOD, TERT. Después con el programa STRING identificamos los genes más relevantes ya que tienen interacciones entre ellos como se indica con flechas rojas en la figura 21.

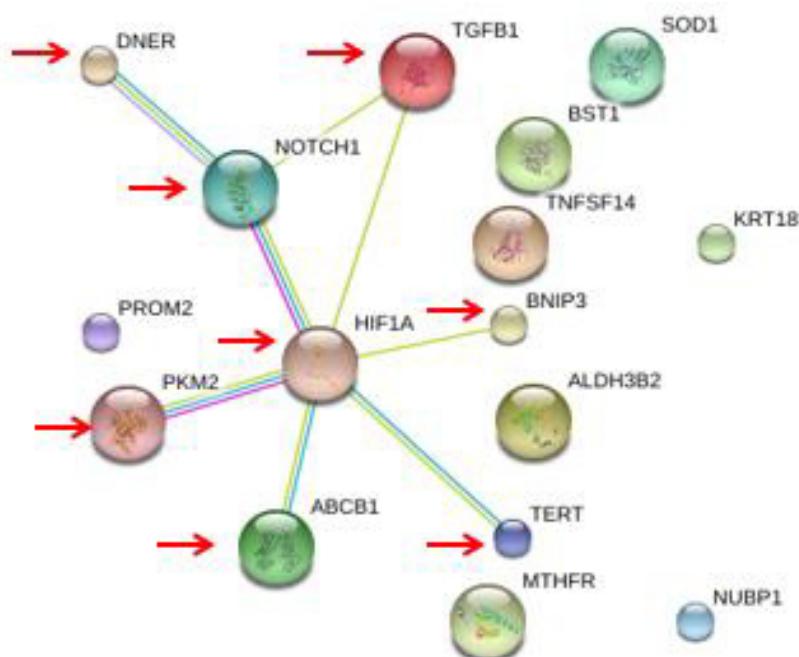


Figura 21. Genes involucrados en FR de ACCRs, relacionados entre sí. Representamos como esferas de colores los genes que identificamos como sobre-expresados en ACCRs resistentes a 5FUOL, con un alto porcentaje de CMT. Las líneas que unen a un gen con otro y las flechas, indican que hay interacción entre éstos.

Después evaluamos la diferencia de expresión entre las CMT y las células madre normales obtenidas de tejidos adiposo humano. Observamos que las CMT sobre-expresaban ABCB1, ABCG2, BINP3, ALDH3B2, EGF, HGD y KRT18. En cambio,

las células madre normales poseen una baja expresión de BST1, GAPDH, HIF-1 α , MEG3 y TGF β .

Con todos estos genes involucrados nuevamente realizamos un mapa para evaluar la interacción de los genes y las vías en las que participan mediante el programa STRING. Encontramos que los genes se dividen principalmente en tres funciones: relacionados con hipoxia (HIF-1 α , BNIP3, NOTCH, BCL-2, TGF- β , MTHFR, AKT), respuesta inmune (SOD, BST1, VNN1, EGF, TGF- β , CLEC4E, PI3KCA) y apoptosis (MYC, BNIP3, AKT1, GAPDH, KRT18) como se muestra en la Figura 22.

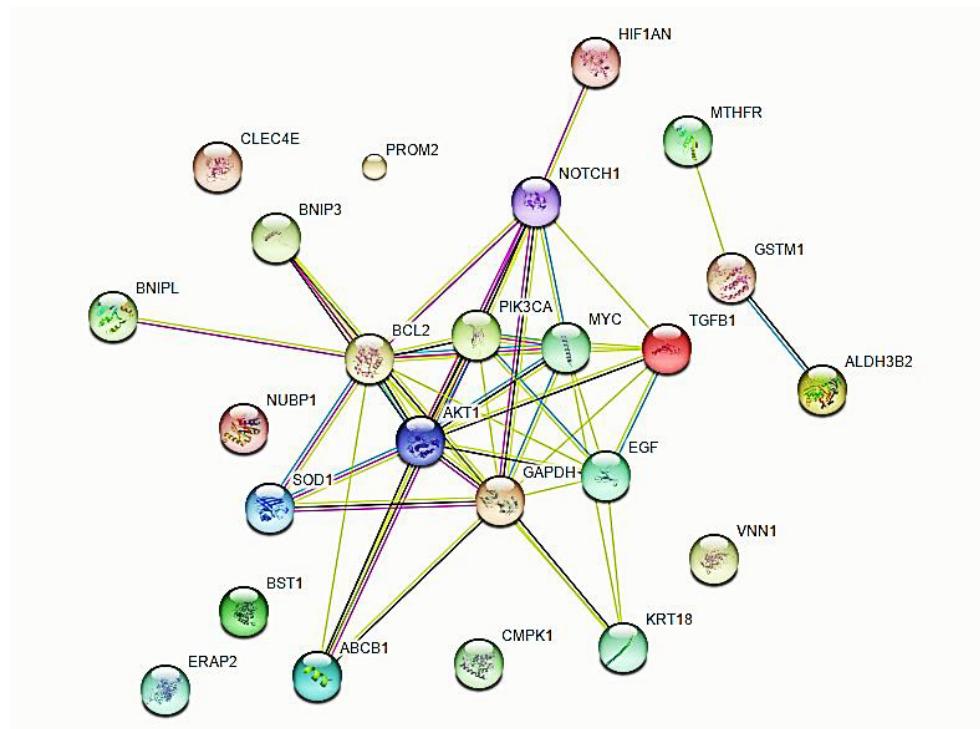


Figura 22. Genes involucrados en la resistencia de las CMT. Los genes están representados por los círculos de colores. Las líneas que hay entre los genes indican que hay interacción entre ellos.

Debido a todos los resultados encontrados, proponemos, entonces, un mecanismo que explique la resistencia a 5FU y oxaliplatino en las CMT. Para ello, sabiendo que el 5FU es un fármaco que cuando la célula tumoral sobre-expresa ABCB1 (bomba de eflujo) evita que el agente tumoral cumpla su acción biológica sacando el compuesto tóxico de la célula diana. Por otro lado, se sabe que cuando el 5FU

entra en una célula, esté tiene como mecanismo de acción la inhibición de la timidilato sintasa y con esto la síntesis del DNA sin embargo, como mecanismo de rescate esta la hipoxia (mecanismo que ocurre en muchos tumores debido a concentraciones bajas de oxígeno, estímulo EGF). Como respuesta a este estímulo se activan los genes de respuesta a hipoxia (HRE) entre los cuales se encuentra: VEGFR, Glut-1, BNIP3. Este último evita la unión de Bcl-2 a beclina y con esto la activación de la autofagia y por tanto la sobrevida de la célula. El oxaliplatino normalmente induce apoptosis por causar aductos en el RNA y DNA, sin embargo, pensamos que en las muestras que analizamos, el oxaliplatino está induciendo estrés mitocondrial el cual induce la expresión CK-18 y PARP1, SOD1 y con esto la activación de la autofagia como se muestra en la Figura 23.

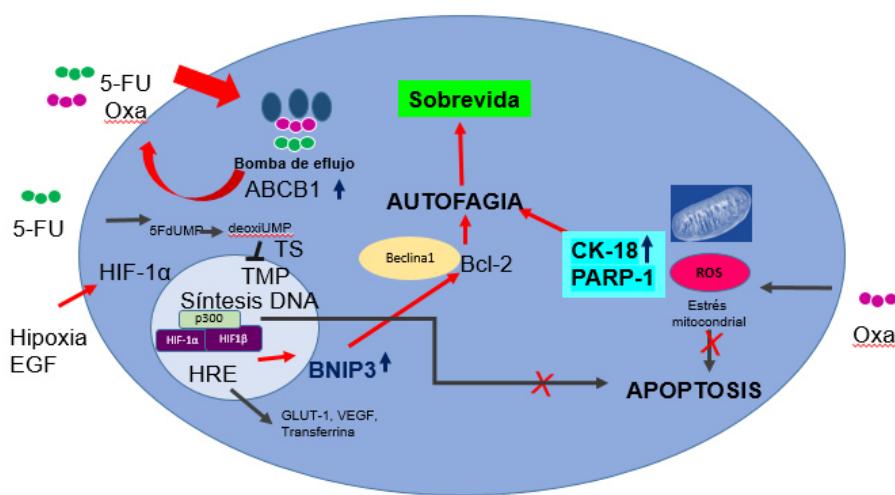


Figura 23. Mecanismo propuesto de resistencia asociado a 5FU y oxaliplatino en las CMT. Este gráfico representamos las funciones de los genes más importantes que están directamente relacionados con bloquear la apoptosis de las CMT al adicionar los fármacos 5-fluoruracilo y oxaliplatino.

10. Discusión

Realizamos el presente estudio para obtener y aportar conocimientos fundamentales sobre las causas de la resistencia a los medicamentos que se usan en los regímenes terapéuticos más utilizados en el mundo; los cuales se basan en la prescripción de fármacos antineoplásicos de primera línea. Con ese propósito, analizamos la expresión génica diferencial de tumores de ACCR, y de CMT derivadas de dichos tumores y de cultivos completos de las líneas obtenidas de ACCR, Colo 320DM y de CMT derivadas de esta línea celular. Con estos conocimientos relacionamos los efectos biológicos de los genes y las vías metabólicas en las que participan los genes diferencialmente expresados en ACCR-FR y CMT-FR y presentamos una interpretación del papel que desempeñan estos genes y las vías metabólicas en las que participan sobre FR del CCR.

En ACCR el 5FU y su profármaco, capecitabina (XELODA) se utilizan en los regímenes llamados FOLFOX-6, XELOX y XELODA¹¹³. Este último régimen se llama así porque está basado únicamente en la prescripción de capecitabina, nombre comercial de este fármaco (Xeloda)¹¹⁴. Por otro lado, XELOX y FOLFOX-6 están reforzados por oxaliplatino¹¹⁵. Además, FOLFOX-6 incluye a leucovorina. La leucovorina es un derivado del ácido fólico, también conocido como ácido folínico, el cual se usa por sus propiedades protectoras contra los efectos tóxicos de los agentes anti-neoplásicos y porque potencia la actividad anti-neoplásica de 5FU¹¹⁶.

Considerando que los medicamentos mencionados ejercen sus efectos farmacológicos en una forma combinada, nosotros decidimos realizar nuestros ensayos de quimiosensibilidad con mezclas de los medicamentos que se utilizan en FOLOFOX-6 o en XELODA y ensayamos individualmente a capecitabina, porque es el único medicamento que se usa en el régimen llamado XELODA (administración oral). Por otro lado, considerando que capecitabina es un profármaco de 5FU y que FOLFOX-6 y XELOX incluyen oxaliplatino en su armamentario, decidimos simplificar nuestra investigación, realizando los estudios de aislamiento y

caracterización de las CMT y de expresión génica diferencial únicamente con 5FUOL, la mezcla de medicamentos utilizada en FOLFOX-6.

En este trabajo utilizamos el método ATP-CRA para determinar la sensibilidad o resistencia de células derivadas de ACCR, por ser uno de los que permite realizar evaluaciones de quimiosensibilidad en una forma relativamente sencilla, y porque requiere muy poca muestra, lo cual resultó especialmente útil cuando recibimos pequeñas muestras de los tumores para realizar nuestro estudio^{102,117}. Dicho método nos permitió evaluar la quimiosensibilidad a las combinaciones de fármacos de primera línea (evaluando a la par de cada ensayo la línea celular Colo 320DM como un control interno).

Clasificamos las muestras frescas de ACCR y el colon o recto adyacente al tumor como sensibles cuando la muerte celular fue $>20 \pm 5\%$ y resistentes cuando la muerte celular fue de $<30 \pm 5\%$. Este criterio concuerda con lo reportado por Hye Youn Kwon *et al.*, 2016¹¹⁷. Como resultados interesantes encontramos que de las 51 muestras analizadas el 41% de los tejidos fue clasificado como sensible y el 59% resistente para 5FUOL, y, sorprendentemente, el 94% de los cultivos de ACCR resultó resistente a Xeloda. La baja toxicidad de capecitabina sobre los ACCRs en general, pudo haberse debido a que capecitabina es un profármaco del 5FU y por tanto requiere activarse metabólicamente para tener el efecto citotóxico esperado. Posiblemente esto no ocurrió en los cultivos primarios de ACCRs porque estas células no contaban con una vía metabólica eficaz para convertir a la capecitabina en 5FU. Si esto se comprueba, el ATP-CRA no sería útil para realizar estudios de quimiosensibilidad, con capecitabina y habría que tener todas las precauciones necesarias para evaluar otros profármacos.

Por otro lado, es notable que al menos 19 cultivos mostraron un PMC aparentemente negativo con la capecitabina, solo en cinco casos observamos valores aparentemente negativos de PMC con 5FUOL y en cuatro casos con XELOX. Una interpretación de este fenómeno (PMC aparentemente negativo) apunta a que las células de estos cultivos produjeron más ATP que los controles —

que es lo que mide el ATP-CRA—. Esta mayor concentración intracelular de ATP sólo tiene dos posibles explicaciones: 1) que las células de algunos de nuestros cultivos primarios de ACCR se dividieron, estimuladas por el efecto del 5FUOL o 2) que estas células aumentaron su producción de ATP por el estímulo del 5FUOL. Nosotros descartamos la primera posibilidad porque, al determinar la concentración de células y el porcentaje de viabilidad (con azul tripán) de estos cultivos atípicos, no encontramos diferencias significativas ($p > 0.05$) con respecto a los controles, ni en la cantidad de células, ni en el porcentaje de viabilidad. Entonces, lo más probable es que la mayor concentración de ATP intracelular en los cultivos fue una reacción de las células al efecto tóxico del 5FUOL. En apoyo de esta hipótesis, ya comentamos en la introducción de la tesis que algunos fármacos producen un estrés oxidativo en las CMT, lo cual estimula la producción de NADPH y este incremento, a su vez, se traduce en un aumento en la producción de ATP; que es justamente lo que estamos observando. La otra posibilidad —queno excluye a la primera, es la actividad de ciertos genes, que se activan por el estrés oxidativo, causado por los fármacos antineoplásicos. Uno de estos mecanismos es el siguiente: en las células sometidas a estrés oxidativo se activa a la subunidad alfa del factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1 α). Esta subunidad, a su vez, induce la expresión de genes que promueven la supervivencia de las células tumorales (esto se comentará más adelante).

Sobre la quimiosensibilidad de las muestras de colon y recto adyacentes a los ACCRs, ésta fue estadísticamente diferente a la quimiosensibilidad de los ACCR con la combinación XELOX (capecitabina y oxaliplatino) pero no observamos diferencia entre los ACCRs y tejido adyacente a los tumores con la combinación 5FUOL y XELODA; razón por la cual, en este trabajo, decidimos incluir muestras de intestino sano. Estos resultados concuerdan con lo reportado previamente, donde se menciona que existe una resistencia intrínseca o adquirida a agentes antineoplásicos en los tejidos adyacentes al tumor y como éstos ya han adquirido cambios o mutaciones similares a las del tumor¹¹⁸. En apoyo de esta suposición, las CMT y los fibroblastos asociados a carcinomas (CAF, por sus siglas en inglés,

carcinoma-associated fibroblasts) son capaces de malignizar a distancia células normales, exportando citoquinas, quimiocinas y miRNAs¹¹⁹. La condición de FR del intestino de algunos pacientes pudo haberse presentado por tres razones, no-mutuamente excluyentes: 1) que hay personas que son naturalmente resistentes (al menos parcialmente) a los fármacos que nosotros utilizamos. 2) Aunque los donadores de tejidos sanos no mostraron signos anatomo-patológicos, sugerentes de estar en estrés, ellos pudieron haber estado bajo un estrés metabólico y comportarse en forma parecida a las muestras de colon y recto adyacentes a los ACCRs, como ya comentamos en el párrafo anterior. 3) Las muestras de intestino adyacente a los ACCTs-FR pudieron haber desarrollado parte de su resistencia por contener células transformadas y haber activado sus sistemas de defensa al estar ya genéticamente alteradas por efecto de las CMT o por los CAF, de los ACCRs vecinos. En tal caso sería fundamental que se hicieran estudios adecuados para determinar hasta qué distancia de los ACCR están presentes células malignas. Aunque determinamos la quimiosensibilidad de los tejidos adyacentes a los tumores primarios, no se llevó a cabo la determinación de su expresión génica diferencial, por limitaciones de tiempo. Sin embargo, se recomienda para futuros estudios indagar un poco más en el tema ya que podrían tener un enorme valor predictivo y terapéutico.

La línea celular Colo 320DM resultó ser una línea francamente sensible a todas las combinaciones de fármacos que probamos, mostrando un muy alto PMC frente a 5FUOL, capecitabina/oxaliplatiino y capecitabina sola (Tabla15). Este hallazgo nos fue útil para hacer los estudios que siguieron a éste, porque utilizamos a Colo320 como un control interno. A pesar de su alta fármaco-sensibilidad se nota que aún esta línea tiene un pequeño porcentaje de células malignas, resistentes a los fármacos utilizados; lo cual confirmamos al aislar y caracterizar a las CMT-Colo320 (ver más adelante).

En los últimos años, se ha propuesto que las CMT son el motor que mantiene vivos a los tumores, les permite expandirse, producir metástasis y desarrollar resistencia

contra los medicamentos antineoplásicos. Es por ello, que las CMT constituyeron nuestro principal foco de atención para desarrollar el presente trabajo. Entonces, uno de nuestros objetivos fue saber si la FR de los ACCRs está relacionada con el porcentaje de CMT (células CD44⁺ y CD24⁺). En los estudios, cuyos resultados estamos discutiendo aquí, observamos que, al igual que la quimiosensibilidad, el porcentaje de CMT fue notablemente variable entre los cortes de ACCRs, incluso en los cultivos de Colo 320DM; lo que sugiere que el número de CMT está cambiando constantemente dentro de los tumores, e incluso en las líneas celulares, y que la distribución de CMT dentro de cada tumor, es notablemente variable. Es decir, que en una porción del tejido tumoral puede haber un porcentaje mucho mayor de CMT que en otra parte del mismo tumor. El hallazgo más importante que hicimos al analizar el contenido de CMT en los cortes de ACCRs y en Colo 320DM es que el porcentaje de CMT es considerablemente bajo, los cual concuerda con las observaciones de otros grupos de investigación¹²². Por otro lado, el porcentaje de células CD44⁺ y CD24⁺ fue significativamente menor en los cortes de ACCRs sensibles que en los resistentes a 5FUOL. En general, es notable la baja concentración de CMT en los ACCRs sensibles y en Colo 320DM: tomando todos los datos en conjunto, el rango de CMT en los cortes de ACCR sensibles a 5FUOL fue 3-5% y en los cortes de ACCRs resistentes a 5FUOL fue 12-13%; mientras que el rango de Colo 320DM fue de 3.3 a 6.7%. Estas observaciones concuerdan con las de otros grupos de investigación¹²³.

En otro orden de ideas, en este trabajo nosotros logramos una tasa de éxito en los aislamientos de CMT de ACCR de 11.8%: obtuvimos 6 aislados de CMT derivadas de ACCRs de 51 cultivos primarios y un único aislado de la línea Colo320 que sometimos al proceso de aislamiento de CMT. Además, de los 6 aislados que obtuvimos, tres provenían de tejidos resistentes a 5FUOL y tres de tejidos sensibles. Pero todas las CMT eran resistentes a 5FUOL, lo cual concuerda con lo reportado por otros investigadores¹²⁴. Sin embargo, es muy importante hacer notar que en trabajos recientes se ha logrado observar que hay CMT que son sensibles a combinaciones específicas de fármacos o anticuerpos monoclonales¹²⁵. Lo cual

abre la interesante posibilidad de controlar, e incluso curar el cáncer si se encuentra la forma de atacar a las CMT con fármacos o anticuerpos monoclonales a los que estas células sean sensibles.

Las células que nosotros aislamos de ACCRs CD24⁺ y CD44⁺ tenían una morfología típica (esferas de tumor) en cultivos enriquecidos con las CMT y fármaco-resistencia a 5FUOL. —Es muy importante hacer notar que nuestro grupo es uno de los muy pocos en el mundo que ha logrado aislar y expandir CMT ya que las mayores limitaciones para realizar estudios sobre la biología celular y molecular de las CMT se debe, fundamentalmente, al escaso número de CMT que contienen los tumores —como nosotros hemos mostrado y discutido aquí — y a que estas células son extremadamente difíciles de cultivar. Además, es importante remarcar que nosotros logramos con éxito el aislamiento de las CMT a partir de tumores que se encontraban en estadios avanzados y sólo de pacientes que no habían recibido tratamiento previo (quimioterapia o radioterapia).

Para realizar los análisis de expresión génica elegimos el sistema *TruSeq Target RNA* de Ilumina (Miseq) porque éste sistema permite el análisis masivo de varias muestras a la vez mostrando los diferentes perfiles de expresión. Además, este sistema permite identificar mutaciones presentes en los genes de las muestras analizadas con la limitante del tamaño del fragmento secuenciado ya que para el análisis de expresión se recomienda hacer lecturas solo de 5' a 3' y de tamaños entre 150-300 pb.

Tanto los ACCRs sensibles, como los resistentes, mostraron una enorme dispersión en cuanto al Log₁₀ del número de copias registradas con respecto al Log₁₀ del número de copias de los cDNA de colon y recto sano. Un ANOVA del número de lecturas repetidas de los genes, de los grupos completos de ACCRs sensibles o de resistentes a 5FUOL con respecto a las muestras de colon sano mostró diferencias significativas en 5 genes sobre-expresados por los ACCRs. Estos genes fueron los siguientes: BST1, MTHFR, NOTCH1, NUBP1 y AKT (BST1 y AKT se sobreexpresaron en el 80% de los tumores de CCR. Aunque la sobre-expresión de BST1

se reporta como un marcador específico de leucocitos, este gen se sobre-expresa en la mayoría de los tumores metastásicos¹²⁶. AKT, GADPH¹²⁷ y NOTCH1¹²⁸ juegan un papel crucial en múltiples procesos celulares como el metabolismo de la glucosa, la apoptosis, la proliferación celular, la transcripción y la migración celular y por ello, su sobre-expresión se correlaciona con una mayor agresividad de los tumores. NUBP1 es una proteína de unión a nucleótidos y ya que evaluamos el ensayo de ATP para discriminar entre sensibles y resistentes esto corrobora las diferencias observadas en la expresión de NUBP1.

Además, encontramos que los tumores más avanzados sobre-expresaban TGFβ y HIF-α ($p<0.01$). El factor de crecimiento transformante beta (TGF-β)¹²⁹ y HIF-1¹³⁰, son señales que inducen la expresión de otros factores de crecimiento como la proteína específica de fibroblastos (FSP1), la actina del músculo liso alfa (SMAα), el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y las citocinas IL-6, IL-23 y/o IL-1β (proinflamatorias) provenientes de linfocitos T CD4+ que participan en el microambiente para que se promueva la transición epitelial mesenquimal. Además estos, activan otras vías como WNT, Hedgehog (HH), NOTCH y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) involucradas en la proliferación descontrolada y la activación de la transición epitelial-mesenquimal.

No se observaron diferencias significativas entre la expresión génica de ACCRs FR y sensibles. Por lo tanto, no fue posible identificar genes diferencialmente expresados en los ACCRs que puedan ser utilizados como marcadores de FR en ACCR. No, al menos, con el tamaño de muestra ($n=33$ ACCRs) que nosotros utilizamos en este trabajo.

Debido a que el ensayo de quimiosensibilidad mostró una gran variabilidad entre los diferentes tejidos y la mayoría de estos presentaban desviaciones estándar muy amplias, decidimos clasificar a los pacientes como sensibles o resistentes basados en el porcentaje de CMT (sensibles tejidos con porcentajes menores a 5% o resistentes tejidos con porcentajes mayores al 5%) y el ensayo ATP-CRA para de esta manera si alguno estaba en el límite de la sensibilidad agruparlo donde

realmente le correspondiera. Finalmente, ya con los pacientes re-agrupados (16 tejidos sensibles y 17 tejidos resistentes) se realizaron diversas pruebas estadísticas Kruskal–Wallis (ANOVA-Rangos), Mann–Whitney encontrando que los genes ABCB1, BCL-2, GAPDH, KRT-18, MTHFR, PROM2, MYC, NOTCH, SOD1, TERT, ALDH3B2, ENTPD5 se encuentran sobre-expresados en los tejidos resistentes que tienen un alto porcentaje de CMT.

Además, en un análisis sobre la progresión tumoral y los genes asociados a dicho proceso encontramos que TGF- β y HIF-1 α se encuentran sobre-expresados en los tejidos con estadios más avanzados (estadio III- IV). Lo cual concuerda con trabajos previos.

También investigamos si hay una diferencia de expresión en las CMT obtenidas y el tejido original encontrando que estaban sobre-expresados los genes ABCB1, ABCG2, BNIP3, BST1, BTG1, C7ORF44, EGF, ENTPD5, KRT18, MEG3, MYC, NFKB, TYMS, TGF β y VNN1.

Para identificar aquellos genes implicados en la resistencia a 5FUOL, comparamos la expresión de estos últimos genes frente a células madre mesenquimales (CMMs) normales obtenidas de tejido adiposo de una persona sana y observamos que los genes que estaban mayoritariamente expresados en los ACCRs fueron ABCB1¹³¹, ABCG2, ALDH3B2, EGF, HGD y KRT18¹³², BNIP3¹³³, los cuales también están sobre-expresados en las CMT y en los tejidos resistentes. Estos genes han sido recientemente reportados por otros autores asociados con resistencia de manera independiente a múltiples fármacos y diferentes neoplasias.

Esperando que, en un futuro cercano, la secuenciación masiva sea una herramienta que permitirá realizar análisis de expresión génica accesible para su uso clínico, con los conocimientos adquiridos en éste y en otros estudios¹³⁴ sobre la expresión génica diferencial, responsable de FR del CCR, permitirá realizar rutinariamente estudios *ex vivo* de expresión génica diferencial, en tumores de cada paciente que permitan identificar genes específicos implicados en respuestas clínicas refractarias a la quimioterapia convencional y ofrecer a los pacientes un tratamiento

quimioterapéutico basado en la respuesta ex vivo de los tumores primarios o metastásicos a medicamentos alternos, más eficaces y dirigidos, precisamente, contra los genes implicados en el perfil de resistencia de cada paciente en particular¹¹³. Y no sólo eso, considerando que las células cancerosas mutan constantemente y, como consecuencia de esos cambios, suelen cambiar también sus perfiles de sensibilidad¹³⁵. Los estudios de expresión génica, como el que aquí hemos implementado, pero personalizados, permitirán realizar análisis genéticos periódicos de tumores intestinales o de las metástasis, durante el tratamiento de cada paciente, para monitorear la expresión génica de sus células malignas y su sensibilidad a medicamentos alternativos; y así, estar en condiciones de ajustar oportunamente el tratamiento quimioterapéutico, de acuerdo con la sensibilidad que vaya adquiriendo el cáncer, en cada paciente. El tratamiento que reemplace al que haya quedado obsoleto, estará basado, justamente, en el ataque, por fármacos específicos, contra la nueva firma de genes diferencialmente expresados y en un tratamiento prediseñado y personalizado, basado en métodos de químiosensibilidad adecuados, como el ATP-CRA¹⁰⁹. Posiblemente, este círculo virtuoso podrá alargar y mejorar la calidad de vida de los pacientes por un tiempo indefinido, durante su tratamiento, e incluso erradicar el cáncer.

11. Conclusiones

La resistencia a 5FUOL de los ACCR se debe mayoritariamente al porcentaje de CMT

Todas las CMT de los ACCRs analizados eran resistentes a 5FUOL

Los ACCRs intestinales y los tejidos adyacentes a éstos muestran una sensibilidad similar a 5FUOL

Usando el método de ATP-CRA encontramos que, en la muestra analizada de pacientes con CCR el 59% era resistente a 5FUOL.

Al evaluar combinaciones como Xeloda y Xelox observamos que cuando un tejido es sensible lo es a múltiples fármacos.

El porcentaje de ACCRs resistentes a capecitabina fue considerablemente más alta que la resistencia a 5FUOL o a oxaliplatino/capecitabina determinada en muestras pareadas.

El cultivo y purificación de CMT de CCR, mantiene la expresión de CD44 y CD24 y resistencia a los tratamientos de 5FUOL.

El éxito en el aislamiento de las CMT depende, en gran medida, del estadio tumoral, y del tamaño de la muestra.

Los genes expresados diferencialmente, en forma estadísticamente significativa, implicados en la resistencia a 5FUOL de las CMT son KRT18, ABCB1 y BNIP3.

Las funciones de los tres genes identificados como los más relevantes en la resistencia de las CMT-ACCRs a 5FUOL son las siguientes: 1) eliminar de las CMT los fármacos evaluados mediante bombas de eflujo; 2) inducir autofagia y con ello favorecer la supervivencia de las células malignas y 3) metabolizar los fármacos, neutralizando su citotoxicidad

Estas conclusiones confirman nuestra hipótesis.

12. Perspectivas

1. Incrementar el número de muestras para hacer el análisis (tanto de tejidos tumorales como aislados de CMT).
2. Evaluar si existen mutaciones en los genes sobre-expresados por las CMT.
3. Desarrollar y evaluar una prueba rápida de respuesta al tratamiento en pacientes con CCR basado en el % de CMT y la expresión de KRT-18, ABCB1 y BNIP3. Estos genes son posibles marcadores de resistencia.
4. Establecer una modelo *in vivo* de resistencia para evaluar el tratamiento dirigido contra anti-KRT-18 o anti-BNIP3
5. Evaluar la diferencia de expresión y la respuesta clínica de los pacientes.

13. Referencias.

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin.* 2017;67(1):7-30. doi:10.3322/caac.21387.
2. Karahalios a., English DR, Simpson J a. Weight Change and Risk of Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Epidemiol.* 2015;181(11):832-845. doi:10.1093/aje/kwu357.
3. Matsumoto S, Nishimura T, Kanai M, et al. Safety and efficacy of modified FOLFOX6 for treatment of metastatic or locally advanced colorectal cancer: A single-institution outcome study. *Chemotherapy.* 2008;54(5):395-403. doi:10.1159/000154921.
4. G. R, M. C, A. G, et al. Dose intensity and toxicity of adjuvant XELOX and FOLFOX in over 65 years colon cancer patients. *Ann Oncol.* 2011;22:v119.
<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L71716439%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdr287%5Cnhttp://sfx.library.uu.nl/utrecht?sid=EMBASE&issn=09237534&id=doi:10.1093%2Fannonc%2Fmdr287&atitle=Dose+intensity+and+toxicity+>.
5. Soveri LM, Hermunen K, De Gramont A, et al. Association of adverse events and survival in colorectal cancer patients treated with adjuvant 5-fluorouracil and leucovorin: Is efficacy an impact of toxicity? *Eur J Cancer.* 2014;50(17):2966-2974. doi:10.1016/j.ejca.2014.08.017.
6. Cao Y, Tan A, Gao F, Liu L, Liao C, Mo Z. A meta-analysis of randomized controlled trials comparing chemotherapy plus bevacizumab with chemotherapy alone in metastatic colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis.* 2009;24(6):677-685. doi:10.1007/s00384-009-0655-9.
7. Bao B, Ahmad A, Azmi AS, Ali S, Sarkar FH. Overview of cancer stem cells (CSCS) and mechanisms of their regulation: Implications for cancer therapy. *Curr Protoc Pharmacol.* 2013;(SUPPL.61). doi:10.1002/0471141755.ph1425s61.
8. Rowehl RA, Burke S, Bialkowska AB, et al. Establishment of highly tumorigenic human colorectal cancer cell line (CR4) with properties of putative cancer stem cells.

- PLoS One.* 2014;9(6). doi:10.1371/journal.pone.0099091.
9. Rao G, Liu H, Li B, et al. Establishment of a human colorectal cancer cell line P6C with stem cell properties and resistance to chemotherapeutic drugs. *Acta Pharmacol Sin.* 2013;34(6):793-804. doi:10.1038/aps.2013.56.
 10. D'Arcangelo M, Todaro M, Salvini J, et al. Cancer stem cells sensitivity assay (STELLA) in patients with advanced lung and colorectal cancer: A feasibility study. *PLoS One.* 2015;10(5). doi:10.1371/journal.pone.0125037.
 11. Del Rio M, Molina F, Bascoul-Mollevi C, et al. Gene expression signature in advanced colorectal cancer patients select drugs and response for the use of leucovorin, fluorouracil, and irinotecan. *J Clin Oncol.* 2007;25(7):773-780. doi:10.1200/JCO.2006.07.4187.
 12. Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer. In: *The Lancet.* Vol 383. ; 2014:1490-1502. doi:10.1016/S0140-6736(13)61649-9.
 13. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015;65(2):87-108. doi:10.3322/caac.21262 [doi].
 14. Aldaco-Sarvide, F, Pérez-Pérez, P, Cervantes-Sánchez, G T-, Torres, L, Erazo-V A. *Mortalidad Por Cáncer En México 2000-2010: El Recuento de Los Daños.* Vol 11.; 2012. http://www.smeo.org.mx/gaceta/2012/GAMOV11_6_2012.pdf.
 15. Rizo Ríos P, González Rivera A, Sánchez Cervantes F, Murguía Martínez P. Tendencia de la mortalidad por cáncer en México: 1990-2012. *Evid Médica e Investig en salud.* 2015;8(1):5-15.
 16. Hano García OM, Wood Rodríguez L, Galbán García E, Abreu Vázquez M del R. Factores de riesgo para el cáncer colorrectal. *Rev Cubana Med.* 2011;50(2):118-132.
 17. Delgado-González P, Said-Fernandez S, García-González IS, Garza-Treviño EN, Padilla-Rivas GR, Flores-Gutiérrez JP, Muñoz-Maldonado GE, Treviño-Lozano MA, González-Guerrero JF M-RH. Cáncer colorrectal en Nuevo León : factores de riesgo, hallazgos clínicos y cambios en el desempeño físico de los pacientes a los 12 meses de postcirugía. *Salud Publica Mex.* 2016.

18. Fairley TL, Cardinez CJ, Martin J, et al. Colorectal cancer in U.S. adults younger than 50 years of age, 1998-2001. *Cancer*. 2006;107(SUPPL.):1153-1161. doi:10.1002/cncr.22012.
19. Song M, Garrett WS, Chan AT. Nutrients, foods, and colorectal cancer prevention. *Gastroenterology*. 2015;148(6):1244-1260. doi:10.1053/j.gastro.2014.12.035.
20. Pericleous M, Mandair D, Caplin ME. Diet and supplements and their impact on colorectal cancer. *J Gastrointest Oncol*. 2013;4(4):409-423. doi:10.3978/j.issn.2078-6891.2013.003.
21. Heitman SJ, Ronksley PE, Hilsden RJ, Manns BJ, Rostom A, Hemmelgarn BR. Prevalence of Adenomas and Colorectal Cancer in Average Risk Individuals: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2009;7(12):1272-1278. doi:10.1016/j.cgh.2009.05.032.
22. Todaro M, Francipane MG, Medema JP, Stassi G. Colon Cancer Stem Cells: Promise of Targeted Therapy. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2151-2162. doi:10.1053/j.gastro.2009.12.063.
23. Bjerknes M, Cheng H. Intestinal Epithelial Stem Cells and Progenitors. *Methods Enzymol*. 2006;419:337-383. doi:10.1016/S0076-6879(06)19014-X.
24. Lin SA, Barker N. Gastrointestinal stem cells in self-renewal and cancer. *J Gastroenterol*. 2011;46(9):1039-1055. doi:10.1007/s00535-011-0424-8.
25. Brittan M, Wright NA. The gastrointestinal stem cell. *Cell Prolif*. 2004;37(1):35-53. doi:10.1111/j.1365-2184.2004.00299.x.
26. MÓRAN A., ORTEGA P., JUAN C de; et. al. Differential colorectal carcinogenesis: Molecular basis and clinical relevance. *World J Gastrointest Oncol*. 2010;2(3):151-158. doi:10.4251/wjgo.v2.i3.151.
27. Jackson-Thompson J, Ahmed F, German R, Lai S, Friedman C. Descriptive epidemiology of colorectal cancer in the United States, 1998-2001. *Cancer*. 2006;107(Suppl.):1103-1111. doi:10.1002/cncr.22007.
28. Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular Basis of Colorectal Cancer. *N Engl J Med*.

- 2009;361(25):2449-2460. doi:10.1056/NEJMra0804588.
29. Bosman F, Yan P. Molecular pathology of colorectal cancer. *Pol J Pathol.* 2014;65(4):257-266. doi:10.5114/pjp.2014.48094.
30. Failli A, Consolini R, Legitimo A, et al. The challenge of culturing human colorectal tumor cells: Establishment of a cell culture model by the comparison of different methodological approaches. *Tumori.* 2009;95(3):343-347.
31. Chao C, Tallman ML, Ives KL, Townsend CM, Hellmich MR. Gastrointestinal hormone receptors in primary human colorectal carcinomas. *J Surg Res.* 2005;129(2):313-321. doi:10.1016/j.jss.2005.04.038.
32. Phelps RA, Chidester S, Dehghanizadeh S, et al. A Two-Step Model for Colon Adenoma Initiation and Progression Caused by APC Loss. *Cell.* 2009;137(4):623-634. doi:10.1016/j.cell.2009.02.037.
33. Worthley DL, Whitehall VL, Spring KJ, Leggett BA. Colorectal carcinogenesis: Road maps to cancer. *World J Gastroenterol.* 2007;13(28):3784-3791. doi:10.3748/wjg.v13.i28.3784.
34. Armaghany T, Wilson JD, Chu Q, Mills G. Genetic alterations in colorectal cancer. *Gastrointest Cancer Res.* 2012;5(1):19-27.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22574233> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3348713/>
35. Garza-Treviño EN, Said-Fernández SL, Martínez-Rodríguez HG. Understanding the colon cancer stem cells and perspectives on treatment. doi:10.1186/s12935-015-0163-7.
36. Ford AC, Veldhuyzen van Zanten SJO, Rodgers CC, Talley NJ, Vakil NB, Moayyedi P. Diagnostic utility of alarm features for colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. *Gut.* 2008;57(11):1545-1553. doi:10.1136/gut.2008.159723.
37. Tanaka T, Tanaka M, Tanaka T, Ishigamori R. Biomarkers for colorectal cancer. *Int J Mol Sci.* 2010;11(9):3209-3225. doi:10.3390/ijms11093209.
38. André T, Boni C, Navarro M, et al. Improved overall survival with oxaliplatin,

- fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *J Clin Oncol.* 2009;27(19):3109-3116. doi:10.1200/JCO.2008.20.6771.
39. Colak S, Medema JP. Human colonic fibroblasts regulate stemness and chemotherapy resistance of colon cancer stem cells. *Cell Cycle.* 2016;15(12):1531-1537. doi:10.4161/15384101.2014.973321.
40. Nguyen L V., Vanner R, Dirks P, Eaves CJ. Cancer stem cells: an evolving concept. *Nat Rev Cancer.* 2012. doi:10.1038/nrc3184.
41. Deonarain MP, Kousparou CA, Epenetos AA. Antibodies targeting cancer stem cells: A new paradigm in immunotherapy? *MAbs.* 2014;1(1):12-25. doi:10.4161/mabs.1.1.7347.
42. Sampieri K, Fodde R. Cancer stem cells and metastasis. *Semin Cancer Biol.* 2012;22(3):187-193. doi:10.1016/j.semcaner.2012.03.002.
43. de Sousa e Melo F, Vermeulen L. Wnt signaling in cancer stem cell biology. *Cancers (Basel).* 2016;8(7). doi:10.3390/cancers8070060.
44. Basu S, Haase G, Ben-Ze'ev A. Wnt signaling in cancer stem cells and colon cancer metastasis. *F1000Research.* 2016;5:699. doi:10.12688/f1000research.7579.1.
45. Reiman JM, Knutson KL, Radisky DC. Immune promotion of epithelial-mesenchymal transition and generation of breast cancer stem cells. *Cancer Res.* 2010;70(8):3005-3008. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4041.
46. Yiu AJ, Yiu CY. Biomarkers in colorectal cancer. In: *Anticancer Research.* Vol 36. ; 2016:1093-1102. doi:10.1007/s12094-010-0502-z.
47. Rubio D, Garcia-Castro J, Martín MC, et al. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res.* 2005;65(8):3035-3039. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-4194.
48. Jung S, Panchalingam KM, Rosenberg L, Behie LA. Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells in defined serum-free media. *Stem Cells Int.* 2012. doi:10.1155/2012/123030.

49. Gupta SC, Kim JH, Prasad S, Aggarwal BB. Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals. *Cancer Metastasis Rev.* 2010;29(3):405-434. doi:10.1007/s10555-010-9235-2.
50. Li L, Bhatia R. Stem cell quiescence. *Clin Cancer Res.* 2011;17(15):4936-4941. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-1499.
51. Kobayashi S, Yamada-Okabe H, Suzuki M, et al. LGR5-positive colon cancer stem cells interconvert with drug-resistant LGR5-negative cells and are capable of tumor reconstitution. *Stem Cells.* 2012;30(12):2631-2644. doi:10.1002/stem.1257.
52. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
53. Dallas NA, Xia L, Fan F, et al. Chemoresistant colorectal cancer cells, the cancer stem cell phenotype, and increased sensitivity to insulin-like growth factor-I receptor inhibition. *Cancer Res.* 2009;69(5):1951-1957. doi:10.1158/0008-5472.can-08-2023.
54. Yan K, Chia L, Li X. The intestinal stem cell markers Bmi1 and Lgr5 identify two functionally distinct populations. *Pnas.* 2012;109(2):466-471. doi:10.1073/pnas.1118857109/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1118857109.
55. Taipale J, Beachy PA. The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature.* 2001;411(6835):349-354. doi:10.1038/35077219.
56. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med.* 1997;3(7):730-737. doi:10.1038/nm0797-730.
57. Najbauer J, Kraljik N, Németh P. Glioma Stem Cells: Markers, Hallmarks and Therapeutic Targeting by Metformin. *Pathol Oncol Res.* 2014;20(4):789-797. doi:10.1007/s12253-014-9837-z.
58. La Porta CAM, Zapperi S. Human breast and melanoma cancer stem cells biomarkers. *Cancer Lett.* 2013;338(1):69-73. doi:10.1016/j.canlet.2012.03.017.

59. Wang G, Wang Z, Sarkar FH, Wei W. Targeting prostate cancer stem cells for cancer therapy. *Discov Med.* 2012;13(69):135-142.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3367460/>&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.
60. Dorado J, Lonardo E, Miranda-Lorenzo I, Heeschen C. Pancreatic cancer stem cells: New insights and perspectives. *J Gastroenterol.* 2011;46(8):966-973.
doi:10.1007/s00535-011-0422-x.
61. Shmelkov S V., Butler JM, Hooper AT, et al. CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133 + and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors. *J Clin Invest.* 2008;118(6):2111-2120. doi:10.1172/JCI34401.
62. Hu Y, Fu L. Targeting cancer stem cells: a new therapy to cure cancer patients. *Am J Cancer Res.* 2012;2(3):340-356.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3365812/>&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.
63. Langan RC, Mullinax JE, Ray S, Raiji MT, Schaub N, Xin HW, Koizumi T, Steinberg SM, Anderson A, Wiegand G, Butcher D, Anver M, Bilchik AJ, Stojadinovic A, Rudloff U AI. A Pilot Study Assessing the Potential Role of non-CD133 Colorectal Cancer Stem Cells as Biomarkers. *J cancer.* 2012;3.
64. Hongo K, Tanaka J, Tsuno NH, et al. CD133(-) Cells, Derived From a Single Human Colon Cancer Cell Line, Are More Resistant to 5-Fluorouracil (FU) Than CD133(+) Cells, Dependent on the beta 1-Integrin Signaling. *J Surg Res.* 2012;175(2):278-288.
doi:10.1016/j.jss.2011.03.076.
65. Cammareri P, Lombardo Y, Francipane MG, Bonventre S, Todaro M, Stassi G. Isolation and Culture of Colon Cancer Stem Cells. *Methods Cell Biol.* 2008;86:311-324. doi:10.1016/S0091-679X(08)00014-9.
66. Botchkina IL, Botchkina IL, Rowehl RA, et al. Phenotypic subpopulations of metastatic colon cancer stem cells: genomic analysis. *Cancer Genomics Proteomics.* 2009;6(1):19-29.
<http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=19451087&r>

- etmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers2://publication/uuid/6BC21668-3AE8-46DE-98E1-7D07CF23A436.
67. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*. 2007;445(7123):106-110. doi:10.1038/nature05372.
 68. Du L, Wang H, He L, et al. CD44 is of functional importance for colorectal cancer stem cells. *Clin Cancer Res*. 2008;14(21):6751-6760. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1034.
 69. Yan Y, Zuo X, Wei D. Concise Review: Emerging Role of CD44 in Cancer Stem Cells: A Promising Biomarker and Therapeutic Target. *Stem Cells Transl Med*. 2015;4(9):1033-1043. doi:10.5966/sctm.2015-0048.
 70. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *PNAS*. 2003;100(11):3983-3988. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2018.
 71. Cho SH, Park YS, Kim HJ, et al. CD44 enhances the epithelial-mesenchymal transition in association with colon cancer invasion. *Int J Oncol*. 2012;41(1):211-218. doi:10.3892/ijo.2012.1453.
 72. Polyak K, Hahn WC. Roots and stems: stem cells in cancer. *Nat Med*. 2006;12(3):296-300. doi:10.1038/nm1379.
 73. Trapasso S, Allegra E. Role of CD44 as a marker of cancer stem cells in head and neck cancer. *Biol Targets Ther*. 2012;6:379-383. doi:10.2147/BTT.S37906.
 74. Aigner S, Ramos CL, Hafezi-Moghadam A, et al. CD24 mediates rolling of breast carcinoma cells on P-selectin. *FASEB J*. 1998;12(12):1241-1251.
 75. Jaggupilli A, Elkord E. Significance of CD44 and CD24 as cancer stem cell markers: An enduring ambiguity. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012. doi:10.1155/2012/708036.
 76. Yeung TM, Gandhi SC, Wilding JL, Muschel R, Bodmer WF. Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(8):3722-3727. doi:10.1073/pnas.0915135107.

77. Chen W, Zhang X, Chu C, et al. Identification of CD44+ Cancer Stem Cells in Human Gastric Cancer. *Hepatogastroenterology*. 2013;60(124):949-954.
doi:10.5754/hge12881.
78. Jijiwa M, Demir H, Gupta S, et al. CD44V6 regulates growth of brain tumor stem cells partially through the AKT-mediated pathway. *PLoS One*. 2011;6(9).
doi:10.1371/journal.pone.0024217.
79. Deng J, Gao G, Wang L, Wang T, Yu J, Zhao Z. CD24 expression as a marker for predicting clinical outcome in human gliomas. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:517172. doi:10.1155/2012/517172.
80. Aomatsu N, Yashiro M, Kashiwagi S, et al. CD133 Is a Useful Surrogate Marker for Predicting Chemosensitivity to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. *PLoS One*. 2012;7(9). doi:10.1371/journal.pone.0045865.
81. Kristiansen G, Winzer K-J, Mayordomo E, et al. CD24 expression is a new prognostic marker in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2003;9:4906-4913.
82. Chen S, Song X, Chen Z, et al. CD133 Expression and the Prognosis of Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2013;8(2).
doi:10.1371/journal.pone.0056380.
83. Weichert W, Denkert C, Burkhardt M, et al. Cytoplasmic CD24 expression in colorectal cancer independently correlates with shortened patient survival. *Clin Cancer Res*. 2005;11(18):6574-6581. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-0606.
84. Pang R, Law WL, Chu ACY, et al. A subpopulation of CD26 + cancer stem cells with metastatic capacity in human colorectal cancer. *Cell Stem Cell*. 2010;6(6):603-615.
doi:10.1016/j.stem.2010.04.001.
85. Maeda K, Ding Q, Yoshimitsu M, et al. CD133 Modulates HIF-1?? Expression under Hypoxia in EMT Phenotype Pancreatic Cancer Stem-Like Cells. *Int J Mol Sci*. 2016;17(7). doi:10.3390/ijms17071025.
86. Li XP, Zhang XW, Zheng LZ, Guo WJ. Expression of CD44 in pancreatic cancer and its significance. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(6):6724-6731. doi:10.3969/j.issn.1674-

8115.2015.09.022.

87. Sugino T, Gorham H, Yoshida K, et al. Progressive loss of CD44 gene expression in invasive bladder cancer. *Am J Pathol*. 1996;149(3):873-882.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC13865145/>
88. Choi Y La, Lee SH, Kwon GY, et al. Overexpression of CD24: Association with invasiveness in urothelial carcinoma of the bladder. *Arch Pathol Lab Med*. 2007;131(2):275-281. doi:10.1043/1543-2165(2007)131[275:OOCAWI]2.0.CO;2.
89. Brabertz S, Schmalhofer O, Brabertz T. Gastrointestinal stem cells in development and cancer. *J Pathol*. 2009;217(2):307-317. doi:10.1002/path.2475.
90. Roy S, Majumdar AP. Signaling in colon cancer stem cells. *J Mol Signal*. 2012;7(1):11. doi:10.1186/1750-2187-7-11.
91. Verma M, Sarfaty M, Brooks D, et al. Population-based programs for increasing colorectal cancer screening in the United States. *CA Cancer J Clin*. 2015;65(6 PG-496-510):496-510. doi:10.3322/caac.21295.
92. Belov L, Zhou J, Christopherson RI. Cell Surface Markers in Colorectal Cancer Prognosis. *Int J Mol Sci*. 2010;12(1):78-113. doi:10.3390/ijms12010078.
93. Zhao Y, Butler EB, Tan M. Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics. *Cell Death Dis*. 2013;4(3):e532. doi:10.1038/cddis.2013.60.
94. Wu C-P, Calcagno AM, Ambudkar S V. Reversal of ABC drug transporter-mediated multidrug resistance in cancer cells: evaluation of current strategies. *Curr Mol Pharmacol*. 2008;1(2):93-105. doi:10.2174/1874467210801020093.
95. Engelman JA, Zejnullah K, Mitsudomi T, et al. MET Amplification Leads to Gefitinib Resistance in Lung Cancer by Activating ERBB3 Signaling. *Science (80-)*. 2007;316(5827):1039-1043. doi:10.1126/science.1141478.
96. Kothari S, Cizeau J, McMillan-Ward E, et al. BNIP3 plays a role in hypoxic cell death in human epithelial cells that is inhibited by growth factors EGF and IGF. *Oncogene*. 2003;22(30):4734-4744. doi:10.1038/sj.onc.1206666.

97. Mayes PA, Campbell L, Ricci MS, Plastaras JP, Dicker DT, El-Deiry WS. Modulation of TRAIL-induced tumor cell apoptosis in a hypoxic environment. *Cancer Biol Ther.* 2005;4(10):1068-1074. doi:2255 [pii].
98. Singh A, Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene.* 2010;29(34):4741-4751. doi:10.1038/onc.2010.215.
99. Naujokat C. Targeting Human Cancer Stem Cells with Monoclonal Antibodies. *J Clin Cell Immunol.* 2012;1(S5). doi:10.4172/2155-9899.S5-007.
100. Ochiai T, Nishimura K, Watanabe T, et al. Individualized chemotherapy for colorectal cancer based on the collagen gel droplet-embedded drug sensitivity test. *Oncol Lett.* 2012;4(4):621-624. doi:10.3892/ol.2012.823.
101. Lee H, Park J, Kim J-H, et al. The ATP-based doublet chemotherapy response assay for un-resectable advanced gastric cancer; a single center, prospective, randomized controlled study. *Gastrointest Endosc.* 2012;75(4 suppl. 1):Ab236. doi:10.1016/j.gie.2012.04.180.
102. Lee JH, Kim MC, Oh SY, et al. Predictive value of in vitro adenosine triphosphate-based chemotherapy response assay in advanced gastric cancer patients who received oral 5-fluorouracil after curative resection. *Cancer Res Treat.* 2011;43(2):117-123. doi:10.4143/crt.2011.43.2.117.
103. Kang SM, Park MS, Chang J, et al. A feasibility study of adenosine triphosphate-based chemotherapy response assay (ATP-CRA) as a chemosensitivity test for lung cancer. *Cancer Res Treat.* 2005;37(4):223-227. doi:10.4143/crt.2005.37.4.223.
104. Jung WH, Yoon AP, Eun JJ, Kang YL, Ji EK, Sohn SK. Complete remission of unresectable colon cancer after preoperative chemotherapy selected by adenosine triphosphate-based chemotherapy response assay. *J Korean Med Sci.* 2008;23(5):916-919. doi:10.3346/jkms.2008.23.5.916.
105. Kim HA, Yom CK, Moon BI, et al. The use of an in vitro adenosine triphosphate-based chemotherapy response assay to predict therapeutic response in breast cancer. *Breast.* 2008;17(1):19-26. doi:10.1016/j.breast.2007.06.001.

106. Park S, Woo Y, Kim H, et al. In vitro adenosine triphosphate based chemotherapy response assay in gastric cancer. *J Gastric Cancer*. 2010;10(4):155-161. doi:10.5230/jgc.2010.10.4.155.
107. Matsuo K, Bond VK, Im DD, Rosenshein NB. Prediction of Chemotherapy Response With Platinum and Taxane in the Advanced Stage of Ovarian and Uterine Carcinosarcoma: A Clinical Implication of In vitro Drug Resistance Assay. *Am J Clin Oncol*. 2010;33(4):358-363. doi:10.1097/COC.0b013e3181af30d3.
108. Xu X, Zhang Y, Williams J, et al. Parallel comparison of Illumina RNA-Seq and Affymetrix microarray platforms on transcriptomic profiles generated from 5-aza-deoxy-cytidine treated HT-29 colon cancer cells and simulated datasets. *BMC Bioinformatics*. 2013;14(Suppl 9):S1. doi:10.1186/1471-2105-14-S9-S1.
109. Delgado-Gonzalez P. Estudio sociodemografico y clínico del CCR en Nuevo León y análisis de la sensibilidad a medicamento de primera línea en cultivos primarios de tumores colorrectales.
110. Hoff P, Pazdur R. UFT Plus Oral Leucovorin: A New Oral Treatment for Colorectal Cancer. *Oncologist*. 1998;3(3):155-164.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10388099>.
111. Jung WH, Yoon AP, Kang YL, Sohn SK. Heterogeneity of adenosine triphosphate-based chemotherapy response assay in colorectal cancer - Secondary publication. *Yonsei Med J*. 2009;50(5):697-703. doi:10.3349/ymj.2009.50.5.697.
112. Reigner B, Blesch K, Weidekamm E. Clinical Pharmacokinetics of Capecitabine. *Clin Pharmacokinet*. 2001;40(2):85-104. doi:10.2165/00003088-200140020-00002.
113. Elsa N.Garza-Trevino , Martha S.Rodriguez-Gonzalez PD, Gonzalez , Yesenia G.Alonso-Cruz , Adolfo Soto-Dominguez JFG, Guerrero , Yanko Castro-Govea , Emiliano Michel Sanchez SS, Fernandez HGM-R. Remarkably higher efficacy and a wider safety window for nonfrontline over first-line drug combinations in the adenocarcinoma Colo 320DM cell line. *JBUON*. 2017.
114. Hirsch BR, Yousuf Zafar S. Capecitabine in the management of colorectal cancer. *Cancer Manag Res*. 2011;3(1):79-89. doi:10.2147/CMR.S11250.

115. Ducreux M, Bennouna J, Hebbar M, et al. Capecitabine plus oxaliplatin (XELOX) versus 5-fluorouracil/ leucovorin plus oxaliplatin (FOLFOX-6) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2011;128:682-690.
116. André T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, et al. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med.* 2004;350(23):2343-2351.
doi:10.1056/NEJMoa032709.
117. Kwon HY, Im-kyung Kim JK, Sohn S-K, Lee KY. In Vitro Adenosine Triphosphate-Based Chemotherapy Response Assay as a Predictor of Clinical Response to Fluorouracil-Based Adjuvant Chemotherapy in Stage II Colorectal Cancer. *Cancer Res Treat.* 2016;48:970-977.
118. Samarasinghe B. The Hallmarks of Cancer 6: Tissue Invasion and Metastasis. *Sci Am.* 2013;1-16. <http://blogs.scientificamerican.com/guest-blog/the-hallmarks-of-cancer-6-tissue-invasion-and-metastasis/>.
119. Carlos-González-Villarreal, Herminia Guadalupe Martínez-Rodríguez SS-F. How desirable and undesirable features of naïve or genetically reengineered mesenchymal stem cells are being considered in preclinical or clinical assays. *JBUON.*
120. Bayarsaihan D. Epigenetic Mechanisms in Inflammation. *J Dent Res.* 2011;90(1):9-17. doi:10.1177/0022034510378683.
121. Ducasse M, Brown MA. Epigenetic aberrations and cancer. *Mol Cancer.* 2006;5:60. doi:10.1186/1476-4598-5-60.
122. Sahlberg SH, Spiegelberg D, Glimelius B, Stenerlöw B, Nestor M. Evaluation of cancer stem cell markers CD133, CD44, CD24: Association with AKT isoforms and radiation resistance in colon cancer cells. *PLoS One.* 2014;9(4). doi:10.1371/journal.pone.0094621.
123. Inoda S, Hirohashi Y, Torigoe T, et al. Cytotoxic T lymphocytes efficiently recognize human colon cancer stem-like cells. *Am J Pathol.* 2011;178(4):1805-1813. doi:10.1016/j.ajpath.2011.01.004.

124. Moitra K. Overcoming Multidrug Resistance in Cancer Stem Cells. *Biomed Res Int.* 2015;2015. doi:10.1155/2015/635745.
125. De Angelis ML, Zeuner A, Policicchio E, et al. Cancer Stem Cell-Based Models of Colorectal Cancer Reveal Molecular Determinants of Therapy Resistance. *Stem Cells Transl Med.* 2016;5(4):511-523. doi:10.5966/sctm.2015-0214.
126. Govindarajan A, Paty PB. Predictive markers of colorectal cancer liver metastases. *Future Oncol.* 2011;7(2):299-307. doi:10.2217/fon.10.184.
127. Zhang J-Y, Zhang F, Hong C-Q, et al. Critical protein GAPDH and its regulatory mechanisms in cancer cells. *Cancer Biol Med.* 2015;12(January):10-22. doi:10.7497/j.issn.2095-3941.2014.0019.
128. Huang R, Tang Q, You Q, et al. Disparity expression of Notch1 in benign and malignant colorectal diseases. *PLoS One.* 2013;8(12). doi:10.1371/journal.pone.0081005.
129. Lampropoulos P, Zizi-Sermpetzoglou A, Rizos S, Kostakis A, Nikiteas N, Papavassiliou AG. TGF-beta signalling in colon carcinogenesis. *Cancer Lett.* 2012;314(1):1-7. doi:10.1016/j.canlet.2011.09.041.
130. Bakker WJ, Harris IS, Mak TW. FOXO3a Is Activated in Response to Hypoxic Stress and Inhibits HIF1-Induced Apoptosis via Regulation of CITED2. *Mol Cell.* 2007;28(6):941-953. doi:10.1016/j.molcel.2007.10.035.
131. Liu YS, Hsu HC, Tseng KC, Chen HC, Chen SJ. Lgr5 promotes cancer stemness and confers chemoresistance through ABCB1 in colorectal cancer. *Biomed Pharmacother.* 2013;67(8):791-799. doi:10.1016/j.biopharm.2013.08.001.
132. Lim SH, Spring KJ, De Souza P, Mackenzie S, Bokey L. Circulating tumour cells and circulating nucleic acids as a measure of tumour dissemination in non-metastatic colorectal cancer surgery. *Eur J Surg Oncol.* 2015;41(3):309-314. doi:10.1016/j.ejso.2014.12.005.
133. Zhang J, Ney PA. Role of BNIP3 and NIX in cell death, autophagy, and mitophagy. *Cell Death Differ.* 2009;16(7):939-946. doi:10.1038/cdd.2009.16.

134. Negrei C, Hudita A, Ginghina O, et al. Colon Cancer Cells Gene Expression Signature As Response to 5- Fluorouracil, Oxaliplatin, and Folinic Acid Treatment. *Front Pharmacol.* 2016;7(June):172. doi:10.3389/fphar.2016.00172.
135. Kumar R, Chaudhary K, Gupta S, et al. CancerDR: cancer drug resistance database. *Sci Rep.* 2013;3(Figure 1):1445. doi:10.1038/srep01445.

ANEXO 1: Reactivos

Reactivos (grado reactivo, a menos que se especifique otra cosa) y medios de cultivo

ABCAM, Cambridge, MA, USA.

Anticuerpos monoclonales de ratón anti-CD44 conjugado con PE CY7.
Anticuerpos monoclonales de ratón anti-CD24 conjugado con FITC
Kit de inmunohistoquímica (ab64264)

Corning, Manassas, VA, USA

Aqua, grado biología molecular
Suero bovino fetal 35-010-CV .

CTR Scientific, Monterrey, N.L, México

Acetona
Metanol
Xileno

EMSURE/Merk, Darmstadt, Alemania.

Etanol absoluto.

Fisher México, S. de R.L. de C.V. San Nicolás de los Garza, N.L. México

Bicarbonato de sodio

Gibco/Invitrogen Grand Island, NY, USA.

Colagenasa tipo I de *Clostridium histolyticum*. 215,000 UI/mg
Gentamicina 10 mg/mL
IMDM
Medio de cultivo DMEM-F12
RPMI
Suero fetal bovino.
Tripsina 0.25% con EDTA (1X)

Promega Corporation, Madison, WI, USA.

ATP-CRA. CellTiter-Glo® Luminecent Cell Viability Assay

Peprotech, Rocky Hill NJ, USA

bFGF 100-18B
bEGF AF-100-15

QIAGEN, Strasse, Hilde, Germany

RNEASY PLUS MINI KIT
RNA LATER

Signa Aldrich, St. Louis, MO, USA

Azul Tripán
Capecitabina
Dimetilsulfóxido
HEPES
L-glutamina
Poly-L-lisina
Tween 20
TRIS-EDTA

Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA

DAPI medio de montaje

Fármacos evaluados

5-FU 250mg/5mL Lote L14G008 Caducidad Junio 2017. PISA- Lemery, S.A. de C.V.,D.F., México.

Oxaliplatino 50mg/10mL LoteFH040A Caducidad Junio 2017. TEVA- Lemery, S.A. de C.V.,D.F., México.

Leucovorina Lote C14D704 Caducidad Diciembre 2017 PISA Lemery, S.A. de C.V.,D.F., México.

Capecitabina SIGMA, St. Louis, MO, USA.

ANEXO 2: Consumibles

Corning Incorporated, Corning, NY, USA.

Tubos de 15mL estériles con tapón de rosca.

Tubos de 50mL estériles con tapón de rosca.

Botellas de cultivo de 25cm² con tapón de rosca.

Botellas de cultivo de 75cm² con tapón de rosca.

Costar-Corning Incorporated, Corning, NY, USA.

Placas de 96 pozos de ultra baja adherencia transparente con fondo redondo.

Thermo Scientific-ThermoFisher Scientific, Vantaa, Finland.

Placas de 96 pozos blancas para luminiscencia con fondo plano

Beckman Coulter, Brea, USA

Agencourt AMPure -XP

Miltenyi, MACS Lindbergh, Auburn, USA.

Microperlas CD44 Lot 515087067

Beckton Dickinson NJ, USA.

Jeringa de insulina

ANEXO 3: Equipo

Nikon Eclipse 50i Camara Digital Sight DS-2MV. XCite120 EXFO con software ENIS-Elements B12 Modelo 2.30.

Microscopio invertido, Modelo VE-403, Velab.

Microcentrifuga Centrifuge 5415. Eppendorf North America, Inc., Westbury, N.Y., USA

Equipo lector de Microplacas Marca Biotek Modelo Cytaion 3M. BioTek Instruments Inc. Winooski, Vermont, USA.

Bioanalyzer 2100 Agilent Technologies, Inc. Waldbronn, Germany.

MiSeq marca Illumina, Inc. San Diego, California, USA

Termociclador

Incubadora de microplacas Hybrex, SciGene Corporation, Sunnyvale, USA

Centrifuga Dynac Modelo: 420101. Becton Dikinson Primary Core Diagnostics, Sparks, MD, USA.

Centrifuga 5415. Eppendorf North America, Inc., Westbury, N.Y., USA

Campana de flujo laminar clase II Modelo 36212-04. Labconco Corporation Kansas, Missouri, USA.

Incubadora con inyector de CO₂ y humedad Modelo MCO-20IAC. Marca PANASONIC, SANYO. MCO-20AIC. Panasonic Healthcare Co., Ltd., Gunma, Japan

ANEXO 4: Soluciones

Medio para aislar y mantener CMT

DMEM F12 suplementado con los siguientes reactivos:

Glucosa	6 mg /mL
NaHCO ₃	1 mg de /mL
HEPES	5 mM
Glutamina	2 mM
Heparina	4 µg /mL
SAB	4mg /mL,
bFGF	10 ng de /mL
EGF	20 ng/mL
Transferrina humana	100 µg /mL
Insulina	25 µg /mL
Putrescina	9.6 µg /mL
Selenito de sodio	30 nM
Progesterona	20 nM

Mezclar la colagenasa con el PBS y agitarla hasta disolver todos los grumos para posteriormente esterilizarla mediante filtración y adicionar antibiótico y antimicótico.

Medio de disagregación de tejido y tumores colorectales-

RPMI	20 mL
Gentamicina (10mg/mL)	100µL (concentración final 50µg/mL)
Anfotericina B (2.5mg/mL)	20µL (concentración final 2.5µg/mL)

Este medio de cultivo no se le debe suplementar con suero fetal bovino.

Fijador Metanol/acetona

Se prepara una mezcla 1:1 (v:v) de metanol y acetona absolutos y se almacena en refrigeración para evitar evaporación.

PBS

Cloruro de Potasio	0.106 gr
Fosfato de Potasio	0.102 gr
Cloruro de Sodio	4.09 gr
Fosfato de Sodio	0.798 gr

Ajustar el pH a 7.4 y aforar a 500mL con agua MiliQ para esterilizar por autoclave.

PBS 1X con antibiótico y antimicótico-

Gentamicina (10mg/mL)	250µL (concentración final 50µg/mL)
Anfotericina B (2.5mg/mL)	50µL (concentración final 2.5µg/mL)
PBS	50mL

Mezclar bien y almacenar a 4°C en frascos de vidrio con tapón de rosca.

RPMI suplementado-

Medio RPMI	44.7mL
Gentamicina (10mg/mL)	250µL (concentración final 50µg/mL)
Anfotericina B (2.5mg/mL)	50µL (concentración final 2.5µg/mL)
SFB	5.0 mL

Solución de colagenasa tipo I

Colagenasa tipo I	40 mg
PBS	20 mL
<i>Mezclar la colagenasa con el PBS y agitarla hasta disolver todos los grumos.</i>	
<i>Posteriormente esterilizar la solución mediante filtración con un filtro para jeringa con poros de 0.22µM y adicionar antibiótico y el antimicótico.</i>	
Gentamicina (10mg/mL)	100µL (concentración final 50µg/mL)
Anfotericina B (2.5mg/mL)	20µL (concentración final 2.5µg/mL).

Etanol al 70%-

Etanol absoluto grado molecular	70 mL
Agua Mili Q	Aforar a 100 mL
<i>Azul Tripán al 0.4%</i>	
<i>Azul Tripán</i>	
PBS	0.4 g
<i>Mezclar bien y almacenar a 4°C</i>	

Modo de empleo: se toman 16.0 µL de esta solución y se mezclan con 4.0 µL de la suspensión celular. Se depositan 10 µL de esta suspensión en una cámara de Neubauer y se cuentan las células azules (muertas) e incoloras y refringentes (vivas) en los 4 cuadrantes de la cámara. Se determina el porcentaje de viabilidad celular y la concentración (número de células/mL aplicando la siguiente ecuación:

$$\left[\text{Promedio de las células vivas de cuadrantes} \right] \left[\text{Factor de dilución de la suspensión celular} \right] \left[5 \right] = \times 10^4 \text{ células/mL}$$

RESUMEN BIOGRÁFICO
M.C. Elsa Nancy Garza Treviño

Candidata para el Grado de DOCTOR EN CIENCIAS con especialidad en

Biología Molecular e Ingeniería Genética

Tesis: Análisis del transcriptoma de células madre de adenocarcinoma colorrectal resistentes a 5-fluorouracilo, oxaliplatino y leucovorina.

Campo de Estudio: Biología Molecular

Datos personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León el 11 de Agosto de 1984.

Hija de Gerardo Javier Garza Garza y Elsa Nora Treviño Garza

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en el año 2006 de la Facultad de Medicina con el grado de Química Clínica Bióloga y en el año del 2010 de la Facultad de Biología con el grado de Maestra en Ciencias con acentuación en Inmunobiología.

Experiencia profesional:

2010- 2017 Institución de educación superior pública, Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina, Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular. Personal profesional no docente (**investigador tiempo completo**).

2006-2007. Químico en Investigación. Laboratorio de Medicina Molecular y Terapia Celular en el Hospital y Clínica Oca. Participación en el protocolo titulado “Separación y purificación de células CD133+ a partir de aféresis para pacientes con isquemia cardíaca y pie diabético”. capacitación y entrenamiento en el manejo de técnicas moleculares, citometría de flujo y cultivo celular.

2005-2006. Servicio Social. Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, en la unidad de Diagnóstico Molecular. Título del proyecto en el que participé: “Detección de mutaciones c282y, h63d y s65c mediante PCR y RFLPs en individuos con hemocromatosis bajo la supervisión de la Dra. Rocío Ortiz López.

2005. Prácticas profesionales en el hospital San José, Monterrey, Nuevo León.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DESDE 2013 – 2017

Artículos publicados

- 1. Remarkably higher efficacy and a wider safety window for non-frontline-over first-line drug combinations in the adenocarcinoma Colo 320DM cell line.** Elsa-N Garza-Treviño, Martha-S Rodríguez-González, Paulina Delgado-González, Yesenia-G Alonso-Cruz, Adolfo Soto-Domínguez, Juan F. González-Guerrero, Yanko Castro-Govea, Emiliano Michel Sánchez, Salvador Said-Fernández, Herminia-G. Martínez-Rodríguez. JBUON, 2017
- 2. Colorectal cancer in a northeastern mexican population: risk factors, clinical findings, and their correlation with 12 month karnofsky scale changes.** Paulina Delgado-González, Said-Fernández S, Irma Sandra García González, Elsa Nancy Garza Treviño, Gerardo Raymundo Padilla-Rivas, Juan Pablo Flores Gutiérrez, Gerardo Enrique Muñoz Maldonado, Marco Antonio Treviño-Lozano, Juan Francisco González Guerrero, Herminia Guadalupe Martinez Rodriguez. Revista de Salud Pública de México, 2016
- 3. UNDERSTANDING THE ORIGIN OF COLON CANCER STEM CELLS AND PERSPECTIVES ON TREATMENT.** Elsa N Garza-Treviño, Salvador L Said-Fernández, Herminia G Martínez-Rodríguez. Cancer Cell International, January 2015.
- 4. DETERMINACION DEL POTENCIAL TERAPEUTICO IN VITRO DE FÁRMACOS CON ACTIVIDAD ANTINEOPLASICA EN EL TRATAMIENTO DEL CANCER COLORRECTAL.** Revista de Investigación y Ciencia de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario José Eleuterio González de la UANL, 2013.
- 5. Musa × paradisiacaL. (plátano): el extracto hexánico de las hojas y el de acetato de etilo del rizoma son activos contra *Mycobacterium tuberculosis* resistente a los medicamentos de primera línea”.** Gloria María Molina-Salinas, Herminia Guadalupe Martínez-Rodríguez, Jorge Luis Ortega-García, Yazmín Berenice Martínez-Martínez, Elsa Nancy Garza Treviño, Salvador Said-Fernández, Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas (RMCF), 2016. En prensa
- 6. CORRELATION BETWEEN MAJOR RISK FACTORS AND CLOSELY RELATED MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS ISOLATES, GROUPED BY THREE CURRENT GENOTYPING PROCEDURES. A POPULATION BASED STUDY IN NORTHEAST MEXICO.** Peñuelas-Urquides K, Martínez-Rodríguez HG, Enciso-Moreno JA, Molina-Salinas GM, Silva-Ramírez B, Padilla-Rivas GR, Vera-Cabrera L, Torres-de-la-Cruz VM, Martínez-Martínez YB, Ortega-García JL, Garza-Treviño EN, Enciso-Moreno L, Saucedo-Cárdenas O, Becerril-Montes P, Said-Fernández. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 2014.
- 7. LUCIFERASE TIME-BASED, HIGH-THROUGHPUT SCREENING ASSAY FOR DISCOVERY OF HIV-1 INHIBITORS.** Humberto H. Lara*, Elsa N. Garza Treviño, María E.

De Zamacona, Lucia Mureyko, Liliana Ixtepan-Turrent. **Journal of Human Virology & Retrovirology, 2014.**

8. A POPULATION-BASED STUDY OF FIRST AND SECOND -LINE DRUG-RESISTANT TUBERCULOSIS IN A HIGH-BURDEN AREA OF THE MEXICO/UNITED STATES BORDER.

Pola Becerril-Montes, Salvador Said-Fernández, Julieta Luna Herrera, Guillermo Caballero-Olín, José Antonio Enciso-Moreno, Herminia Guadalupe Martínez-Rodríguez, Gerardo Padilla-Rivas, Elsa Nancy-Garza-Treviño and Gloria María Molina-Salinas. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 2013.

Artículos en proceso de escritura

1. **Alternative antineoplastic agents against colorectal cancer using an *in vitro* chemosensitivity method.** Elsa N. Garza Treviño, Martha Sofía Rodríguez González, Paulina Delgado González, Juan F González Guerrero, Irma Sandra García González, Herminia G. Martínez Rodríguez, Yesenia Alonso, Adolfo Soto Domínguez, Salvador L. Said Fernández.
2. **Genes associated with resistance to 5FU, Oxaliplatin in patients with colorectal cancer.** Elsa N. Garza Treviño, Paulina Delgado González, Juan F González Guerrero, Irma Sandra García González, Herminia G. Martínez Rodríguez, Adolfo Soto Dominguez, Salvador L. Said Fernández.