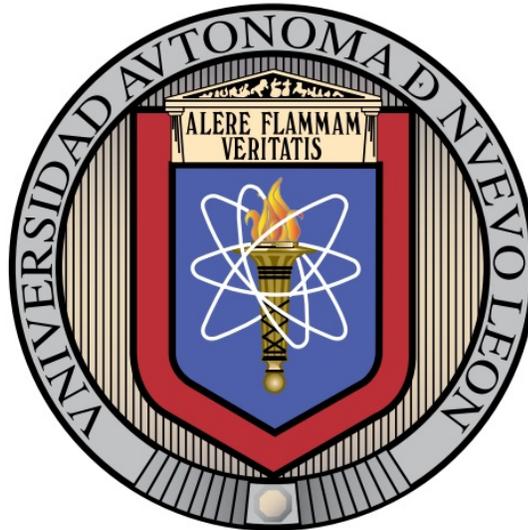


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**ADENOCARCINOMA COLORRECTAL:
ANÁLISIS DE CORRELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE CÉLULAS
MADRE DE TUMOR ABCB1+/BNIP3+/KRT18+, FÁRMACORRESISTENCIA Y
RESPUESTA CLÍNICA A FOLFOX-6.**

por

M.C.P. ORLANDO DANIEL SOLIS CORONADO

**Como requisito parcial para obtener el Grado de Maestría en Ciencias
con orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética**

Febrero 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**ADENOCARCINOMA COLORRECTAL:
ANÁLISIS DE CORRELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE CÉLULAS
MADRE DE TUMOR ABCB1+/BNIP3+/KRT18+, FÁRMACORRESISTENCIA Y
RESPUESTA CLÍNICA A FOLFOX-6.**

por

M.C.P. ORLANDO DANIEL SOLIS CORONADO

**Como requisito parcial para obtener el Grado de Maestría en Ciencias
con orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética**

Febrero 2019

**“ADENOCARCINOMA COLORRECTAL:
ANÁLISIS DE CORRELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE CÉLULAS
MADRE DE TUMOR ABCB1⁺/BNIP3⁺/KRT18⁺, FÁRMACORRESISTENCIA Y
RESPUESTA CLÍNICA A FOLFOX-6”.**

Aprobación de la Tesis:



Dr. C. Salvador Luis Said y Fernández
Director de Tesis



Dra. C. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez
Co-Director de Tesis



Dr. C. Adolfo Soto Domínguez
Miembro de la Comisión de Tesis



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

**“ADENOCARCINOMA COLORRECTAL:
ANÁLISIS DE CORRELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE CÉLULAS
MADRE DE TUMOR ABCB1⁺/BNIP3⁺/KRT18⁺, FÁRMACORRESISTENCIA Y
RESPUESTA CLÍNICA A FOLFOX-6”.**

presentado por:

M.C.P. Orlando Daniel Solís Coronado

Este estudio se desarrolló bajo la dirección del Dr. C. Salvador Luis Said y Fernández, la co-dirección de la Dra. C. Herminia Martínez Rodríguez y la asesoría del Dr. C. Adolfo Soto Domínguez.

ASPECTOS ÉTICOS

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo el número de registro *BI18-00001* y fue considerado como un estudio de bajo riesgo para el paciente.

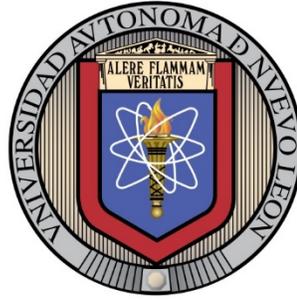
FINANCIAMIENTO DEL ESTUDIO

Para desarrollar el presente trabajo se contó con el apoyo económico del Fondo Sectorial para la Investigación Básica SEP/CONACYT con el proyecto *CB2012-01-178641-M* y de una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), para el tesista, inscrito en el programa de Maestría en Ciencias con orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética con el número de registro *602720* de la Convocatoria de Becas Nacionales 2016 – Segundo Periodo.

LUGARES DE TRABAJO

El presente estudio fue desarrollado en las instalaciones del Laboratorio de Terapia Celular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, el Laboratorio de Terapéutica Antioxidante del Departamento de Histología, el Servicio de Anatomía Patológica y Citopatología y el Centro Universitario Contra el Cáncer a través del Servicio de Oncología, todos de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL). Además, contamos con el apoyo del Servicio de Cirugía Oncológica, el Servicio de Gastroenterología y Endoscopia Digestiva y el Servicio de Anatomía Patológica del Centro Médico Nacional del Noreste - Unidad Médica de Alta Especialidad (*U.M.A.E.*) No. 25 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

INSTITUCIONES Y DEPENDENCIAS PARTICIPANTES



Universidad Autónoma de Nuevo León (U.A.N.L.)

Facultad de Medicina y Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González"

Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular - Laboratorio de Terapia Celular

Departamento de Histología – Laboratorio de Terapéutica Antioxidante

Servicio de Anatomía Patológica y Citopatología

Centro Universitario Contra el Cáncer – Servicio de Oncología



Instituto Mexicano del Seguro Social (I.M.S.S.)

Centro Médico Nacional del Noreste – Unidad Médica de Alta Especialidad No. 25

Servicio de Cirugía Oncológica

Servicio de Gastroenterología y Endoscopia Digestiva

Servicio de Anatomía Patológica

COLABORADORES

*De la Facultad de Medicina y Hospital Universitario
"Dr. José Eleuterio González" de la Universidad Autónoma de Nuevo León*

Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular

Dr. C. Elsa Nancy Garza Treviño
Dr. med. Paulina Delgado González
Dr. C. Kame Alberto Galán Huerta
Dr. C. Gerardo Raymundo Padilla Rivas
M.C.P. Alejandra Mayela Martínez Garza
Est. med. Carlos Iván Valencia Salgado



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
Y MEDICINA MOLECULAR



Departamento de Histología

Dr. C. Roberto Montes de Oca Luna
Dr. C. Humberto Rodríguez Rocha



DEPARTAMENTO DE
Histología

Servicio de Anatomía Patológica y Citopatología

Dr. med. Oralia Barboza Quintana
Dr. med. Juan Pablo Flores Gutiérrez
M.C.P. Ana Karen Luna Marroquín



Servicio de Oncología

Dr. med. Oscar Vidal Gutiérrez
Dr. Juan Francisco González Guerrero



De la Unidad Médica de Alta Especialidad No. 25 -

Centro Médico Nacional del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social

Servicio de Cirugía Oncológica

Dr. Absalón Espinoza Velazco
Dra. Irma Sandra García González
Dr. Rafael Mendoza Bautista
Dr. Carlos Eduardo Bañuelos Hernández



Servicio de Gastroenterología y Endoscopia Digestiva

Dra. Norma Edith Mar Villegas



AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el apoyo económico brindado para el desarrollo de este proyecto y por la Beca de Posgrado No. 602720 de la Convocatoria de Becas Nacionales 2016 – Segundo Periodo.

Al **Dr. C. Salvador Said Fernández**, director de tesis. Por aceptarme como su estudiante y orientarme en las dudas que surgieron en el transcurso del proyecto. Por siempre darse el tiempo para la revisión de avances, presentaciones y escritos de este trabajo, por toda su ayuda y conocimientos brindados en estos casi cuatro años de mi llegada a su laboratorio. Muchas gracias por depositar su confianza en mí, ser tan paciente, por aguantarme en este tiempo y motivarme a seguir adelante. Se le estima mucho Dr. Said.

A la **Dra. C. Herminia Martínez Rodríguez**, co-directora de tesis. Por aceptar ser parte de la revisión de este trabajo, por toda su paciencia y por aceptarme como estudiante de su Laboratorio de Terapia Celular desde mi llegada como pasante de Servicio Social. Gracias por estar siempre disponible para la revisión y críticas del trabajo, por todos esos consejos y sugerencias que me brindó, por todos esos regaños y por la motivación que me dio durante este tiempo. La admiro mucho como docente desde que fue mi profesora de Biología Molecular en la carrera de Medicina en el año 2011. La estimo y admiro, gracias por todo.

Al **Dr. C. Adolfo Soto Domínguez**, miembro de la comisión de tesis. Por todas las facilidades que me brindo con reactivos, uso de microscopios y por su valiosa asesoría para los experimentos y presentaciones. Gracias por su compromiso, su paciencia, por sus consejos y regaños, a pesar de lo terco que soy y por todo el tiempo invertido en mí.

A la **Dra. C. Elsa Nancy Garza Treviño**, colaboradora de tesis. Muchas gracias por todo el conocimiento y ayuda que me proporcionó a lo largo de estos años. Gracias por motivarme a investigar, por ser tan buena persona conmigo, por estar siempre disponible para dudas, por preocuparse por el desarrollo de este proyecto y por depositar su confianza en mí.

A la **Dra. med. Paulina Delgado González**, colaboradora de tesis. Gracias por toda la ayuda brindada y su interés en este proyecto, por asistir conmigo a los hospitales para la toma de muestras y para la revisión de expedientes clínicos, por toda la confianza que depositó en mí y por ser tan buena conmigo.

Al **Dr. C. Kame Alberto Galán Huerta**, por su ayuda con el análisis estadístico, por tomarse el tiempo para explicarme las pruebas, por toda su paciencia y amabilidad.

Al **Dr. C. Humberto Rodríguez Rocha**, por permitirme hacer uso de las instalaciones y equipo del Laboratorio de Terapéutica Antioxidante del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina, UANL. Gracias por su interés, críticas y cuestionamientos hacia este trabajo.

A la **Dra. Alejandra Mayela Martínez Garza**, pasante de Servicio Social, por ayudarme con la información clínica del presente proyecto, por asistir conmigo a las cirugías para la toma de muestras y por todo el interés y disposición en todo momento a lo largo de este año. Gracias por todo, sin su ayuda no hubiera sido posible terminar.

A la **Dra. med. Oralia Barboza Quintana**, jefe del Servicio de Anatomía Patológica y Citopatología del Hospital Universitario, UANL, a la **Dra. med. Raquel Garza Guajardo** y **Dr. med. Juan Pablo Flores Gutiérrez**, profesores del citado Servicio y **Dra. Ana Karen Luna Marroquín**, por permitirme hacer uso del escáner de laminillas.

Al **Dr. Absalón Espinoza Velazco**, jefe del Servicio de Cirugía Oncológica de la UMAE 25 del IMSS, a la **Dra. Irma Sandra García González** y **Dra. Denisse Guzmán Zuñiga**,

profesores adscritos a citado servicio, **Dr. Rafael Mendoza Bautista** y **Dr. Eduardo Bañuelos Hernández**, residentes de cirugía oncológica, por permitirme hacer uso de expedientes clínicos y por brindarme muestras de tejidos para el desarrollo de este proyecto, siempre con total disposición y amabilidad.

Al **Dr. med. Santos Guzmán López**, actual Secretario General de la UANL. Por su constante apoyo, motivación y por toda su ayuda desde que inicié la carrera de Medicina en el año 2009, hasta la actualidad. Gracias por todo Dr., se le estima.

A la **Dra. C. Ana María Rivas Estilla**, jefe del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina, UANL, por todo el apoyo recibido a lo largo de estos casi 4 años en el Departamento y por transmitir su gusto a la Hepatología, desde el pregrado.

A la **Dra. C. Raquel Ballesteros Elizondo**, coordinador del Programa de Tutorías de la Subdirección de Estudios de Pregrado y profesor del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina, UANL, por todos sus consejos, motivación y apoyo en este tiempo.

A la **Dra. C. Elvira Garza González**, profesor del Servicio de Gastroenterología del Hospital Universitario, UANL. Por impulsarme y motivarme a investigar y por estar pendiente de mí desde que era su estudiante en la asignatura de Microbiología, en el año 2010.

A la **Dra. C. Lydia Rivera Morales**, profesor del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL. Por su toda su motivación y constante apoyo.

Al **MVZ Luis Botello Soto**, del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina, UANL, por su ayuda con la realización de los cortes histológicos.

A los compañeros que conocí en el Laboratorio de Terapia Celular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, Facultad de Medicina, UANL: **Est. med. Carlos Valencia Salgado**, **Dra. Yesenia Alonso Cruz**, **MC. Florencia Pedroza Montoya** y **Dr. Carlos González Villarreal**, por todo el apoyo y ayuda que recibí de ustedes.

A mis compañeros y amigos de la Generación 2016-2018 de Maestría en Ciencias: **Dr. Angel Gabriel Estrada Cárdenas**, **MC. José Luis Nava Ríos**, **MC. Juan Ángel García Quiñones**, **MC. Alejandro Cerna Ornelas**, **MC. Luis Ángel Trujillo Villarreal**, **Dr. Xico Alberto Acosta Villalobos**, **Dra. Yolanda Salinas Álvarez**, **Dra. Guillermina Muñoz Ríos**, **Dra. Rocío Sánchez Uresti**, **Dr. Ángel González Mireles**, por su amistad y apoyo en todo momento.

A todos los profesores y compañeros del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular y del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina, UANL, con los que conviví, por sus acertadas críticas y propuestas de mejora hacia este proyecto.

A todo personal administrativo del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular: **Juany Hinojos Escobedo**, **Lic. Ariadna López Gutiérrez**, **Lic. Liliana Pérez González**, **Lic. Soledad Mata Cobos**, **C.P. Ruth Cervantes Juárez**, **Cristy Jiménez**, **Nancy Venegas**, **Angie Lechuga**, **Lulú Mendoza Moreno**, **Cathy Martínez**, **Vicky Rincón** y **Sr. Eduardo Cisneros**, por toda la ayuda, facilidades y apoyo proporcionado.

A las autoridades de la **Facultad de Medicina y Hospital Universitario de la UANL**, en especial a la **Coordinación de Área Básica de la Subdirección de Estudios de Posgrado**, por las facilidades que me dieron para realizar el programa de Maestría en Ciencias.

A mi mamá, Guadalupe Coronado Carrizales y **mi papá, Javier Solis García**, por su apoyo en los momentos difíciles. También **a mi hermano, Ing. Alejandro Solis Coronado**, por su ayuda con las animaciones y dibujos del presente trabajo.



ÍNDICE

Sección	Página
LISTADO DE TABLAS	IV
LISTADO DE FIGURAS.....	V
LISTADO DE ABREVIATURAS.....	VI
RESUMEN.....	VIII
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. Definición y características del cáncer colorrectal	3
2.2. Epidemiología del CCR	3
2.2.1. Epidemiología mundial	3
2.2.2. Epidemiología en México	5
2.2.3. Epidemiología en Nuevo León	5
2.3. Factores de riesgo y protectores del CCR	6
2.4. Histología de la pared del colon	6
2.5. Biología del epitelio intestinal	7
2.6. Anatomía patológica del CCR	9
2.7. Diagnóstico y estadiaje del CCR.....	10
2.8. Tratamiento del CCR.....	11
2.9. Valoración del estado funcional del paciente con ACCR.....	12
2.10. Biopatología de la carcinogénesis colorrectal.....	13
2.11. Transición epitelio-mesenquimal	16
2.12. Microambiente tumoral	17
2.13. Células madre de tumor (CMT).....	18
2.13.1. Características de las CMT	19
2.13.2. Mecanismos moleculares de farmacorresistencia en CMT	20
2.13.3. Marcadores de CMT	21
2.13.4. Métodos de aislamiento y caracterización de CMT	24
2.14. Determinación ex vivo de FR de neoplasias.....	25
CAPÍTULO 3. ANTECEDENTES DIRECTOS.....	27
3.1. Ubicación del proyecto en la línea de trabajo	27
3.2. Correlación entre número de CMT y quimiorresistencia en tejidos de ACCRs.....	27
3.3. Perfil de expresión génica de CMT resistentes a 5FUOL.....	28
3.3.1. ABCB1	28
3.3.2. KRT18.....	29
3.3.3. BNIP3	29



CAPÍTULO 4. JUSTIFICACIÓN	30
CAPÍTULO 5. HIPÓTESIS	31
CAPÍTULO 6. OBJETIVOS	32
6.1. Objetivo general.....	32
6.2. Objetivos específicos.....	32
CAPÍTULO 7. DISEÑO EXPERIMENTAL	33
7.1. Estrategia general.....	33
CAPÍTULO 8. MATERIAL Y MÉTODOS	34
8.1. Aislamiento de CMT de ACCR.....	34
8.2. Caracterización de las CMT de ACCR.....	35
8.2.1. Fijación de las CMT.....	35
8.2.2. Doble marcaje de las CMT.....	35
8.3. Diferenciación de CMT a células epiteliales	36
8.4. Selección de casos de ACCR y colección de datos clínico-patológicos	37
8.4.1. Base de datos matriz y obtención de tejidos de ACCR.....	37
8.4.2. Criterios de inclusión y exclusión de casos de ACCR.....	39
8.5. Obtención de cortes histológicos	40
8.5.1. Tinción de Hematoxilina y Eosina (H & E).....	41
8.6. Inmunohistoquímica de doble marcaje.....	41
8.6.1. Análisis e interpretación de imágenes de IHQ de doble marcaje.....	43
8.7. Análisis estadístico de los datos	46
CAPÍTULO 9. RESULTADOS	47
9.1. Aislamiento de CMT de ACCRs	47
9.2. Co-expresión de CD24 y CD44 en aislados de CMT de ACCR.....	48
9.3. Co-expresión de marcadores de FR en aislados de CMT de ACCR	48
9.4. Diferenciación de las CMT de ACCR a células epiteliales	48
9.5. Características clínicas del grupo de estudio.....	52
9.6. Determinación del IK a dos años de seguimiento clínico	54
9.7. Estructura histológica del colon sano y ACCRs teñidos con H&E.....	55
9.8. Expresión de marcadores de CMT en ACCR y colon sano.....	58
9.8.1. Coexpresión de CD24 y CD26.....	59
9.8.2. Coexpresión de CD44 y CD26.....	60
9.8.3. Expresión de CD26	62
9.8.4. Expresión aislada de CD24 y CD44.....	62
9.9. Expresión de marcadores de resistencia a 5FUOL en ACCR y colon sano	65
9.9.1. Coexpresión de ABCB1 y CK-18	66



9.9.2. Coexpresión de ABCB1 y BNIP3.....	66
9.9.3. Expresión de ABCB1.....	67
9.9.4. Expresión de CK-18.....	68
9.9.5. Expresión de BNIP3.....	68
CAPÍTULO 10. DISCUSIÓN.....	72
CAPÍTULO 11. CONCLUSIONES.....	80
CAPÍTULO 12. PERSPECTIVAS.....	81
CAPÍTULO 13. BIBLIOGRAFÍA.....	82
CAPÍTULO 14. ANEXOS.....	93
14.1. Medios y soluciones para cultivo celular.....	93
14.2. Reactivos para preparación de hematoxilina y eosina.....	95
14.3. Fijadores de células y tejidos.....	96
14.4. Soluciones y reactivos para inmunohistoquímica.....	97
CAPÍTULO 15. RESUMEN BIOGRÁFICO.....	98



LISTADO DE TABLAS

Tabla 1; Sistemas de clasificación de neoplasias colorrectales	11
Tabla 2; Mecanismos de acción de fármacos antineoplásicos utilizados en CCR	12
Tabla 3; Índice de Karnofsky	13
Tabla 4; Características de células madre normales y células madre de tumor.....	19
Tabla 5; Ventajas y desventajas de las técnicas de caracterización de CMT.....	26
Tabla 6; Técnica para incluir tejidos en parafina.....	38
Tabla 7; Criterios de inclusión y exclusión del proyecto	40
Tabla 8; Protocolo de tinción de hematoxilina y eosina para cortes en parafina	41
Tabla 9; Procedimiento para desparafinar cortes histológicos	42
Tabla 10; Pruebas estadísticas y variables utilizadas para el análisis de los datos	46
Tabla 11; Características clínicas de los pacientes con ACCR.....	53
Tabla 12; Índice de Karnofsky inicial y final de los casos de ACCR.....	55
Tabla 13; Coexpresión de marcadores de CMT CD24/CD26 y CD44/CD26 en ACCR y colon humano sano.	61
Tabla 14; Expresión de CD26 en colon sano y en ACCRs.....	63
Tabla 15; Coexpresión de marcadores de resistencia a 5FUOL ABCB1/CK-18 y ABCB1/BNIP3 en ACCRs y colon sano.	69
Tabla 16; Expresión de ABCB1 y CK-18 en ACCRs y colon sano.....	70



LISTADO DE FIGURAS

Figura 1; Características de las células malignas.....	3
Figura 2; Incidencia y mortalidad general por cáncer en el año 2018.....	4
Figura 3; Incidencia y mortalidad general por cáncer en México en el año 2015.	5
Figura 4; Estructura anatómica e histológica de la pared del colon.....	7
Figura 5; Organización celular y biología del epitelio gastrointestinal.....	9
Figura 6; Aspecto macroscópico del cáncer colorrectal.	10
Figura 7; Modelo de progresión del CCR y carcinogénesis molecular.....	14
Figura 8; Transición epitelial mesenquimal (TEM).....	17
Figura 9; Origen de las células madre de tumor (CMT).....	18
Figura 10; Mecanismos de farmacorresistencia de las células madre de tumor.....	21
Figura 11; Mapa de calor de expresión génica diferencial de las CMT aisladas de ACCRs resistentes a 5FUOL.....	28
Figura 12; Imagen representativa del programa Sketch&Calc®.....	45
Figura 13; Morfología de las CMT de ACCRs.....	47
Figura 14; Coexpresión de CD44 y CD24 en cultivos puros de CMT de ACCR.....	49
Figura 15; Coexpresión de marcadores de resistencia a 5FUOL ABCB1/CK18 y ABCB1/BNIP3 en cultivos puros de CMT de ACCR.....	50
Figura 16; Diferenciación de CMT de ACCR a células epiteliales.....	51
Figura 17; Distribución del porcentaje de muerte celular (PMC) a 5FUOL de los casos de ACCR incluidos.....	53
Figura 18; Supervivencia a 2 años de los casos de ACCR en función de su sensibilidad a 5FUOL.	54
Figura 19; Estructura histológica de colon sano y de ACCRs en diferentes grados de diferenciación.....	56
Figura 20; Expresión de marcadores de CMT en tejidos de ACCR y colon sano.....	58
Figura 21; Coexpresión o expresión de marcadores de CMT en ACCRs sensibles o resistentes a 5FUOL y colon sano.....	64
Figura 22; Expresión de marcadores de resistencia a 5FUOL en cortes de ACCR y colon sano.	65
Figura 23; Coexpresión o expresión de marcadores de resistencia en ACCRs sensibles o resistentes a 5FUOL y colon sano.	71



LISTADO DE ABREVIATURAS

-	Negativo a	CMN	Célula madre normal
%	Porcentaje	CMT	Célula madre de tumor
+	Positivo a	CO ₂	Dióxido de carbono
>	Mayor que	d	día(s)
>	Menor que	DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
=	Igual a	DDP-4	Dipeptidil-peptidasa 4
≥	Mayor o igual que	Dkk	Proteína Dickkopf-1
°C	Grados centígrados	DLL4	Ligando 4 de tipo Delta (del inglés, <i>Delta-like ligand 4</i>)
µg	microgramo	DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's cell culture medium
µL	microlitro	EGF	Factor de crecimiento epidérmico
µm	micrómetros	EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
5-FU	5-Fluorouracilo	EpCAM	Molécula de adhesión de células epiteliales
5FUOL	5-Fluorouracilo, oxaliplatino, leucovorina	EE	Error estándar
ABC	Transportadores dependientes de la unión de ATP	FACS	Clasificación de células activadas por fluorescencia
ACCR	Adenocarcinoma colorrectal	FGF-β	Factor de crecimiento fibroblástico β
ACE	Antígeno carcinoembrionario	FITC	Isotiocianato de fluoresceína
ADN	Acido desoxirribonucleico	FOLFIRI	5-Fluorouracilo, irinotecan, leucovorina
AINES	Antiinflamatorios no esteroideos	FOLFOX-6	5-Fluorouracilo, oxaliplatino, leucovorina
ALCAM	Molécula de adhesión celular de leucocitos activados	FOX	Factor de transcripción - Forkhead-box
ALDH	Aldehído deshidrogenasa	FR	Farmacorresistencia
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>	xg	Fuerza centrífuga relativa
ARN	Ácido ribonucleico	g	Gramo(s)
ATP	Adenosin trifosfato	GLOBOCAN	<i>Global Cancer Observatory</i>
ATP-CRA	<i>Adenosine triphosphate-based chemotherapy response assay</i>	h	hora(s)
Bcl-2	Familia de proteínas esenciales para la apoptosis	H&E	Hematoxilina y Eosina
BMP	Proteína Morfogénica de Hueso (del inglés, <i>Bone Morphogenic Protein</i>)	HH	Vía de señalización Hedgehog
BNIP3	Proteína 3 de interacción con BCL2	HIF-1α	Subunidad 1α del factor inducible por hipoxia
CA 19-9	Antígeno carbohidrato 19-9 o Antígeno sializado de Lewis	IF	Inmunofluorescencia
CCR	Cáncer colorrectal	IHQ	Inmunohistoquímica
CD	<i>Cluster of differentiation</i>	IK	Índice de Karnofsky
CK	Citoqueratina	IMC	Índice de Masa Corporal
CK-17	Citoqueratina 17	IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's cell culture Media</i>
CK-18	Citoqueratina 18	IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
CK-20	Citoqueratina 20	kDa	Kilodalton
CL	Criptas de Lieberkühn		
CMI	Célula madre intestinal		



K-W	Kruskal-Wallis (prueba estadística)	PMC	Porcentaje de muerte celular
L	Litro(s)	rpm	Revoluciones por minuto
Lgr5/GRP49	Receptor 5 acoplado a proteína G que contiene repeticiones ricas en leucina	RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute - cell culture medium</i> -segundos
m	meses	seg	segundos
M	Moles	SFB	Suero fetal bovino
MACS	Clasificación de células activadas magnéticamente	TBST	Tris buffer salino + Tween 20
MAPK	Proteínas activadas por mitógenos	TEM	Transición epitelio-mesenquimal
MDR	Multidrogresistencia	TGFR-β	Receptor del factor de crecimiento transformante - β
MEC	Matriz extracelular	TGF-β	Factor de crecimiento transformante - β
min	minutos	TME	Transición mesenquimal-epitelial
mL	mililitro(s)	TNM	Tumor-Ganglio-Metástasis (del inglés; <i>Tumor, Node, Metastasis</i>)
mm	milímetros	TRS	<i>Target retrieval solution</i>
mm²	milímetros cuadrados	UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
mm³	milímetros cúbicos	UMAE	Unidad Médica de Alta Especialidad
MMP	Metaloproteasas	U-MW	U-Mann Whitney (prueba estadística)
mTOR	mammalian Target of Rapamycin	v/v	volumen / volumen
nM	nanomoles	VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
OMS	Organización Mundial de la Salud	XELOX	Capecitabina, oxaliplatino
p	Valor de significancia estadística	ZO-1	Zónula occludens-1
PBS	Tampón fosfato salino	α-SMA	α- actina de musculo liso
PE-Cy7	Ficoeritrina-cianina 7		
pH	Potencial de hidrogeno		
PIK3	Fosfatidilinositol 3- cinasa		



RESUMEN

ADENOCARCINOMA COLORRECTAL: ANÁLISIS DE CORRELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE CÉLULAS MADRE DE TUMOR ABCB1⁺/BNIP3⁺/KRT18⁺, FÁRMACORRESISTENCIA Y RESPUESTA CLÍNICA A FOLFOX-6.

MCP. Orlando Daniel Solís Coronado

Fecha de graduación: Febrero 2019

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética

Área de Estudio: Medicina y Patología Humana – Patología Gastrointestinal

Número de Páginas: 98

Antecedentes. El adenocarcinoma colorrectal (ACCR) es un problema mundial de salud pública, debido a su alta prevalencia y mortalidad. El tratamiento del ACCR es la cirugía, y en etapas avanzadas, ésta se combina con quimioterapia. Uno de los esquemas más frecuentemente utilizados es FOLFOX-6; que incluye 5-fluorouracilo, oxaliplatino y leucovorina (5FUOL). A pesar de que FOLFOX-6 es uno de los mejores esquemas, disponibles actualmente, más del 90% de los pacientes tratados con éste y otros esquemas desarrollan fármacorresistencia, y debido a ello, la mayoría de ellos mueren en un término promedio de 20 meses. Se ha señalado a las células madre de tumor (CMT) como las principales responsables de la iniciación de cáncer, de la invasión de tejidos y metástasis, de su fármacorresistencia, y de su recurrencia. Las CMT tienen marcadores típicos para su identificación; p.e. CD44 y CD24. Sin embargo, estos marcadores no son específicos de CMT. Respecto al surgimiento de fármacorresistencia, nuestro grupo de trabajo, previamente identificó la sobreexpresión de los genes KTR18, ABCB1 y BNIP3 en aislados de CMT resistentes a 5FUOL. **El problema.** Los tratamientos convencionales son iatrogénicos y los pacientes mueren en un plazo relativamente corto porque surgen CMT resistentes a los fármacos empleados. Por ello se requiere desarrollar métodos, que permitan predecir si un tratamiento estandarizado será útil para al menos prolongar la vida de los pacientes. En caso contrario, permitir la prescripción de un tratamiento más eficaz. Sin embargo, es realmente difícil, laborioso, tardado y costoso aislar CMT y caracterizar su exoma.

Justificación. Este estudio permitirá analizar cortes histológicos mediante inmunohistoquímica, simplificando considerablemente la detección de CMT resistentes a 5FUOL. **Objetivo.** Investigar si, en cortes histológicos de ACCR existe correlación entre la cantidad de CMT ABCB1⁺, CK-18⁺, BNIP3⁺, con las siguientes variables: resistencia *in vitro* a 5FUOL, presencia de metástasis, índice de Karnofsky y porcentaje de pacientes sobrevivientes a dos años de haberse iniciado el tratamiento. **Material, métodos y resultados.** De seis ACCRs frescos, mediante cultivo en un medio selectivo para CMT y en placas de baja adherencia, aislamos, expandimos y caracterizamos células resistentes a 5FUOL. Con inmunofluorescencia de doble marcaje y utilizando anticuerpos monoclonales, verificamos que los aislados de ACCR coexpresaban los marcadores de CMT (CD24 y CD44) y de resistencia a 5FUOL (ABCB1, CK-18⁺ y BNIP3). Además, indujimos a los aislados de CMT a diferenciarse a células epiteliales y verificamos su estirpe epitelial, porque estas células expresaban los marcadores de epitelio CK-17, CK-20, una mezcla de citoqueratinas (*Cocktail-CK*) y EGFR. Por lo tanto, demostramos que las CMT de ACCR expresaban los marcadores de resistencia y que éstas podían identificarse en cortes de ACCR, utilizando estos marcadores. De la base de datos de nuestro laboratorio seleccionamos 20 casos de ACCR, registramos los datos sociodemográficos y clínicos y recuperamos las muestras de tumor correspondientes — criopreservadas o incluidas en parafina —, de las cuales obtuvimos cortes finos para determinar el área ocupada por las CMT que coexpresaban los marcadores de CMT resistentes a 5FUOL, previamente validados en los aislados de CMT, arriba mencionados. Cuantificamos en cada corte, el área ocupada por las células coexpresando los marcadores de interés. Para ello utilizamos un programa de cómputo que dividió en cuadrados el área completa, ocupada por cada corte y dos observadores contaron, independientemente, los cuadros positivos para cada marcador o mezcla de marcadores. El número de cuadros se correlacionó o asoció con las variables arriba mencionadas, utilizando pruebas estadísticas apropiadas. La cantidad de CMT coexpresando CD24/CD26, ABCB1/CK18 y ABCB1/BNIP3 o sólo ABCB1 en cortes de ACCR resistentes a 5FUOL, mostró una correlación y dependencia positivas ($p < 0.05$) con todas las variables arriba mencionadas. **Conclusión.** Nuestros resultados apoyan nuestra hipótesis. Por lo tanto, la cuantificación de CMT ABCB1⁺/BNIP3⁺/KRT18⁺, en cortes histológicos de ACCR permite saber si FOLFOX-6 será eficaz para tratar a los pacientes con ACCRs desde antes de instituir este tratamiento. El enfoque aquí presentado puede extenderse a otros tipos de cáncer con resultados promisorios.

Dr. C. Salvador Luis Said y Fernández
Director de Tesis

Dra. C. Herminia Martínez-Rodríguez
Co-director de Tesis



ABSTRACT

COLORECTAL ADENOCARCINOMA: CORRELATION ANALYSIS BETWEEN THE CONCENTRATION OF TUMOR STEM CELLS ABCB1⁺/BNIP3⁺/KRT18⁺, PHARMACORESISTENCE AND CLINICAL RESPONSE TO FOLFOX-6

Orlando Daniel Solis-Coronado, BMed.

Graduation date: February 2019

Candidate for the Master of Science degree in Molecular Biology and Genetic Engineering.

Pages: 98

Study area: Medicine and Human Pathology – Gastrointestinal Pathology

Background. Colorectal adenocarcinoma (CRAC) is a worldwide public health problem due to its high prevalence and mortality. The treatment of CRAC is surgery, and in advanced stages, surgery is combined with chemotherapy. One of the most frequently used schemes to treat CRAC is FOLFOX-6; which includes 5-fluorouracil, oxaliplatin and leucovorin (5FUOL). Although FOLFOX-6 is one of the best schemes currently available, more than 90% of patients, treated with this and other schemes, develop drug resistance. As a result, most patients die within an average of 20 months. Tumor stem cells (CMT) have been identified as the main responsible for the initiation of cancer, tissue invasion and metastasis, drug resistance, and recurrence. The CMT have typical markers for identification; e.g. CD44 and CD24. However, these markers are not specific of CMT. Regarding the emergence of drug resistance, our working group previously identified the overexpression of the KTR18, ABCB1 and BNIP3 genes in CMT isolates resistant to 5FUOL. **The problem.** Conventional treatments are iatrogenic and patients die in a relatively short time due to the emergency of CMT drug-resistant to the treatment given to the patient. Therefore, it is necessary to develop methods that allow predicting whether a standardized treatment will be useful to at least to enlarge the time-life of patients. Otherwise, to allow prescribing a more efficacious treatment. However, it is really difficult, laborious, time consuming and expensive to isolate CMT and characterize their exome in each patient. **Justification.** This study will allow the analysis of histological cuts by means of immunocytochemistry, considerably simplifying the detection of CMT resistant to 5FUOL. **Objective.** To investigate if, in histological cuts of ACCR, there is a correlation between the amount of CMT ABCB1⁺, CK-18⁺, BNIP3⁺, with the following variables: *in vitro* resistance to 5FUOL, presence of metastasis, Karnofsky index and percentage of survival patients, after two years of initiated their treatment. **Material, methods and results.** From six fresh ACCRs, we isolated, expanded and characterized cells resistant to 5FUOL by culturing them in a selective medium for CMT and using plates of low adherence. With double-labeled immunofluorescence and using monoclonal antibodies, we verified that the ACCR isolates coexpressed the markers of CMT (CD24 and CD44) and resistance to 5FUOL (ABCB1, CK-18 + and BNIP3). In addition, we induced the CMT isolates to differentiate into epithelial cells and verified their epithelial lineage, because these cells expressed the epithelial markers CK-17, CK-20, a mixture of cytokeratins (*Cocktail-CK*) and EGFR. Therefore, we demonstrated that the CMTs isolated form CRAC expressed resistance markers and that these could be identified in CRAC sections, using these markers. From the database of our laboratory, we selected 20 cases of CRAC, recorded the sociodemographic and clinical data and recovered the corresponding tumor samples — cryopreserved or included in paraffin —, from which we obtained fine cuts to determine the area occupied by the CMT that co-expressed the 5FUOL-resistance markers of CMT, previously validated in the CMT isolates. In each histological cut we quantify the area occupied by the cells coexpressing the markers of interest. To do this, we used a computer program that divided into squares the entire area occupied by each cut. Then, two observers independently counted the positive squares (showing a specific color for each marker of pair-markers). These correlation or dependence of the area occupied by each marker or pair-markers was analyzed with the above-mentioned variables, using appropriate statistical tests. The area (equivalent to the number of CMT) co-expressing CD24/CD26, ABCB1/CK18 and ABCB1/BNIP3 or only ABCB1 in ACCR sections resistant to 5FUOL, showed a positive correlation and dependence ($p < 0.05$) with all the variables mentioned above. **Conclusion.** Our results support our hypothesis. Therefore, the quantification of CMT ABCB1⁺/BNIP3⁺/KRT18⁺, in histological cuts of CRAC allows knowing if FOLFOX6 will be effective to treat patients with CRAC before instituting this treatment. The approach presented here can be extended to other types of cancer with promising results.

Salvador Luis Said y Fernández, Ph.D.

Thesis director

Herminia Martínez-Rodríguez, Ph.D.

Thesis Co-director



CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer colorrectal (CCR), actualmente es considerado como un problema de salud pública debido a que, en el mundo, esta enfermedad es la segunda causa de muerte por cáncer y la tercera neoplasia con mayor incidencia^[1]. En los países industrializados, el CCR normalmente se detecta en estadios tempranos, debido a la implementación de cribados preventivos desde los 50 años edad. Sin embargo, en los países en desarrollo, como México, la detección de CCR se realiza habitualmente en estadios avanzados^[2]. El tratamiento base del CCR es la cirugía combinada con un régimen quimioterapéutico; como FOLFOX-6, XELOX o XELODA. FOLFOX-6 incluye la administración de 5-fluorouracilo (5-FU), oxaliplatino y leucovorina^[3,4]. En adelante, llamaremos a la mezcla de estos medicamentos 5FUOL. XELOX se basa en la prescripción de capecitabina —un profármaco de 5-FU—. XELODA consiste solamente en la administración de capecitabina. Menos del 50% de los pacientes responde a alguno de estos esquemas de tratamiento y los pacientes respondedores lo hacen en forma variable, eventualmente estos pacientes presentan recidivas y la mayoría de ellos muere en un término de 20 meses, después de iniciado el tratamiento^[5]. Entonces, es muy importante desarrollar nuevos métodos que permitan pronosticar, oportunamente, el éxito o el fracaso del uso de los regímenes quimioterapéuticos convencionales y la búsqueda de nuevos esquemas de medicamentos anti-CCR^[6]. Los nuevos esquemas quimioterapéuticos idealmente deberían ser personalizados. Para ello se requiere reunir varios requisitos: ante todo, conocer la fármacorresistencia (FR) de los tumores primarios a los regímenes convencionales y la sensibilidad a medicamentos anti-neoplásicos alternativos^[7,8]. Por otro lado, para desarrollar nuevos esquemas quimioterapéuticos se requiere también conocer las causas de la supervivencia de las células malignas en microambientes desfavorables para las células normales y los factores que confieren al CCR su capacidad para producir metástasis; así como un método adecuado para evaluar, *ex vivo*, los fármacos de interés^[7]. Sobre todos estos temas, se han logrado considerables avances: 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 inmune y de transitar, de una estirpe epitelial a una mesenquimal (TEM). En esta transición están implicadas las células madre de tumor (CMT); a las cuales se les ha responsabilizado de iniciar los tumores primarios, de la FR y de la formación de metástasis^[9,10]. Entonces, es prioritario estudiar exhaustivamente a las CMT. Sin embargo, una de las dificultades que existen en el estudio de la Biología Celular y Molecular de las CMT de CCR es que estas células se encuentran distribuidas en los tumores de CCR en un porcentaje muy bajo^[11]. Además, muy pocos grupos de investigadores han logrado aislar y expandir *in vitro* a las



CMT para estudiarlas adecuadamente^[12,13]. Es por ello, que hasta la fecha no se cuenta con un marcador específico para identificar a las CMT de CCR, ni de blancos terapéuticos dirigidos, precisamente, contra estas células^[14]. Una alternativa consiste en identificar CMT que estén expresando marcadores de resistencia en cortes histológicos y relacionarlas con la condición de resistencia a 5FUOL. De esta manera no sería necesario aislar y caracterizar a las CMT; lo cual permitiría realizar múltiples análisis simultáneamente y en una forma accesible y rápida para los laboratorios de histopatología. Al respecto, nuestro grupo de trabajo hizo recientemente las tres siguientes observaciones, como resultados de la tesis doctoral de Garza Treviño: 1) se encontró una correlación estadísticamente significativa entre el número de CMT de adenocarcinomas colorrectales (ACCRs) y la resistencia *ex vivo* de cultivos primarios de dichos tumores a 5FUOL. 2) En cortes histológicos de ACCR se observaron células que co-expresaron dos de los marcadores típicos de CMT (CD24 y CD44). 3) Por medio de secuenciación masiva del ADN de aislados de CMT, se identificaron tres marcadores moleculares que son sobre-expresados por las CMT de ACCR (ABCB1, BNIP3 Y KRT18) y que están implicados en la resistencia a 5FUOL^[15]. Estos hallazgos, en conjunto, permiten suponer que es posible identificar CMT de ACCR ABCB1⁺/BNIP3⁺/KRT18⁺, directamente en cortes histológicos de ACCR y relacionarlos con la condición de resistencia a 5FUOL y otros parámetros desfavorables para los pacientes, como la posibilidad de desarrollar metástasis y una corta expectativa de vida.

Por todas las razones expuestas, en el presente trabajo analizamos la correlación entre el área ocupada por -ACCR ABCB1⁺/BNIP3⁺/KRT18⁺ en cortes histológicos, la quimiosensibilidad *ex vivo* a 5FUOL y la respuesta clínica de los pacientes con ACCR a FOLFOX-6.

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

2.1. Definición y características del cáncer colorrectal

El CCR se define como el crecimiento incontrolado de células anormales, derivadas del epitelio del colon o del recto^[16,17]. Las células anormales, o malignas, son el producto de mutaciones que ocurren en el genoma de una sola célula (mutación clonal) y que se acumulan con el transcurso del tiempo. La *figura 1* muestra varias de las características de las células malignas que les permiten sobrevivir y proliferar en ambientes nocivos para las células sanas. El CCR se manifiesta como un surgimiento de tumores sólidos, que son capaces de producir metástasis en diversos órganos. De ahí, su condición de malignidad [18,19].

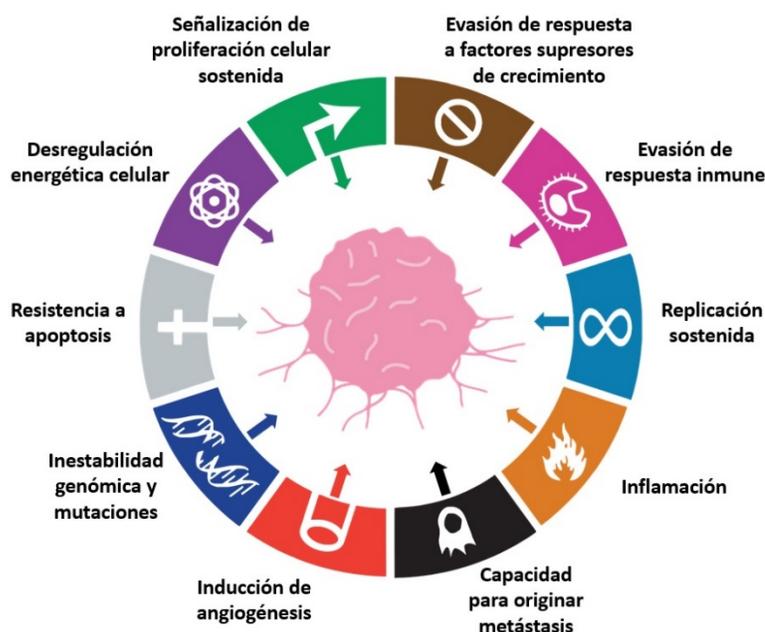


Figura 1; Características de las células malignas. En esta imagen se ilustran las ocho características fundamentales que las células malignas tienen para sobrevivir y proliferar en ambientes complejos dentro del microambiente tumoral. Imagen modificada de Hannahan & Weinberg^[19].

2.2. Epidemiología del CCR

2.2.1. Epidemiología mundial

El CCR es un problema mundial de salud pública, representa hasta el 10% del total de las neoplasias en el ser humano. Mas del 80% de los casos de CCR se manifiestan entre la quinta y octava década de la vida, con una mediana de edad de 60 años. Tiene mayor prevalencia en hombres que en mujeres, en una relación de 2:1^[1,20,21].

A nivel mundial, en el año 2018, el CCR ocupa el segundo lugar en incidencia y en mortalidad, con 1.8 millones de casos nuevos y 881,000 defunciones, respectivamente. En el sexo masculino, la incidencia del CCR ocupa el tercer lugar entre el resto de las neoplasias, situándose después del cáncer de pulmón y de próstata. Además, el CCR es la cuarta neoplasia con mayores tasas de mortalidad, después del cáncer de pulmón, carcinoma hepatocelular y cáncer de estómago, respectivamente. En el sexo femenino, el CCR ocupa el segundo lugar en incidencia, inmediatamente detrás del cáncer de mama y el tercer lugar en mortalidad, después del cáncer de mama y pulmón. La *figura 2* muestra gráficamente la relación del CCR respecto a otros tipos de cáncer. Según el GLOBOCAN, el CCR representa a 1 de cada 10 casos de defunción provocada por neoplasias^[1].

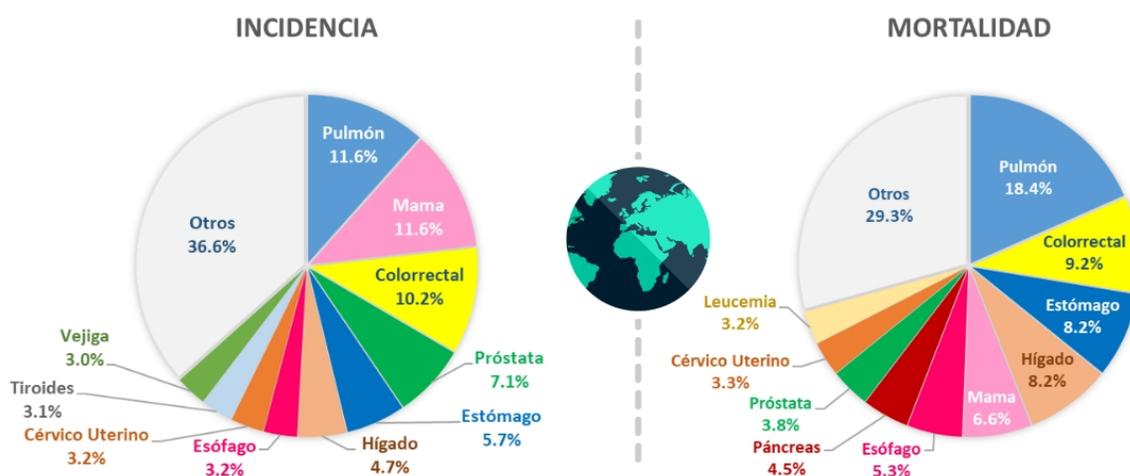


Figura 2; Incidencia y mortalidad general por cáncer en el año 2018. Los gráficos circulares representan la incidencia (gráfico izquierdo) y mortalidad (gráfico derecho) a nivel mundial por cáncer en año 2018, en donde se observa que el CCR ocupó el 3er. lugar en incidencia y 2do. en mortalidad entre el resto de las neoplasias registradas. Imagen modificada de Bray Freddie, *et. al* ^[1].

La prevalencia del CCR varía a nivel mundial, e incluso dentro de una misma región. Las tasas de incidencia son más altas en países desarrollados, debido a la implementación de herramientas de cribado para el diagnóstico oportuno, logrando diagnosticar mayor cantidad de casos en estadios tempranos (etapa clínica I o II); lo cual posibilita iniciar un tratamiento de forma oportuna. Mientras que, en los países en vías de desarrollo, el CCR generalmente se detecta en estadios avanzados (etapa clínica III o IV), dificultando el tratamiento de primera línea de los pacientes con esta neoplasia, precisamente por la invasión local, regional o a distancia que ya presentan las neoplasias al momento del diagnóstico^[22,23]. En el año 2018, las tasas más altas de incidencia de CCR se presentaron en varios países europeos desarrollados como Hungría, Noruega, Eslovenia y Eslovaquia. En América del Norte, destaca Estados Unidos y en el continente asiático, Japón y la República de Corea^[1,20].

2.2.2. Epidemiología en México

En nuestro país, el cáncer es considerado como la tercera causa de mortalidad en ambos sexos. En el año 2015, ocurrieron 85,201 defunciones por cáncer en México, mostrando un aumento considerable en las últimas tres décadas^[24]. Las neoplasias con mayores tasas de mortalidad, fueron el cáncer de próstata, de mama, cervicouterino y de pulmón. Respecto al CCR, este ocupa el séptimo lugar en mortalidad a nivel nacional con 5,853 defunciones^[25]. En cuanto a la incidencia, el CCR ocupa el tercer lugar y el primero entre neoplasias gastrointestinales (*Figura 3*)^[26].

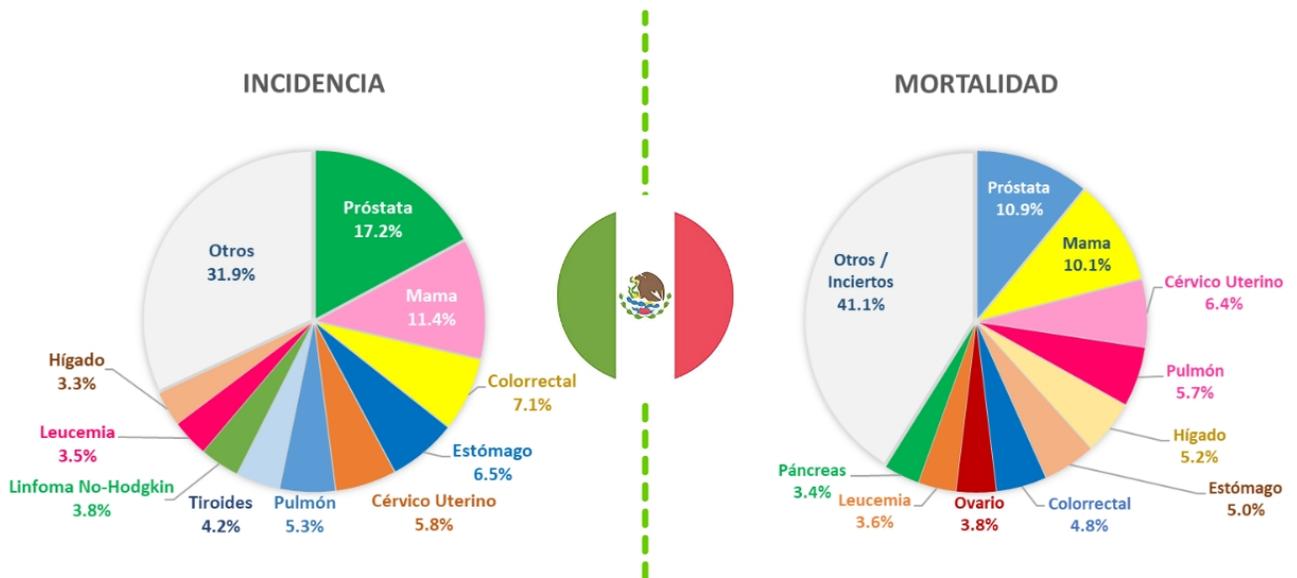


Figura 3; Incidencia y mortalidad general por cáncer en México en el año 2015. Los gráficos circulares representan la incidencia (grafico izquierdo) y mortalidad (grafico derecho) por cáncer en México en el año 2015, en donde el CCR ocupa el 3er. lugar en incidencia y 7mo. en mortalidad entre todas las neoplasias registradas, según Aldaco-Sarvide, *et. al.* y Gómez-Dantés, *et al* ^[25-26].

2.2.3. Epidemiología en Nuevo León

En el año 2008, en el estado de Nuevo León, ocurrieron 135 defunciones por CCR, de las 3275 muertes reportadas por dicha neoplasia en el país. Aunque no se cuenta hasta el momento con información epidemiológica exacta del CCR en esta región, existen escasos estudios que reportan que la mediana de la edad y el sexo predominante es similar a lo reportado con la literatura y gran parte de los casos se diagnostican en estadios avanzados presentando un rápido deterioro funcional en los pacientes que lo presentan^[27-29].



2.3. Factores de riesgo y protectores del CCR

Existen factores de riesgo para desarrollar CCR que son modificables y no modificables^[30]. Entre los factores modificables se incluyen el consumo elevado de carnes rojas y procesadas, así como cantidades excesivas de grasas y carbohidratos, la baja ingesta de fibra, frutas, vegetales, vitaminas A, C y E, diabetes mellitus, obesidad y sobrepeso, el alcoholismo, tabaquismo, la inactividad física, los antecedentes personales de pólipos adenomatosos –lesiones premalignas del CCR– y la enfermedad inflamatoria intestinal. Entre los factores de riesgo no modificables que incrementan el riesgo de desarrollar CCR se encuentra la edad mayor a 60 años, el sexo masculino y los antecedentes heredofamiliares de cáncer^[23,31,32]. Por otro lado, se han identificado factores protectores contra el desarrollo de CCR como el consumo de frutas, vegetales, el bajo consumo de carne roja, mayor consumo de pescado, fibra y aceites vegetales, el consumo de antiinflamatorios no esteroideos (AINES), la actividad física y el índice de masa corporal (IMC) normal de 18.5 a 24.9 ^[33,34].

2.4. Histología de la pared del colon

La *figura 4* muestra la estructura de la pared del colon. Ahí se observa que la pared del colon está formada por cuatro capas: la mucosa, submucosa, muscular externa y serosa^[35,36]. La *mucosa* es la superficie en contacto con el lumen intestinal y está compuesta por epitelio columnar simple, el cual es altamente dinámico y tiene las funciones de absorción, secreción y protección. El epitelio columnar simple forma invaginaciones tubulares, llamadas criptas de Lieberkühn (CL), que contienen diferentes poblaciones celulares, cuyo recambio es contante. Este proceso mantiene la homeostasis del epitelio y generalmente ocurre cada 3 o 4 días^[37]. Las células que constituyen las CL son los enterocitos (absortivos), células caliciformes (productoras de mucina), células entero-endocrinas (productoras de hormonas y aminos activas), células de Paneth (encargadas de la respuesta inmune en el intestino) y las células madre intestinales (CMI), encargadas del recambio celular hacia diferentes linajes de la cripta^[23,38,39].

La mucosa, también está formada por la *lámina propia* formada de tejido conjuntivo laxo o matriz extracelular (MEC) y una delgada capa de musculo liso llamada *muscularis mucosae*. La segunda pared del colon, es la *submucosa*, que consiste en tejido conjuntivo denso irregular, colagenoso, con abundantes vasos sanguíneos. En esta capa se encuentra, además, el plexo de Meissner, un componente del sistema nervioso entérico. La tercera capa es la *muscular externa*, formada por dos capas gruesas de musculo liso que junto con el plexo de Auerbach son responsables de mezclar, comprimir e impulsar el contenido del tubo digestivo por medio de la peristalsis. La *serosa* es la parte más externa de la pared colónica

y está compuesta por tejido conjuntivo, colágeno, elastina y tejido adiposo, revestido por epitelio plano o mesotelio que aportan propiedades lubricantes, para que las asas intestinales se deslicen entre sí^[35,40].

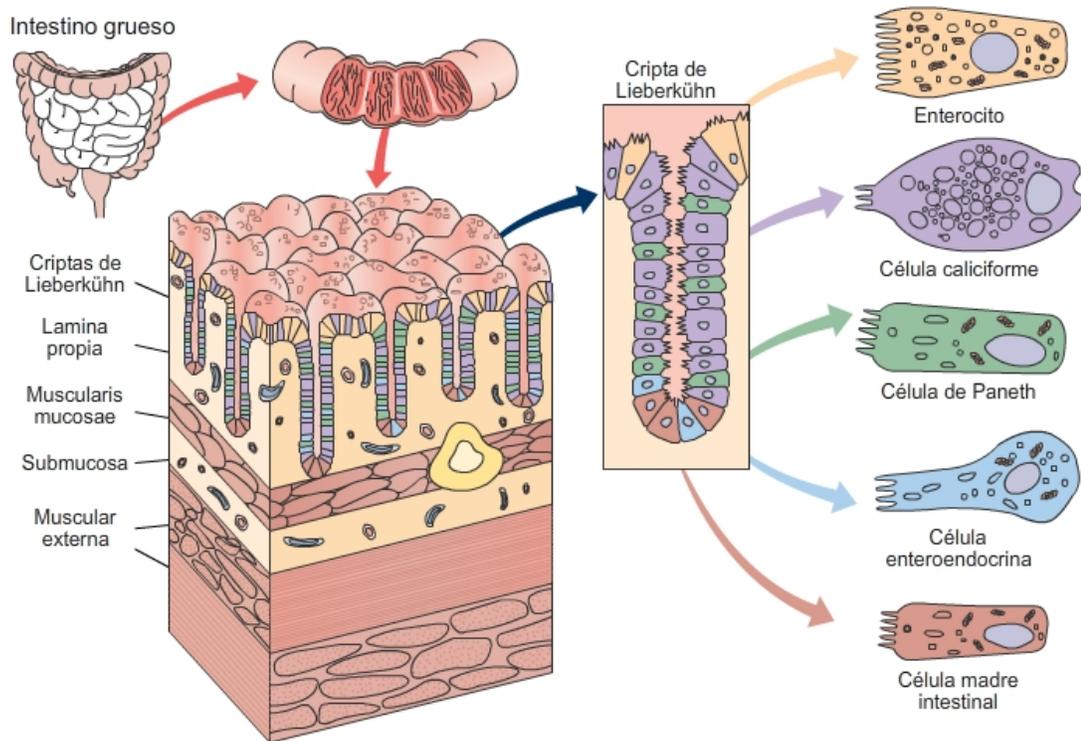


Figura 4; Estructura anatómica e histológica de la pared del colon. El colon está formado por cuatro capas que son la mucosa, submucosa, muscular externa y serosa. La mucosa a su vez, está conformada por un epitelio columnar simple, una lámina propia y una capa de tejido muscular liso, llamada *muscularis mucosae*. El epitelio forma invaginaciones en la pared de la mucosa llamadas criptas de Lieberkühn, que contienen diversos linajes celulares, entre ellos los enterocitos, las células caliciformes, enteroendocrinas, las células de Paneth y las células madre intestinales, cada una de ellas con funciones definidas que ayudan a mantener la homeostasis del epitelio colónico. Imagen modificada de Boron & Boulpaep^[40].

2.5. Biología del epitelio intestinal

Las CMI se encuentran localizadas en la base de las CL y su función es esencial en la homeostasis del epitelio gastrointestinal, definido como el equilibrio entre la ganancia y pérdida de células. Las CMI son responsables del recambio, regeneración y la diferenciación hacia las diferentes estirpes celulares que conforman las criptas. Para su identificación, presentan el marcador Lgr5⁺/GRP49⁺^[6,23] y están inmersas en un nicho celulares y estructurales, que proporcionan ligandos, factores de crecimiento y otras moléculas para su mantenimiento y correcta función. Los nichos estructurales y estromales están localizados



en la lámina propia —alrededor de las criptas— y el nicho epitelial se encuentra contiguo a las CMI-Lgr5⁺ [41,42].

El nicho estructural lo constituyen proteínas fibrosas que forman la MEC, como las fibras de colágeno (principal componente de la MEC), lamininas, glucosaminoglicanos, fibronectinas e integrinas proporcionando el andamiaje molecular y el sistema de anclaje/adhesión del epitelio con el citoesqueleto, que mantendrán la arquitectura y polaridad de las células del intestino. En tanto, el nicho estromal está conformado por células mesenquimales pericriptales como los fibroblastos, miofibroblastos, pericitos, células endoteliales, del sistema inmune y células neurales, siendo los fibroblastos las células con mayor proporción en la lámina propia^[41]. Contiguas a las CMI —dentro de la cripta—, se encuentran las células de Paneth (nicho epitelial), que además de su función secretora de péptidos antibacterianos y de la esterilización del medio circulante del nicho, proveen factores paracrinos implicados en la regulación homeostática, mantenimiento y diferenciación de las CMI^[6,42]. Es importante destacar que la comunicación entre los nichos estromales, estructurales y epiteliales con las CMI, está regulada por complejas redes de señalización que son clave para la homeostasis del epitelio gastrointestinal y que han sido objeto de estudio en diversas enfermedades, entre ellas, el CCR. Las vías de señalización implicadas son la vía Wnt- β -catenina, la vía TGF- β /BMP, Notch, Hedgehog, Noggin y Ef/Efrina (*Figura 5*)^[41].

La vía Wnt- β -catenina y Notch son esenciales para el mantenimiento de la arquitectura del epitelio intestinal, así como la adecuada diferenciación y proliferación de las CMI-Lgr5⁺. Estas se encuentran activas en la base de las CL y su silenciamiento ocurre en las partes superiores de las mismas. Las acciones de la vía Wnt- β -catenina requieren del agonista R-spondina y de ligandos-Wnt 3 y 5a suministrados por células de Paneth, fibroblastos y miofibroblastos pericriptales, respectivamente. La vía Notch, es la responsable de la definición del linaje absorbente o secretor de las células progenitoras derivadas de CMI. Sus ligandos (por ejemplo, DLL4) los suministran las células de Paneth^[6,41,42].

La contraparte de la vía Wnt- β -catenina, es la señalización TGF- β /BMP, que se activa en la parte superior de las CL y se silencia a medida que avanza a la base de las CL. Esta vía inhibe la expansión de las CMI. Sus ligandos son secretados en las partes altas de las CL y sus moléculas antagonistas (Gremlina 1 y 2, cordina y Noggin) son secretadas por células del nicho estromal. La señalización Hedgehog y Noggin se relacionan con la homeostasis de los componentes del nicho estromal y la formación de criptas, respectivamente^[6,41]. Por otro lado, la señalización de Eph/Efrina, promueve la compartimentalización y el movimiento migratorio de las células a lo largo de las criptas, además de mantener la homeostasis de CMI y de Paneth al restringir ligandos clave para su

proliferación, en territorios ya diferenciados. La efrina-B, es el ligando de esta vía y su receptor es Eph-B se encuentran ubicados en las partes superiores y en las bases de las CL, respectivamente^[41].

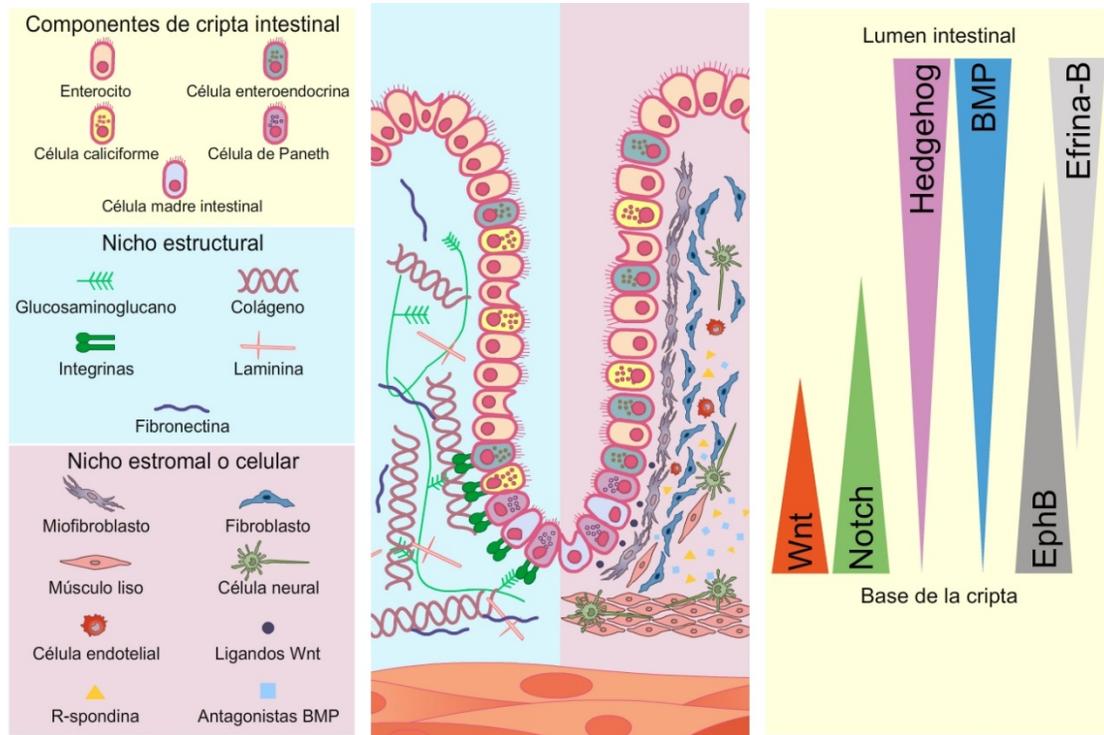


Figura 5; Organización celular y biología del epitelio gastrointestinal. La homeostasis del epitelio se debe a la adecuada función entre las células ubicadas en el interior de las criptas de Lieberkühn, el nicho estromal y el nicho estructural. Las células madre intestinales (CMI) y las de Paneth se ubican en el fondo de las criptas. Las CMI son las responsables del recambio, regeneración y diferenciación hacia los diversos linajes de células de la cripta, en tanto que, las células de Paneth, se encargan de proveer factores paracrinos a las CMI, para que estas ejecuten sus funciones. Conforman el nicho estromal y estructural, células y moléculas inmersas en la matriz extracelular, respectivamente (parte derecha de la figura). La homeostasis epitelial requiere la participación de vías de señalización involucradas con la proliferación y destino de linajes, como la vía Wnt, Notch, Hedgehog, BMP, Eph/Efrina. La participación de estas vías de señalización se destaca en triángulos a la derecha de la imagen, la parte más ancha indica mayor activación de la vía, la parte más angosta indica menor participación de la vía. Imagen modificada de Meran y cols. ^[41].

2.6. Anatomía patológica del CCR

La localización más frecuente del CCR es el recto (60% de los casos), seguido del colon sigmoide/descendente (25%) y ciego/válvula ileocecal (10%). Los signos de CCR en el lado derecho del intestino, son frecuentemente la obstrucción de la luz del intestino y anemia; mientras que en el lado izquierdo predomina la presencia de sangre oculta en heces y cambios en el hábito intestinal^[17,43].

En el análisis macroscópico del CCR, los tumores tienden a presentar formas polipoides y constrictivas o anulares. Tienen bordes irregulares, mal circunscritos y ulcerados, independientemente de la localización. Las formas polipoides se presentan con

mayor frecuencia en el colon derecho, como masas exofíticas que se proyectan al lumen intestinal. Las formas constrictivas rodean la pared intestinal en forma circunferencial y presentan una ulcera central en su superficie, rodeada de bordes sobreelevados (estenosis en servilletero), estos localizados en colon izquierdo y recto, principalmente (Figura 6)^[18,44].

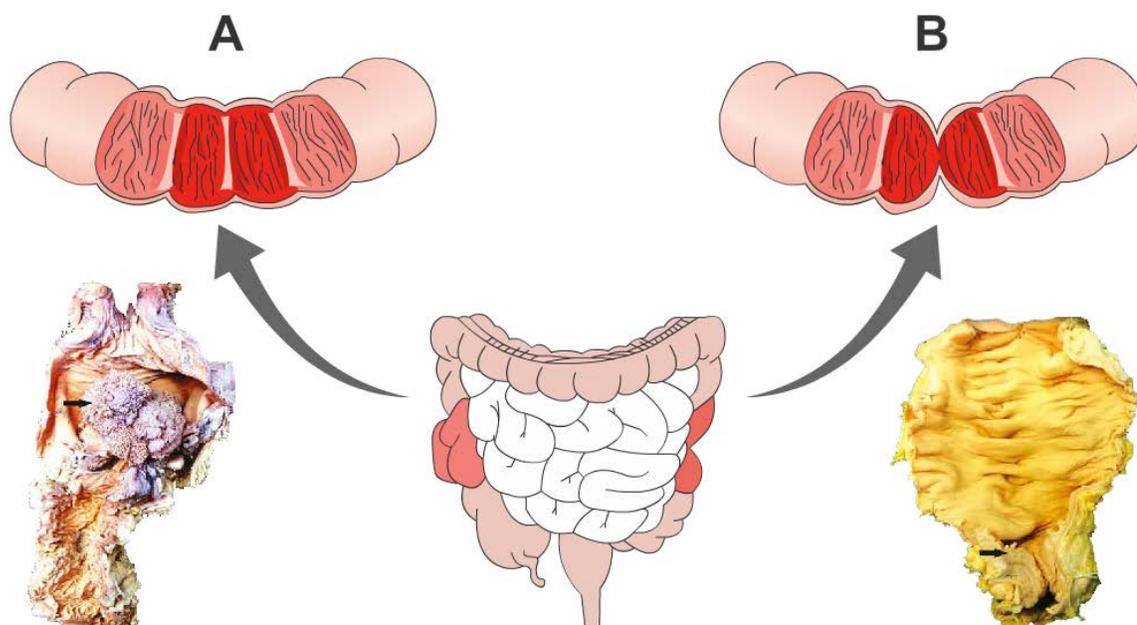


Figura 6; Aspecto macroscópico del cáncer colorrectal. En el lado A de la figura se muestra una masa tumoral polipoide que muestra proliferación exofítica en forma de “coliflor” (flecha negra de imagen inferior, lado A), característicos de las masas tumorales por CCR en el lado derecho del colon. En el lado B, se muestra la tumoración en el lado izquierdo del colon, la cual tiene configuración en “anillo de sello”, la cual rodea la pared intestinal (flecha negra de imagen inferior, lado B), estas lesiones son características del CCR ubicadas en el lado izquierdo y en recto. Imagen modificada de Mohan ^[18].

Las características microscópicas del CCR no difieren según la localización, sin embargo, existen diferentes variedades histológicas del CCR. La variedad más frecuente (95% de los casos) es el adenocarcinoma colorrectal (ACCR). A su vez, el ACCR presenta diferentes grados de diferenciación. Los ACCR indiferenciados/anaplásicos, son los que tienden a tener un pronóstico más desfavorable. El ACCR se disemina por propagación directa a estructuras adyacentes y por metástasis a vasos (diseminación linfática y hematogena), siendo los ganglios linfáticos, el hígado, los pulmones y los huesos, los sitios más frecuentemente invadidos^[18,43].

2.7. Diagnóstico y estadiaje del CCR

El diagnóstico del CCR está basado en la historia clínica, exploración física y estudios complementarios invasivos y no invasivos. La colonoscopia con toma de biopsias constituye el estándar de oro para la determinación del diagnóstico definitivo, porque este método



permite la visualización directa de las lesiones tumorales. Aunque la colonoscopia es un método diagnóstico invasivo, esta práctica se ha asociado a una disminución de mortalidad por CCR, debido a la implementación de cribados preventivos desde los 50 años de edad. La detección del antígeno carcinoembrionario y CA 19-9, también han sido utilizados para detectar y mantener el control de recidivas, sin embargo, esta prueba tiene una baja sensibilidad y especificidad^[44-47].

Para el estadiaje del CCR, se usa frecuentemente el sistema de clasificación *TNM* (*tumor, node and metastasis*). Este sistema es muy útil para determinar el pronóstico y ayuda a seleccionar el tratamiento que se ha de administrar a los pacientes. La clasificación *TNM* se determina de acuerdo con el grado de invasión tumoral en las diferentes capas de la pared intestinal, así como la presencia de metástasis a ganglios linfáticos y otros órganos, y no por el tamaño del tumor primario. Existen otros sistemas de estadiaje para neoplasias colorrectales como la clasificación de Astler-Coller (modificado del sistema Dukes)^[18,43,44]. Los sistemas de estadificación y su relación con la supervivencia a 5 años se presentan en la *Tabla 1*.

Tabla 1; Sistemas de clasificación de neoplasias colorrectales

Estadio	TNM	Astler-Coller	Características anatomopatológicas	Supervivencia a 5 años
I	T1 N0 M0	A	Neoplasia limitada a mucosa	> 90%
II	T2 N0 M0	B1	Neoplasia afecta submucosa	85%
II	T3 N0 M0	B2	Neoplasia afecta muscular +/- serosa	70 - 80%
III	Tx N1 M0	C1	Neoplasia afecta muscular + GL regionales	35 - 65%
III	Tx N1 M1	C2	Neoplasia afecta serosa + GL regionales	20 - 35%
IV	Tx Nx M1	D	Metástasis a distancia	5%

Abreviaturas: GL; Ganglio linfático, X; Cualquier número. Modificado de Mohan ^[18]

2.8. Tratamiento del CCR

El tratamiento base del CCR es la cirugía. Su objetivo principal es la remoción del tumor primario y la disección de ganglios linfáticos hasta tener márgenes negativos a neoplasia, sin embargo, la cirugía como único tratamiento, solo se destina para los pacientes con estadios iniciales del CCR, mientras que la terapia sistémica (quimioterapia) adyuvante o neoadyuvante junto con la cirugía son el tratamiento principal de los estadios avanzados^[16,45].

La base de la terapia sistémica para el tratamiento de neoplasias colorrectales es el 5-fluorouracilo (5- FU). Este no es eficaz en monoterapia y con frecuencia se combina con otros antineoplásicos, como oxaliplatino y ácido folínico —conocido también como leucovorina—. Estos tres fármacos, combinados, forman el esquema FOLFOX-6; el cual es



uno de los esquemas quimioterapéuticos estándar para el ACCR. Otro esquema muy utilizado es la combinación de 5-FU, leucovorina e irinotecan (FOLFIRI). La capecitabina, por otro lado, es un profármaco de 5-FU administrado a los pacientes vía oral; el cual, combinado con oxaliplatino conforman el armamentario de XELOX^[45,48]. Todos estos esquemas de terapia presentan una tasa de respuesta terapéutica no mayor al 50% y un rango de supervivencia de 17 a 20 meses, después de iniciado el tratamiento. La mayoría de los pacientes mueren debido al surgimiento de células malignas farmacorresistentes. Este mecanismo biológico, es responsable de la recurrencia del ACCR, hasta en el 90% de los casos^[48-50]. Los mecanismos de acción de la terapia sistémica se muestran en la *Tabla 2*.

Tabla 2; Mecanismos de acción de fármacos antineoplásicos utilizados en CCR

Terapia	Fármaco	Nombre	Clase farmacológica	Mecanismo de acción
Terapia sistémica/ Agentes citotóxicos	5-FU	Adrucil®	Antimetabolitos - Análogos de pirimidina	Inhibición de la TS necesaria para la síntesis de ADN y el crecimiento celular.
	Capecitabina	Xeloda®		
	Oxaliplatino	Eloxatin®	Complejos de platino	Inhiben la replicación del ADN por la inducción de enlaces cruzados en sus cadenas, en la fase G1 y S del ciclo celular, favoreciendo apoptosis.
	Leucovorina	Wellcovorin®	Análogos del ácido fólico	Coenzima que incrementa la eficacia de 5-FU, estabilizando su unión con la TS para inhibirla.
	Irinotecan	Camptosar®	Campotecinas	Inhiben la topoisomerasa I, responsable del desenrollamiento del ADN durante la replicación. Es específico de la fase S del ciclo celular.

Abreviaturas: CCR; Cáncer colorrectal, 5-FU; 5-Fluorouracilo, TS; Timidilato sintasa, ADN; Ácido desoxirribonucleico.

2.9. Valoración del estado funcional del paciente con ACCR

En la práctica clínica, la valoración del estado funcional, autocuidado, dependencia y de la calidad de vida del paciente se realiza por medio del Índice de Karnofsky (IK)^[51]. El IK contempla un puntaje de 0 a 100 para el desempeño de los pacientes con cáncer. En donde, 0 significa que el paciente ha fallecido y 100 indica que el paciente realiza todas sus actividades de forma normal (*Tabla 3*)^[52]. Se ha reportado que el valor del IK correlaciona con la supervivencia, pronóstico y la respuesta a la quimioterapia y que los pacientes con un IK menor a 50, tienen mayor probabilidad de fallecer en un lapso de 6 meses^[53]. Cabe aclarar que la asignación del IK dentro de un nivel en esta escala se hace en forma subjetiva, existiendo alta variabilidad inter-observador, sin embargo, el IK constituye una herramienta muy útil para valorar a los pacientes, ya que su aplicación en la clínica es fácil y rápida^[51,52,54].



Tabla 3; Índice de Karnofsky

Nivel dependencia	Valoración	Criterios
A Realiza actividades y trabaja de forma normal; no necesita cuidados especiales.	100	Normal, sin quejas, sin indicios de enfermedad.
	90	Actividades normales, pero con signos y síntomas leves de enfermedad.
	80	Actividad normal con esfuerzo, con algunos signos y síntomas de enfermedad.
B Incapaz de trabajar; capaz de cuidar la mayoría de las necesidades personales.	70	Capaz de cuidarse, pero incapaz de llevar a término actividades normales o trabajo.
	60	Requiere atención ocasional, pero puede cuidarse a sí mismo.
	50	Requiere asistencia considerable. Encamado menos del 50% del día.
C Incapaz de cuidar de sí mismo; Requiere atención hospitalaria o institucional.	40	Incapacitado, necesita cuidados especiales. Encamado más del 50% del día.
	30	Invalído grave, tratamiento de soporte activo.
	20	Muy grave, encamado por completo, necesita hospitalización y tratamiento activo.
	10	Moribundo.
	0	Muerto.

2.10. Biopatología de la carcinogénesis colorrectal

El CCR se debe a la acumulación de mutaciones genéticas multisequenciales a lo largo del tiempo e involucra alteraciones variadas en la arquitectura de la mucosa gastrointestinal que terminan por generar una masa tumoral con alto potencial metastásico. Estos cambios genéticos están involucrados en la patogénesis del ACCR por medio de dos vías moleculares: La vía canónica *APC/β*-catenina (también llamada secuencia adenoma-carcinoma o vía de inestabilidad cromosómica) y la vía de los genes de reparación de errores del ADN (o vía de inestabilidad microsatelital)^[6,55,56].

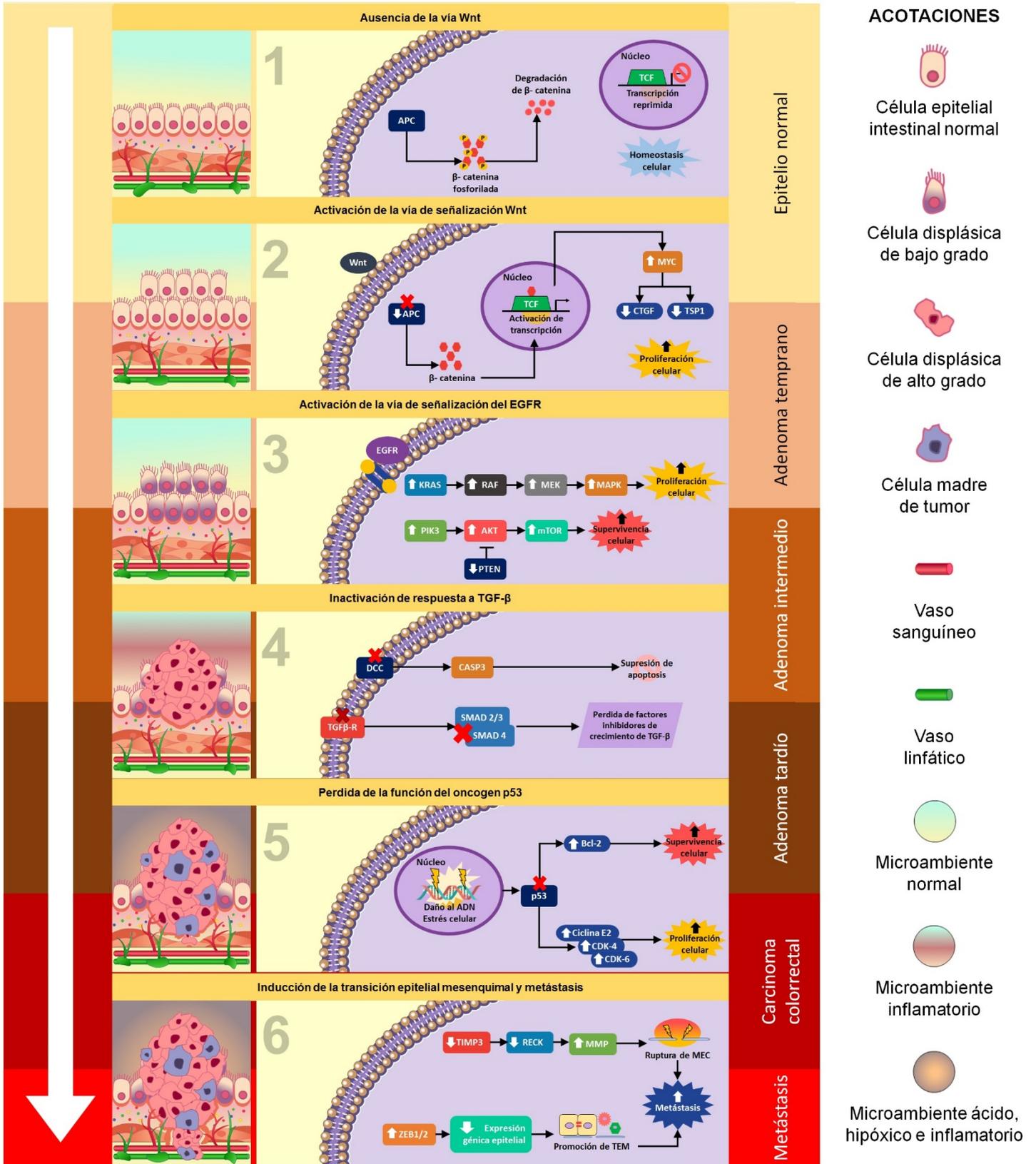
La vía canónica, se encuentra alterada en el 85% de los casos esporádicos de ACCR. En los inicios de la patogénesis de esta neoplasia, el gen *APC* que fisiológicamente regula la adhesión, migración y apoptosis celular en las CL, se encuentra mutado con frecuencia (más del 80% de los casos), generando la formación de criptas aberrantes y displásicas, que llevarán a la formación de adenomas. Este gen está en constante relación con la vía *Wnt-β*-catenina, fundamental para la homeostasis del epitelio gastrointestinal. La pérdida de *APC* genera en el citoplasma de la célula, la acumulación constante *β*-catenina desfosforilada y su translocación al núcleo (normalmente es degradada y fosforilada en citoplasma cuando está presente *APC*) y activa constantemente la transcripción de *c-myc* y ciclina *D₁*, relacionados con el crecimiento, proliferación y supervivencia celular incontrolada. También, las mutaciones puntuales en el gen *K-ras*, que codifica para proteínas que interrumpen las



vías de señalización de receptores de factores de crecimiento (como *EGFR*), entre ellas las *MAPK* y *PIK3* (un segundo mensajero) y las deleciones en los genes supresores de tumores *DCC*, *SMAD 2* y *SMAD4*, contribuyen en forma importante a la transición adenoma-carcinoma^[55-59].

Por otro lado, *TP53*, un supresor tumoral que regula la transcripción de genes que codifican para proteínas reguladoras de los *checkpoints* del ciclo celular, apoptosis y angiogénesis, resulta mutado en el 80% de los casos de ACCR, constituyendo un paso crítico en la transformación de los adenomas displásicos de alto grado a carcinomas *in situ* e invasores (*Figura 7*, pág. 15)^[55-57].

Figura 7; Modelo de progresión del CCR y carcinogénesis molecular. El CCR se debe a la acumulación secuencial de lesiones genéticas; las cuales se suceden a lo largo del tiempo. Estos cambios se manifiestan como una transición de mucosa normal del intestino a carcinoma invasivo. En la mucosa normal, el gen *APC*, que regula el crecimiento celular y la apoptosis degrada normalmente a la β -catenina fosforilada en el citoplasma. De esta manera se inhibe la transcripción de los genes involucrados en proliferación celular (**recuadro 1**). Por otro lado, ciertas mutaciones en el gen *APC* (que ocurren el 80% de los casos de CCR), dan lugar a la formación de criptas aberrantes, displasia y formación de adenomas. Esto se debe a que, en ausencia de *APC*, β -catenina desfosforilada activa la transcripción de genes como *c-myc* que inducen la proliferación celular descontrolada (**recuadro 2**). Además, existen mutaciones en la señalización de receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*), de *k-ras*, involucrada en la transducción de señales mitogénicas que culminan en proliferación celular y de *AKT*, que favorecen la autofagia y con ello la supervivencia celular (**recuadro 3**). En los adenomas intermedio-tardíos, también existen mutaciones en el gen *DCC* (un supresor de tumores), en el receptor del factor de crecimiento transformante β (*TGF β -R*) y en *SMAD2/3* y *4*, que favorecen la pérdida de respuesta a factores inhibidores de crecimiento y la supresión de apoptosis (**imagen 4**). Las mutaciones en *p53* resultan comunes en el CCR, debido a lesiones en el ADN; lo que resulta en inestabilidad genética y estrés celular. Esto provoca la sobreexpresión de proteínas anti-apoptóticas (*Bcl-2*) y el aumento de la actividad de ciclina E2 (**imagen 5**), con ello favoreciendo la supervivencia y proliferación celular en entornos que les resultarían lesivos a las células normales. Por último, también se activa la expresión de genes y proteínas capaces de escindir la matriz extracelular, como las metaloproteinasas (*MMP's*), además de que las células tumorales adquieren propiedades móviles e invasivas por medio de transición epitelio-mesenquimal (**imagen 6**), con ello generan metástasis a órganos distantes.





En cambio, la vía del mecanismo de inestabilidad microsatelital, se encuentra alterada en hasta el 15% de los casos de ACCR. Las mutaciones en línea germinal de los genes de reparación de errores de bases del ADN, como *MSH2*, *MSH6*, *MLH1*, *PMS1* y *PMS2* impiden la corrección de errores de transcripción y favorecen la proliferación celular y la supresión de apoptosis generando la aparición de ACCR^[56,58,59].

Es importante mencionar que dentro de la patogénesis del ACCR, la inflamación y el microambiente tumoral, participan en forma importante en la transformación adenoma-carcinoma y la progresión hacia metástasis, por medio de procesos biológicos como la transición epitelio-mesenquimal^[55,56].

2.11. Transición epitelio-mesenquimal

La transición epitelio-mesenquimal (TEM) es un proceso biológico dinámico, mediante el cual las células epiteliales (inmóviles y adheridas a la lámina propia) a células mesenquimales; las cuales son móviles e invasivas. Es decir, las células mesenquimales derivadas de tumores pueden perforar la MEC, abrirse paso a través de ésta y llegar a diferentes órganos^[60-62]. La TEM implica la participación de una red compleja de moléculas efectoras, factores de transcripción y una activación aberrante de vías de señalización, que permiten a las células mesenquimales adaptarse al microambiente tumoral; el cual es hipóxico y lesivo para las células normales. Bajo esas condiciones, las células mesenquimales derivadas de tumores pueden proliferar, diferenciarse y resistirse a la apoptosis. Condiciones que favorecen la formación exitosa de micrometástasis^[63,64]. Las moléculas efectoras de la TEM son proteínas que definen el fenotipo epitelial o mesenquimal de las células. Se ha reportado que las células epiteliales expresan E-cadherina, *ZO-1*, claudinas y ocludinas, que, en conjunto, mantienen la adhesión célula-célula y la polaridad ápico-basal. Por otro lado, la mayoría de las células mesenquimales sobreexpresan N-cadherina, fibronectina, vimentina y α -SMA. Estos marcadores se asocian con un alto grado de malignidad de las neoplasias, con resistencia a las quimioterapias, con un pronóstico desfavorable y recurrencia del cáncer. Además de los marcadores mencionados, las células malignas pueden identificarse porque cambian su morfología, debido a una reorganización de su citoesqueleto y secretan moléculas proteolíticas, como metaloproteasas (MMP), capaces de destruir la lámina basal de los tejidos y diseminarse a través de vasos sanguíneos, linfáticos y órganos distantes, como se ilustra en la *figura 8* (pág. 17)^[63,65,66].

Los factores de transcripción que participan en la TEM son Snail/Slug, *TWIST1/2*, *ZEB1/2*, *PROX* y miembros de la familia *FOX*. Estos regulan negativamente la expresión de marcadores epiteliales y expresan de forma aberrante marcadores de fenotipo mesenquimal. La sobreexpresión de estos factores de transcripción también se ha asociado con

características clínico-patológicas desfavorables en pacientes con ACCR. Por último, los inductores de la TEM constituyen vías moleculares de señalización celular que se activan individualmente o en conjunto. Estas son la vía Wnt- β -catenina y *TGF- β /Smad*, Notch, Hedgehog, *PIK3/Akt*, principalmente. La hiperactivación anormal de estas vías en el ACCR, conduce a la regulación negativa por medio de factores de transcripción (principalmente Snail) de marcadores epiteliales y la ganancia de marcadores mesenquimales^[61–63].

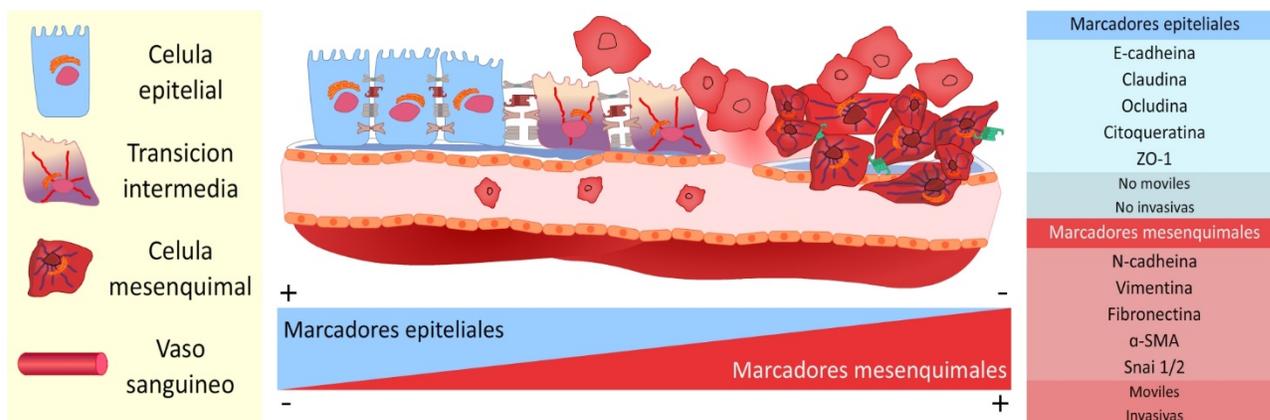


Figura 8; Transición epitelial mesenquimal (TEM). La TEM es un proceso biológico mediante el cual las células epiteliales, normalmente inmóviles, se transforman en células mesenquimales, sobreexpresando N-cadherina, vimentina y Snai, e inhibiendo la expresión de marcadores epiteliales como E-cadherina, ZO-1, claudinas y ocludinas. Con ello, las células transformadas adquieren propiedades móviles e invasivas, que permiten migrar hacia otros órganos. En las barras triangulares ubicadas en la parte inferior de la figura, se observan los cambios representativos de este fenómeno. La barra azul indica las proteínas y características que presentan las células epiteliales, mientras que la barra roja, indica las proteínas y características que presentan las células mesenquimales.

2.12. Microambiente tumoral

El microambiente tumoral es una red compleja de interacciones entre las células malignas y las células del estroma inmersas en la MEC. Entre estas células están los fibroblastos (principales componentes del estroma tumoral), células del sistema inmune, mieloides, endoteliales, pericitos, entre otras^[67–69]. En este microambiente, participan también mediadores inflamatorios, vías de señalización, factores de crecimiento y metabolitos, embebidos en un medio tumoral ácido e hipóxico, proporcionando un ambiente idóneo para la invasión de las células tumorales a la MEC y supervivencia prolongada de estas células malignas, debido a la inhibición de la apoptosis, el escape del sistema inmune, la activación de la autofagia y de la angiogénesis^[68,70].

Una subpoblación celular dentro del microambiente tumoral, ha cobrado gran importancia debido a su capacidad de resistencia a quimioterapias estándar, estas son las células madre de tumor (CMT)^[67–69,71]. El estudio extenso de los mecanismos biológicos de FR que presentan las CMT, así como su identificación en tejidos, es un reto en la actualidad.

2.13. Células madre de tumor (CMT)

Las células madre de tumor (CMT) son una subpoblación celular inmersa en el microambiente tumoral con características genóticas y fenotípicas distintas de otras estirpes celulares^[72]. Las CMT han sido vinculadas directamente con la resistencia a quimioterapia, recaídas, crecimiento y progresión tumoral, y la formación de metástasis. Además, las CMT son las principales responsables de la iniciación y repoblación tumoral, por lo que han sido llamadas las “células iniciadoras del cáncer”. Estas representan entre 1% y el 10% del total de células de un tumor y están constante comunicación con el microambiente tumoral; el cual favorece la activación de los múltiples mecanismos de resistencia a quimioterapia^[10,71,73].

El origen de las CMT es controversial y existen múltiples teorías que abordan su desarrollo, sin embargo, la más aceptada es la del modelo jerárquico, en donde se postula que las CMT son originadas a partir de células madre normales (CMN), progenitoras y de células tumorales sometidas a dediferenciación. Es decir, células transformadas que pasaron por una TEM, que presentan mutaciones en genes supresores de tumores y oncogenes (*Figura 9*)^[10,11,73,74]. El modelo jerárquico, posibilita el entendimiento de futuras estrategias terapéuticas en los pacientes con ACCR, entre ellas el uso de agentes quimioterapéuticos que por un lado ataquen a células tumorales o del estroma y por otro, su combinación con agentes dirigidos selectivamente a CMT. Estas estrategias posiblemente tengan un impacto positivo en la sobrevida de los pacientes^[10,75].

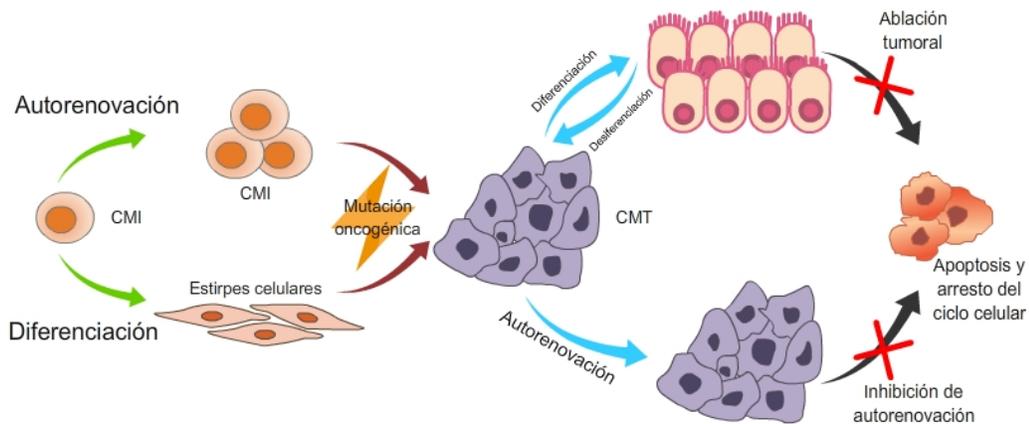


Figura 9; Origen de las células madre de tumor (CMT). Las células madre intestinales (CMI) presentan la característica de autorrenovación y diferenciación multilinaje, cuando estas células presentan mutaciones oncogénicas, se transforman en CMT. Las CMT también pueden originarse de células tumorales diferenciadas, por medio de un proceso de dediferenciación. Las CMT adquieren las características de las CMI, generando de esta manera nuevas CMT y células tumorales diferenciadas, lo que contribuye a la heterogeneidad del microambiente tumoral. Las CMT se consideran las células iniciadoras del cáncer. La eliminación de las CMT podría ayudar a la ablación tumoral por medio de procesos biológicos como la apoptosis. Imagen modificada de Phi, *et.al*^[10].



2.13.1. Características de las CMT

Las CMT presentan cinco características principales: la autorrenovación ilimitada, pluripotencialidad, control homeostático, quiescencia y capacidad para formar o repoblar tumores. La propiedad de autorrenovación se refiere a la capacidad de las CMT de formar nuevas CMT idénticas. Por otro lado, la pluripotencialidad, se refiere a la capacidad de las CMT para diferenciarse a diferentes estirpes celulares del microambiente tumoral. El control homeostático es la capacidad que tienen las CMT para modular y equilibrar la diferenciación y la autorrenovación de las células, por último, la quiescencia, que se ha definido como la capacidad de las CMT para entrar en un estado de reposo (fase G₀ del ciclo celular), cuando las CMT están expuestas a un microambiente desfavorable, p.e., la exposición a quimioterapia, hipoxia o falta de nutrientes^[73,74,76,77].

La desregulación en los procesos de autorrenovación y la pérdida del control homeostático, son responsables del gran potencial que tienen las CMT para iniciar la formación de tumores. Se ha reportado que las CMN comparten ciertas características con su contraparte, las CMT^[76,78,79]. En la *tabla 4*, se muestra una comparación entre CMN y CMT.

Tabla 4; Características de células madre normales y células madre de tumor.

	CMN	CMT
Autorrenovación	Si	Si
Duración del ciclo celular	Ciclo prolongado	Ciclo corto
Estabilidad genómica	Si	Alterada
Capacidad de reparación del genoma	Si	Alterada
Localización en CL	Parte basal	Parte basal
Diferenciación	No diferenciadas, pero se diferencian a células normales.	No diferenciadas, pero forman células anormales heterogéneas
Resistencia a quimio/radioterapia	No	Si
Resistencia a hipoxia	No	Si
Vías de señalización	Wnt, Notch y HH en homeostasis	Wnt, Notch y HH alteradas
Identificación	LGR5 ⁺	Variable en cada tejido

Abreviaturas: CMN; Células madre normales, CMT; Células madre de tumor, CL, Cripta de Lieberkühn, TGF- β ; Factor de crecimiento transformante- β , HH; Vía de señalización Hedgehog.



2.13.2. Mecanismos moleculares de farmacorresistencia en CMT

Las CMT están implicadas en la resistencia a antineoplásicos y son las principales responsables de las recaídas y metástasis debido a la heterogeneidad tumoral^[10,73,74]. La FR se ha clasificado en adquirida y *de novo*. La FR adquirida, es aquella en donde los pacientes responden de forma inicial al tratamiento, pero poco tiempo después presentan recaídas y resistencia terapéutica, es considerado el tipo más frecuente de FR. Por otro lado, en la FR *de novo*, los pacientes son refractarios al tratamiento desde su inicio^[80]. La FR representa un problema común en los pacientes oncológicos, siendo una de las causas principales por las cuales los pacientes fallecen o presentan recaídas de enfermedad. Otro problema en oncología es que, hasta el momento, los esquemas terapéuticos, solamente están dirigidos hacia células tumorales diferenciadas y sensibles a los medicamentos antineoplásicos, por lo que las CMT permanecen indemnes^[11,77,81].

La FR en las CMT se debe a que estas células presentan múltiples mecanismos moleculares de defensa contra agentes que les resultan lesivos, estos son: la sobreexpresión de transportadores de fármacos o bombas de eflujo, la activación de enzimas desintoxicadoras en citosol, la reparación mejorada del ADN, la quiescencia e inactivación de vías apoptóticas. Estos mecanismos en conjunto, activan de forma aberrante las vías de señalización Wnt- β -catenina, HH y Notch, además de alterar el microambiente tumoral o someterse a TEM ^[74,81,82].

La sobreexpresión de transportadores de fármacos es el mecanismo de FR más común en las CMT, donde la familia de transportadores de unión a ATP (bombas de eflujo ABC), son las principales representantes. Estas moléculas tienen la capacidad de transportar los agentes quimioterapéuticos hacia el exterior de la célula tumoral, lo que dificulta que los fármacos lleguen a una concentración plasmática eficaz. Se ha reportado que junto con la eliminación del fármaco también se exportan moléculas que favorecen la tumorigénesis. Se han considerado como armas de doble filo; debido a que, por una parte, eliminan xenobióticos y toxinas dañinas para las células, pero, por otra parte, eliminan fármacos de las células en condiciones patológicas. La vía Wnt- β -catenina y *HIF-1 α* regulan la expresión de las bombas de eflujo^[81,82].

Otro mecanismo de defensa de las CMT contra la quimioterapia es su capacidad para desintoxicarse. Este mecanismo consiste en degradar a los fármacos, mediante la actividad de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH); la cual convierte aldehídos tóxicos derivados del metabolismo, en ácidos carboxílicos. La expresión de ALDH está regulada por medio de vías Notch-HH^[10,82].

La inhibición de la apoptosis llevada a cabo por la sobreexpresión de miembros de la familia Bcl-2 en conjunto con proteínas Bad y Bim (antiapoptóticas) y la represión de

proteínas Bax y Bak (proapoptóticas) en respuesta a daños en p53 es otro mecanismo de FR de las CMT, junto con los mecanismos mejorados de reparación de ADN por medio de proteínas BCRA - Rad51 y la quiescencia, esta última activando *mTOR*. La activación de vías de prosupervivencia por parte de las CMT, también induce la expresión de proteínas antifagocíticas y la autofagia, en esta última interviene el gen *BNIP3* que codifica para proteínas que interaccionan con Bcl-2, logrando resistir condiciones adversas y evadir del sistema inmune^[74,81–83]. Los mecanismos de FR, se resumen en la *Figura 10*.

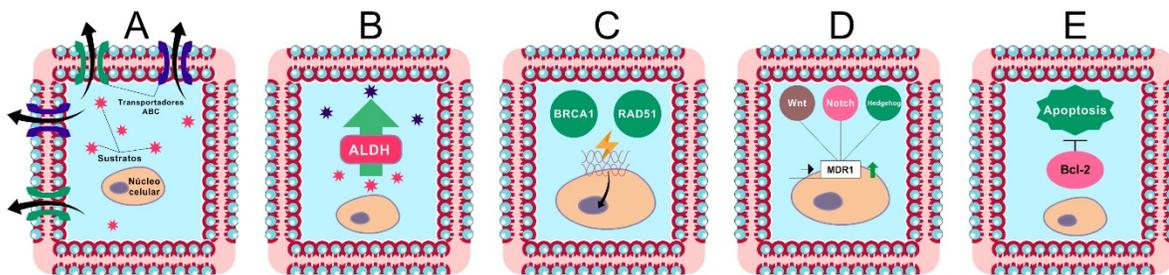


Figura 10; Mecanismos de farmacorresistencia de las células madre de tumor. En la imagen A se muestra la sobreexpresión de las bombas de eflujo ABC. Éstas son transportadoras transmembrales que expulsan de las células a los fármacos antineoplásicos; y así, evitando que éstos alcancen concentraciones letales para las CMT. En la imagen B, se muestra la sobreexpresión de las enzimas detoxificadoras ALDH, que degradan e inactivan a algunos agentes terapéuticos. La imagen C muestra el mecanismo de reparación mejorada del ADN, mediante la expresión de las proteínas BRCA y Rad51. La imagen D corresponde a la activación de vías de señalización celular alteradas, que finalmente activan la transcripción de genes que codifican para proteínas de multidrogorresistencia (MDR). La imagen E indica la supresión de apoptosis por medio de la sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas derivadas de Bcl-2. Imagen modificada de Babashah^[74].

2.13.3. Marcadores de CMT

Las CMT se aislaron por primera vez hace más de una década en la leucemia mieloide aguda. Los aislados de CMT de esta neoplasia mostraban una capacidad de autorrenovación ilimitada y fueron identificadas por ser portadoras de marcadores de superficie denominados *cluster of differentiation (CD's)*^[84]. Posteriormente se encontraron en tumores sólidos. Se ha reportado que los marcadores típicos de CMT de ACCR son: CD24, CD26, CD44, CD133, CD166 (ALCAM), CD326 (EpCAM) y ALDH1. La expresión de los marcadores antes mencionados se asoció con la formación de tumores, diferenciación a distintos linajes celulares, autorrenovación y FR. Sin embargo, estos marcadores también están presentes en CMN^[74,85–87]. La identificación específica de CMT es, en la actualidad, un reto; debido a la heterogeneidad que estas células presentan. La búsqueda de biomarcadores específicos de CMT constituye un campo de investigación activo, debido a que, en un futuro con su identificación específica, se podrían implementar terapias dirigidas, ser usados como marcadores pronósticos de supervivencia y de respuesta al tratamiento^[74,85]. A



continuación, se ofrece una breve revisión de los marcadores de CMT en CCR, aclarando que no son específicos de esta neoplasia.

2.13.3.1. CD24

CD24 es una proteína anclada por glicosil-fosfatidilinositol a la membrana celular, está compuesta de 27 aminoácidos. Se encuentra en la superficie de los linfocitos B, granulocitos y células tubulares renales. Juega un papel importante en la interacción célula-célula y adhesión celular^[86,88,89]. Se ha reportado su expresión en una amplia variedad de neoplasias, asociándose a inducción de TEM, desarrollo de metástasis y peor pronóstico cuando se encuentra sobrepresada^[90-92]. CD24 actúa como ligando para P-selectina, un receptor de células endoteliales y plaquetas, que al estar en contacto inicia el rodamiento de las células tumorales dentro del endotelio para formar metástasis. CD24 coexiste con CD44, CD29 y CD31 en diferentes neoplasias^[88,89,93].

2.13.3.2. CD26

CD26 conocida también como dipeptidil peptidasa-4 (DPP4), es una glicoproteína estructural de la membrana celular expresada en células endoteliales, epiteliales y linfocitos B, se asocia con la regulación del sistema inmune y transducción de señales. CD26 desempeña un papel esencial en el metabolismo de la glucosa. Es considerado un marcador de CMT de CCR debido a que promueve la formación de tumores *in vivo*, de esferoides *in vitro* y FR a cisplatino y 5-FU cuando se encuentra sobrepresada junto con CD133 en las líneas celulares de CCR SW620 y HCT116. Por otro lado, actúa como una molécula de adhesión y regula al alza la expresión de MMP, además de promover la TEM y la migración de células tumorales por vasos sanguíneos. Su sobrepresión ha sido documentada en diferentes neoplasias, entre ellas el ACCR, considerándose como un marcador predictivo de metástasis^[94-96].

2.13.3.3. CD44

CD44 es una proteína transmembranal expresada en células endoteliales, epiteliales, fibroblastos y leucocitos. Está involucrada en procesos de proliferación, adhesión, migración celular, hematopoyesis y activación de linfocitos. Molecularmente está conformada por un dominio extracelular (ectodominio), uno transmembranal y uno citoplasmático. El ectodominio se encuentra en interacción con el microambiente y es un correceptor de factores de crecimiento, citocinas y proteínas tirosina-cinasas, mientras que el dominio citoplasmático es el encargado de la transducción de señales, mediando la transcripción de genes. Su principal ligando es el hialuronato, este último inmerso en la MEC^[89,97,98].



En el ACCR, la sobreexpresión de CD44 juega un papel importante en la progresión, metástasis y pronóstico desfavorable para los pacientes^[99]. La asociación CD44-hialuronato por medio del dominio citoplasmático se asocia con la activación de vías de señalización relacionadas con la proliferación celular (vía Wnt, *k-ras*, MAPK, PIK3 y EGFR), supervivencia celular (por medio de la proteína *Bcl-2*), FR (por expresión aumentada de MDR1 y ABCG2) y angiogénesis. Por otro lado, esta asociación promueve la TEM, aumentando la MMP-9 que destruye la MEC. Esto favorece la interacción con selectinas P, L y CD62 en células endoteliales, permitiendo su integración, rodamiento y la extravasación de las células tumorales^[88,98,100,101]. La expresión de este marcador se encuentra asociada con la formación de tumores en ratones inmunodeficientes, FR, formación de esferoides *in vitro*, autorrenovación y diferenciación a diversos linajes, todas ellas, características de CMT^[88,89].

2.13.3.4. CD133

CD133, llamado también prominina-1, es una glicoproteína ubicada en las protuberancias de la membrana celular. Se relaciona con la compartimentalización, mantenimiento y expansión de las CMN. Es el marcador más utilizado para aislar y caracterizar CMT, debido a que células CD133⁺ muestran características de CMT cuando se cultivan *in vitro* y se implantan en modelos *in vivo*. Además, las CMT-CD133⁺ son resistentes a múltiples agentes antineoplásicos, debido a que sobreexpresan ABCB5. Estudios de inmunohistoquímica (IHQ) lo han relacionado con la progresión de ACCR, pronóstico desfavorable y recidivas tumorales cuando se sobreexpresa con otros marcadores como CD44 y CD24. Los inductores de CD133 son la hipoxia y la disfunción mitocondrial^[102–105].

2.13.3.5. CD166/ALCAM y CD326/EpCAM

ALCAM y EpCAM son glicoproteínas transmembranales que actúan como moléculas de adhesión intercelular. EpCAM se expresa exclusivamente en epitelios y neoplasias derivadas de ellos, se encarga de regular la polaridad de las células por medio de uniones adherentes^[106,107]. ALCAM se expresa en una variedad de células y está implicada en la supervivencia celular, la motilidad de monocitos a través del endotelio, angiogénesis y el mantenimiento del nicho de CMI^[108,109]. La sobreexpresión de ALCAM y EpCAM en el ACCR se correlaciona con agresividad del cáncer, metástasis y una corta supervivencia^[108,110,111].

2.13.3.6. Marcadores citoplasmáticos de CMT

Además de los biomarcadores presentes en la membrana plasmática, existen biomarcadores citoplasmáticos que expresan las CMT en tumores sólidos y neoplasias



hematológicas. Entre estos marcadores están ALDH1 y Musashi-1. La sobreexpresión de ALDH1 en CCR y otras neoplasias, correlaciona con la progresión tumoral y FR^[112–114].

Musashi-1, por otro lado, se expresa en el fondo de las CL y pertenece a la familia de proteínas de unión al ARN, regulando la estabilidad del ARN mensajero y la traducción de proteínas implicadas en la señalización oncogénica. En ACCR ha sido una oncoproteína que se sobreexpresa con células CD44⁺ y se asocia con estadios tumorales avanzados, pronóstico desfavorable y resistencia a 5-FU debido a la formación de gránulos de estrés anti-apoptóticos^[115,116].

2.13.4. Métodos de aislamiento y caracterización de CMT

Las CMT de ACCR pueden aislarse de tumores frescos o de líneas celulares. Las CMT tienen la característica de formar esferoides o colonosferas cuando son cultivados en medio libre de suero, en condiciones no adherentes. Este método de cultivo es selectivo para CMT (no diferenciadas). Las células diferenciadas mueren por falta de los nutrientes contenidos en el suero. Los esferoides de CMT pueden ser caracterizados por medio de la expresión de marcadores típicos de CMT^[117,118].

Existen múltiples métodos para caracterizar CMT. Cada uno de ellos ofrece ventajas y limitaciones. Entre los métodos empleados para caracterizar CMT está la citometría de flujo, inmunohistoquímica (IHQ) e inmunofluorescencia (IF). Utilizando cualquiera de estos métodos, es posible detectar la expresión de marcadores típicos de CMT. Las técnicas de caracterización se describen brevemente a continuación.

2.13.4.1. Técnicas de caracterización basadas en citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica de separación y clasificación celular basada en las propiedades físico-químicas que las células presentan. Ofrece información acerca de la emisión de fluorescencia cuando las células atraviesan, una por una, por un haz de luz. La citometría de flujo es utilizada ampliamente para la detección de CMT y existen varias estrategias que promueven su uso como la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), células activadas magnéticamente (MACS), la tinción de Hoechst 33342 y el ensayo ALDEFLUOR^[117–119].

El ensayo FACS utiliza fluorocromos que emiten luz de diferente longitud de onda cuando son estimulados por luz ultravioleta. Estos fluorocromos se conjugan con anticuerpos monoclonales, dirigidos contra una proteína específica, permitiendo, así, clasificar y seleccionar células positivas o negativas a uno o varios marcadores. El ensayo MACS utiliza perlas magnéticas unidas a un anticuerpo monoclonal específico, permitiendo la selección de células que expresan el antígeno deseado. A diferencia de FACS, el MACS sólo permite



seleccionar células positivas a un solo marcador. El ALDEFLUOR identifica y selecciona las células con alta actividad de la enzima ALDH —marcador típico de CMT—. Hoechst 33342, es un colorante fluorescente que identifica la actividad celular de las bombas de eflujo ABC —que sobreexpresan las CMT—. En este ensayo, la ausencia de tinción indica la presencia de células que están sobreexpresando las bombas ABC, debido a que las CMT expulsan el colorante más rápidamente que las células normales; las cuales se tiñen más rápidamente y por más tiempo^[119]. Las ventajas y desventajas de las técnicas de citometría de flujo se mencionan en la *Tabla 5*.

2.13.4.2. Caracterización por inmunofluorescencia e inmunohistoquímica

La inmunofluorescencia (IF) y la inmunohistoquímica (IHQ) son técnicas que permiten detectar antígenos expresados en tejidos o células, mediante el uso de anticuerpos específicos. En la IHQ se emplean enzimas para amplificar las señales de interés y en la IF se utilizan fluorocromos acoplados a anticuerpos secundarios. Los fluorocromos emiten una luz fluorescente cuando son estimulados por luz ultravioleta (UV). Tanto con IF como con IHQ pueden visualizarse las células marcadas positivamente con la ayuda de un microscopio de campo claro, en el caso de IHQ y de epifluorescencia en el caso de IF. Tanto la IHQ como la IF son técnicas muy sensibles, específicas y utilizadas de rutina en los laboratorios de patología. Además, pueden visualizarse células expresando uno o más marcadores en una misma preparación^[120–122]. Existen métodos directos e indirectos de IF e IHQ. La IHQ y la IF, no están exentas de limitaciones. Las ventajas y limitaciones se mencionan en la *Tabla 5*.

2.14. Determinación ex vivo de FR de neoplasias

Se han publicado diferentes estrategias para conocer la sensibilidad de los tumores a fármacos que ya están en el mercado o en desarrollo. Estas estrategias son útiles para pronosticar la respuesta clínica de los pacientes, a un régimen quimioterapéutico dado. Uno de los enfoques más utilizados para estos fines, es la determinación de quimiosensibilidad de cultivos primarios de células tumorales o de líneas celulares a los agentes antineoplásicos, mediante ensayos de viabilidad celular. Existen varios bioensayos para evaluar la sensibilidad o resistencia de las células tumorales a los agentes antineoplásicos. Algunos de ellos son el de azul alamar, el azul tripán y el ATP-CRA (del inglés; *adenosine triphosphate-based chemotherapy response assay*). El método ATP-CRA, se basa en la medición de los niveles intracelulares de ATP, mediante luminiscencia del par luciferina-luciferasa^[123]. Es un método de medición de la viabilidad celular más sensible que otros bioensayos con usos similares, y requiere sólo una mínima cantidad de células (2,000 a 20,000) para realizarlo. Lo cual ofrece una enorme ventaja en bioensayos donde se utilizan



biopsias humanas. El ATP-CRA ha mostrado una buena correlación entre la respuesta de susceptibilidad *ex vivo* de cultivos primarios y en pacientes con distintos tipos de neoplasias^[124]. Es por ello que nosotros utilizamos al ATP-CRA para evaluar todos los medicamentos que nos interesa estudiar.

Tabla 5; Ventajas y desventajas de las técnicas de caracterización de CMT.

Técnica	Ventajas	Desventajas	
Citometría de flujo	FACS	<ul style="list-style-type: none"> • Detecta la expresión de múltiples proteínas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Alto costo y uso de equipos complejos. • No pueden usarse muestras sólidas.
	MACS	<ul style="list-style-type: none"> • Rápido y fácil de realizar. 	<ul style="list-style-type: none"> • Solo detecta la expresión de una proteína. • Alto costo y uso de equipos complejos. • No pueden usarse muestras sólidas.
	ALDH/ Aldefluor	<ul style="list-style-type: none"> • Estabilidad de expresión del marcador. 	<ul style="list-style-type: none"> • Especificidad. • Alto costo y uso de equipos complejos. • No pueden usarse muestras sólidas.
	Tinción de Hoechst	<ul style="list-style-type: none"> • Detecta células que sobrepresan bombas de eflujo ABC. 	<ul style="list-style-type: none"> • Baja especificidad (no identifica isoformas). • Reproducibilidad. • Toxicidad del colorante.
Microscopia	IF	<ul style="list-style-type: none"> • Multi-detección de antígenos. • Aplicable a tejidos y suspensiones. • Alta sensibilidad y especificidad. • Protocolos cortos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Fluorescencia disminuye respecto al tiempo. • Tiempo para visualización/ captura imágenes. • Usa microscopio de epifluorescencia. • Interpretación y resultados cualitativos.
	IHQ	<ul style="list-style-type: none"> • Multi-detección de antígenos. • Alta sensibilidad y especificidad. • Uso de microscopio de luz. • Aplicable en tejidos y suspensiones. • Tinción estable respecto al tiempo. • Barato y accesible. 	<ul style="list-style-type: none"> • Protocolos largos. • Necesita buena preservación de muestras. • Interpretación y resultados cualitativos.

Abreviaturas: CMT; Células madre de tumor, FACS; Clasificación de células activadas por fluorescencia, MACS; Clasificación de células activadas magnéticamente, ALDH; Aldehído deshidrogenasa, IF; Inmunofluorescencia, IHQ; Inmunohistoquímica. Modificado de Moghbeli, et.al.^[119]



CAPÍTULO 3. ANTECEDENTES DIRECTOS

3.1. Ubicación del proyecto en la línea de trabajo

El presente proyecto de tesis es parte de uno mayor titulado: “*Adecuación para uso clínico y validación de un bioensayo ex vivo para predecir la eficacia clínica de esquemas quimioterapéuticos para tratar adenocarcinomas colorrectales*”. Previamente en nuestro grupo de trabajo, y bajo la dirección de los doctores Herminia Martínez Rodríguez y Salvador Said y Fernández, *Martha Sofía Rodríguez-González*, en el año 2012 como parte de su tesis de maestría, implementó y validó el método de viabilidad celular ATP-CRA, en biopsias de ACCR, logrando la caracterización de cultivos primarios de ACCR y clasificarlos como sensibles o resistentes a la combinación de fármacos utilizados en FOLFOX-6, a la que se le llamó 5FUOL (por contener 5-FU, oxaliplatino y leucovorina). La mayor parte de los casos incluidos se encontraban en estadios avanzados de la enfermedad (etapa III ó IV) y todos eran esporádicos. La concentración de 5FUOL en los cultivos primarios de ACCR fue equivalente a la dosis letal al 50% (DL₅₀) de cada fármaco. Como estándar se utilizó la línea celular de ACCR, COLO 320DM y como controles sanos se incluyeron en los estudios, células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano^[125]. Los datos que se obtuvieron de dicho trabajo, fueron utilizados para el desarrollo de este proyecto.

Por otro lado, *Delgado-González P y Garza-Treviño E.N.*, desde el año 2012 hasta la fecha, elaboraron una base de datos que incluye información sociodemográfica y clínica de 92 pacientes con diagnóstico histopatológico de ACCR y los resultados de quimiosensibilidad a 5FUOL de 80 muestras de ACCR y de 39 muestras de quimiosensibilidad a XELOX. Además, ellas reunieron un biobanco de muestras de tejido de ACCR que contiene a la fecha más de 40 muestras criopreservadas y 58 bloques de tejido tumoral, embebidos en parafina. Estos últimos, utilizados para el desarrollo de este proyecto. También en 2017, como parte del trabajo de tesis doctoral de *Garza-Treviño E.N.*, se obtuvieron resultados que fueron fundamentales para la realización del presente estudio, y que se refieren enseguida.

3.2. Correlación entre número de CMT y quimiorresistencia en tejidos de ACCRs

Mediante el ATP-CRA, se evaluó la sensibilidad o resistencia a 5FUOL de 40 cultivos primarios de ACCR. En dicho estudio, se observó una gran dispersión en cuanto al porcentaje de muerte celular (PMC). Sin embargo, fue posible determinar que el 80% de los tejidos de ACCR analizados eran resistentes a 5FUOL y el resto de las muestras (20%) fueron medianamente resistentes o sensibles. Además, se observó una correlación

estadísticamente significativa entre el número de CMT en cortes histológicos de ACCR (identificadas como células CD24⁺, CD44⁺ y CD24⁺/CD44⁺) y la sensibilidad a 5FUOL^[15].

3.3. Perfil de expresión génica de CMT resistentes a 5FUOL

En 2017, *Garza-Treviño E.N.*, como parte de su tesis doctoral, identificó tres genes sobreexpresados por la mayoría de las CMT de ACCR; esto fueron los genes *ABCB1*, *BNIP3* y *KRT18* (Figura 11). Además, en el mismo estudio, se observó que la sensibilidad de los ACCRs depende del porcentaje de CMT contenidas en los cortes histológicos^[15]. Dichos genes se usaron como marcadores de resistencia a 5FUOL en el presente proyecto. Enseguida describimos sus principales características.

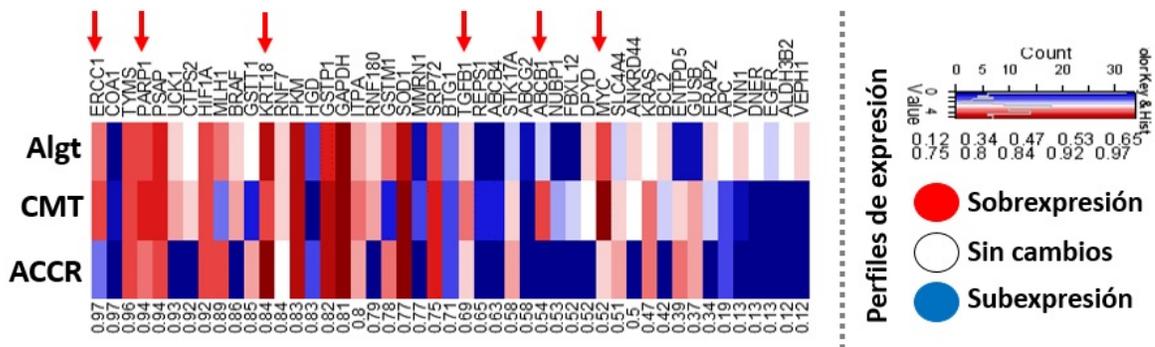


Figura 11; Mapa de calor de expresión génica diferencial de las CMT aisladas de ACCRs resistentes a 5FUOL. En la imagen se puede observar la sobreexpresión (cuadros rojos) de los genes KRT18, ABCB1, BNIP3, entre otros, relacionados a la resistencia a la mezcla 5FUOL, en CMT aisladas de la línea celular Colo320 y de tejidos de ACCR, mediante secuenciación masiva de dichas muestras. Las flechas rojas señalan los genes diferencialmente expresados en las CMT. Imagen modificada de Garza-Treviño E.N.^[15].

3.3.1. ABCB1

El gen *ABCB1* se encuentra localizado en el cromosoma 7p21.12 y codifica para una proteína transmembranal del mismo nombre o también llamada p-glicoproteína-1 (Pgp-1)/MDR1. Esta última, es miembro de la superfamilia de transportadores ABC (*ATP-binding cassette*), implicados en la multifármacorresistencia y se encuentra altamente conservada entre especies^[126,127]. La proteína ABCB1 está conformada por dos dominios transmembranales hidrófobos, con 6 hélices- α cada uno y dos dominios de unión a nucleótidos hidrofílicos, localizados en el citoplasma de las células. ABCB1 actúa como una bomba de eflujo para una variedad de compuestos xenobióticos tóxicos y permite la salida de productos quimioterapéuticos fuera de la célula, disminuyendo la concentración intracelular de estos y contribuyendo a la FR en los pacientes oncológicos, además se ha reportado que también es responsable del eflujo de moléculas de señalización que promueven la tumorigénesis^[126,128,129].



3.3.2. KRT18

El gen *KRT18* se encuentra en el cromosoma 12q13 y codifica para una proteína estructural de los epitelios, llamada citoqueratina 18 (CK-18), forma parte de los filamentos intermedios^[130,131]. Pertenece a la familia I - ácida de las CK's y para su función normal se co-expresa con CK-8 neutro-básica. CK-18 tiene una función importante en la estabilidad mecánica e integridad de las células epiteliales por su asociación directa con desmosomas y hemidesmosomas, participando en la polaridad ápico-basal celular^[132].

También participa en la regulación de la apoptosis, progresión del ciclo celular y se asocia con vías de señalización como PIK3/Akt, Wnt y ERK/MAPK, relacionadas con proliferación celular^[130,131]. La sobreexpresión de CK-18 está correlacionada con una pobre diferenciación celular y mal pronóstico en distintos tipos de cáncer^[133]. Su papel como marcador de CMT no se había reportado hasta el momento.

3.3.3. BNIP3

El gen *BNIP3* codifica para una proteína que se localiza en la membrana mitocondrial externa de las células. La proteína BNIP3 contiene un dominio BH3 y actúa como un factor proapoptótico, así como inductor de la autofagia y mitofagia, teniendo un papel dual en la biología (muerte y supervivencia celular). Su expresión se encuentra regulada por la hipoxia. BNIP3 interactúa con otras proteínas antiapoptóticas, incluyendo a una proteína E1B de 19 kDa, beclina-1 y Bcl2. También, causa disfunción mitocondrial, lo que genera especies reactivas de oxígeno y la inducción de la autofagia por medio la asociación con mTOR. Los cambios en la expresión de BNIP3, junto con otros miembros de la familia Bcl-2 están implicados en transformación maligna de diversos tejidos y se conocen como marcadores claves de cáncer y de resistencia a los mecanismos inductores de muerte celular. La desregulación de la expresión de BNIP3 se asocia entonces con el crecimiento tumoral y enfermedad agresiva. BNIP3 se ha encontrado expresado en áreas perinecróticas de varios carcinomas de células epiteliales^[134–137].



CAPÍTULO 4. JUSTIFICACIÓN

El CCR es una de las neoplasias más frecuentes en nuestra población. El tratamiento consiste en la resección quirúrgica y quimioterapia. En nuestro medio uno de los esquemas terapéuticos más utilizados es FOLFOX-6, que incluye a 5-FU, oxaliplatino y leucovorina. Se ha reportado que menos del 50% de los pacientes que lo reciben no responden a la quimioterapia y el 50% restante lo hacen de manera heterogénea.

En nuestro grupo hemos observado que las CMT de ACCR son las principales responsables de la FR y en la mayoría de las muestras las CMT sobreexpresan ABCB1, KRT18 y BNIP3 y están correlacionados con resistencia a 5FUOL.

Actualmente, los métodos para determinar la sensibilidad a estos fármacos se basan en la respuesta clínica y la sensibilidad *in vitro* de las células tumorales a la exposición de estos tratamientos. Por ello, como una alternativa, en este trabajo se evaluó, en cortes histológicos de ACCRs, la expresión de los marcadores típicos de CMT (CD44, CD24 y CD26) y los productos proteicos de los genes de resistencia a 5FUOL (ABCB1, KRT18 y BNIP3), con el fin de proponerlos como marcadores pronósticos de la respuesta al tratamiento con FOLFOX-6.



CAPÍTULO 5. HIPÓTESIS

En cortes histológicos de ACCRs, el área ocupada por CMT ABCB1⁺, KRT18⁺, BNIP3⁺ o sus combinaciones correlaciona con la sensibilidad a 5FUOL, el PMC, el IK, presencia de metástasis tiempo de sobrevida, y pobre pronóstico para los pacientes.



CAPÍTULO 6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Investigar si, en cortes histológicos de ACCRs, existe correlación entre el área ocupada por CMT ABCB1⁺, KRT18⁺, BNIP3⁺, o sus combinaciones con las siguientes variables: Sensibilidad *in vitro* a 5FUOL, IK a dos años del tratamiento inicial, presencia de metástasis y porcentaje de pacientes sobrevivientes a dos años del tratamiento inicial

6.2. Objetivos específicos

1. Aislar y caracterizar CMT a partir de ACCR y su posterior diferenciación a células epiteliales.
2. Determinar si existe correlación entre el área ocupada por CMT CD26⁺, CD24⁺, CD44⁺ o sus combinaciones en los cortes histológicos de ACCR con las variables antes descritas de los pacientes.
3. Determinar si existe correlación entre el área ocupada por células ABCB1⁺, KRT18⁺ BNIP3⁺, o sus combinaciones en los cortes histológicos de ACCR con las variables antes descritas de los pacientes.



CAPÍTULO 7. DISEÑO EXPERIMENTAL

7.1. Estrategia general

El presente proyecto se dividió en cinco etapas para su desarrollo; las cuales se describen a continuación:

- **Primera etapa:** Aislar CMT de ACCRs y caracterizarlas, mediante IF de doble marcaje, con anticuerpos monoclonales anti-CD44 y anti-CD24 y la expresión de los productos proteicos de ABCB1 con CK-18 o BNIP-3.
- **Segunda etapa:** Evaluar la pluripotencia de las CMT aisladas de ACCRs. Para ello, los aislados de CMT se indujeron a diferenciarse a linajes epiteliales, cuya estirpe se confirmó, mediante IF con anticuerpos monoclonales anti-CK-17, -CK-20, -EGFR y una mezcla de anti-CKs, todos estos, marcadores específicos de células epiteliales.
- **Tercera etapa:** Selección de casos de ACCR en nuestra base de datos, análisis histopatológico de las muestras correspondientes de ACCR embebidas en parafina y recolección de los datos clínico-patológicos correspondientes.
- **Cuarta etapa:** Obtención de cortes histológicos de las muestras de ACCR seleccionadas y, mediante escaneo de lamillas, identificación y conteo de CMT CD26⁺/CD24⁺ ó CD44⁺ y ABCB1/CK-18⁺ ó BNIP3⁺, así como la identificación y conteo de CMT que expresan los marcadores arriba mencionados de forma aislada.
- **Quinta etapa:** Análisis morfológico de las preparaciones de IHQ, determinando las áreas de positividad a los marcadores descritos en la cuarta etapa y análisis estadístico de los datos con pruebas de correlación y asociación analizando las variables antes mencionadas.



CAPÍTULO 8. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1. Aislamiento de CMT de ACCR

Obtuvimos muestras frescas de seis ACCRs primarios extirpados quirúrgicamente de pacientes atendidos en el Hospital Universitario de la UANL o en el Centro Médico Nacional del Noreste, Unidad de Altas Especialidades Médicas No. 25 (UMAE 25), IMSS. El diagnóstico de ACCR, se confirmó por patólogos adscritos en ambas instituciones, inmediatamente después del acto quirúrgico. Los patólogos examinadores nos donaron una muestra de aproximadamente 2 x 3 cm, de cada tumor y de unos 5 cm² de colon sano. Los tejidos tumorales y sanos se colocaron en tubos cónicos estériles de polipropileno de 50 mL (Wuxi NEST Biotechnology Corporation, Rahway, NJ, USA), y éstos, en hieleras con hielo y se trasladaron de inmediato a nuestro laboratorio. Las muestras se lavaron una vez con solución salina fisiológica estéril y dos veces con solución amortiguadora de fosfatos (PBS). Las muestras se descontaminaron, sumergiéndolas en etanol al 70% por 40 seg, agitando los tubos suavemente, por inversión. Se desechó el sobrenadante y se lavaron las muestras tres veces con PBS, adicionado con 2.5 µg de anfotericina B/mL 100 µg/mL de gentamicina (Life Technologies Co. Grand Island, NY, USA). Las muestras se colocaron en cajas de Petri de poliestireno (Corning Incorporated-Life Sciences, Oneonta, NY, USA) en condiciones asépticas. Cada una de las muestras se cortó, por separado, en trozos de aproximadamente 0.5-1.0 mm³ y se mezcló con 1 vol de 2.0 µg de colagenasa tipo I (Life Technologies Co., Carlsbad, CA)/mL de medio de cultivo del Roswell Park Memorial Institute (RPMI, Life Technologies) adicionado con gentamicina y anfotericina B, a las concentraciones arriba descritas (en adelante medio adicionado). Cada una de estas preparaciones se incubó, con agitación magnética, a 37°C por 2 h y se pasó por una malla con poros de 100 µm (Corning). Las células se sedimentaron, centrifugando cada preparación a 730 x g por 10 min. Se lavó el paquete celular tres veces con PBS adicionado y las células se resuspendieron en 1 mL de medio IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, adicionado y enriquecido con 10% de suero fetal bovino (SFB). En adelante, medio adicionado y enriquecido. El medio IMDM y el SFB se adquirieron de Life Technologies. Se determinó la viabilidad celular por el método de azul de tripano, utilizando una cámara de Neubauer. Se sembraron 1 x10⁶ células viables en una placa de Petri de poliestireno de 60 x 15 mm de diámetro, conteniendo 5 mL de IMDM adicionado y enriquecido y se incubaron a 37°C, en atmósfera de CO₂ al 5% por 20 días, cambiando el medio cada tercer día. En el día 21, las células se cambiaron a placas de Petri conteniendo 5 mL de medio de selección de CMT (DMEM [Dulbecco's Modified Eagle's médium; Life Technologies], adicionado con 10 nM de nicotinamida (Sigma Aldrich- Merck , St. Luis MO, USA), 20 ng de EGF [epidermal growth factor]/ mL y 10 ng de FGF-β [fibroblast



growth factor; PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA]/mL, 2.5 µg de anfotericina B/mL y 100 µg de gentamicina B/mL). Las células se incubaron a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% por 15 días, cambiando el medio de cultivo cada tercer día.

8.2. Caracterización de las CMT de ACCR

En el día 35 después de iniciado el aislamiento de las CMT se dividió cada uno de los cultivos de CMT en tres alícuotas. Una alícuota se fijó con metanol/acetona. Las células de la segunda alícuota se indujeron para diferenciarse a células epiteliales y las de la tercera alícuota se preservaron en nitrógeno líquido o se mantuvieron en cultivo, según se requirió.

8.2.1. Fijación de las CMT

Para la fijación de las CMT, se obtuvo el medio de cultivo de nuestras placas de Petri y se centrifugó a Se colectaron las células suspendidas en el medio de cultivo en tubo cónico de 15 mL (Wuxi NEST Biotechnology Corporation, Rahway, NJ, USA) y se sedimentaron por centrifugación a 50 rpm, por 10 min. Se reservó el paquete celular y se lavaron las células, dos veces, con PBS. Se suspendió el paquete celular en metanol-acetona (1:1 v/v) y se almacenó la preparación a 4°C hasta su uso. Con estas células se hizo un frotis en un portaobjetos pretratado con poli-L lisina (Sigma Aldrich).

8.2.2. Doble marcaje de las CMT

En un frasco de Coplin de vidrio conteniendo TBST (Tris-buffered saline Tween 20) se sumergieron los frotis de las CMT, tres veces por 3 min por vez. Cada frotis se cubrió con 50 µL de una solución de bloqueo de proteínas, incluida en el Kit Mouse & Rabbit Specific HRP/DAB (ABC) Detection IHC (Abcam Inc, Cambridge, MA, USA). Los frotis se incubaron en cámara húmeda a 37°C por 30 min y se les agregaron los anticuerpos monoclonales como se describe a continuación, todos los anticuerpos monoclonales se adquirieron de Abcam Inc, Cambridge, MA, USA] en todos los casos se utilizó PBS como diluyente.

8.2.2.1. Combinación de anti-CD24 y anti-CD44

Anti-CD24 conjugado con FITC (*fluorescein isothiocyanate*; verde; clona SN3, dilución 1:100) y anti-CD44 conjugado con PE/Cy7 (*phycoerythrin* (PE) / *Cyanine7* (Cy7); rojo; clona F10-44-2, dilución 1:100). El anticuerpo anti-CD24 fue monoclonal de ratón y anti-CD44 de conejo.



8.2.2.2. Combinación de anti-ABCB1 y anti-CK-18

Anti-ABCB1 (clona EPR10364-57, dilución 1:200) y anti-CK-18 (clona C-04, dilución 1:200). El anticuerpo anti-CK-18 fue monoclonal de ratón y anti-ABCB1 de conejo.

8.2.2.3. Combinación anti-ABCB1 y anti-BNIP3

Anti-ABCB1 (clona EPR10364-57, dilución 1:200) y anti-BNIP3 (clona Ana40, dilución 1:100). El anticuerpo anti-BNIP3 fue monoclonal de ratón y anti-ABCB1 de conejo.

8.2.2.4. Procedimiento

Se mezclaron en un tubo de microcentrífuga de 2 mL (Costar®- Corning Incorporated-Life Sciences, Oneonta, NY, USA) 50 µL de cada uno de los anticuerpos, para obtener cada una de las combinaciones arriba mencionadas. Los frotis de CMT se cubrieron con 50 µL de cada una de esas combinaciones y se incubaron en una cámara húmeda, en oscuridad, a 4 °C por 12 h. Como control negativo de la técnica de IF de doble marcaje se utilizaron frotis de aislados de CMT, a los cuales se les omitieron las combinaciones de anticuerpos primarios antes descritos. Las preparaciones se lavaron tres veces con TBST, cada una por 3 min. Cada preparación se cubrió con 50 µL de anticuerpos secundarios Alexa Fluor® 488 (verde) y 560 (rojo) (Invitrogen, Carlsbad, CA), diluidos 1:1000 con PBS, a excepción de la combinación de anticuerpos anti-CD24/anti-CD44. Se incubaron las preparaciones en una cámara húmeda a 37°C por 1 h y se lavaron por inmersión (cinco veces) en TBST y se cubrieron con 10 µL de medio de montaje VECTASHIELD® mezclado con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI; Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA) como medio para la observación de núcleos celulares. Se colocó, sobre las preparaciones un cubreobjetos de 22 x 40 mm (Corning) y se selló con esmalte comercial para uñas y se conservaron a 4°C hasta su observación. Todo el procedimiento arriba descrito se realizó en oscuridad. Se observaron las preparaciones con un microscopio de epifluorescencia Nikon ECLIPSE 50i (Nikon Instruments Inc. Melville, NY, USA) y se fotografiaron cinco campos seleccionados al azar, a una amplificación de 400 diámetros, con la ayuda de la aplicación Qcapture Pro-7 (Qimaging, Inc./Media Cybernetics, Inc., Rockville, MD, USA). Como parte del análisis realizado se sobrepusieron las imágenes utilizando el programa Image J, del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (National Institute of Health, USA <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>).

8.3. Diferenciación de CMT a células epiteliales

Un aislado de CMT de ACCR se sedimentó mediante centrifugación, a 50 rpm por 10 min en tubos cónicos de 15 mL, se resuspendieron en RPMI y se determinó su porcentaje de viabilidad, con Azul de Tripán, se ajustó su concentración a 1×10^5 CMT/mL con RPMI



1640 adicionado con gentamicina, anfotericina B y 2% de seroalbúmina bovina (SAB [Sigma-Aldrich-Merck]), se inocularon 1×10^3 CMT en microcámaras de cultivo Nunc Lab-Tek II Chamber Slide® (Thermo Scientific) —estas microcámaras están construidas en portaobjetos y cada portaobjetos tiene cuatro cámaras—. Las células se incubaron a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% por 25-30 días, cambiando el medio de cultivo cada tercer o cuarto día y visualizando la morfología de las células en un microscopio invertido VELAB®, modelo VE-403- (Velab, Co., MX). Además, se incrementó la concentración de SBF en el medio de cultivo el día 3-4 a 5%, el día 9-10 a 10% y al día 15 a 15%. Las células diferenciadas se fijaron con metanol-acetona (1:1 v/v [pág. 35]) y se conservaron a 4°C, hasta su análisis con IF. El procedimiento de marcaje y análisis se describe en la página 36, utilizando los siguientes anticuerpos monoclonales primarios (1:200 [Abcam], diluidos con PBS): La primera cámara, contando de izquierda a derecha, se trató con anti-CK-17, la segunda cámara, con anti-CK-20, la tercera con una mezcla de anticuerpos monoclonales contra diversas citoqueratinas (CK), y en la cuarta cámara se incluyó anti-EGFR, se incubaron las microcámaras a 4°C por 12 h en una cámara húmeda y a cada cámara se le añadieron 200 µL de los anticuerpos secundarios (1:500 con PBS [Alexa Fluor (AF)® 488, verde y 560, rojo]. AF-488 se añadió a las preparaciones con anti-CK-17, 20 y mezcla de anti-CK, y AF-560 se agregó a las cámaras con anti-EGFR. Se incubaron las preparaciones en oscuridad, a 37°C, en cámara húmeda por 1 h y se lavaron, tres veces, por inmersión en TBST, 3 min por vez. Se retiraron las divisiones de las microcámaras y agregaron 10 µL de VECTASHIELD® — con DAPI — a cada preparación, la cual se cubrió con un cubreobjetos. Se conservaron las laminillas a 4°C, en oscuridad, hasta su visualización en microscopio de epifluorescencia. De tres campos seleccionados al azar, se tomaron fotografías a una amplificación de 400 diámetros y se sobrepusieron las imágenes utilizando el programa Image J.

8.4. Selección de casos de ACCR y colección de datos clínico-patológicos

8.4.1. Base de datos matriz y obtención de tejidos de ACCR

Se seleccionaron casos de ACCR de nuestra base de datos. De cada caso se colectaron los siguientes datos de cada paciente (antes y pasados dos años de la resección de su tumor primario): Número de folio, IK inicial y final, antecedentes personales patológicos y heredofamiliares, historia clínica de los casos, resultados del análisis histopatológico derivado de tejido de colonoscopias, estadio de la enfermedad (determinado por la clasificación TNM de la OMS), etapa clínica y notas clínicas de consultas médicas de seguimiento de los casos.



La determinación de la sensibilidad a 5FUOL y el aislamiento de las CMT formó parte de las tesis de maestría y doctorado de *Rodríguez-González, M, Garza-Treviño, EN y Delgado González, P.*, respectivamente. En este trabajo se analizó esa información como parte de los objetivos de este proyecto. Brevemente: de cada uno de los casos de ACCR se colectaron muestras de tumor, conservadas en nitrógeno líquido y tres bloques de tejido intestinal sano de origen cadavérico. Todos los casos incluidos en el presente estudio fueron diagnosticados como ACCRs y se descartó la presencia de neoplasia en los tejidos sanos intestinales por patólogos adscritos a los Hospitales del IMSS o de la UANL. Las muestras se dividieron en dos porciones. La primera se fijó, en solución de Carnoy (etanol absoluto, cloroformo y ácido acético glacial (6:3:1 v/v) y se incluyeron en parafina, con la ayuda de un procesador automático de tejidos -Histokinette- (modelo KD-TS3D, Kedi Instrumental Equipment CO) y un centro de inclusión de parafina (modelo KD-BM I, Kedi Instrumental Equipment CO.). El procedimiento de inclusión de tejidos en parafina se muestra en la *Tabla 6*. Estos bloques se utilizaron en la cuarta etapa de este proyecto.

Tabla 6; Técnica para incluir tejidos en parafina

Equipo	Paso	Reactivo	Tiempo
Histokinette / Procesador de tejidos	Fijación	Solución de Carnoy	5 días
	Deshidratación	Etanol al 60%	60 min cada paso
		Etanol al 70%	
		Etanol al 80%	
		Etanol al 96%	
	Aclaramiento	Etanol al 100% ¹	60 min
Etanol al 100% y Xilol ²			
Preinclusión	Xileno ¹	60 min	
Centro de inclusión	Inclusión definitiva	Parafina líquida ³	60 min

Abreviaturas: ¹dos cambios del reactivo al tiempo indicado, ²; Proporción 1:1 (v/v), ³; Requiere de unidades o cassetes de inclusión.

Con el segundo fragmento de cada muestra de ACCR se evaluó su sensibilidad a 5FUOL con el ATP-CRA y además se aislaron las CMT. Para ello, se realizó el protocolo de aislamiento de células tumorales de ACCR de la sección 8.1. Las células se sembraron en microplacas de 96 pozos de baja adherencia, en presencia de 5FUOL, se incubaron a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%, por 48 h y se determinó el porcentaje de viabilidad con el kit Cell-Titer-Glo®. Luminescent Cell Viability Assay (Promega Corporation, Madison, WI, USA).



Luego, se convirtieron los resultados de luminiscencia en porcentaje de muerte celular (PMC), utilizando la siguiente ecuación:

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

Donde:

PMC es Porcentaje de muerte celular

LCT es Luminiscencia del sobrenadante de las células tratadas, con 5-FUOL, equivalente a la concentración de ATP intracelular.

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

Los valores de PMC se utilizaron para clasificar los ACCRs como sensibles a 5FUOL ($PMC \geq 20$) o resistentes ($PMC < 20$).

8.4.2. Criterios de inclusión y exclusión de casos de ACCR

Para llevar a cabo la selección de los casos de ACCR que participaron en este proyecto, se consideraron los criterios de inclusión y exclusión que aparecen en la *Tabla 7* (pág. 40).

De los 94 casos incluidos en la base datos matriz del grupo de trabajo, solamente cumplieron con los citados criterios de inclusión, 20 casos de ACCR. Estos últimos fueron los seleccionados para participar en la cuarta y quinta etapa de nuestro estudio, de los cuales 10 casos fueron sensibles y 10 resistentes a 5FUOL. Una vez realizada la discriminación de los casos, se extrajo toda la información de la base de datos matriz de los casos seleccionados y estos se incluyeron en una nueva base de datos, exclusiva para el desarrollo de este proyecto, esta última se realizó con el programa Microsoft Excel[®], respetando el folio asignado de los casos por los proyectos previos -*BI11-004* y *BI14-009*-. Para ello, se realizaron cartas institucionales de transferencia de datos clínicos y de muestras biológicas ante los Comités de Ética en Investigación de las instituciones participantes, con el fin de hacer uso adecuado de estos.

**Tabla 7; Criterios de inclusión y exclusión del proyecto**

Criterio	Consideraciones
Criterios de inclusión	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Contar con el historial completo de datos sociodemográficos y clínicos, incluyendo el diagnóstico histopatológico de ACCR¹ y su estadio, en base a la clasificación TNM². ✓ Contar con los datos cuantitativos de sensibilidad a 5FUOL³ y el PMC⁴. ✓ Que el paciente hubiera iniciado su tratamiento al menos dos años antes de la fecha de inicio del presente estudio. ✓ Contar con el seguimiento clínico completo de los casos a los 2 años del tratamiento inicial. ✓ Que se contara con una muestra de ACCR, debidamente criopreservada o incluida en bloques de parafina, con un tamaño suficiente para realizar el número de cortes histológicos necesarios (10 cortes histológicos por caso de ACCR). ✓ Que el paciente no hubiera recibido quimioterapia/radioterapia, previo a la extirpación de su tumor primario. ✓ Que el paciente no tuviera antecedentes personales o heredofamiliares de CCR.
Criterios de exclusión	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Pacientes que retiraran su consentimiento informado. ▪ Muestras dañadas o con poco tejido para realizar cortes histológicos. ▪ No contar con historial clínico completo y/o el seguimiento de los casos. ▪ No contar con los resultados de sensibilidad a 5FUOL. ▪ Tipos histológicos distintos al ACCR.

Abreviaturas: ¹ACCR; Adenocarcinoma colorrectal. ²TNM; Tumor, ganglios linfáticos y metástasis. ³5FUOL; 5-Fluorouracilo, oxaliplatino y leucovorina. ⁴PMC; Porcentaje de muerte celular.

8.5. Obtención de cortes histológicos

Se obtuvieron cortes histológicos de tejidos incluidos en parafina de los veinte casos de ACCR y tres de tejido intestinal sano. Además, se obtuvo 1 bloque de tejido embebido en parafina de cerebro humano, que sirvió como control negativo de la técnica de IHQ de doble marcaje, empleada en este trabajo. Para ello, los bloques de parafina fueron colocados en un micrótopo rotativo manual (modelo RM2125RTS, Leica Biosystems Nussloch, Nussloch, DE) para realizar secciones seriadas de 4 µm de espesor. Las tiras de tejido seccionado se colocaron y extendieron en un baño de flotación digital para tejidos (modelo KD-P Wather Bath, Kedi Instrumental Equipment CO.), que contenía agua destilada a 45°C. Enseguida, fueron montadas en portaobjetos de 75 x 25 mm tratados previamente con (3-aminopropil)-trietoxisilano (Sigma Aldrich), para mejorar la adherencia del tejido en las laminillas. Se obtuvieron 14 laminillas de cada uno de los bloques de tejido tumoral o sano. Dos de estos cortes se tiñeron de hematoxilina y eosina [H&E]. En cuatro cortes se hizo un doble marcaje con IHQ de doble marcaje y ocho cortes se reservaron como posible repuesto. En cuanto al tejido cerebral se obtuvieron 6 cortes histológicos, que fueron empleados para la técnica de IHQ de doble marcaje — descrita en secciones posteriores —. Las laminillas con los cortes histológicos se colocaron en una canastilla de metal y en un horno a 50°C por 1 h y se reservaron a temperatura ambiente hasta su uso.



8.5.1. Tinción de Hematoxilina y Eosina (H & E)

Para la tinción de H&E se realizaron cortes histológicos en todos los bloques de tejidos tumorales y sanos con el fin de determinar la integridad del tejido y confirmar los hallazgos histopatológicos de ACCR e histología normal de intestino sano, respectivamente. Para ello se siguió con el protocolo de tinción de H&E que se muestra en la *Tabla 8*. Las muestras se montaron con resina para microscopía basada en xileno -Entellan® (Merck KGaA, Darmstadt, DE)- y se conservaron a temperatura ambiente, hasta su fotodocumentación mediante un escáner de laminillas –Aperio AT2 Digital Pathology Scanner® (modelo AT2, Leica Biosystems Inc, Buffalo Grove, IL, USA)–. Este equipo nos permitió realizar capturas de imágenes desde 40 hasta 400 diámetros, de manera automatizada. Los archivos fotográficos escaneados fueron almacenados en los equipos de cómputo de nuestro laboratorio y respaldados en discos duros portátiles para su posterior análisis.

Tabla 8; Protocolo de tinción de hematoxilina y eosina para cortes en parafina

Paso #	Inmersión en solución	Tiempo	Paso #	Inmersión en solución	Tiempo
1	Xileno	5 min	10	Agua amoniaca	2 inmersiones rápidas
2	Etanol-Xileno (1:1)	5 min	11	Agua corriente	Enjuague lento
3	Etanol 100%	2 min	12	Agua destilada	Enjuague lento
4	Etanol 96%	2 min	13	Eosina	6 inmersiones
5	Agua destilada	Enjuague lento	14	Etanol 96%	1 min
6	Hematoxilina	2 min	15	Etanol 100% I	2 min
7	Agua corriente	Enjuague lento	16	Etanol 100% II	2 min
8	Alcohol acido	1 inmersión rápida	17	Etanol-Xileno (1:1)	3 min
9	Agua corriente	Enjuague lento	18	Xileno	5 min

8.6. Inmunohistoquímica de doble marcaje

Se obtuvieron cortes histológicos de ACCR, tejido intestinal sano y cerebral para realizar inmunohistoquímica (IHQ) de doble marcaje con el fin de observar y cuantificar el área de positividad a marcadores típicos de CMT evaluando las combinaciones CD24/CD26 y CD44/CD26 y de los productos proteicos de los genes de resistencia a 5FUOL determinando la expresión de las siguientes combinaciones proteicas: ABCB1/CK-18 y ABCB1/BNIP3. Los tejidos de ACCR fueron considerados como nuestro grupo experimental, los tejidos sanos fueron utilizados como control sano y el tejido cerebral como control negativo de la técnica de IHQ de doble marcaje. Para lograr la observación de dos marcadores en una misma preparación se llevó a cabo el protocolo de IHQ de doble marcaje que se menciona brevemente a continuación: Los cortes histológicos se desparafinaron e



hidrataron realizando inmersiones sucesivas, a temperatura ambiente, en las soluciones que se muestran en la *Tabla 9*.

Tabla 9; Procedimiento para desparafinar cortes histológicos

Solución	Tiempo de inmersión (min)
Xileno I	15
Xileno II	10
Etanol 100% I	6
Etanol 100% II	6
Etanol 95%	6
Etanol 85%	6
Agua destilada	6
Tris Buffer salino (TBS) + Tween 20 (TBS-T)	6

Después, se realizó la recuperación de antígenos por calor, con la solución –Target Retrieval Solution[®] (TRS)– basada en citrato a pH 6.1 (Dako, Agilent Technologies, Inc, Santa Clara, CA), precalentada a 96°C por 20 min, en un rack de plástico. Se sumergieron, en éste, los portaobjetos con los cortes histológicos por 25 min a 96°C en una olla de presión con temperatura controlada. Después, se dejaron enfriar, dejándolos dentro de la misma solución por 20 min. Este procedimiento se realizó con el fin de exponer los antígenos del tejido embebido en parafina y así mejorar la intensidad de tinción con los anticuerpos utilizados. Posteriormente, las laminillas se lavaron con TBS-T en 2 ocasiones, cada una por 6 min. Las preparaciones se cubrieron con 50 µL de los siguientes anticuerpos primarios de conejo (uno por cada laminilla), diluidos como se indica a continuación. Todas las diluciones se hicieron con PBS y se obtuvieron de Abcam: Anti-CD26 (clona: policlonal, dilución 1:200), se usó para observar la expresión de marcadores típicos de CMT ó anti-ABCB1 monoclonal (clona EPR10364-57, dilución 1:200) para detectar las proteínas de resistencia a 5FUOL. Las preparaciones con los anticuerpos se incubaron con sus respectivas preparaciones por 12 h, en una cámara húmeda oscura a 4°C.

Las preparaciones se lavaron dos veces con TBS-T, 3 min por vez y cada preparación se cubrió con 50 µL del reactivo Rabbit AP Polymer, incluido en el Double Stain IHC Kit: M&R on human tissue (HRP/Green & AP/Fast Red, Abcam)[®] y se dejó en reposo por 1 h a temperatura ambiente. Se lavaron las preparaciones tres veces con TBS-T, 2 min por vez. Cada laminilla se cubrió con 100 µL del reactivo Permanent Red mix, que contenía 1 mL de sustrato, 200 µL de activador Fast-Red (5X) y 10 µL de cromógeno rojo permanente (Fast-Red-100X), todos estos reactivos estaban incluidos en el Double Stain IHC Kit. Las preparaciones se dejaron a temperatura ambiente, en una superficie lisa, realizando 2 cambios del reactivo Permanent Red mix. Cada cambio se hizo con una duración de 10 min,



observando la tinción con un microscopio de luz (modelo DME, Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, DE). Las preparaciones se lavaron por inmersión, una vez en agua destilada por 20 seg y tres veces en TBS-T, 3 min por vez. Las preparaciones se cubrieron con 50 µL de las siguientes diluciones de anticuerpos primarios monoclonales de ratón. Uno por cada laminilla. Para las laminillas que contenían el anticuerpo anti-CD26, añadimos los siguientes anticuerpos con sus respectivas diluciones -todas con PBS, los anticuerpos fueron adquiridos de Abcam-: anti-CD24 (clona ALB9, dilución 1:100) ó anti-CD44 (clona F10-44-2, dilución 1:200). Para las laminillas que contenían el anticuerpo anti-ABCB1: anti-CK-18 (clona C-04, dilución 1:200) ó anti-BNIP3 (clona F10-44-2, dilución 1:50). Todas las preparaciones se incubaron por 12 h, en una cámara húmeda oscura a 4°C y se lavaron por inmersión en TBS-T, 2 min por vez. Cada preparación se cubrió con 50 µL del reactivo Mouse HRP Polymer, incluido en el Double Stain IHC Kit: M&R on human tissue (HRP/Green & AP/Fast Red)[®] y se incubó por 1 h a temperatura ambiente, en cámara húmeda, mientras se seguía el progreso de la tinción con un microscopio de campo claro. Después, las preparaciones se lavaron dos veces con TBS-T, 2 min por vez. Se agregaron 100 µL de cromógeno verde esmeralda, incluido en el Double Stain IHC Kit y éstas se incubaron en una cámara húmeda a temperatura ambiente por 30 min. Las laminillas se lavaron tres veces, mediante inmersiones (5 seg) en agua destilada. Se eliminó el exceso de agua. Los cortes se contratiñeron, por inmersión (30 seg) en hematoxilina de Mayer, se lavaron tres veces por inmersión en agua destilada, 5 seg por vez y se realizó el montaje de cada preparación con resina para microscopía basada en xileno Entellan[®]. Las muestras se dejaron reposar 30 min a temperatura ambiente e inmediatamente después se escaneó la totalidad de cada corte con el equipo Aperio AT2 Digital Pathology Scanner[®], que nos facilitó el Servicio de Anatomía Patológica y Citopatología del Hospital Universitario, UANL. Los archivos fotográficos escaneados fueron almacenados en los equipos de cómputo de nuestro laboratorio y respaldados en discos duros portátiles para su posterior análisis.

8.6.1. Análisis e interpretación de imágenes de IHQ de doble marcaje

Los archivos fotográficos arriba mencionados se visualizaron con el programa Aperio ImageScope - Pathology Slide Viewing Software[®] (versión gratuita en línea, [Leica Biosystems Imaging, Inc. URL: <https://www.leicabiosystems.com/digital-pathology/manage/aperio-imagescope/>]). Se capturaron cinco campos, seleccionados al azar, de cada preparación, y cada combinación de marcadores analizados. Es decir, cinco capturas de cada uno de los 20 casos de ACCR, cinco para cada uno de los tres tejidos sanos intestinales y cinco capturas del control negativo de cerebro. Todo ello para cada una de las siguientes combinaciones de marcadores: CD24/CD26, CD44/CD26, ABCB1/CK-18 y



ABCB1/BNIP3. Las imágenes fueron capturadas con una amplificación de 23.8 diámetros. Estos archivos digitales se resguardaron en los equipos de cómputo de nuestro laboratorio. Luego, determinamos el área de positividad a los marcadores descritos anteriormente, combinados y en forma aislada, utilizando el programa SketchAndCalc[®] Irregular Area Calculator (versión gratuita en línea [iCalc Inc, Palm Coast, FL, USA. URL: <https://www.sketchandcalc.com/>]). Ingresamos las imágenes histológicas capturadas a 23.8 aumentos a este programa y este último, ubicó una plantilla cuadriculada de color blanco, directamente en la captura de la imagen. La cuadrícula, que abarcaba completamente la imagen histológica, estaba conformada por 1746.5 cuadros, equivalentes a 0.16 mm^2 ó $1.29 \times 10^5 \mu\text{m}^2$, mientras que cada cuadro que formaba esta cuadrícula, media $7.41 \times 10^{-5} \text{ mm}^2$ ó $7.41 \times 10^1 \mu\text{m}^2$ (Figura 12, pág. 45). Se realizó el conteo manual de cada cuadro, en cada una de las cinco imágenes histológicas por combinación de marcadores, por dos observadores independientes, determinando el área de positividad para los marcadores descritos anteriormente, de la siguiente manera:

Para las imágenes con la combinación CD24/CD26 y CD44/CD26 que evaluaba los marcadores putativos de CMT, se consideró:

- *Positividad para CD44⁺ o CD24⁺*: A todos aquellos cuadros que se tenían marcaje de color verde, en cualquier parte de las células.
- *Positivo para CD26⁺*: Todos los cuadros que se tenían marcaje de color rojo, en cualquier parte de las células.
- *Positivo para CD24⁺/CD26⁺ o CD44⁺/CD26⁺*: Todos los cuadros que tenían marcaje de color violeta intenso y/o aquellas que tenían un marcaje de color azul intenso, lo que indicaba la co-localización de las proteínas de interés.
- *Negativo para CD24/CD26⁻ o CD44/CD26⁻ o cada uno de estos marcadores de forma independiente*: A todos aquellos cuadros que no presentaban tinción roja, verde, azul o violeta intenso, es decir, donde solo se observaban los núcleos celulares, teñidos con hematoxilina de Mayer.

Para las imágenes con la combinación ABCB1/CK-18 y ABCB1/BNIP3 que evaluaba los marcadores de resistencia a 5FUOL, se consideró:

- *Positividad para CK-18⁺ o BNIP3⁺*: A todos los cuadros que se tenían marcaje de color verde, en cualquier parte de las células.
- *Positividad para ABCB1⁺*: A todos los cuadros que se tenían marcaje de color rojo, en cualquier parte de las células.

- *Positivos para ABCB1⁺/CK-18⁺ o ABCB1⁺/BNIP3⁺*: A todos los cuadros que tenían marcaje de color violeta intenso y/o aquellas que tenían un marcaje de color azul intenso, lo que indicaba la co-localización de las proteínas de interés.
- *Negativo para ABCB1⁺/CK-18⁺ o ABCB1⁺/BNIP3⁺ o cada uno de estos marcadores de forma independiente*: A todos aquellos cuadros que no presentaban tinción roja, verde, azul o violeta intenso, es decir, donde solo se observaron los núcleos celulares contra-teñidos con hematoxilina de Mayer.

En la *figura 12* se ilustra el procedimiento antes descrito. El número de cuadros contados por cada observador fue registrado en bases de datos individuales, creadas con el software Microsoft Excel[®] (Microsoft[®]), para después realizar el análisis estadístico.

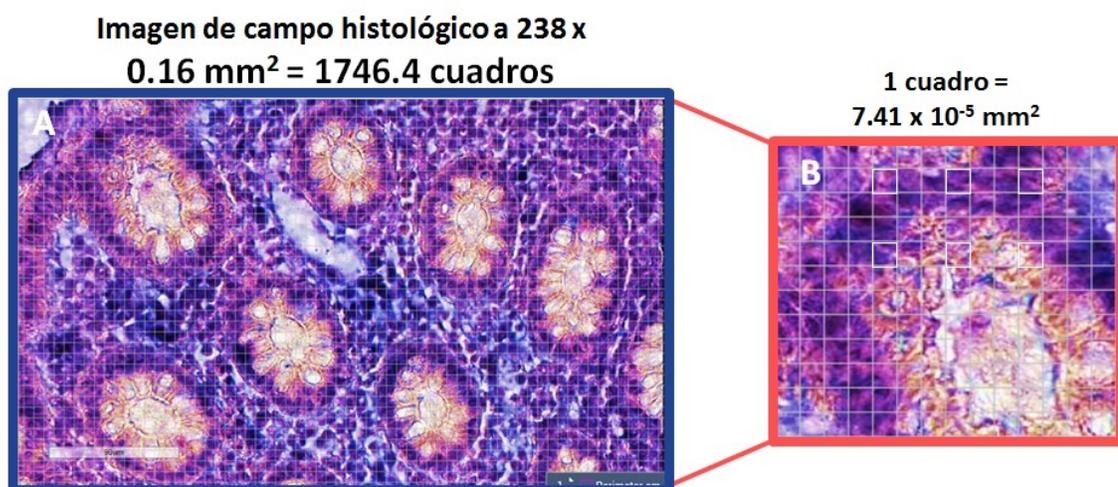


Figura 12; Imagen representativa del programa *Sketch&Calc*[®]. El programa *Sketch&Calc*[®] está conformado por una planilla de cuadros en el cual como fondo podemos insertar la imagen que deseamos. La cuadrícula completa consta de 1746.4 cuadros (imagen A), equivalentes a 0.16 mm² o 1.29 x 10⁵ μm², cada cuadro mide 7.41 x 10¹ μm² (imagen B, cuadros blancos). Este programa permitió hacer el conteo manual de cuadros de los distintos colores de nuestras preparaciones de IHQ de doble marcaje y con ello establecer el área correspondiente a la tinción, de esta manera siendo un método cuantitativo. La imagen de fondo corresponde a un tejido sano de intestino grueso capturado a 238x, al cual se le realizó IHQ de doble marcaje para los marcadores ABCB1/BNIP3.



8.7. Análisis estadístico de los datos

Se llevo a cabo un análisis de correlación y/o asociación del promedio de cuadros positivos contados manualmente por cada observador para las diferentes combinaciones de marcadores realizados, primeramente, analizando los tejidos tumorales de ACCR ($n=20$). Para ello, clasificamos los tejidos tumorales como sensibles y resistentes a 5FUOL ($n=10$ para cada uno). Una vez clasificados los datos, se compararon los casos sensibles contra los resistentes en las siguientes variables: quimiosensibilidad *in vitro* a 5FUOL, contra el PMC, el IK final determinado a los dos años del seguimiento de los casos, la presencia de metástasis, muerte y sobrevida a dos años del tratamiento inicial en los casos de ACCR. Para realizar estas comparaciones utilizamos las pruebas estadísticas que aparecen en la *tabla 10*.

Tabla 10; Pruebas estadísticas y variables utilizadas para el análisis de los datos

Tejidos comparados		Variables analizadas	Prueba estadística	Valor de p	
ACCRs ¹ Sensibles vs. Resistentes	→	Cuadros positivos para: CD24+/CD26+, CD44+/CD26+, CD44+, CD24+, CD26+ vs ABCB1+/CK-18+, ABCB1+/BNIP3+, CK-18+, BNIP3+ y ABCB1+	Sensibilidad a 5FUOL ²	U- Mann-Whitney	$p < 0.05^5$
			PMC ³	Rho de Spearman	
			IK Final ⁴	Kruskal-Wallis	
			Sobrevida	Rho de Spearman	
			Metástasis	U- Mann-Whitney	
			Muerte	U- Mann-Whitney	

*Abreviaturas:*¹ACCR; adenocarcinoma colorrectal. ²5FUOL-; 5-fluorouracilo, oxaliplatino y leucovorina. ³PMC; Porcentaje de Muerte Celular. ⁴IK; Índice de Karnofsky determinado a 2 años del tratamiento inicial. ⁵ $p < 0.05$; valor considerado como estadísticamente significativo.

Por otro lado, comparamos la expresión de marcadores típicos de CMT y de resistencia a 5FUOL, determinados a partir del promedio de cuadros positivos para cada combinación y en forma aislada, comparando tejidos tumorales de ACCR vs. Tejidos intestinales sanos con la prueba de U de Mann-Whitney (U-MW). Además, comparamos los tejidos de la siguiente manera: tejidos tumorales resistentes vs. Tumorales sensibles, tejidos sanos vs Tumorales resistentes y tejidos sanos vs Tumorales sensibles, para esto utilizamos la prueba de Kolmogórov-Smirnov (K-S).

En todos los análisis estadísticos consideramos un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo a las variables analizadas, lo que indicaba correlación o asociación con estas. Los análisis estadísticos se realizaron con ayuda del software IBM® SPSS® Statistics -versión 20- (IBM Corporation, Chicago, IL, USA).

CAPÍTULO 9. RESULTADOS

9.1. Aislamiento de CMT de ACCRs

La *figura 13* muestra el aspecto típico de dos de los seis aislados de ACCRs. Utilizando el medio selectivo y el método de cultivo adaptado en nuestro laboratorio, conseguimos aislar una gran cantidad de CMT en botellas de cultivo y cajas de Petri de baja adherencia. En la figura puede observarse que la mayor parte de las CMT aisladas eran refringentes y presentaron una morfología esférica. Estas células presentaron un crecimiento acelerado, ya que a los cuatro días de cultivo en medio selectivo para CMT mostraron una confluencia mayor al 80% y una viabilidad celular del 90%. En la *figura 13* pueden observarse también agregados de células y los esferoides que típicamente forman las CMT en cultivo; lo que apoya el hecho de que efectivamente aislamos CMT en nuestro laboratorio.

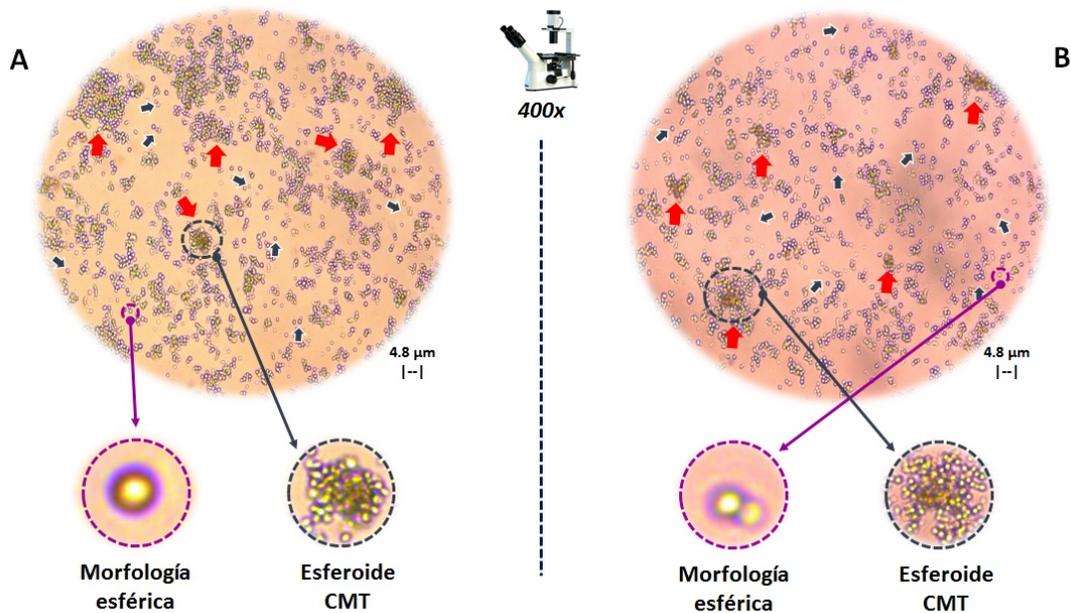


Figura 13; Morfología de las CMT de ACCRs. Las imágenes A y B corresponden a dos cultivos diferentes de CMT, que representan los resultados de las imágenes de los seis aislados de CMT obtenidos para realizar parte del presente estudio.; los cuales se aislaron de dos muestras diferentes de ACCR y se expandieron en medio libre de suero, adicionado con factores de crecimiento. Ambas imágenes muestran forma esférica birrefringente (círculos morados), cúmulos de células (flechas rojas y azules) y esferoides (círculos azules). típicas de las CMT, cultivadas en medio selectivo (libre de suero y adicionado con factores de crecimiento) y en condiciones de baja adherencia. Nuestro laboratorio es uno de los pocos en el mundo que han sido capaces de aislar y caracterizar *in vitro* CMT.



9.2. Co-expresión de CD24 y CD44 en aislados de CMT de ACCR

La *figura 14* (pág. 49) es una muestra representativa de uno de los seis cultivos de CMT que se aislaron durante el presente estudio. Las células de estos cultivos crecieron bajo condiciones selectivas de CMT, mostraron su forma esférica y co-expresaron los marcadores de superficie típicos de CMT (CD44 y CD24), conservando sus núcleos en excelente estado. En cambio, en los controles negativos, en los que se omitieron los anticuerpos monoclonales sólo se observaron los núcleos celulares teñidos con DAPI.

9.3. Co-expresión de marcadores de FR en aislados de CMT de ACCR

La *figura 15* (pág. 50) se muestra que todas las CMT de dos cultivos tenían núcleos bien conservados y que coexpresaron los marcadores de resistencia a 5FUOL: ABCB1 y CK-18 o ABCB1 y BNIP3. Por otro lado, los frotis de aislados de CMT de ACCR, a los cuales se les omitió las combinaciones de anticuerpos primarios y que fueron utilizados como controles negativos, mostraron núcleos celulares, teñidos con DAPI, bien conservados e íntegros, y sin células con marcaje positivo.

9.4. Diferenciación de las CMT de ACCR a células epiteliales

En la *figura 16* (pág. 51) se muestran campos representativos de uno de los 6 cultivos de CMT inducidas a diferenciarse a células epiteliales. Puede observarse que la mayor parte de las células presentó un núcleo bien conservado y expresó citoqueratina (CK)-17, CK-20, una mezcla de citoqueratinas (Cocktail CK AE1/AE3) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, *epidermal growth factor receptor*). La morfología de las células diferenciadas fue discretamente alargada y la mayor parte fueron puntiformes y se agruparon en pequeños cúmulos. Las imágenes sobrepuestas de cada uno de los marcadores epiteliales mencionados y de la contratinción con DAPI, mostró que la mayor parte de las células diferenciadas expresaban en la periferia de los núcleos celulares los marcadores epiteliales. Los cultivos de células diferenciadas crecieron hasta alcanzar una confluencia superior al 80% y alrededor de 50% de viabilidad. Las células diferenciadas se adhirieron al sustrato después del día 15 de haberse iniciado su inducción.

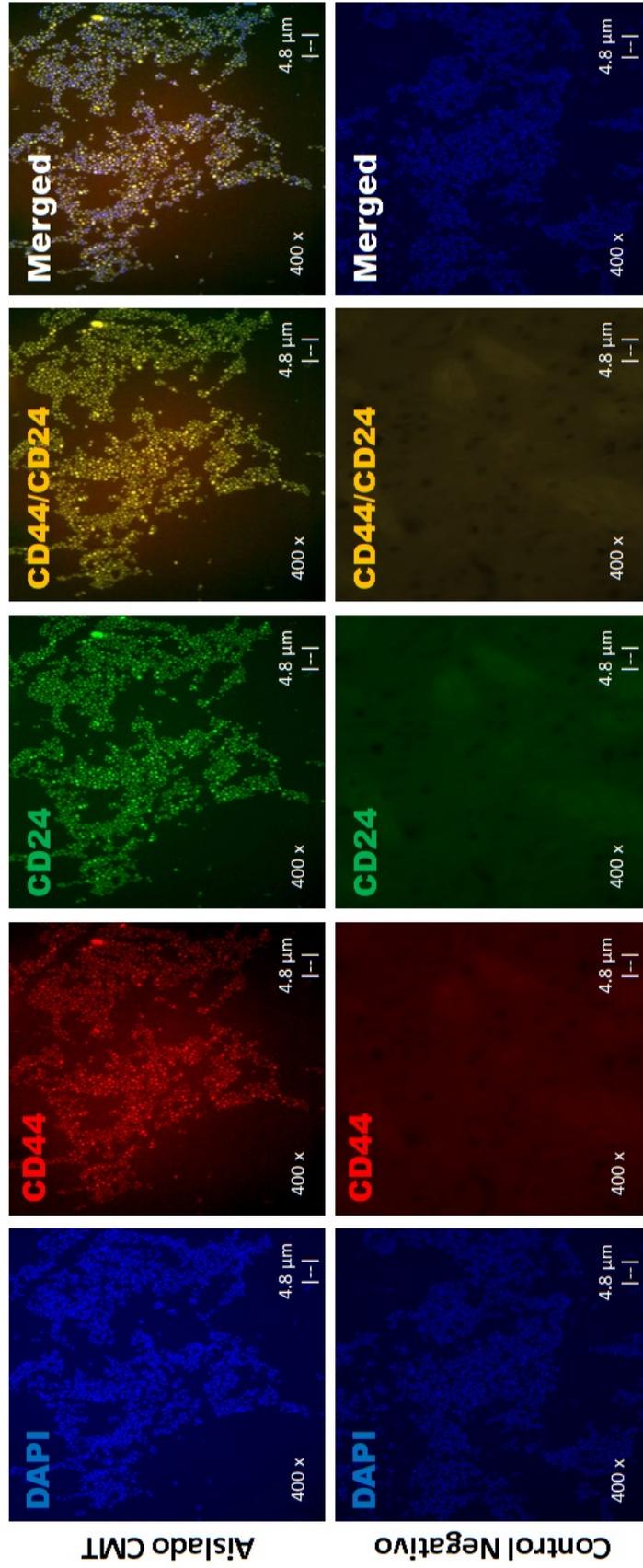


Figura 14; Coexpresión de CD44 y CD24 en cultivos puros de CMT de ACCR. En la serie superior de fotografías de esta imagen se muestra un cultivo representativo de CMT teñido con DAPI y marcado, mediante inmunofluorescencia, con anticuerpos monoclonales anti-CD44-PE-Cy7 y con anti-CD24-FITC. Con DAPI se observan, íntegros, todos los núcleos celulares (primera columna), con CD44 o CD24 se aprecia que todas las células estaban expresando ambos marcadores (segunda y tercera columna, respectivamente), lo cual se corroboró con el doble marcaje CD24/CD44 (cuarta columna) y confirmamos con la presencia de núcleos celulares en estas células (quinta columna -*merged*). Por otro lado, en un corte de cerebro humano, utilizado como control negativo se observan claramente los núcleos celulares, bien conservados y un marcaje negativo con CD44, CD24 y por ende a CD44/CD24.

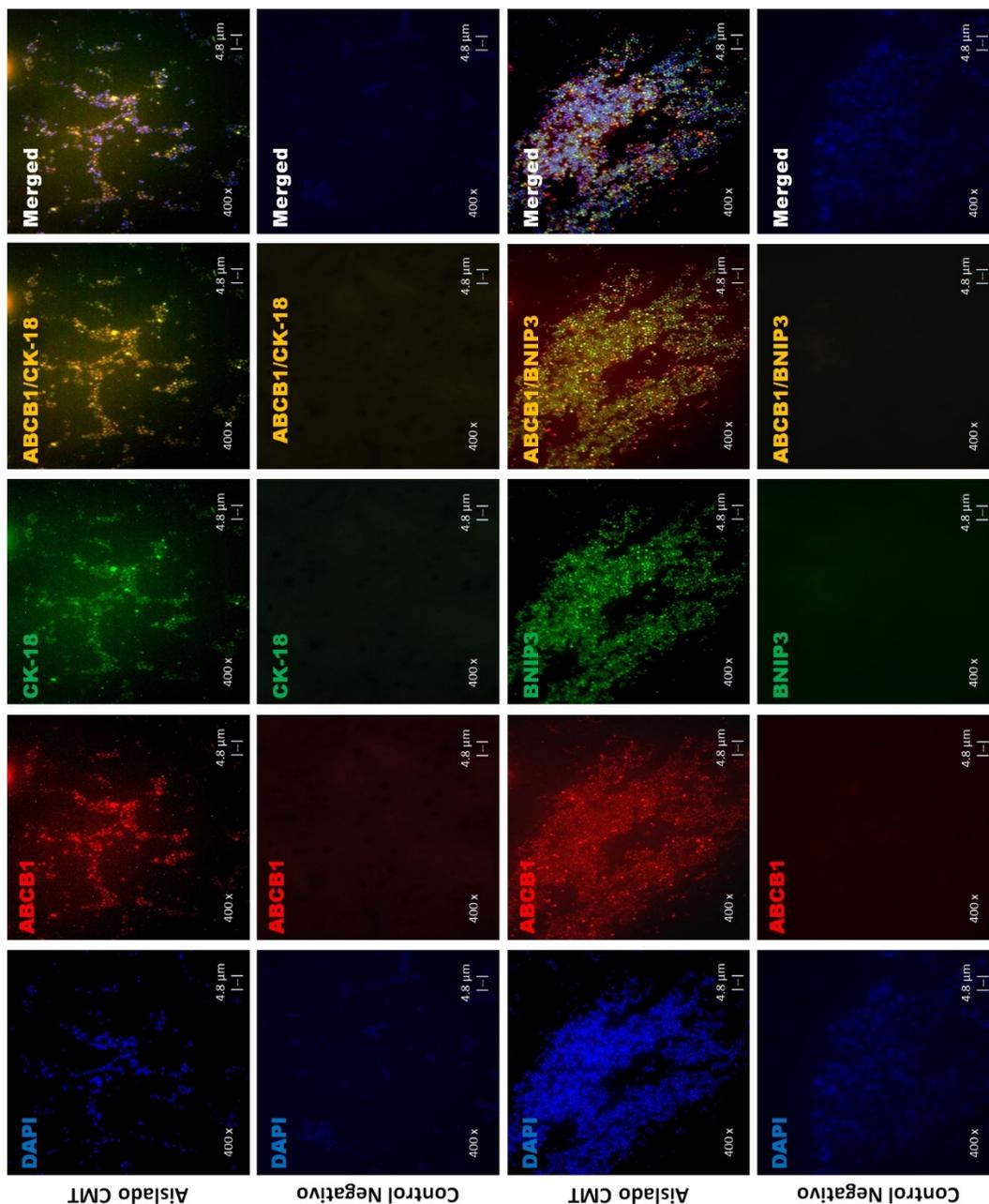


Figura 15; Coexpresión de marcadores de resistencia a 5FUOL ABCB1/CK18 y ABCB1/BNIP3 en cultivos puros de CMT de ACCR. La fila 1 de fotografías de esta imagen muestra un cultivo representativo de CMT teñido con DAPI y marcado, mediante inmunofluorescencia (IF), con anticuerpos monoclonales anti-ABCB1 empleando Alexa Fluor (AF) 560 (rojo) y anti-CK-18 empleando AF 488 (verde). Con DAPI se observan, todos los núcleos celulares (primera columna de la primera fila). Todas las células expresaron ABCB1 y CK-18 (segunda y tercera columna de la fila 1) y en todas, estos dos marcadores estaban co-expresados (cuarta columna de la fila 1), lo cual se corrobora con la presencia de núcleos celulares en estas células (quinta columna de la fila 1). Por otro lado, en la fila 3 de fotografías se muestra un cultivo representativo de CMT teñido con DAPI y marcado, mediante IF, con anticuerpos monoclonales anti-ABCB1 empleando AF 560 (rojo) y anti-BNIP3 empleando AF 488 (verde). Con DAPI se observan, todos los núcleos celulares (primera columna de la tercera fila). La mayor parte de las células expresaron ABCB1 y BNIP3 (segunda y tercera columna de la fila 3) y en la mayoría, estos dos marcadores estaban co-expresados (cuarta columna de la fila 3). En las series de fotografías de la fila 2 y 4, que corresponden a cortes de cerebro humano -incluidos como controles negativos-, se aprecia la ausencia total de fluorescencia en todos los marcapos con anticuerpos monoclonales. En cambio, se observan claramente los núcleos teñidos con DAPI.

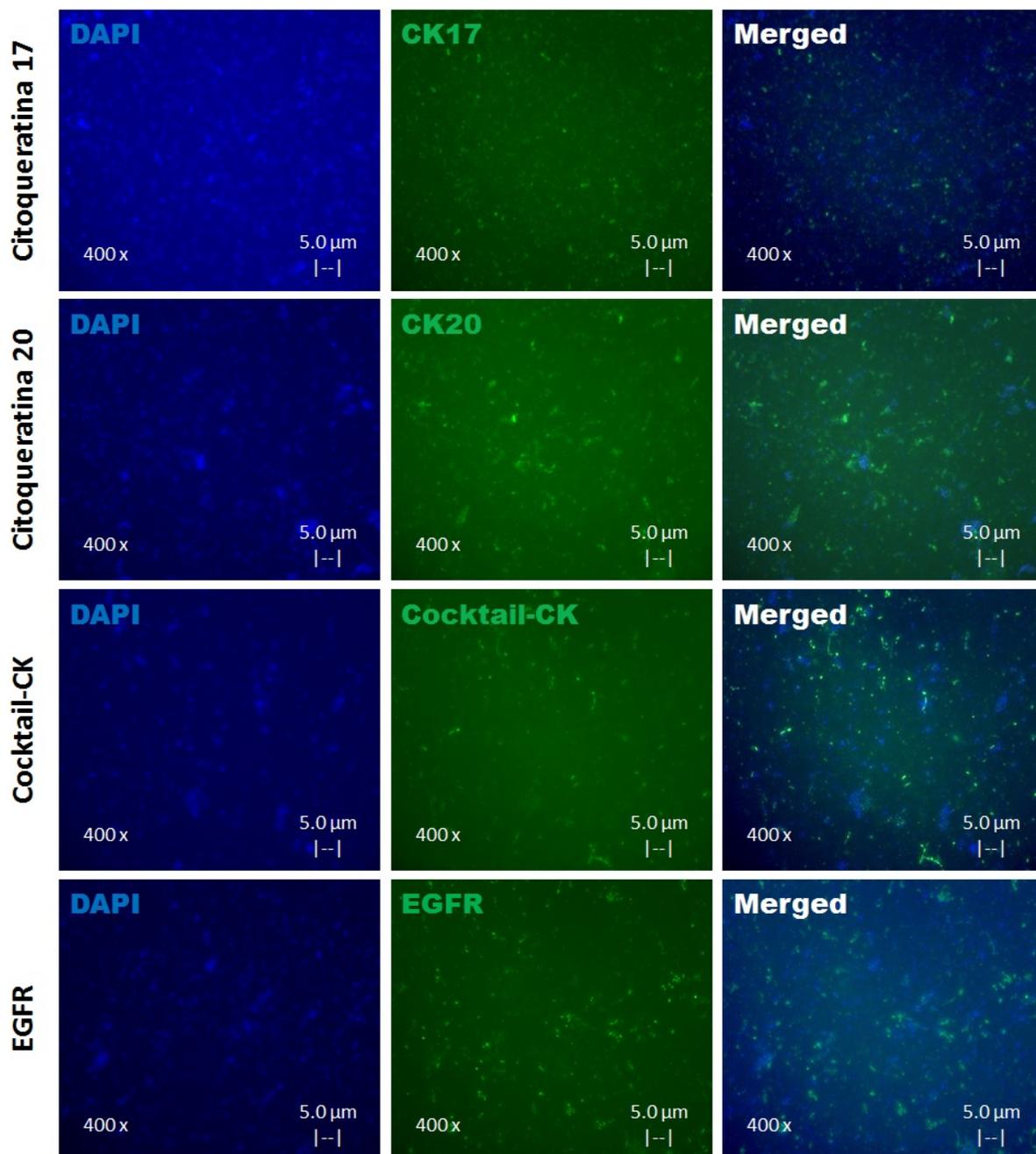


Figura 16; Diferenciación de CMT de ACCR a células epiteliales. En las fotografías de esta imagen se muestra un cultivo representativo de células epiteliales diferenciadas a partir de CMT de ACCR con medio de cultivo suplementado con suero. Este fue teñido con DAPI y marcado, mediante inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales anti-CK-17, anti-CK-20, anti-CK-AE1/AE3 (Cocktail-CK) y con anti-EGFR, utilizando para todos estos marcadores *Alexa Fluor 488* (verde) como anticuerpo secundario. Con DAPI se observan, íntegros, todos los núcleos celulares (primera columna). Todas las células expresaron CK-17, 20, AE1/AE3 y EGFR (segunda columna), lo cual se corroboró con la presencia de núcleos celulares en estas células (tercera columna), sin embargo, no se aprecia aun la morfología típica de las células epiteliales.



9.5. Características clínicas del grupo de estudio

La *tabla 11* (pág. 53) muestra las características clínicas de nuestro grupo de estudio. En esta tabla puede observarse lo siguiente: se incluyeron 20 casos de ACCR. La mayor parte de los pacientes (80%) se atendieron en el Centro Médico Nacional de Noreste -UMAE No. 25 del IMSS y la quinta parte de ellos (20%) en el Hospital Universitario de la UANL. La mayoría de los participantes eran hombres. La mediana de la edad para ambos sexos fue de 60 años, con un rango entre 44 y 96 años. La mediana de la edad para el género masculino y femenino fue de 62 y 52 años, respectivamente.

La localización tumoral en la mayoría de los casos fue en colon y el grado de diferenciación más frecuente fue el moderadamente diferenciado (85%), seguido de los poco diferenciados (10%) y por último los bien diferenciados (5%). En cuanto al estadio tumoral, según la clasificación TNM de la OMS: 15% de los casos fueron T2, 65% T3 y 20% T4. Por otro lado, según la etapa clínica, 10% estaba en el estadio I, el 45% estaba en el estadio II, el 40% en el estadio III y el 5% en el estadio IV.

Por otro lado, 10 casos de ACCR (50%) se consideraron sensibles y 10 resistentes (50%) cuando se examinaron los datos de la base matriz correspondientes al ensayo de quimiosensibilidad a 5FUOL por el método de ATP-CRA, que tomó en cuenta el PMC a la combinación de fármacos descrita, considerando un punto de corte de 20% de PMC. En la *figura 17* (pág. 53) se muestra la distribución del PMC de los cultivos primarios de ACCR expuestos a 5FUOL, derivado de la base de datos matriz de nuestro grupo de trabajo.

Al realizar el seguimiento clínico de los 20 de los casos de ACCR, 12 de ellos (60%) habían recibido quimioterapia adyuvante -quimioterapia después de la cirugía-, de los cuales, 7 casos fueron resistentes y 5 sensibles a 5FUOL. También, 8 casos (40%) no recibieron ningún tipo de esquema de tratamiento después del acto quirúrgico, de ellos 5 fueron sensibles y 3 casos resistentes a 5FUOL. Ningún paciente recibió quimioterapia neoadyuvante -quimioterapia antes de la cirugía-, ya que fue considerado como criterio de inclusión en este estudio.

Además, 13 casos de ACCR de los 20 incluidos (65%), no presentaron metástasis a lo largo de los 2 años del seguimiento clínico, de ellos 8 casos fueron sensibles y 5 resistentes. Los 7 casos restantes (35%), presentaron manifestaciones clínicas de metástasis. De este subgrupo, 5 casos fueron resistentes (71%) y 2 fueron sensibles a 5FUOL (29%). La distribución de órganos afectados por metástasis fue de la siguiente manera: doble-metástasis en pulmón-hígado (2 casos resistentes), hígado-hueso (1 caso resistente), hueso (1 caso resistente), hígado (1 caso sensible y 1 resistente) y vejiga urinaria (1 caso sensible)

Tabla 11; Características clínicas de los pacientes con ACCR.

Variable	n= 20 (%)	Variable	n= 20 (%)
Género (%)		Etapa clínica (%)	
Masculino	13 (65%)	I	2 (10%)
Femenino	7 (35%)	II A	9 (45%)
Edad en años (rango)		III A	2 (10%)
General	60 (44-96)	III B	4 (20%)
Masculino	62 (45-73)	III C	2 (10%)
Femenino	52 (44-96)	IV B	1 (5%)
Adscripción de los casos (%)		Quimioterapia (%)	
UMAE 25, IMSS	16 (80%)	Neoadyuvante	0 (0%)
HU, UANL	4 (20%)	Adyuvante	12 (60%)
Localización tumoral (%)		Ninguno	8 (40%)
Colon	16 (80%)	Diferenciación histológica (%)	
Recto	4 (20%)	Bien diferenciado	1 (5%)
Estadio tumoral - TNM (%)		Moderadamente diferenciado	17 (85%)
T2 N0 M0	2 (10%)	Poco diferenciado	2 (10%)
T2 N1 M0	1 (5%)	Quimiosensibilidad in vitro a 5FUOL (%)	
T3 N0 M0	9 (45%)	Sensible	10 (50%)
T3 N1 M0	3 (15%)	Resistente	10 (50%)
T3 N2 M1	1 (5%)	Sobrevida en meses	
T4 N0 M0	1 (5%)	Sensibles a 5FUOL	23.7
T4 N1 M0	2 (10%)	Resistentes a 5FUOL	20.5
T4 N2 M0	1 (5%)		

Abreviaturas: ACCR; Adenocarcinoma colorrectal, UMAE 25, IMSS; Unidad Médica de Alta Especialidad No.25, Instituto Mexicano del Seguro Social, HU, UANL; Hospital Universitario, Universidad Autónoma de Nuevo León, *TNM*; tamaño del tumor (T), diseminación del cáncer hasta los ganglios linfáticos (N) y metástasis (M). T1-T4, tamaño y extensión del tumor principal. N1-N3, número y ubicación de los ganglios linfáticos invadidos. M0, el cáncer aún no se ha diseminado a otras partes del cuerpo. M1, hay metástasis, 5FUOL; 5-fluorouracilo, oxaliplatino y leucovorina.

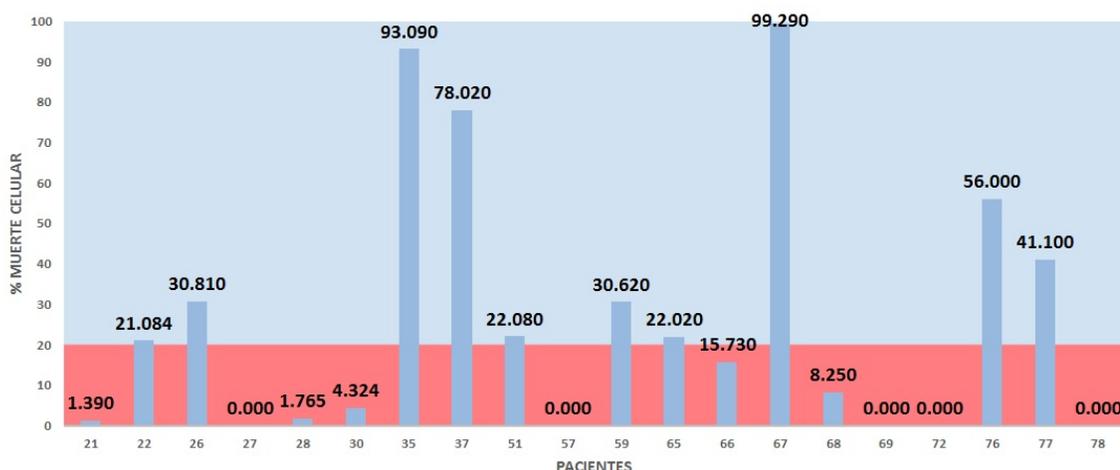


Figura 17; Distribución del porcentaje de muerte celular (PMC) a 5FUOL de los casos de ACCR incluidos. En la imagen se presenta el PMC obtenido de la mezcla a 5FUOL con el método ATP-CRA, al exponer a las células tumorales de cultivos primarios (CP) de ACCR a las concentraciones plasmáticas máximas reportadas para cada fármaco de la mezcla 5FUOL por 48 h: 5-FU (10.0 µg/mL), oxaliplatino (2.9 µg/µL) y leucovorina (0.5 µg/µL). Se consideró un PMC ≥20% como un CP-ACCR sensible y <20% como resistente a 5FUOL. En la imagen se puede observar que 10 casos fueron sensibles (barra azul tenue) y 10 casos resistentes a 5FUOL (barra roja).

La *figura 18* muestra la supervivencia de los casos incluidos, en donde se encontraban con vida hasta la fecha de corte de nuestro estudio (Julio de 2018) 13 casos (65%), sobrepasando los 24 meses (m) de sobrevida, mientras que 7 casos (35%) fallecieron dentro del periodo de observación de 2 años. En la *figura 18* se muestra el número de decesos y casos vivos agrupándolos por su sensibilidad a 5FUOL. El promedio de sobrevida fue de 23.7 m (rango de 23-24 m / mediana= 24 m) para los casos sensibles y 20.5 m (rango de 0.1-24 m / mediana =24 m) en casos resistentes a 5FUOL (ver *tabla 11*).

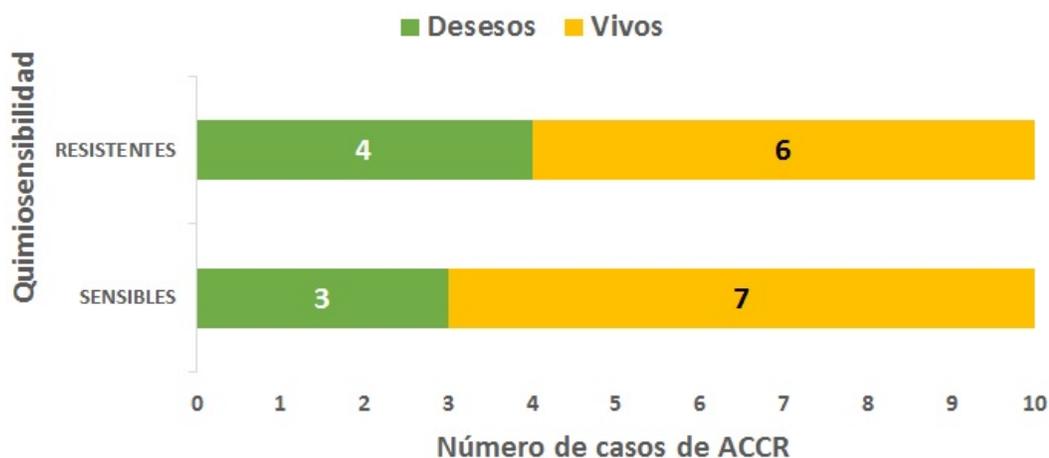


Figura 18; Supervivencia a 2 años de los casos de ACCR en función de su sensibilidad a 5FUOL. Realizamos el seguimiento clínico a 24 meses de los 20 casos de ACCR de nuestra cohorte. De los 10 casos sensibles, 7 continuaban vivos y 3 fallecieron, mientras que en la población resistente 5FUOL, 6 casos continuaban vivos y 4 habían fallecido, todos por metástasis. Las barras verdes indican los pacientes que habían fallecido y las barras amarillas, los que continuaban vivos a los 2 años de seguimiento.

9.6. Determinación del IK a dos años de seguimiento clínico

La *tabla 12* (pág. 55) muestra los IK registrados inmediatamente después de la extirpación de los tumores intestinales -IK inicial- y a los dos años posquirúrgicos -IK final- de los 20 casos de ACCR incluidos en este trabajo. El IK inicial del 70% de los casos era bueno (presentando una valoración de IK de 80 hasta 100), El IK inicial del resto de los casos (30%) era regular con valores de 50 hasta 70.

En cuanto al IK final, 9 casos de ACCR (45%) se conservaron en valores de 100. De estos 9 casos, cuatro fueron resistentes y cinco sensibles a 5FUOL. Un paciente mostro un IK final de 70 (5%) y otro de 50 (5%), los cuales fueron sensibles a 5FUOL, uno de ellos presentaba metástasis hepáticas y el otro a vejiga urinaria. Además, se presentó un caso con IK final de 30 (5%) y otro valorado en 10 (5%). Los cultivos primarios de ambos pacientes eran resistentes a 5FUOL. El paciente con IK final de 30 presentaba metástasis simultaneas a hígado y hueso, y el paciente con IK final de 10 no presentaba metástasis.



Siete casos de ACCR (35%) fallecieron en el intervalo de seguimiento (IK final = 0). De estos siete casos, 4 fallecieron por metástasis y los cultivos primarios de todos ellos eran resistentes a 5FUOL, mientras que los tres casos restantes fueron sensibles a 5FUOL y fallecieron por otras causas.

Tabla 12; Índice de Karnofsky inicial y final de los casos de ACCR

I.K. Inicial ¹		I.K. Final ²	
Valor asignado	n = 20 (%)	Valor asignado	n = 20 (%)
100	3 (15%)	100	9 (45%)
90	7 (35%)	70	1 (5%)
80	4 (20%)	50	1 (5%)
70	1 (5%)	30	1 (5%)
60	3 (15%)	10	1 (5%)
50	2 (10%)	0	7 (35%)

¹IK inicial; Índice de Karnofsky inicial. Este correspondió a la valoración clínica, realizada antes de la cirugía. ²IK final; se obtuvo 2 años después de iniciado el tratamiento (cirugía). IK=100 indica que el paciente tiene una situación clínica-funcional normal. Un IK= 0 indica que el paciente ha fallecido.

9.7. Estructura histológica del colon sano y ACCRs teñidos con H&E

En la *figura 19* (pág. 56 y 57) se muestran imágenes representativas de los cortes histológicos obtenidos de intestino sano y de ACCRs seleccionados para nuestro estudio, mostrando tres ejemplos de diferenciación tisular.

En la primera columna, fila A, se muestra una fotomicrografía de un corte de intestino sano. puede observarse la presencia de epitelio cilíndrico simple con invaginaciones tubulares rectas, no ramificadas, hacia el interior de la mucosa y estructuras ovoides en forma de rodetes llamadas criptas de Lieberkühn o glándulas intestinales; las cuales están rodeadas de la lámina propia o tejido conjuntivo. Debajo de la mucosa, se muestra una delgada capa de musculo liso, integro, la *muscularis mucosae* y debajo de esta, la submucosa. En la segunda columna, fila A de la *figura 19*, se observan dentro de las CL, células caliciformes, las cuales son células ovaladas pálido-blanquecinas que se proyectan hacia la luz de las criptas. Entre las células caliciformes, se encuentran los enterocitos o células absortivas con una morfología cilíndrica. Con una mayor amplificación, se observa la lámina propia en la periferia. Las células intestinales muestran su polaridad, con núcleos celulares ordenados y orientados hacia la lámina propia, la presencia de figuras mitóticas bipolares normales y la ausencia de pleomorfismo celular y nuclear.

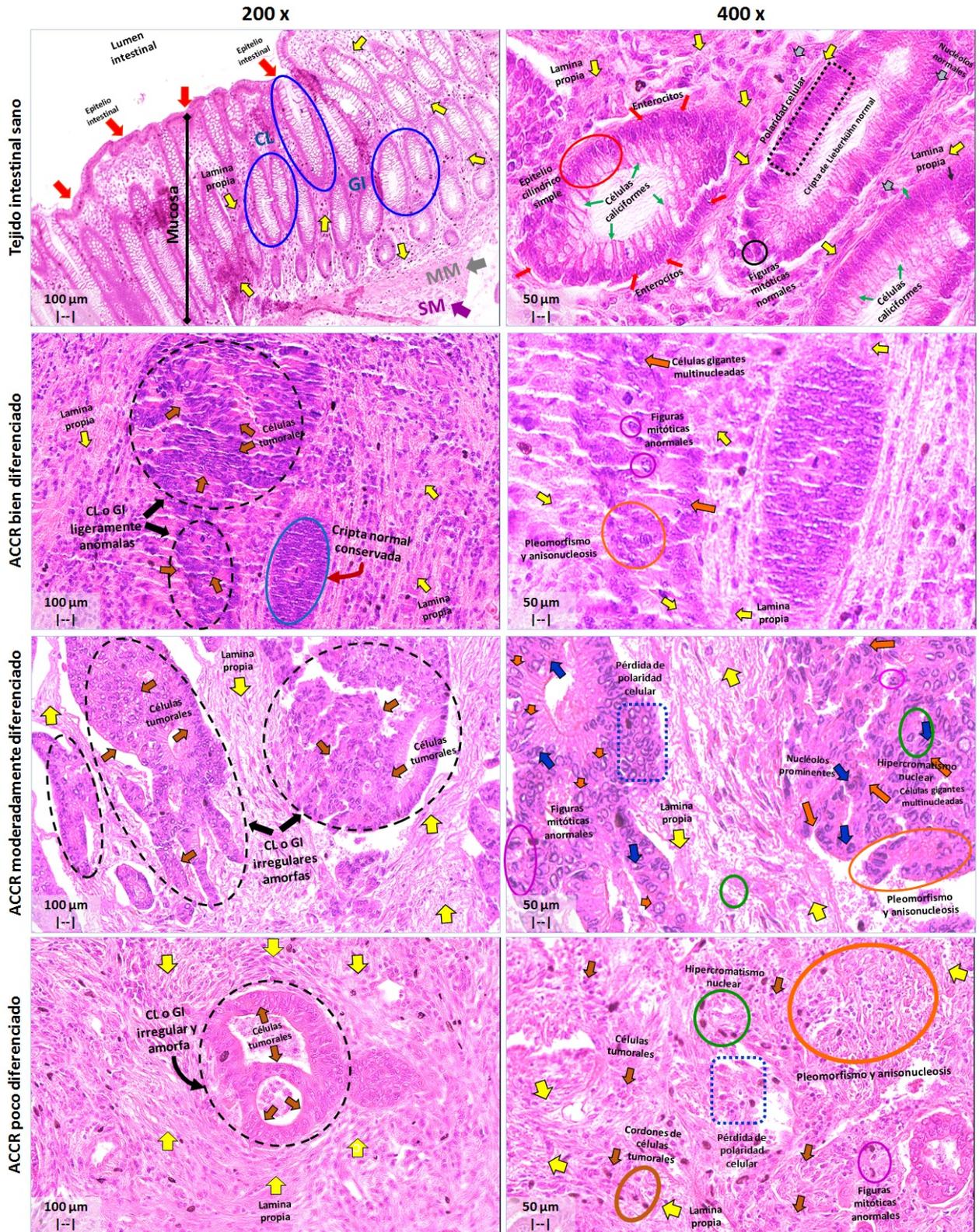
En cuanto a los cortes de ACCR (Fila B-D de la *figura 19*) se distinguen ACCRs con diferentes grados de diferenciación. En los ACCRs moderados o pobremente diferenciados se observan las siguientes características: un patrón irregular de glándulas o de criptas, sin



células caliciformes dentro de ellas; pérdida de la polaridad celular; presencia de núcleos celulares dispersos y sin orientación hacia la lámina propia; un marcado pleomorfismo y anisonucleosis; la presencia de figuras mitóticas anormales multipolares; células gigantes multinucleadas, hipercromatismo; nucléolos prominentes y la infiltración de células tumorales en la lámina propia.

Por otro lado, en los tumores bien diferenciados, estos conservaron en su morfología, criptas bien definidas alternadas con criptas amorfas e irregulares, a comparación de la diferenciación moderada, en donde más del 50% del tejido tumoral presentó criptas irregulares y en los ACCRs mal diferenciados, menos del 50% presentó estas estructuras anormales, siendo un hallazgo importante la presencia de cordones de células tumorales.

Figura 19; Estructura histológica de colon sano y de ACCRs en diferentes grados de diferenciación. Teñimos cortes finos histológicos de colon humano sano (primera fila) y de ACCRs (segunda a cuarta filas) con hematoxilina y eosina (H&E). A una ampliación de 200X. Se aprecia en los cortes de colon sano la arquitectura glandular típica (círculos azules), la lámina propia (flechas amarillas), *muscularis mucosae* (MM, flecha gris) y submucosa (SM, flecha morada). A 400x observamos la presencia de epitelio cilíndrico simple (círculo rojo), característico de las criptas de Lieberkühn o glándulas intestinales (CL o GI), junto con células caliciformes (flechas verdes) y enterocitos (flechas rojas) en el interior de las CL, estas últimas rodeadas de lámina propia íntegra (flechas amarillas). Igualmente, es notable la organización celular y la polaridad de las estructuras (rectángulo punteado negro) y la presencia de figuras mitóticas normales (círculo negro). De la segunda a cuarta fila de imágenes se muestran cortes histológicos de ACCR bien diferenciado (segunda fila), moderadamente diferenciado (tercera fila) y pobremente diferenciado (cuarta fila). En los ACCR bien diferenciados se conserva la estructura de las CL o GI, alternando con criptas aberrantes, a comparación de los moderados y pobremente diferenciados, donde la mayor parte de las CL o GI tienen morfología irregular y amorfa (círculos negros punteados). Todos los ACCR aquí mostrados, presentaron pérdida de la polaridad celular (rectángulo punteado azul), presencia de células gigantes multinucleadas (flechas naranjas), figuras mitóticas anormales (círculo morado), nucléolos prominentes (flechas azules), pleomorfismo y anisonucleosis (círculo naranja) e hipercromatismo nuclear (círculos verdes). Las células tumorales se señalan con flechas en color café.



9.8. Expresión de marcadores de CMT en ACCR y colon sano

La figura 20 muestra células coexpresando CD24/CD26 y CD44/CD26, así como la expresión aislada de CD26, en cortes de colon sano y de ACCR, visualizados con IHQ de doble marcaje. Se aprecia una expresión diferencial entre ACCRs sensibles y resistentes de ACCR. En cuanto al colon sano se observa una menor cantidad de células coexpresando los marcadores mencionados que en los cortes de ACCR. No se observó la expresión de las proteínas CD24 y CD44 por separado.

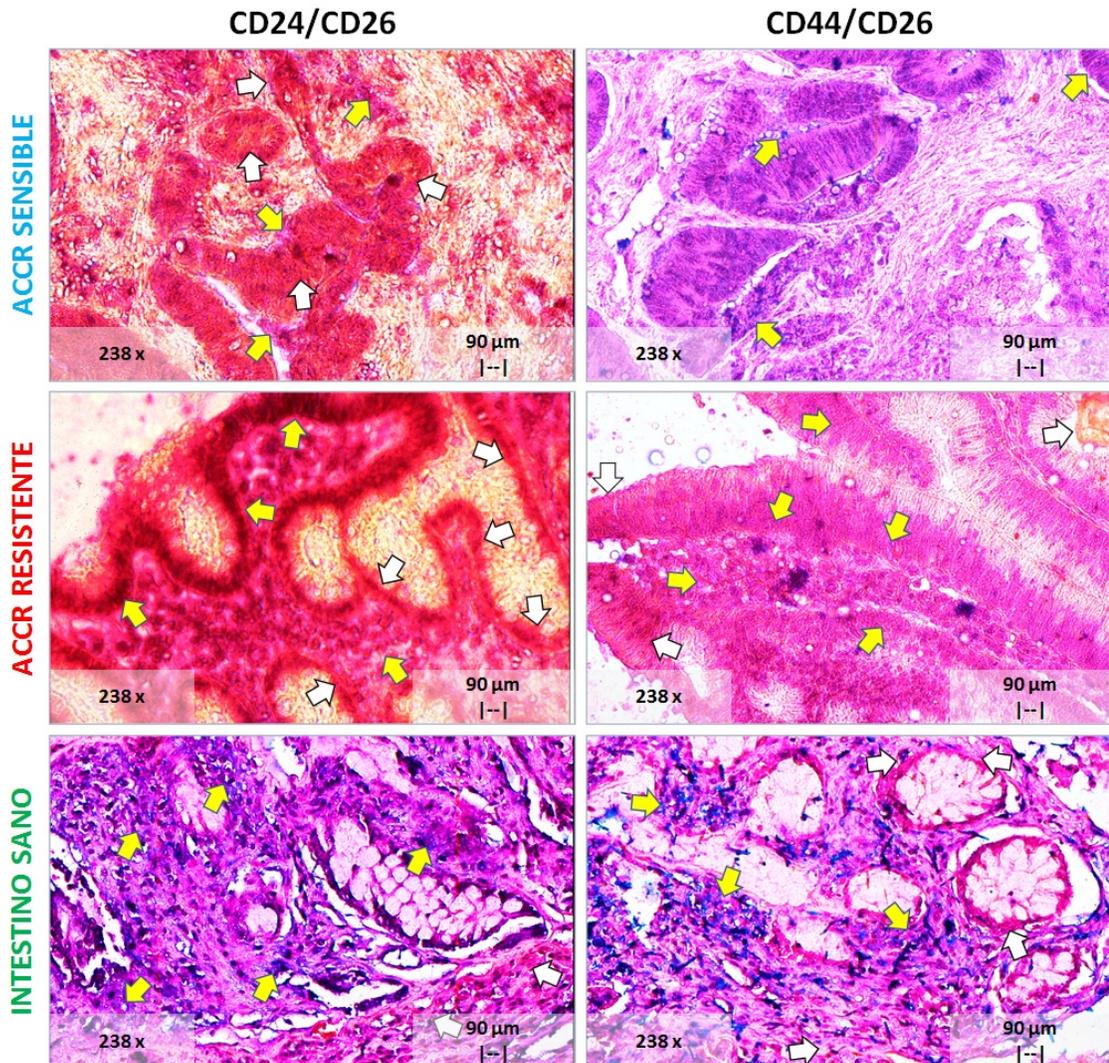


Figura 20; Expresión de marcadores de CMT en tejidos de ACCR y colon sano. Teñimos, mediante inmunohistoquímica de doble marcaje, cortes finos de ACCRs, previamente incluidos en parafina, utilizando anticuerpos monoclonales anti-CD24, anti-CD44 y el policlonal anti-CD26. En las imágenes se muestra la colocalización de CD24/CD26 (primera columna) y CD44/CD26 (segunda columna), señaladas con flechas amarillas. Se aprecia una expresión diferencial de ambas combinaciones de marcadores colocalizados en tejido sensible, resistente a 5FUOL e intestino sano (primera a tercera fila de imágenes, respectivamente). También puede observarse la expresión, por separado, de CD26, igualmente mostrando diferencias en su expresión en los tres grupos analizados (flechas blancas).



La *figura 21* (pág. 64), muestra tres gráficos con los promedios \pm error estándar (EE) de 10 cortes de ACCRs sensibles, 10 cortes de ACCRs resistentes a 5FUOL y 3 cortes de colon humano sano. Estas cifras se obtuvieron contando el número de cuadros — equivalentes al área cubierta por células expresando los marcadores de interés — en cinco campos microscópicos al azar y por dos observadores independientes. Los resultados fueron los siguientes:

Hubo una mayor coexpresión de CD24 y CD26⁺ en ACCRs sensibles a 5FUOL (36.16 ± 5.7 cuadros) que por ACCRs resistentes (33.06 ± 3.1 cuadros; $p=0.006$) y que por colon sano (17.40 cuadros ± 1.23 ; $p=0.008$). La coexpresión de CD24 y CD26 por ACCRs resistentes a 5FUOL fue mayor que en colon sano ($p < 0.001$).

En los cortes de ACCR resistentes a 5FUOL encontramos un número mayor de cuadros conteniendo células que coexpresaban CD44 y CD26 (39.74 ± 4.0 cuadros), que en los ACCRs sensibles a 5FUOL (24.28 ± 3.289 cuadros; $p=0.025$) y que en colon sano (19.80 ± 2.98 cuadros; $p=0.488$).

Respecto a la expresión aislada de CD26 encontramos que la expresión de este marcador fue mayor en ACCRs resistentes a 5FUOL (256.44 ± 12.69 cuadros) que en los ACCRs sensibles (226.53 ± 15.68 ; $p=0.034$) y que en colon sano (8.98 ± 1.09 ; $p= < 0.001$). La expresión de aislada de CD26 por ACCRs sensibles a 5FUOL fue mayor que en colon sano ($p < 0.001$). No logramos encontrar la expresión aislada de CD24 ni de CD44.

9.8.1. Coexpresión de CD24 y CD26

En la *tabla 13* (pág. 61) se muestran los resultados del conteo de cuadros que incluían CMT CD24⁺/CD26⁺ en los cortes de ACCR y en colon sano, observándose una gran variación entre los ACCRs sensibles y resistentes a 5FUOL. Se obtuvo una diferencia promedio de 5, 4 y 1 cuadros en el tejido resistente, sensible y sano, respectivamente, entre dos observadores independientes.

Al realizar el análisis estadístico del número de cuadros analizados para esta combinación con la prueba Kruskal-Wallis para muestras independientes (K-W), observamos diferencias significativas entre los cortes de colon sano vs. ACCRs sensibles ($p= 0.008$), sanos vs. Tejidos tumorales resistentes ($p < 0.001$) y tejidos sensibles vs. Resistentes ($p= 0.006$). Por otro lado, al comparar el número de cuadros conteniendo células CD24⁺/CD26⁺ en los ACCRs sensibles vs. ACCRs resistentes y las variables clínicas propuestas, obtuvimos los siguientes resultados: la mayor cantidad de cuadros conteniendo células CD24⁺/CD26⁺, se asoció con ACCR resistentes a 5FUOL ($p= 0.005$). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los ACCRs resistentes o sensibles a 5FUOL con sus correspondientes PMCs ($p= 0.244$), IKs finales ($p= 0.124$), sobrevida ($p= 0.614$),



presencia de metástasis ($p=0.465$), ni con los pacientes que fallecieron durante los dos años contados a partir del tratamiento inicial ($p=0.293$).

9.8.2. Coexpresión de CD44 y CD26

El promedio \pm EE de cuadros conteniendo células CD44⁺/CD26⁺ en ACCRs resistentes a 5FUOL fue 39.74 ± 4.0 ; y el de los cuadros con células de ACCRs sensibles a 5FUOL fue 24.28 ± 3.28 . El promedio de cuadros con células CD44⁺/CD26⁺ de colon sano fue 19.80 ± 2.98 cuadros (*Figura 21- gráfico B*). Se tuvo una diferencia promedio de 4, 2 y 3 cuadros en el tejido resistente, sensible y sano, respectivamente, entre los dos observadores independientes.

En la *tabla 13* (pág. 61), se muestran los resultados del conteo de cuadros conteniendo células CD44⁺/CD26⁺ en los ACCRs y colon sano, observándose una gran variación de cuadros entre los casos tumorales, sobre todo en el grupo sensible a 5FUOL.

Utilizando la prueba de K-W, observamos diferencias significativas entre el número de cuadros conteniendo células CD44⁺/CD26⁺ de ACCR sensibles vs. ACCR resistentes ($p=0.025$). Sin embargo, no encontramos diferencias entre los cortes de colon sano vs. los ACCRs sensibles a 5FUOL ($p=1.000$) ni entre los ACCRs resistentes vs. Colon sano ($p=0.488$). Esto último, a pesar de que se encontró una cantidad mayor de cuadros con células CD44⁺/CD26⁺ en los ACCRs resistentes a 5FUOL.

La mayor cantidad de cuadros conteniendo células CD24⁺/CD26⁺, se asoció o se correlacionó con los ACCRs resistentes a 5FUOL ($p=0.008$), con la presencia de metástasis ($p=0.001$), con los pacientes muertos a los dos años de iniciado su tratamiento ($p<0.001$), casos de ACCR con IK final=0 vs. IK=10 ($p<0.001$), IK final=0 vs. IK=50 ($p=0.005$), IK=0 vs. IK=30 y vs. IK=100 ($p=0.022$). Los cortes de ACCRs de pacientes con IK final=0 tenían un mayor número de cuadros CD44⁺/CD26⁺. Interesantemente encontramos una correlación negativa del número de cuadros conteniendo células CD24⁺/CD26⁺ con una menor supervivencia ($p<0.001$). es decir, un menor número de cuadros conteniendo células CD24⁺/CD26⁺ se correlacionó con una menor supervivencia. No encontramos diferencias significativas con el PMC ($p=0.110$).



Tabla 13: Coexpresión de marcadores de CMT CD24/CD26 y CD44/CD26 en ACCR y colon humano sano

Tejido analizado	Sensibilidad 5FUOL	Folio asignado ¹	Expresión CD24/CD26			Expresión de CD44/CD26				
			Observador 1	Observador 2	Observador 1	Observador 2				
			Prom. cuadros positivos ²	Área en μm ²	Prom. cuadros positivos	Área en μm ²	Prom. cuadros positivos ²	Área en μm ²		
Tejido tumoral: ACCR	Sensible	22	10.8	8.00 x 10 ²	5.6	4.15 x 10 ²	13.2	9.78 x 10 ²	11.4	8.45 x 10 ²
		26	179.2	1.33 x 10 ⁴	165.4	1.23 x 10 ⁴	0	0	0	0
		35	86	6.37 x 10 ³	74.2	5.50 x 10 ³	94.2	6.98 x 10 ³	94.2	6.98 x 10 ³
		37	0	0	0	0	0	0	0	0
		51	23.8	1.76 x 10 ³	11.4	8.45 x 10 ²	44.6	3.30 x 10 ³	36	2.67 x 10 ³
		59	3	2.22 x 10 ²	5.4	4.00 x 10 ²	11	8.15 x 10 ²	6.2	4.59 x 10 ²
		65	0	0	1.6	1.19 x 10 ²	0	0	0	0
		67	23.2	1.72 x 10 ³	20.4	1.51 x 10 ³	55.2	4.09 x 10 ³	55	4.08 x 10 ³
		76	31.6	2.34 x 10 ³	27.8	2.06 x 10 ³	26.8	1.99 x 10 ³	26.8	1.99 x 10 ³
		77	29.6	2.19 x 10 ³	24.2	1.79 x 10 ³	7	5.19 x 10 ²	4	2.96 x 10 ²
		Prom ± EE	38.72 ± 8.45	2.87 x 10 ³ ± 6.26 x 10 ²	33.6 ± 7.83	2.49 x 10 ³ ± 5.8 x 10 ²	25.2 ± 4.61	1.87 x 10 ³ ± 3.42 x 10 ²	23.36 ± 4.73	1.73 x 10 ³ ± 3.50 x 10 ²
		21	0	0	0.8	5.93 x 10 ¹	82.6	6.12 x 10 ³	74.8	5.54 x 10 ³
		27	36.6	2.71 x 10 ³	36	2.67 x 10 ³	47.4	3.51 x 10 ³	45.6	3.38 x 10 ³
		28	0	0	3.2	2.37 x 10 ²	26	1.93 x 10 ³	21	1.56 x 10 ³
30	59	4.37 x 10 ³	64.2	4.76 x 10 ³	31	2.30 x 10 ³	28.8	2.13 x 10 ³		
57	41	3.04 x 10 ³	43.4	3.22 x 10 ³	10.8	8.00 x 10 ²	9.4	6.97 x 10 ²		
66	0	0	0	0	54.8	4.06 x 10 ³	56.6	4.19 x 10 ³		
68	47.6	3.53 x 10 ³	53.2	3.94 x 10 ³	0	0	0	0		
69	52.4	3.88 x 10 ³	53.8	3.99 x 10 ³	76.2	5.65 x 10 ³	70	5.19 x 10 ³		
72	30.4	2.25 x 10 ³	42	3.11 x 10 ³	91	6.74 x 10 ³	68.8	5.10 x 10 ³		
78	46	3.41 x 10 ³	51.6	3.82 x 10 ³	0	0	0	0		
Prom ± EE	31.3 ± 4.42	2.32 x 10 ³ ± 3.28 x 10 ²	34.82 ± 4.44	2.58 x 10 ³ ± 3.29 x 10 ²	41.98 ± 5.98	3.11 x 10 ³ ± 4.43 x 10 ²	37.5 ± 5.45	2.78 x 10 ³ ± 4.04 x 10 ²		
Tejido sano: Intestino sano:	Sensible	S02	22.2	1.65 x 10 ³	17.4	1.29 x 10 ³	41.4	3.07 x 10 ³	35.8	2.65 x 10 ³
		S06	13.2	9.78 x 10 ²	9.6	7.11 x 10 ²	14.2	1.05 x 10 ³	12.6	9.34 x 10 ²
		S13	18.4	1.36 x 10 ³	23.6	1.75 x 10 ³	9	6.67 x 10 ²	5.8	4.30 x 10 ²
Prom ± EE	17.93 ± 2.21	1.33 x 10 ³ ± 1.64 x 10 ²	16.86 ± 2.76	1.25 x 10 ³ ± 2.05 x 10 ²	21.53 ± 6.14	1.60 x 10 ³ ± 4.55 x 10 ²	18.06 ± 5.99	1.34 x 10 ³ ± 4.44 x 10 ²		
Cél (-): Humano	N/A	CBR-H 01	0	0	0	0	0	0	0	
		Prom ± EE	0 ± 0	0	0 ± 0	0	0 ± 0	0	0	

Abreviaturas: ACCR: Adenocarcinoma colorrectal, 5-FUOL; 5-fluorouracilo, oxaliplatino y leucovorina, μm², micrómetros cuadrados, Prom; promedio, EE; Error estándar, Ctl (-); Control Negativo, N/A. No aplica. ¹ Folio asignado a cada caso por nuestro laboratorio, ² Promedio resultado de conteos manuales de cuadros positivos a CD24/CD26 o CD44/CD26, en 5 campos microscópicos al azar a 238x de amplificación, por cada observador, en forma independiente.



9.8.3. Expresión de CD26

Observamos la expresión en forma aislada de la proteína CD26 en los ACCRs y colon sano. En los cortes de ACCRs resistentes a 5FUOL registramos un promedio \pm EE de 256.44 ± 12.69 cuadros conteniendo células CD26⁺; en los de ACCRs sensibles a 5FUOL 226.53 ± 15.68 cuadros conteniendo células CD26⁺ y en el colon sano 8.98 ± 1.09 cuadros (*Figura 21- gráfico C*, pág. 64). Entre los dos observadores independientes registramos diferencias promedio de 3, 28 y 1 cuadros en el conteo de ACCRs resistentes, sensibles y colon sano, respectivamente.

En la *tabla 14* (pág. 63) se muestran los resultados del conteo de cuadros conteniendo células CD26⁺ en los cortes de ACCRs sensibles y resistentes a 5FUOL y de colon sano. En dicha tabla se observa que los cortes de ACCRs resistentes a 5FUOL presentaron un área ocupada por células CD26⁺ significativamente mayor que en los cortes de ACCRs sensibles a 5FUOL ($p=0.034$), y que en los cortes de colon sano ($p<0.001$).

Además, encontramos una asociación significativa entre el mayor número de cuadros conteniendo células CD26⁺ y una mayor supervivencia ($p=0.010$) y entre una menor área ocupada por células CD26⁺ con el número de pacientes que murieron en un período igual o menor a dos años de iniciado el tratamiento ($p<0.001$). No encontramos diferencia significativa entre el número de cuadros conteniendo células CD26⁺ y las variables de IK final, PMC, o la presencia de metástasis.

9.8.4. Expresión aislada de CD24 y CD44

No observamos CMT expresando CD24 o de CD44 por separado.



Tabla 14: Expresión de CD26 en colon sano y en ACCRs.

Tejido analizado	Sensibilidad 5FUOL	Folio asignado ¹	Observador 1		Observador 2	
			Prom. cuadros positivos ²	Área en μm^2	Prom. cuadros positivos	Área en μm^2
Tejido tumoral: ACCR	Sensible	22	79.3	5.88×10^3	76.5	5.67×10^3
		26	222.3	1.65×10^4	223.3	1.65×10^4
		35	93.8	6.95×10^3	89.2	6.61×10^3
		37	205.3	1.52×10^4	191.6	1.42×10^4
		51	130.1	9.64×10^3	124.6	9.23×10^3
		59	209.7	1.55×10^4	202.9	1.50×10^4
		65	678	5.02×10^4	718.8	5.33×10^4
		67	209.5	1.55×10^4	216.2	1.60×10^4
		76	257.1	1.91×10^4	250.8	1.86×10^4
		77	171.7	1.27×10^4	179.9	1.33×10^4
	Prom \pm EE	225.68 \pm 21.8	$1.67 \times 10^4 \pm 1.62 \times 10^3$	227.38 \pm 22.7	$1.68 \times 10^4 \pm 1.68 \times 10^3$	
	Resistente	21	289.1	2.14×10^4	293	2.17×10^4
		27	127.5	9.45×10^3	118.8	8.80×10^3
		28	208.6	1.55×10^4	202.4	1.50×10^4
		30	336.7	2.49×10^4	328.7	2.44×10^4
		57	267.1	1.98×10^4	259.8	1.93×10^4
		66	479.5	3.55×10^4	495.9	3.67×10^4
		68	335.8	2.49×10^4	321.6	2.38×10^4
		69	119	8.82×10^3	117.7	8.72×10^3
72		211.6	1.57×10^4	210.6	1.56×10^4	
78		204.9	1.52×10^4	200.5	1.49×10^4	
Prom \pm EE	257.98 \pm 18	$1.91 \times 10^4 \pm 1.33 \times 10^3$	254.90 \pm 18	$1.89 \times 10^4 \pm 1.33 \times 10^3$		
Tejido sano: Intestino sano	Sensible	S02	9.9	7.34×10^2	6.9	5.11×10^2
		S06	10.8	8.00×10^2	9.2	6.82×10^2
		S13	7.7	5.71×10^2	9.4	6.97×10^2
		Prom \pm EE	9.47 \pm 1.33	$7.02 \times 10^2 \pm 9.86 \times 10^1$	8.50 \pm 1.75	$6.30 \times 10^2 \pm 1.30 \times 10^2$
Ctl (-): Cerebro	N/A	CBR-H 01	0	0	0	0
		Prom \pm EE	0 \pm 0	0	0 \pm 0	0

Abreviaturas: ACCR; Adenocarcinoma colorrectal. 5FUOL; 5-fluorouracilo, oxaliplatino y leucovorina. μm ; micrómetros. Prom; promedio. ES; Error estándar. Ctl (-); Control Negativo. N/A; No aplica. ¹Folio asignado a cada caso por nuestro laboratorio. ²Promedio \pm EE del número de cuadros conteniendo células CD26⁺. Estos promedios se calcularon con los conteos de cinco campos seleccionados al azar, con una amplificación de 238 diámetros y dos observadores que trabajaron en forma independiente.

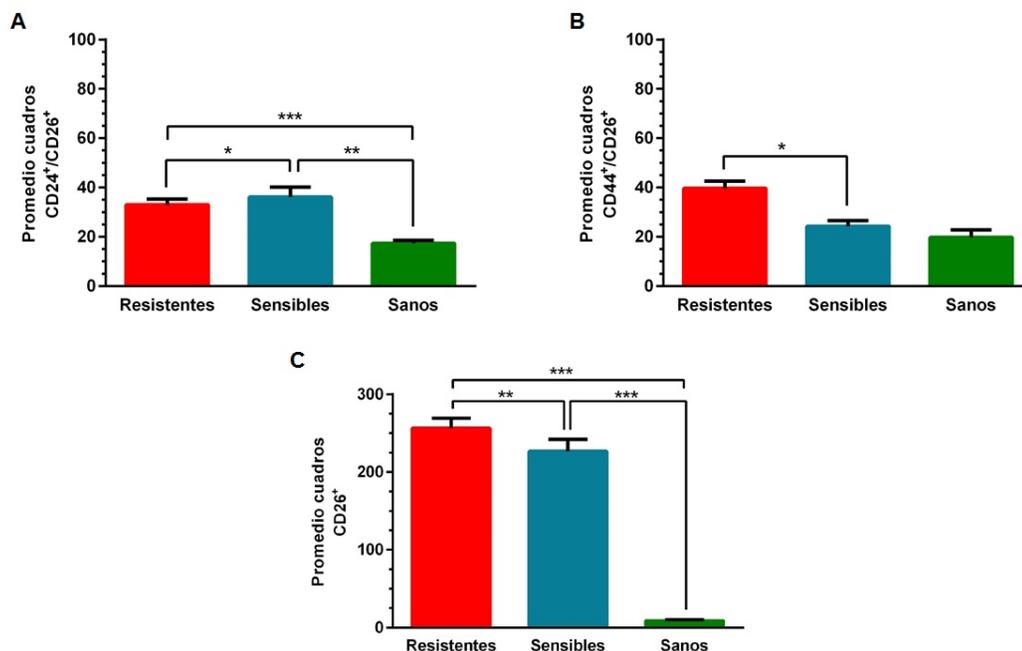


Figura 21; Coexpresión o expresión de marcadores de CMT en ACCRs sensibles o resistentes a 5FUOL y colon sano. Se determinó la cantidad de cuadros que mostraban células coexpresando CD24 y CD26 y CD44 con CD26, así como los cuadros que mostraban células expresando, por separado, CD26, CD24 o CD44 en cortes de ACCRs resistentes ($n=10$, barras rojas) o sensibles ($n=10$; barras azules) a 5FUOL; así como en cortes de colon sano ($n=3$, barras verdes). Las barras representan el promedio \pm EE (error estándar) del número de cuadros observados en cinco campos elegidos al azar, de cada corte histológico, que contenían células que expresaban los marcadores de interés. En el **gráfico A** se muestran los promedios \pm EE del número de cuadros que contenían células coexpresando CD24 y CD26, encontrando mayor coexpresión en ACCRs sensibles a 5FUOL, que en ACCRs resistentes ($p=0.006^*$) y que colon sano ($p=0.008^{**}$). La coexpresión de CD24 y CD26 por ACCRs resistentes a 5FUOL fue mayor que en colon sano ($p < 0.001^{***}$). En el **gráfico B**, se muestran los promedios \pm EE del número de cuadros que contenían células coexpresando CD44 y CD26, donde los ACCRs resistentes mostraron mayor cantidad de cuadros que coexpresaron CD44/CD26 a comparación de ACCRs sensibles a 5FUOL ($p=0.025^*$) y colon sano. En el **gráfico C**, se muestra el promedio de cuadros \pm EE que contenían células expresando solamente CD26. Los ACCRs resistentes mostraron mayor expresión de CD26 que los ACCRs sensibles ($p=0.034^{**}$) y que colon sano ($p < 0.001^{***}$). Asimismo, los ACCRs sensibles mostraron mayor expresión de CD26 que colon sano ($p < 0.001^{***}$).

9.9. Expresión de marcadores de resistencia a 5FUOL en ACCR y colon sano

Identificamos la coexpresión de los marcadores de resistencia a 5FUOL ABCB1/CK-18, ABCB1/BNIP3; así como ABCB1 y CK-18 expresados independientemente en cortes histológicos de colon sano y ACCR sensibles o resistentes a 5FUOL, por medio de IHQ de doble marcaje. Observamos una expresión diferencial entre los ACCRs sensibles y resistentes; así como en colon sano (*Figura 22*). No observamos expresión independiente de BNIP3.

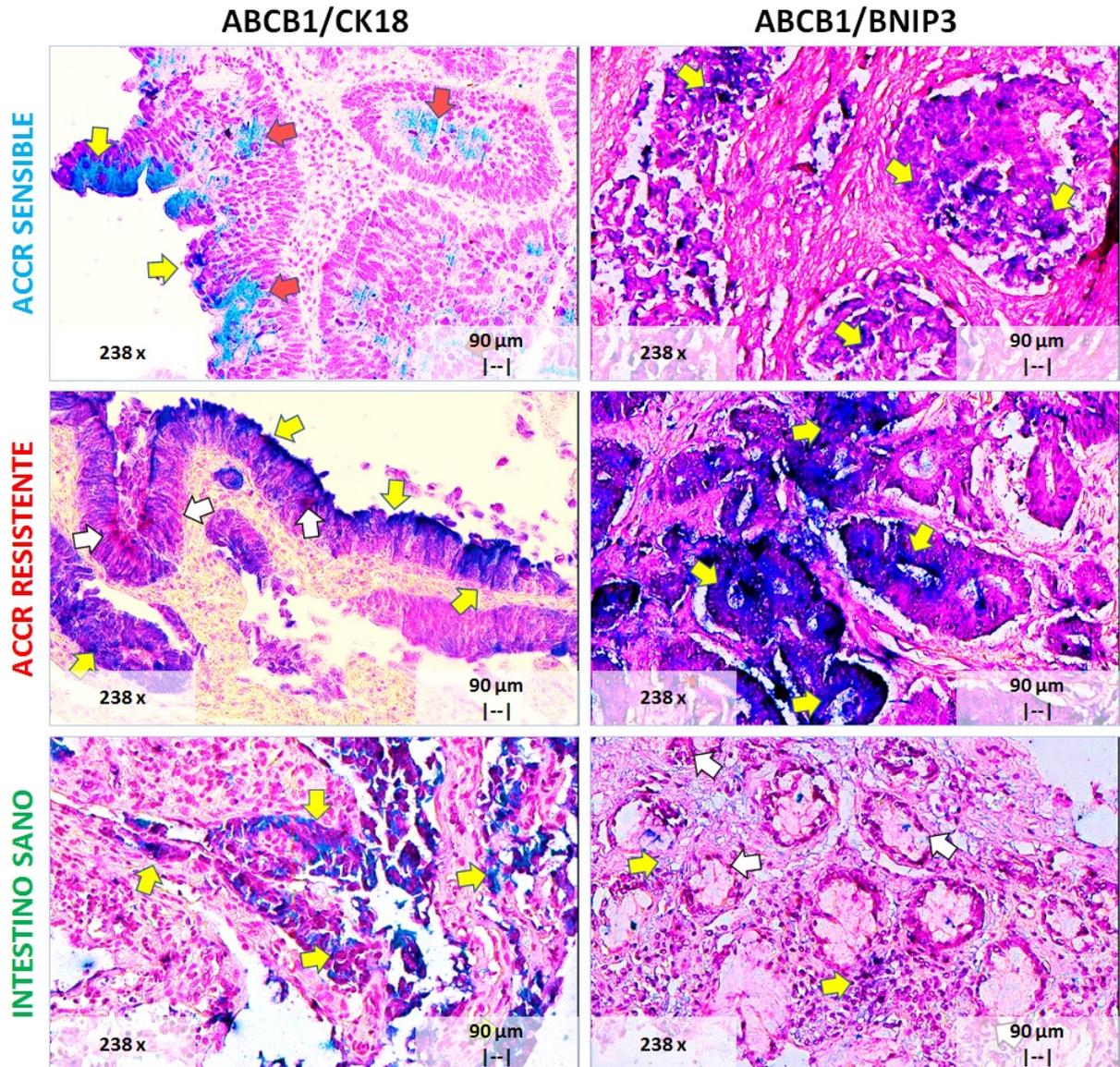


Figura 22; Expresión de marcadores de resistencia a 5FUOL en cortes de ACCR y colon sano. Obtuvimos cortes finos de ACCR sensibles y resistentes a 5FUOL y analizamos en ellos la expresión de marcadores de resistencia, mediante inmunohistoquímica de doble marcaje, utilizando anticuerpos monoclonales anti-ABCB1, anti-CK-18 y anti-BNIP3. En las imágenes se muestra colocalización de ABCB1/CK-18 (primera columna) y ABCB1/BNIP3 (segunda columna), señaladas con flechas amarillas. Se nota una expresión diferencial de ambos pares de marcadores entre los ACCRs sensibles y resistentes a 5FUOL y colon sano (primera a tercera fila de imágenes, respectivamente). También pueden observarse claras diferencias en la expresión independiente de ABCB1 (flechas blancas) y de CK-18 (flechas rojas), entre los tres grupos analizados.



9.9.1. Coexpresión de ABCB1 y CK-18

Al realizar el conteo manual de cuadros conteniendo células que expresaban ABCB1⁺/CK-18⁺, se obtuvo un promedio \pm EE entre dos observadores de 236.98 ± 21.01 cuadros en cortes de ACCRs resistentes a 5FUOL, de 135.87 ± 13.58 en ACCRs sensibles y de 81.3 ± 6.12 cuadros en colon sano (*Figura 23, gráfico A*, pág. 71). Las diferencias de conteo entre los dos observadores fueron de 5, 11 y 2 cuadros en ACCRs resistentes, ACCRs sensibles y colon sano, respectivamente.

En la *tabla 15* (pág. 69) se muestran los resultados del conteo de cuadros conteniendo células ABCB1⁺/CK-18⁺ en ACCRs y colon sano. Se observa una mayor expresión de estas proteínas en los cortes histológicos de ACCRs resistentes que en los de ACCRs sensibles y de colon sano.

Al realizar el análisis estadístico del número de cuadros conteniendo células ABCB1⁺/CK-18⁺ con la prueba de K-W, encontramos una coexpresión de estos marcadores significativamente mayor en los cortes de ACCR resistentes a 5FUOL, que en los de colon sano ($p= 0.003$) y que en los de ACCR sensibles ($p= 0.002$). No encontramos diferencias significativas entre los ACCRs sensibles y los cortes de colon sano ($p= 0.927$).

Encontramos una correlación significativa ($p= 0.001$) entre los cortes que contenían el mayor número de cuadros con células coexpresando ABCB1⁺/CK-18⁺ en los cultivos primarios de ACCRs resistentes a 5FUOL, con el menor PMC, con la presencia de metástasis a los dos años de observación, así como con un IK final (30 vs. 50 y vs 100 [$p = 0.002$ y 0.001 , respectivamente] y 70 vs. 100 [$p= <0.001$]). En todas esas comparaciones, los cortes histológicos de ACCRs con IKs finales <100 , presentaron un mayor número de cuadros conteniendo CMT ABCB1⁺/CK-18⁺ que el de los pacientes con IKs finales= 100. No encontramos diferencias significativas entre la sobrevivencia de los pacientes con ACCR a los dos años del tratamiento inicial ($p= 0.056$) y un mayor número de cuadros conteniendo CMT ABCB1⁺/CK-18⁺.

9.9.2. Coexpresión de ABCB1 y BNIP3

Determinamos un promedio \pm EE de 82.55 ± 7.72 cuadros conteniendo CMT de ACCRs resistentes a 5FUOL que coexpresaban ABCB1⁺/BNIP3⁺; 24.30 ± 3.25 cuadros con células ABCB1⁺/BNIP3⁺ en los cortes de ACCRs sensibles y 14.37 ± 1.83 cuadros con células coexpresando esos marcadores en colon sano (*Figura 23, gráfico B*, pág. 71). El promedio de diferencias de conteo de cuadros en los cortes entre los dos observadores fueron 3, 2 y 1 cuadros en los cortes de ACCRs resistentes, de ACCRs sensibles y de colon sano, respectivamente.



En la *tabla 15* (pág. 69) se muestran los resultados del conteo de cuadros con CMT ABCB1⁺/BNIP3⁺ en los cortes de interés. Observamos una mayor expresión de ABCB1⁺/BNIP3⁺ en los cortes de ACCR resistentes a 5FUOL que en los cortes de ACCR sensibles y que en los de colon sano ($p < 0.001$, en ambos análisis). No hubo diferencias significativas entre los cortes de ACCRs sensibles y colon sano ($p = 1.000$).

Encontramos una correlación significativa entre los cortes que contenían el mayor número de cuadros con células coexpresando ABCB1⁺/BNIP3⁺ en los cultivos primarios de ACCRs resistentes a 5FUOL, con la disminución en el PMC ($p < 0.001$, para ambos análisis), una sobrevida menor a dos años ($p = 0.031$), entre una mayor área ocupada por células ABCB1⁺/BNIP3⁺ con el número de pacientes que murieron en un período igual o menor a dos años de iniciado el tratamiento ($p = 0.036$). También correlaciono con el IK Final (0 vs 70 y 50 [$p < 0.001$ y 0.001], 10 vs 30, 50 y 70 [$p = 0.029$ y < 0.001 respectivamente], donde los valores de IK final menores de las comparaciones realizadas mostraron mayor cantidad de cuadros que coexpresaron ABCB1⁺/BNIP3⁺.

9.9.3. Expresión de ABCB1

El promedio \pm EE del número de cuadros conteniendo células ABCB1⁺ en cortes histológicos de ACCRs resistentes a 5FUOL fue 138.52 ± 20.60 ; en los de ACCRs sensibles, 54.54 ± 6.77 y en los de colon sano 29.47 ± 2.90 (*Figura 23, gráfico C*, pág. 71). Los promedios de las diferencias de conteo entre dos observadores fueron 2, 1 y 4 cuadros en los cortes de ACCRs resistentes, ACCRs sensibles y de colon sano, respectivamente.

En la *tabla 16* (pág. 70) se muestran los resultados del conteo de cuadros conteniendo células ABCB1⁺ en cortes de ACCRs y de colon sano. Puede observarse que hubo una mayor expresión (cantidad de cuadros) de ABCB1 en los ACCRs resistentes a 5FUOL que en los cortes de ACCRs sensibles y de colon sano ($p < 0.001$, para ambos análisis). No encontramos diferencia significativa entre la expresión de ABCB1 en ACCRs sensibles contra tejidos sanos ($p = 0.095$).

La mayor cantidad de cuadros con células ABCB1⁺ mostró una correlación o una asociación positiva con ACCRs resistentes a 5FUOL, con un menor PMC *in vitro*, con una sobrevida < 2 años, la presencia de metástasis y con IK finales= 0 vs 50 y 30 (Los valores de p en todas las comparaciones fueron ≤ 0.001).



9.9.4. Expresión de CK-18

Los promedios \pm EE de cuadros con células CK-18⁺ fueron los siguientes: en los cortes histológicos de ACCRs resistentes a 5FUOL 41.5 ± 5.44 , 29.64 ± 3.25 en los de ACCRs sensibles y en los de colon sano 16.40 ± 1.72 (*figura 23, gráfico D, pág. 71*). Los promedios de diferencias de conteo entre los dos observadores fueron 4, 1 y 2 cuadros en los cortes de ACCRs resistentes, ACCRs sensibles y colon sano, respectivamente.

En la *tabla 16* (pág. 70) se muestra que el promedio de cuadros en los cortes histológicos con células CK-18⁺ de ACCRs resistentes fue mayor que en los cortes de ACCRs sensibles y en los de colon sano. Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p=0.592$), en ambos casos. Tampoco encontramos diferencias significativas en el contenido de células CK-18⁺ en los cortes de ACCRs y la sensibilidad a 5FUOL ($p=0.529$), metástasis ($p=0.657$), IK= 0 a los 2 años de seguimiento ($p=0.125$), con el PMC, ni con la sobrevida de los pacientes ($p=0.527$ y 0.218 , respectivamente). Sin embargo, sí hubo diferencias significativas entre los cortes de tejido con células CK-18⁺ en cortes de ACCRs con IKs finales menores contra IKs mayores [0 vs 30 ($p=0.008$) y 50 vs. 70 ($p=0.033$)].

9.9.5. Expresión de BNIP3

No observamos células que expresaran únicamente BNIP3.



Tabla 15: Coexpresión de marcadores de resistencia a 5FUOL, ABCB1/CK-18 y ABCB1/BNIP3 en ACCRs y colon sano.

Tejido analizado	Sensibilidad 5FUOL	Expresión ABCB1/CK-18				Expresión de ABCB1/BNIP3			
		Observador 1	Observador 2	Observador 1	Observador 2				
	Folio asignado ¹	Prom. cuadros positivos ²	Area en μm^2	Prom. cuadros positivos	Area en μm^2	Prom. cuadros positivos ²	Area en μm^2	Prom. cuadros positivos	Area en μm^2
Tejido tumoral: ACCR	22	119.2	8.83×10^3	129.8	9.62×10^3	18.6	1.38×10^3	19.4	1.44×10^3
	26	274.6	2.03×10^4	285.8	2.12×10^4	73.4	5.44×10^3	74.4	5.51×10^3
	35	47	3.48×10^3	65.6	4.86×10^3	66	4.89×10^3	65.2	4.83×10^3
	37	77.8	5.76×10^3	81.2	6.02×10^3	43	3.19×10^3	52.2	3.87×10^3
	51	143.4	1.06×10^4	158	1.17×10^4	0	0	0	0
	59	42.8	3.17×10^3	52.6	3.90×10^3	31.2	2.31×10^3	38.6	2.86×10^3
	65	50.2	3.72×10^3	44.2	3.28×10^3	0	0	0	0
	67	455.8	3.38×10^4	472.2	3.50×10^4	0	0	0	0
	76	37.2	2.76×10^3	30.8	2.28×10^3	0	0	0	1.63×10^2
	77	84.4	6.25×10^3	64.8	4.80×10^3	0	0	0	1.33×10^2
	Prom ± EE	133.24 ± 19.94	$9.80 \times 10^3 \pm 1.48 \times 10^3$	138.5 ± 20.50	$1.03 \times 10^4 \pm 1.52 \times 10^3$	23.22 ± 4.36	$1.72 \times 10^3 \pm 3.23 \times 10^2$	25.38 ± 4.38	$1.88 \times 10^3 \pm 3.25 \times 10^2$
	21	95.6	7.08×10^3	132.8	9.84×10^3	81	6.00×10^3	72.6	5.38×10^3
	27	486.2	3.60×10^4	495.2	3.67×10^4	63	4.67×10^3	57.2	4.24×10^3
	28	10.2	7.56×10^2	10.2	7.56×10^2	21.6	1.60×10^3	19.6	1.45×10^3
	30	17.8	1.32×10^3	24	1.78×10^3	37.8	2.80×10^3	30	2.22×10^3
	57	396.6	2.94×10^4	431.6	3.20×10^4	17	1.26×10^3	8.8	6.52×10^2
	66	99.8	7.40×10^3	95.8	7.10×10^3	89.8	6.65×10^3	118.6	8.79×10^3
68	207.2	1.54×10^4	193.6	1.43×10^4	218	1.62×10^4	214.2	1.59×10^4	
69	228.2	1.69×10^4	249	1.85×10^4	12.2	9.04×10^2	17.2	1.27×10^3	
72	566.6	4.20×10^4	586.2	4.34×10^4	192.6	1.43×10^4	181.8	1.35×10^4	
78	204.6	1.52×10^4	208.4	1.54×10^4	107.2	7.94×10^3	90.8	6.73×10^3	
Prom ± EE	231.28 ± 29.69	$1.71 \times 10^4 \pm 2.20 \times 10^3$	242.68 ± 30.26	$1.80 \times 10^4 \pm 2.24 \times 10^3$	84.02 ± 11.08	$6.23 \times 10^3 \pm 8.21 \times 10^2$	81.08 ± 10.86	$6.01 \times 10^3 \pm 8.05 \times 10^2$	
Tejido sano: Intestino sano:	S02	39.2	2.90×10^3	41.8	3.10×10^3	0	0	0	0
	S06	127.8	9.47×10^3	124	9.19×10^3	25.4	1.88×10^3	29	2.15×10^3
	S13	79.2	5.87×10^3	75.8	5.62×10^3	19.8	1.47×10^3	12	8.89×10^2
Prom ± EE	82.0 ± 12.65	$6.08 \times 10^3 \pm 9.37 \times 10^2$	80.53 ± 12.26	$5.97 \times 10^3 \pm 9.08 \times 10^2$	15.06 ± 3.61	$1.12 \times 10^3 \pm 2.68 \times 10^2$	13.66 ± 3.82	$1.01 \times 10^3 \pm 2.83 \times 10^2$	
Cerebro Humano (-):	CBR-H101	0	0	0	0	0	0	0	0
	Prom ± EE	0 ± 0	0						

Abreviaturas: ACCR; Adenocarcinoma colorrectal, 5-FUOL; 5-fluorouracilo, oxaliplatino y leucovorina, μm^2 , micrometros cuadrados, Prom; promedio, EE; Error estandar, Ctl (-); Control Negativo, N/A; No aplica. ¹, Folio asignado a cada caso por nuestro laboratorio. ², Promedio resultado de conteos manuales de cuadros positivos a ABCB1/CK-18 ó ABCB1/BNIP3, en 5 campos microscopicos al azar a 238x de amplificación, por cada observador, en forma independiente.



Tabla 16: Expresión de ABCB1 y CK-18 en ACCRs y colon sano.

Tejido analizado	Sensibilidad 5FUOL	Folio asignado ¹	Expresión aislada de ABCB1			Expresión aislada de CK-18				
			Observador 1	Observador 2	Observador 1	Observador 2				
Tejido tumoral: ACCR	Sensible	22	Prom. cuadros positivos ²	Area en µm ²	Prom. cuadros positivos	Area en µm ²	Prom. cuadros positivos	Area en µm ²		
		26	48.8	3.62 x 10 ³	50.4	3.73 x 10 ³	55.6	4.12 x 10 ³	45.6	
		35	16.6	1.23 x 10 ³	12.2	9.04 x 10 ²	0	0	0	
		37	66.6	4.94 x 10 ³	79.6	5.90 x 10 ³	0	0	0	
		51	30	2.22 x 10 ³	36.6	2.71 x 10 ³	51	3.78 x 10 ³	60.4	
		59	56	4.15 x 10 ³	61.2	4.53 x 10 ³	16	1.19 x 10 ³	23.6	
		65	34.4	2.55 x 10 ³	28.4	2.10 x 10 ³	45.4	3.36 x 10 ³	52.4	
		67	25.6	1.90 x 10 ³	27.6	2.05 x 10 ³	54.8	4.06 x 10 ³	57.4	
		76	188.8	1.40 x 10 ⁴	177	1.31 x 10 ⁴	13.8	1.02 x 10 ³	10.4	
		77	53.2	3.94 x 10 ³	56	4.15 x 10 ³	2.6	1.93 x 10 ²	4	
		78	18.4	1.36 x 10 ³	23.4	1.73 x 10 ³	54.4	4.03 x 10 ³	45.4	
		Prom ± EE	53.84 ± 9.92	3.99 x 10 ³ ± 7.35 x 10 ²	55.24 ± 9.33	4.09 x 10 ³ ± 6.91 x 10 ²	29.36 ± 4.61	2.18 x 10 ³ ± 3.42 x 10 ²	29.92 ± 4.62	2.22 x 10 ³ ± 3.42 x 10 ²
		21	89.6	6.64 x 10 ³	105	7.78 x 10 ³	145.8	1.08 x 10 ⁴	159.8	1.18 x 10 ⁴
		27	70.6	5.23 x 10 ³	69.2	5.13 x 10 ³	0	0	0	0
		28	116.4	8.63 x 10 ³	110.4	8.18 x 10 ³	29.4	2.18 x 10 ³	29.4	2.18 x 10 ³
30	86.8	6.43 x 10 ³	86.2	6.39 x 10 ³	44.2	3.28 x 10 ³	50.2	3.72 x 10 ³		
57	36.4	2.70 x 10 ³	34.2	2.53 x 10 ³	0.6	4.45 x 10 ¹	0	0		
66	66.2	4.91 x 10 ³	62	4.59 x 10 ³	75.2	5.57 x 10 ³	81.2	6.02 x 10 ³		
68	100.6	7.45 x 10 ³	91.2	6.76 x 10 ³	67	4.96 x 10 ³	64.4	4.77 x 10 ³		
69	661.4	4.90 x 10 ⁴	681	5.05 x 10 ⁴	23.2	1.72 x 10 ³	39.2	2.90 x 10 ³		
72	118.2	8.76 x 10 ³	97.4	7.22 x 10 ³	0	0	0	0		
78	49	3.63 x 10 ³	38.6	2.86 x 10 ³	8.2	6.08 x 10 ²	12.2	9.04 x 10 ²		
Prom ± EE	139.52 ± 28.84	1.03 x 10 ⁴ ± 2.14 x 10 ³	137.52 ± 29.69	1.02 x 10 ⁴ ± 2.20 x 10 ³	39.36 ± 7.63	2.92 x 10 ³ ± 5.65 x 10 ²	43.64 ± 7.82	3.23 x 10 ³ ± 5.79 x 10 ²		
Tejido sano: Intestino sano	Sensible	S02	21	1.56 x 10 ³	22.4	1.66 x 10 ³	18.2	1.35 x 10 ³	15.6	
		S06	16.4	1.22 x 10 ³	10.2	7.56 x 10 ²	24	1.78 x 10 ³	21	
		S13	56.8	4.21 x 10 ³	50	3.71 x 10 ³	10.4	7.71 x 10 ²	9.2	
Prom ± EE	31.4 ± 6.01	2.33 x 10 ³ ± 4.45 x 10 ²	27.53 ± 5.75	2.04 x 10 ³ ± 4.26 x 10 ²	17.53 ± 3.48	1.30 x 10 ³ ± 2.58 x 10 ²	15.26 ± 3.51	1.13 x 10 ³ ± 2.60 x 10 ²		
Ct (-): Humano	N/A	CBR-H 01	0	0	0	0	0	0	0	
		Prom ± EE	0 ± 0	0	0 ± 0	0	0 ± 0	0	0	

Abreviaturas: ACCR; Adenocarcinoma colorrectal, 5-FUOL; 5-fluorouracilo, oxaliplatino y leucovorina, µm², micrometros cuadrados, Prom; promedio, EE; Error estandar, Ct (-); Control Negativo, N/A; No aplica. ¹. Folio asignado a cada caso por nuestro laboratorio. ². Promedio resultado de conteos manuales de cuadros positivos a ABCB1 o CK-18, en 5 campos microscopicos al azar a 238x de amplificación, por cada observador, en forma independiente.

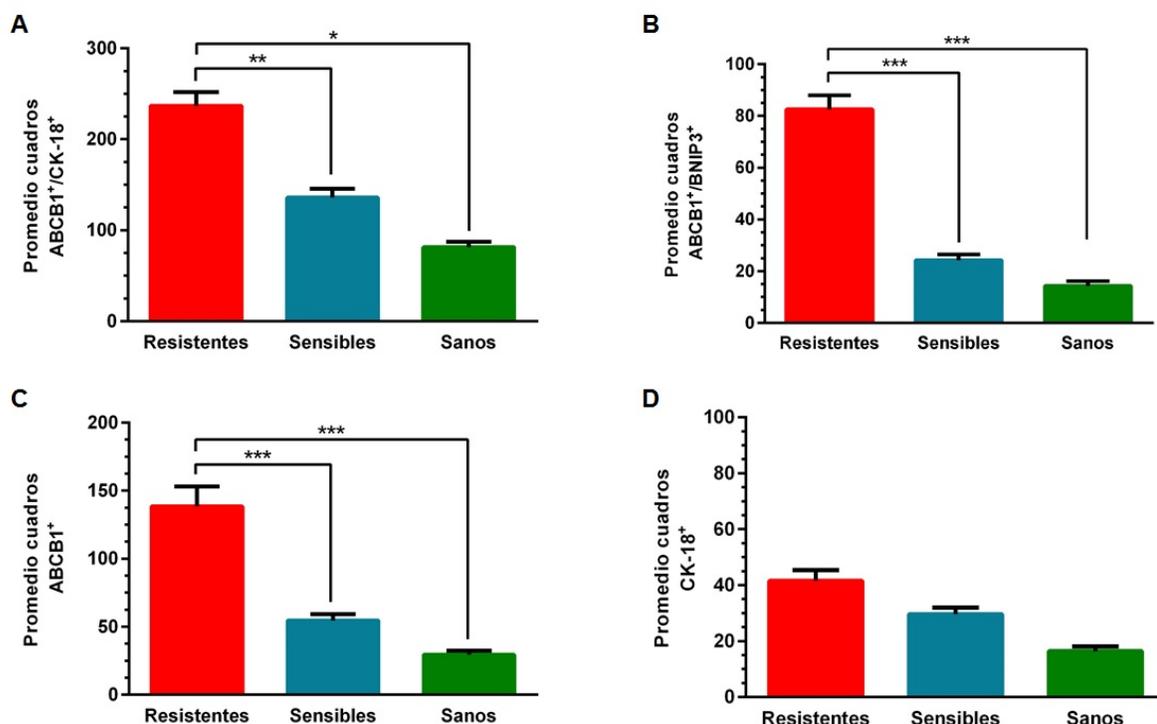


Figura 23; Coexpresión o expresión de marcadores de resistencia en ACCRs sensibles o resistentes a 5FUOL y colon sano. Se determinó la cantidad de cuadros que mostraban células coexpresando ABCB1 y CK-18 y ABCB1 con BNIP3, así como los cuadros que mostraban células expresando, por separado, ABCB1, CK-18 o BNIP3 en cortes de ACCRs resistentes ($n=10$, barras rojas) o sensibles ($n=10$; barras azules) a 5FUOL; así como en cortes de colon sano ($n=3$, barras verdes). Las barras representan el promedio \pm EE (error estándar) del número de cuadros observados en cinco campos elegidos al azar, de cada corte histológico, que contenían células que expresaban los marcadores de interés. En el **gráfico A** se muestran los promedios \pm EE del número de cuadros que contenían células coexpresando ABCB1 y CK-18, encontrando mayor coexpresión de estas proteínas, en ACCRs resistentes a 5FUOL, que en ACCRs sensibles ($p=0.002^{**}$) y que colon sano ($p=0.003^{*}$). En el **gráfico B**, se muestran los promedios \pm EE del número de cuadros que contenían células coexpresando ABCB1 y BNIP3, donde los ACCRs resistentes mostraron mayor cantidad de cuadros que coexpresaron estas proteínas a comparación de ACCRs sensibles a 5FUOL y colon sano ($p<0.001^{***}$). En el **gráfico C**, se muestra el promedio de cuadros \pm EE que contenían células expresando solamente ABCB1. Los ACCRs resistentes mostraron mayor expresión de ABCB1 que los ACCRs sensibles y que colon sano ($p<0.001^{***}$). En el **gráfico D**, se muestra el promedio de cuadros \pm EE que contenían células expresando solamente CK-18. Los ACCRs resistentes mostraron mayor expresión de CK-18 que los ACCRs sensibles y que colon sano, sin embargo, no fue estadísticamente significativo.



CAPÍTULO 10. DISCUSIÓN

El desarrollo de la FR contra agentes quimioterapéuticos convencionales y la evidencia creciente de que las CMT son las principales responsables de este fenómeno biológico, además, de la iniciación y recurrencia tumoral, ha puesto de manifiesto el interés creciente en la genética y biología de las CMT^[79]. Las CMT expresan marcadores típicos para su identificación como las proteínas asociadas a la membrana celular CD24, CD44 y CD133, siendo estos marcadores los que se han estudiado principalmente y que se han utilizado para aislar estas células, mediante técnicas de citometría de flujo, IF e IHQ. El problema es que estos marcadores típicos no son específicos de CMT, ya que también las expresan las células madre normales y células de otros tejidos, dificultando con ello la identificación correcta de las CMT y de las CMN; y por ende, el desarrollo de terapias dirigidas específicamente hacia CMT. Entonces, se requiere de la identificación específica de marcadores de CMT, que puedan ayudar al desarrollo de nuevos tratamientos dirigidos; así como el uso de estos biomarcadores para predecir la respuesta a tratamientos o esquemas antineoplásicos como el denominado FOLFOX-6, usado comúnmente en el tratamiento de etapas avanzadas de las neoplasias gastrointestinales^[10,138].

La identificación correcta de biomarcadores y terapias dirigidas contra las CMT, posiblemente mejorará el pronóstico, sobrevida y respuesta al tratamiento de los pacientes oncológicos^[75]. Al respecto, recientemente nuestro grupo de trabajo, en la tesis doctoral de *Garza Treviño, E*, se identificó la sobreexpresión de tres genes de resistencia a la mezcla 5FUOL en aislados de CMT de ACCR, estos fueron ABCB1, KRT18 y BNIP3^[15]. La sobreexpresión de ABCB1 y por ende de sus productos proteicos, es uno de los múltiples mecanismos de FR que tienen las CMT, lo que ofrece protección a estas células contra entornos que les resultarían lesivos a células normales, como, por ejemplo, la exposición a fármacos antineoplásicos^[83]. En cambio, la sobreexpresión de KRT18 y BNIP3 no se ha reportado hasta el momento como un marcador prometedor de resistencia a 5FUOL en CMT de ACCR, lo que llevó al propósito de este estudio, que fue investigar la correlación de las CMT en base a la expresión de los marcadores típicos que estas presentan (CD24, CD44 y CD26), la expresión de los marcadores de resistencia a 5FUOL, a través de sus productos proteicos (ABCB1, CK-18 y BNIP3) y su correlación con las características clínicas, el seguimiento a 2 años de los casos incluidos de ACCR sensibles y resistentes a 5FUOL y los datos experimentales de quimiosensibilidad *in vitro* a 5FUOL, este último determinado por el ATP-CRA, considerando un punto de corte $\geq 20\%$ de PMC como casos sensibles y $<20\%$ a aquellos casos resistentes a 5FUOL. Por otro lado, se aislaron y caracterizaron CMT de



ACCR en gran proporción y a partir de las estas células, se comprobó su capacidad de pluripotencia a través de la diferenciación hacia el linaje celular epitelial.

En este trabajo, logramos reproducir el método previamente desarrollado por *Garza-Treviño E.N.*, para aislar CMT de tejidos frescos de ACCR, en condiciones de baja adherencia y utilizando un medio de cultivo libre de suero, adicionado con factores de crecimiento. Estos últimos utilizados para acelerar el crecimiento de poblaciones de esferoides. Nuestras CMT, tuvieron la característica de formar *clusters* característicos, con morfología esférica. Estos últimos han sido reportados previamente por *De Angelis, et al.*, quienes a partir de muestras de ACCR, aislaron CMT en una alta proporción, con un medio de cultivo de selección, libre de suero, tal como nosotros lo realizamos en el presente trabajo. Estos autores utilizaron un medio de cultivo de selección, libre de suero, tal como nosotros lo realizamos en el presente trabajo. Las células de *De Angelis, et al.* formaron esferoides, también llamados colonosferas. Estas células expresaron marcadores típicos CD133, CD44 y Lgr5⁺. *De Angelis, et al.* también verificaron las capacidad tumorigénica de las CMT aisladas, utilizando modelos murinos inmunocomprometidos^[139]. *Kondo, et.al.*, aislaron CMT de biopsias de ACCR en el 90% de sus cultivos y lograron que estas células formaran esferoides en el 55% de sus cultivos^[140]. Por otro lado, *Árnadóttir, et.al.* y *Jeppesen, et.al.* reportan la generación de colonosferas, utilizando un medio libre de suero, en un tiempo de incubación de 8 y 10 días, respectivamente, con una tasa de éxito de 83% cada uno^[141,142]. También, en el trabajo de *Kaseb, et. al.*, en muestras de tejido de carcinoma de cabeza y cuello, lograron el aislamiento de CMT de dicha neoplasia, con un medio de cultivo similar al usado en este trabajo, logrando aislar con alta eficiencia CMT, a los 7-14 días después de aplicar el medio de cultivo enriquecido de CMT, observando la morfología de los *clusters* de CMT descrita en este trabajo^[143]. Nosotros, logramos la generación de esferoides en el día 15 de cultivo en el medio de selección de CMT. El rendimiento de las CMT en nuestros cultivos fue adecuado, ya que logramos aislar en gran cantidad CMT de ACCR, en la mayor parte de los cultivos de ACCR que empleamos.

Al igual que otros grupos de trabajo, validamos nuestras CMT mediante la expresión de los marcadores típicos de CMT (CD24 y CD44) por medio de IF de doble marcaje, ya que es una técnica de microscopía sensible, específica, más económica que la citometría de flujo y que es capaz de detectar la expresión múltiple de proteínas intracelulares, así como de proteínas asociadas a la superficie de las células, como en el caso de CD24 y CD44. Recientemente, *Olejniczak y cols.*, aislaron colonosferas a partir de líneas celulares de ACCR, a los cuales se les determinó la expresión de CD133, CD44, EpCAM, entre otros marcadores típicos de CMT, ellos encontraron que los esferoides mostraron una proporción



pequeña de células CD44⁺[144], lo que contrasta con los resultados de nuestro trabajo, esta discrepancia pudo haber sido causada por el uso de líneas celulares comúnmente usada en experimentos y no haber sido caracterizadas directamente en el tejido tumoral fresco. También, *Al-Hajj, et.al.* y *Sun Choi, et.al.* demostraron la expresión de los marcadores CD44⁺/CD24⁻ en mamíferos derivadas de tejidos y líneas celulares de carcinoma de mama, respectivamente[145,146]. Por el contrario, nuestras CMT, expresaron en su totalidad ambos marcadores típicos CD24⁺/CD44⁺, confirmando con ello la generación de cultivos puros de CMT en nuestro laboratorio, estos hallazgos se apoyan con el trabajo de *Vermuelen, et.al.*[147]. Este hallazgo nos podrá permitir en un futuro, el estudio de los mecanismos de FR a esquemas convencionales de quimioterapia distintos a 5FUOL, la valoración su capacidad tumorigénica, potencial metastásico y el desarrollo de estrategias para el bloqueo de proteínas funcionales importantes que tienen las CMT, así como ensayos de sensibilidad a fármacos que guíen al clínico en las decisiones acerca del tratamiento de los pacientes con ACCR, de esta manera contribuyendo a la medicina personalizada.

Observamos que, en la mayor parte de nuestros aislados, las CMT coexpresaron los marcadores de resistencia a 5FUOL, ABCB1/CK-18 y ABCB1/BNIP3. Estos datos confirman los resultados de *Garza-Treviño E.N.*, quien encontró que las CMT, aisladas o formando parte de los ACCRs sobrepresan ABCB1, CK-18 y BNIP3[15]. *Jeppensen, et.al.* demostraron la presencia de esferoides de ACCR ABCB1⁺ y ABCG2⁺, en una baja proporción, contrastando con los resultados de nuestro trabajo[142]. Este fenómeno puede ser explicado debido a que la mayor parte de las nuestras muestras recolectadas, se encontraban en estadios tumorales avanzados, en cambio *Butler, et.al.* demostraron una expresión significativa de ABCB1 en CMT derivadas de la línea celular SW-480 de ACCR, lo cual apoya nuestros resultados[148]. ABCB1 y la familia de transportadores ABC contribuyen a la FR hacia los agentes convencionales de quimioterapia y son considerados como marcadores de CMT en distintos tipos de neoplasias[11,74].

Por otro lado, *Rybak, et. al.* reportaron la expresión de CK-18 y de los marcadores típicos CD44/CD24 en esferoides de CMT cultivados en medio libre de suero, derivados de la línea celular DU145 de carcinoma de próstata, a los 10-12 días de cultivo, estos además mostraron las características biológicas propias de las CMT como la autorrenovación y el potencial tumorigénico[149]. Además, *Steffensen, et.al.*, demostraron la expresión de CK-18 en CMT de carcinoma de ovario CD44⁺, por medio de citometría de flujo y Western Blot[150]. En cuanto al ACCR, *Grillet, et.al.* reportaron la expresión diferencial de CK-18 en células tumorales circulantes de pacientes con ACCR por medio de secuenciación masiva, siendo



el único reporte hasta el momento de CK-18 y su relación con CMT, por lo que estos nuestros hallazgos concuerdan con lo reportado en la literatura^[151].

En cuanto a la expresión de BNIP3 en las CMT, nosotros encontramos una menor proporción de células que coexpresaron con ABCB1, a comparación de CK-18. En la actualidad no existe ningún reporte hasta nuestro conocimiento, que indique a BNIP3 como un marcador de resistencia a esquemas de quimioterapia, ni como un marcador directo de CMT de ACCR, igualmente no encontramos ningún trabajo que demostrará la coexpresión de las proteínas ABCB1/CK-18 ni de ABCB1/BNIP3. Lo que significa un hallazgo relevante en el presente estudio, ya que estas moléculas podrían ser empleadas para el diseño de estrategias terapéuticas que afecten directamente a los mecanismos de FR y de supervivencia que tienen las CMT de los pacientes con ACCR. Sin embargo, es necesario ampliar el número de muestra de cultivos puros de CMT para confirmar nuestros hallazgos y además valorar la capacidad tumorigénica e invasiva mediante ensayos con modelos murinos inmunodeficientes y la exposición a fármacos distintos a 5FUOL.

En otro orden de ideas, diferenciamos *in vitro* CMT de ACCR a células epiteliales mediante el uso de medio de cultivo suplementado con concentraciones crecientes de suero, este último, utilizado con el objetivo de que las células tuvieran adherencia a la superficie de cultivo, la cual lograron a los 15- 20 días, después de su incubación con dicho medio de cultivo. De estas células adheridas, logramos observar mediante IF, la expresión de los marcadores específicos de células epiteliales CK-17, CK-20, Cocktail-CK AE1/AE3 (que detecta CK 10, 14 a 16, por medio de la fracción AE1 y CK 1 a 8, por medio de la fracción de AE3) y EGFR, con ello logramos valorar la capacidad de diferenciación de nuestras CMT. Nuestros resultados son apoyados por el trabajo de *Vermeulen, et.al.* quienes comprobaron la capacidad de diferenciación multilínea de esferoides de ACCR, con un medio de cultivo similar al utilizado en este trabajo. Los esferoides previamente fueron caracterizados y expresaban los marcadores típicos de CMT (CD133⁺, CD44⁺ y CD24⁺), los cuales se regularon a la baja cuando las células se encontraban diferenciadas, en este estado, ellos observaron una mayor expresión de CK-20^[147].

En cuanto a los datos sociodemográficos de la cohorte de casos de ACCR utilizada en el presente estudio, el sexo masculino y la edad mayor a 60 años fue la predominante, coincidiendo con datos reportados en la literatura^[24,29,152]. En cuanto a las características del ACCR de nuestras muestras, la mayor parte de ellas se clasificaron como moderadamente diferenciadas, siendo la localización tumoral más común el colon, igualmente esta variedad, tipo de diferenciación histológica y localización tumoral son las más comunes entre todos los



casos de CCR^[18,43]. Por otro lado, la mayor parte de nuestras muestras, fueron colectadas en estadios avanzados de la enfermedad y el 60% de los pacientes de donde se obtuvo dicha muestra, recibió quimioterapia adyuvante en el seguimiento realizado a 2 años. El diagnóstico de CCR en países en subdesarrollados como México se realiza normalmente en estadios avanzados siendo el tratamiento de estos casos la cirugía y su combinación con esquemas de quimioterapia basados en FOLFOX-6, después del acto quirúrgico^[153], a comparación de los países desarrollados donde los cribados de prevención, hacen posible el diagnóstico y tratamiento oportuno en fases tempranas de esta neoplasia, donde la solamente la cirugía con resección de ganglios linfáticos, es el tratamiento principal, según consensos internacionales^[154].

También en nuestro estudio observamos que el promedio de sobrevida de los casos incluidos fue de 23.7 y 20.5 meses en los casos sensibles y resistentes a 5FUOL, respectivamente, con un punto de corte de 24 meses de seguimiento clínico. Aunque encontramos 3 meses de diferencia entre la sobrevida de ambos grupos, necesitamos ampliar el tiempo de seguimiento clínico de los casos de ACCR de nuestra cohorte, hasta los 5 años para obtener conclusiones definitivas. Por otra parte, observamos que el 65% de los casos, no tuvo metástasis a los 2 años de seguimiento, siendo la mayor parte de ellos, sensibles a 5FUOL, mientras que el 35% restante, presentó metástasis, siendo la población clasificada como resistente a 5FUOL, la más frecuentemente afectada, con diseminación tumoral a pulmón, hígado y hueso, principalmente, lo que concuerda con los sitios de metástasis más comúnmente afectados por el ACCR^[17]. En cuanto al IK final de los pacientes, encontramos que la mitad de nuestra población estudiada, se ubicaba con valores de superiores a 70 y la otra mitad, con un IK menor a 50, de estos últimos, 7 casos (35%) murieron en el periodo de seguimiento de 2 años, siendo resistentes a 5FUOL, la mayor parte de ellos (4 casos). Aunque Soveri, *et.al.* menciona que la sobrevida de los pacientes con ACCR en estadios avanzados es de 20 meses, aproximadamente^[5], en nuestra cohorte la mayor parte de los casos sobrepasó este periodo de tiempo, con excepción de 2 casos, los cuales fueron resistentes a 5FUOL y con manifestaciones de metástasis.

También en este trabajo valoramos la expresión de los marcadores típicos de CMT CD24/CD26 y CD44/CD26, así como los marcadores de resistencia a 5FUOL ABCB1/CK-18 y ABCB1/BNIP3, directamente en tejidos de pacientes con ACCR, por medio de IHQ de doble marcaje. Esta técnica nos permitió valorar la expresión en forma combinada (colocalización) o individual de 2 proteínas en un mismo corte histológico, mediante la generación de reacciones, que en última instancia generan colores detectables en microscopios ópticos por cada proteína de interés, esto resulta conveniente para los laboratorios de histopatología, ya



que evita los problemas comunes del uso de la IF, como la disminución de la señal fluorescente con respecto al tiempo^[155]. Para realizar la parte experimental, primeramente, obtuvimos los datos clínicos de los casos de ACCR (mencionados en los párrafos anteriores) y obtuvimos los tejidos de nuestro biobanco de tejidos de ACCR, estos últimos los clasificamos en base a su sensibilidad *in vitro* a la mezcla 5FUOL, como sensibles o resistentes, considerando el PMC, con un valor de corte de 20% (ver sección de material y métodos). Después se procedió a la obtención de cortes histológicos y la realización de IHQ de doble marcaje. La expresión de las proteínas CD44/CD26, CD24/CD26, ABCB1/CK-18, ABCB1/BNIP3, así como la expresión aislada de cada una de ellas, fue valorada, realizando conteo de cuadros equivalentes a micrómetros cuadrados en softwares de medición, con ello pudimos obtener resultados cuantitativos de la expresión de las proteínas analizadas, que después correlacionamos y asociamos con las siguientes variables clínicas: quimiosensibilidad a 5FUOL, PMC, I.K. Final, sobrevida, presencia de metástasis y muertes a los 2 años de seguimiento clínico de los casos incluidos, mediante análisis estadístico. Cabe aclarar que la mayor parte de los estudios de IHQ tanto en el área diagnóstica como experimental, se realizan de manera cualitativa, siendo este trabajo uno de los primeros en donde identificamos la expresión proteica basada en el conteo de cuadros positivos a tinción por cada proteína.

Logramos observar la expresión diferencial, estadísticamente significativa de la coexpresión de los marcadores típicos de CMT CD24/CD26 entre tejidos resistentes y sensibles a 5FUOL y tejido intestinal sano, en donde los tejidos sensibles mostraron mayor coexpresión de CD24/CD26 cuando se compararon con los otros grupos, así mismo los tejidos sensibles presentaron mayor cantidad de cuadros CD24⁺/CD26⁺, cuando los comparamos contra los sanos. Sin embargo, observamos una notable variación entre pacientes referente a la expresión de CD24⁺/CD26⁺. Por otro lado, la coexpresión de CD24⁺/CD26⁺ se asoció con una menor sensibilidad a 5FUOL, este hallazgo, coincide con lo reportado en la literatura. Por otra parte, no se obtuvo correlación con las otras variables clínicas analizadas, esto podría ser explicado debido a que CD24 y CD26 no son biomarcadores exclusivos de CMT, ya que también identifican a las CMN. Por otro lado, igualmente observamos la expresión diferencial de CD44⁺/CD26⁺, siendo estadísticamente significativa la comparación entre tejidos tumorales resistentes y sensibles, los primeros tuvieron una mayor expresión de CD44⁺/CD26⁺. Sin embargo, no se encontró diferencias significativas entre los cortes de ACCRs y de colon sano. Por otra parte, sí encontramos una asociación entre una mayor coexpresión de CD44⁺/CD26⁺ con variables clínicas desfavorables como una menor quimiosensibilidad a 5FUOL, un menor IK final, presencia de



metástasis y número de decesos a los 2 años del seguimiento clínico o antes. Lo que concuerda con lo reportado por otros autores. No observamos expresión de CD24 ni de CD44, en forma independiente. Estas proteínas se coexpresaron con CD26. Lo cual es interesante, porque posiblemente la expresión de CD24, CD44 y CD26 está coordinada por vías de señalización comunes. Sin embargo, CD26 sí se expresa independientemente de CD24, y de CD44. La expresión de CD26 fue significativamente mayor en ACCRs resistentes a 5FUOL, que en ACCRs sensibles, y en colon sano y esta mayor expresión de CD26 mostró una correlación significativa con una menor sensibilidad a 5FUOL, mayores puntuaciones en el IK final, mayor sobrevida y casos vivos a los 2 años del seguimiento. Estos datos resultan contrastantes con la literatura, sin embargo, nosotros atribuimos este fenómeno a que CD26, es también considerado un biomarcador de CMN, por lo que CD26 identifica a las dos poblaciones celulares.

Por otro lado, también observamos coexpresión de los biomarcadores de resistencia a 5FUOL, ABCB1/CK-18 y ABCB1/BNIP3 y la expresión aislada de ABCB1, en donde se observó una coexpresión, notablemente mayor y estadísticamente significativa de ABCB1/CK-18, ABCB1/BNIP3 y una mayor expresión de ABCB1 los cortes de ACCRs resistentes a 5FUOL que en los ACCRs sensibles o de colon sano y no se observó diferencia entre los cortes de ACCR sensibles y de colon y sano. La coexpresión de ABCB1⁺/CK-18⁺ mostró una correlación con una menor sensibilidad a 5FUOL de los cultivos primarios de ACCR, menores Iks finales y la presencia de metástasis, concordando con lo reportado en la literatura. Lo que sugiere que la coexpresión de ABCB1/CK-18 o de ABCB1/BNIP3 podría ser útil para predecir la eficacia de FOLFOX-6. Sin embargo, no encontramos diferencias significativas con la sobrevida de los pacientes, ni con el número de muertes ocurridas durante el periodo de seguimiento clínico, lo que resulta contradictorio con lo reportado previamente. Esta situación puede explicarse porque la mayor parte de los estudios de expresión de biomarcadores se realizan en un periodo mayor de seguimiento clínico de los pacientes (5 años), probablemente al aumentar el tiempo de seguimiento y el número de casos, en nuestro estudio, obtendremos los mismos resultados. En cuanto a la colocación de ABCB1/BNIP3, encontramos una correlación estadísticamente significativa con una menor quimiosensibilidad a 5FUOL, menores Iks finales, menor sobrevida y mayor mortalidad a los 2 años de seguimiento clínico o antes. Sin embargo, no encontramos correlación con la presencia de metástasis. Por otro lado, la expresión de ABCB1, se asoció de manera significativa con una menor sensibilidad a 5FUOL, Iks bajas, menor sobrevida, presencia de metástasis y mayor mortalidad antes de los dos años de seguimiento clínico. Estos datos también concuerdan con lo reportado en la literatura. Por último, no encontramos



diferencias ni correlación entre la expresión de CK-18, entre los ACCRs sensibles o resistentes ni entre los cortes de colon sano. Tampoco entre la expresión de CK-18 o alguna de las variables clínicas analizadas. Estos resultados contrastan con lo reportado en literatura internacional. Sin embargo, cuando CK-18 se coexpresa con ABCB1 sí parece tener relevancia en la patogenia del CCR, como se mencionó en párrafos anteriores. De todos los marcadores analizados, no encontramos reportes de estudios hechos con doble marcaje en ACCR, en donde se haya analizado la coexpresión de ABCB1/CK-18, ABCB1/BNIP3, CD24/CD26 ni de CD44/CD26. Sin embargo, si existen reportes de la expresión de estas proteínas en forma aislada, empleando IHQ para un solo marcador y reportando sus resultados de manera cualitativa. También al momento, no encontramos ningún reporte que correlacione la valoración del IK con la expresión de biomarcadores.

La contribución principal de este trabajo es que logramos cuantificar por medio del conteo manual de cuadros a través de softwares de medición, la coexpresión de los marcadores típicos de CMT de ACCR y también de los marcadores de resistencia a 5FUOL, estos últimos resultan relevantes ya que la colocalización de ABCB1/CK-18 y ABCB1/BNIP3 correlacionó con variables clínicas desfavorables y con la respuesta al tratamiento *in vitro* a 5FUOL, por lo que estos biomarcadores podrían ser considerados como herramientas diagnósticas para determinar el pronóstico y la respuesta al tratamiento a FOLFOX-6 en los pacientes con ACCR. Aunque logramos observar diferencias significativas, se necesita ampliar el número de muestras y el tiempo de seguimiento clínico de los casos incluidos, para confirmar nuestros hallazgos, con ello lograremos en un futuro, la implementación de la batería de biomarcadores pronósticos a FOLFOX-6, en los laboratorios de patología, contribuyendo de esta forma a la medicina personalizada, mejorando el pronóstico de los pacientes con ACCR.



CAPÍTULO 11. CONCLUSIONES

- Logramos aislar y expandir CMT de ACCR mediante el empleo de medio de cultivo libre de suero.
- Nuestras CMT coexpresaron los marcadores de superficie CD24 y CD44 y también los marcadores de resistencia a 5FUOL (ABCB1/CK-18 y ABCB1/BNIP3).
- Validamos la capacidad de nuestras CMT para diferenciarse a células epiteliales, las cuales expresaron marcadores específicos de epitelio: CK-17, CK-20, Cocktail-CK y EGFR.
- Implementamos la técnica de IHQ de doble marcaje y un método cuantitativo para determinar la expresión de proteínas de interés por medio del uso de softwares de medición de área, en lugar de aplicar análisis cualitativo de las tinciones.
- La expresión de los marcadores típicos CD44/CD26 y la expresión aislada de CD26 fue mayor en los tejidos resistentes a 5FUOL, sin embargo, no correlacionaron con todas las características clínicas desfavorables de los casos de ACCR incluidos.
- La coexpresión de los marcadores de resistencia a 5FUOL ABCB1/CK-18 y ACB1B/BNIP3, así como la expresión aislada de ABCB1, fue significativamente mayor en los tejidos resistentes a 5FUOL que en los ACCRs sensibles y colon sano. Estos marcadores correlacionaron con todas las características desfavorables de los casos incluidos de ACCR por lo que podrían ser útiles para predecir la eficacia de FOLFOX-6.
- La estrategia que seguimos en este trabajo podría aplicarse en otros tipos de cáncer con buenos resultados.
- La batería de biomarcadores de resistencia a 5FUOL, predice la respuesta al tratamiento, la sobrevida, funcionalidad y pronóstico de los pacientes por lo que pudiera ser implementada en los laboratorios de patología en un futuro.
- Los resultados aquí presentados confirman nuestra hipótesis y apoyan el estudio de la tesis doctoral de *Garza-Treviño E.N.*



CAPÍTULO 12. PERSPECTIVAS

- Aumentar el número de muestra de los casos de ACCR.
- Realizar seguimiento clínico de los pacientes en un periodo de tiempo mayor, considerando de 5 a 7 años después de la cirugía de resección del tumor primario.
- Realizar inmunohistoquímica de doble marcaje confirmatoria de un marcador típico de CMT con un marcador de resistencia a 5FUOL, para verificar la colocalización de ambas proteínas en tejidos de ACCR.
- Realizar ensayos *in vivo* en modelo murino para evaluar la capacidad tumorigénica e invasiva de nuestras CMT aisladas de tejido de ACCR.
- Valorar capacidad de pluripotencia de nuestras CMT de ACCR hacia la diferenciación a otros linajes celulares, distintos al epitelial.
- Valorar la capacidad de migración e invasión de nuestras CMT de ACCR mediante ensayos de migración con membranas Transwell y Matrigel.
- Evaluar la capacidad de FR de las CMT, con la exposición a combinaciones de fármacos de quimioterapia convencionales, distintos a 5FUOL y también con anticuerpos monoclonales, esto a través de ensayos de viabilidad celular, como el ATP-CRA.
- Construcción de un anticuerpo bidirigido que bloquee las acciones de las proteínas de resistencia a 5FUOL, es decir ABCB1/CK-18 o ABCB1/BNIP3.



CAPÍTULO 13. BIBLIOGRAFÍA

1. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **68**, 394–424 (2018).
2. Karahalios, A., English, D. R. & Simpson, J. A. Weight change and risk of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Epidemiol.* **181**, 832–845 (2015).
3. Matsumoto, S. *et al.* Safety and efficacy of modified FOLFOX6 for treatment of metastatic or locally advanced colorectal cancer. *Chemotherapy* **54**, 395–403 (2008).
4. Romano, G. *et al.* DOSE INTENSITY AND TOXICITY OF ADJUVANT XELOX AND FOLFOX IN OVER 65 YEARS COLON CANCER PATIENTS. in *ANNALS OF ONCOLOGY* **22**, v119–v119 (OXFORD UNIV PRESS GREAT CLARENDON ST, OXFORD OX2 6DP, ENGLAND, 2011).
5. Soveri, L. M. *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* **50**, 2966–2974 (2014).
6. Bosman, F. & Yan, P. Molecular pathology of colorectal cancer. *Pol J Pathol* **65**, 257–266 (2014).
7. Unger, F. T., Witte, I. & David, K. A. Prediction of individual response to anticancer therapy: historical and future perspectives. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 729–757 (2015).
8. Mitra, A., Mishra, L. & Li, S. Technologies for deriving primary tumor cells for use in personalized cancer therapy. *Trends Biotechnol.* **31**, 347–354 (2013).
9. Bao, B., Ahmad, A., Azmi, A. S., Ali, S. & Sarkar, F. H. Overview of cancer stem cells (CSCs) and mechanisms of their regulation: implications for cancer therapy. *Curr. Protoc. Pharmacol.* 14–25 (2013).
10. Phi, L. T. H. *et al.* Cancer Stem Cells (CSCs) in Drug Resistance and their Therapeutic Implications in Cancer Treatment. *Stem Cells Int.* **2018**, (2018).
11. Papaccio, F. *et al.* Concise review: cancer cells, cancer stem cells, and mesenchymal stem cells: influence in cancer development. *Stem Cells Transl. Med.* **6**, 2115–2125 (2017).
12. Rowehl, R. A. *et al.* Establishment of highly tumorigenic human colorectal cancer cell line (CR4) with properties of putative cancer stem cells. *PloS One* **9**, e99091 (2014).
13. Rao, G. *et al.* Establishment of a human colorectal cancer cell line P6C with stem cell properties and resistance to chemotherapeutic drugs. *Acta Pharmacol. Sin.* **34**, 793 (2013).



14. D'Arcangelo, M. *et al.* Cancer stem cells sensitivity assay (STELLA) in patients with advanced lung and colorectal cancer: a feasibility study. *PloS One* **10**, e0125037 (2015).
15. Garza Treviño, E. N. Análisis del transcriptoma de células madre de adenocarcinoma colorrectal resistentes a 5-Fluorouracilo, oxaliplatino y leucovorina. (Universidad Autónoma de Nuevo León, 2017).
16. Borstnar, C. R. & Cardellach, F. *Farreras Rozman. Medicina Interna.* (Elsevier España, 2016).
17. Niederhuber, J. E., Armitage, J. O., Doroshow, J. H., Kastan, M. B. & Tepper, J. E. *Abeloff's Clinical Oncology E-Book.* (Elsevier Health Sciences, 2013).
18. Mohan, H. *Textbook of pathology.* (Jaypee brothers medical publishers New Delhi, 2005).
19. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell* **144**, 646–674 (2011).
20. Ferlay, J. *et al.* Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int. J. Cancer* (2018).
21. Brenner, H., Kloor, M. & Pox, C. P. Colorectal cancer. *The Lancet* **383**, 1490–1502 (2014).
22. Siegel, R. L. *et al.* Colorectal cancer statistics, 2017. *CA. Cancer J. Clin.* **67**, 177–193 (2017).
23. Loda, M., Mucci, L. A., Mittelstadt, M. L., Van Hemelrijck, M. & Cotter, M. B. *Pathology and epidemiology of cancer.* (Springer, 2016).
24. Sánchez-Barriga, J. J. Tendencias de mortalidad y riesgo de muerte por cáncer colorrectal en las 7 regiones socioeconómicas de México, 2000-2012. *Rev. Gastroenterol. México* **82**, 217–225 (2017).
25. Aldaco-Sarvide, F. *et al.* Mortalidad por cáncer en México: actualización 2015. *cáncer* **85**, 1 (2018).
26. Gómez-Dantés, H. *et al.* La carga del cáncer en México, 1990-2013. *Salud Pública México* **58**, 118–131 (2016).
27. Cisneros, N. V. *et al.* Carcinoma colorrectal: comparación histopatológica entre pacientes mayores y menores de 51 años. *Patol. Rev. Latinoam.* **48**, 12–17 (2010).
28. Delgado-González, P. *et al.* 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 Pública México* **58**, 592–594 (2016).
29. Gutiérrez, J. P. F. Estudio de las bases anatómicas del carcinoma de colon en la población juvenil. (2013).



30. Fairley, T. L. *et al.* Colorectal cancer in US adults younger than 50 years of age, 1998–2001. *Cancer* **107**, 1153–1161 (2006).
31. Dorundi, S. & Bannerjea, A. Colorectal cancer: early diagnosis and predisposing causes. *Surg.-Oxf. Int. Ed.* **24**, 131–136 (2006).
32. Smith, R. K. & Maron, D. J. Epidemiology, risk factors, and prevention. in *Seminars in Colon and Rectal Surgery* **27**, 176–180 (Elsevier, 2016).
33. Song, M., Garrett, W. S. & Chan, A. T. Nutrients, foods, and colorectal cancer prevention. *Gastroenterology* **148**, 1244–1260 (2015).
34. Pericleous, M., Mandair, D. & Caplin, M. E. Diet and supplements and their impact on colorectal cancer. *J. Gastrointest. Oncol.* **4**, 409 (2013).
35. Mills, S. E. *Histology for pathologists*. (Lippincott Williams & Wilkins, 2012).
36. Mohamed, M. & Schofield, J. B. The pathology of colorectal polyps and cancers (including biopsy). *Surg. Oxf.* **32**, 165–171 (2014).
37. Todaro, M., Francipane, M. G., Medema, J. P. & Stassi, G. Colon cancer stem cells: promise of targeted therapy. *Gastroenterology* **138**, 2151–2162 (2010).
38. Bjerknes, M. & Cheng, H. [14]-Intestinal Epithelial Stem Cells and Progenitors. *Methods Enzymol.* **419**, 337–383 (2006).
39. Singh, I. *Textbook of human histology:(with colour atlas & practical guide)*. **6**, (Jaypee brothers medical publishers, 2011).
40. Boron, W. F. & Boulpaep, E. L. *Medical Physiology, 2e Updated Edition E-Book: with STUDENT CONSULT Online Access*. (Elsevier Health Sciences, 2012).
41. Meran, L., Baulies, A. & Li, V. S. Intestinal stem cell niche: the extracellular matrix and cellular components. *Stem Cells Int.* **2017**, (2017).
42. Andersson-Rolf, A., Zilbauer, M., Koo, B.-K. & Clevers, H. Stem cells in repair of gastrointestinal epithelia. *Physiology* **32**, 278–289 (2017).
43. Rubin, E., Rubin, R. & Strayer, D. *Rubin: Patología; fundamentos clinicopatológicos en medicina*. (Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, 2012).
44. Carey, F. Pathology of colorectal neoplasia. *Surg. Oxf.* **35**, 126–131 (2017).
45. Cecil, R. L. F., Goldman, L. & Schafer, A. I. *Goldman's Cecil Medicine, Expert Consult Premium Edition–Enhanced Online Features and Print, Single Volume, 24: Goldman's Cecil Medicine*. **1**, (Elsevier Health Sciences, 2012).
46. Ford, A. C. *et al.* Diagnostic utility of alarm features for colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. *Gut* (2008).
47. Tanaka, T., Tanaka, M., Tanaka, T. & Ishigamori, R. Biomarkers for colorectal cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **11**, 3209–3225 (2010).



48. Hammond, W. A., Swaika, A. & Mody, K. Pharmacologic resistance in colorectal cancer: a review. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **8**, 57–84 (2016).
49. Dickens, E. & Ahmed, S. Principles of cancer treatment by chemotherapy. *Surg.-Oxf. Int. Ed.* **36**, 134–138 (2018).
50. André, T. *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.* **27**, 3109–3116 (2009).
51. Kelly, C. M. & Shahrokni, A. Moving beyond Karnofsky and ECOG performance status assessments with new technologies. *J. Oncol.* **2016**, (2016).
52. Péus, D., Newcomb, N. & Hofer, S. Appraisal of the Karnofsky Performance Status and proposal of a simple algorithmic system for its evaluation. *BMC Med. Inform. Decis. Mak.* **13**, 72 (2013).
53. Puiggròs, C., Lecha, M., Rodríguez, T., Pérez-Portabella, C. & Planas, M. El índice de Karnofsky como predictor de mortalidad en pacientes con nutrición enteral domiciliaria. *Nutr. Hosp.* **24**, 156–160 (2009).
54. Terret, C., Albrand, G., Moncenix, G. & Droz, J. P. Karnofsky performance scale (KPS) or physical performance test (PPT)? That is the question. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **77**, 142–147 (2011).
55. Markowitz, S. D. & Bertagnolli, M. M. Molecular basis of colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* **361**, 2449–2460 (2009).
56. Fearon, E. R. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **6**, 479–507 (2011).
57. Søreide, K. *et al.* Evolving molecular classification by genomic and proteomic biomarkers in colorectal cancer: potential implications for the surgical oncologist. *Surg. Oncol.* **18**, 31–50 (2009).
58. Church, J. Molecular genetics of colorectal cancer. in *Seminars in Colon and Rectal Surgery* **27**, 172–175 (Elsevier, 2016).
59. Yantiss, R. K. & Samowitz, W. S. Molecular Pathology of Gastrointestinal Cancer. *Surg. Pathol. Clin.* **5**, 821–842 (2012).
60. Pereira, L., Mariadason, J. M., Hannan, R. D. & Dhillon, A. S. Implications of epithelial–mesenchymal plasticity for heterogeneity in colorectal cancer. *Front. Oncol.* **5**, 13 (2015).
61. Cao, H., Xu, E., Liu, H., Wan, L. & Lai, M. Epithelial–mesenchymal transition in colorectal cancer metastasis: a system review. *Pathol.-Res. Pract.* **211**, 557–569 (2015).



62. Bhangu, A. *et al.* Epithelial mesenchymal transition in colorectal cancer: Seminal role in promoting disease progression and resistance to neoadjuvant therapy. *Surg. Oncol.* **21**, 316–323 (2012).
63. Vu, T. & Datta, P. Regulation of EMT in colorectal cancer: a culprit in metastasis. *Cancers* **9**, 171 (2017).
64. Zhu, Q.-C., Gao, R.-Y., Wu, W. & Qin, H.-L. Epithelial-mesenchymal transition and its role in the pathogenesis of colorectal cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **14**, 2689–2698 (2013).
65. Choi, J. E. *et al.* Expression of epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell markers in colorectal adenocarcinoma: Clinicopathological significance. *Oncol. Rep.* **38**, 1695–1705 (2017).
66. Pino, M. S. *et al.* Epithelial to mesenchymal transition is impaired in colon cancer cells with microsatellite instability. *Gastroenterology* **138**, 1406–1417 (2010).
67. Colangelo, T. *et al.* Friend or foe?: The tumour microenvironment dilemma in colorectal cancer. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Rev. Cancer* **1867**, 1–18 (2017).
68. Wang, M. *et al.* Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *J. Cancer* **8**, 761 (2017).
69. Das, M. & Law, S. Role of tumor microenvironment in cancer stem cell chemoresistance and recurrence. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **103**, 115–124 (2018).
70. Peddareddigari, V. G., Wang, D. & DuBois, R. N. The tumor microenvironment in colorectal carcinogenesis. *Cancer Microenviron.* **3**, 149–166 (2010).
71. Lau, E. Y.-T., Ho, N. P.-Y. & Lee, T. K.-W. Cancer stem cells and their microenvironment: biology and therapeutic implications. *Stem Cells Int.* **2017**, (2017).
72. Nguyen, L. V., Vanner, R., Dirks, P. & Eaves, C. J. Cancer stem cells: an evolving concept. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 133 (2012).
73. Garza-Treviño, E. N., Said-Fernández, S. L. & Martínez-Rodríguez, H. G. Understanding the colon cancer stem cells and perspectives on treatment. *Cancer Cell Int.* **15**, 2 (2015).
74. Babashah, S. *Cancer stem cells: emerging concepts and future perspectives in translational oncology.* (Springer, 2015).
75. Giammona, A. *et al.* Innovative therapeutic strategies targeting colorectal cancer stem cells. *Curr. Colorectal Cancer Rep.* **13**, 91–100 (2017).
76. Aponte, P. M. & Caicedo, A. Stemness in cancer: stem cells, cancer stem cells, and their microenvironment. *Stem Cells Int.* **2017**, (2017).



77. Peitzsch, C., Tyutyunnykova, A., Pantel, K. & Dubrovskaya, A. Cancer stem cells: the root of tumor recurrence and metastases. in *Seminars in cancer biology* **44**, 10–24 (Elsevier, 2017).
78. Eun, K., Ham, S. W. & Kim, H. Cancer stem cell heterogeneity: origin and new perspectives on CSC targeting. *BMB Rep.* **50**, 117 (2017).
79. Batlle, E. & Clevers, H. Cancer stem cells revisited. *Nat. Med.* **23**, 1124 (2017).
80. Singh, A. & Settleman, J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene* **29**, 4741–4751 (2010).
81. Prieto-Vila, M., Takahashi, R., Usuba, W., Kohama, I. & Ochiya, T. Drug resistance driven by cancer stem cells and their niche. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 2574 (2017).
82. Abdullah, L. N. & Chow, E. K.-H. Mechanisms of chemoresistance in cancer stem cells. *Clin. Transl. Med.* **2**, 3 (2013).
83. Cojoc, M., Mäbert, K., Muders, M. H. & Dubrovskaya, A. A role for cancer stem cells in therapy resistance: cellular and molecular mechanisms. in *Seminars in cancer biology* **31**, 16–27 (Elsevier, 2015).
84. Bonnet, D. & Dick, J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* **3**, 730–737 (1997).
85. Ahmad, G. & Amiji, M. M. Cancer stem cell-targeted therapeutics and delivery strategies. *Expert Opin. Drug Deliv.* **14**, 997–1008 (2017).
86. Kemper, K., Grandela, C. & Medema, J. P. Molecular identification and targeting of colorectal cancer stem cells. *Oncotarget* **1**, 387 (2010).
87. Izumi, D., Ishimoto, T., Sakamoto, Y., Miyamoto, Y. & Baba, H. Molecular insights into colorectal cancer stem cell regulation by environmental factors. *J. Cancer Metastasis Treat. Vol. 1*, 157 (2015).
88. Jaggupilli, A. & Elkord, E. Significance of CD44 and CD24 as Cancer Stem Cell Markers: An Enduring Ambiguity. *Journal of Immunology Research* (2012). doi:10.1155/2012/708036
89. Wahab, S. R., Islam, F., Gopalan, V. & Lam, A. K. The identifications and clinical implications of cancer stem cells in colorectal cancer. *Clin. Colorectal Cancer* **16**, 93–102 (2017).
90. Nakamura, K. *et al.* CD24 expression is a marker for predicting clinical outcome and regulates the epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer via both the Akt and ERK pathways. *Oncol. Rep.* **37**, 3189–3200 (2017).
91. Yang, C.-H. *et al.* Identification of CD24 as a cancer stem cell marker in human nasopharyngeal carcinoma. *PLoS One* **9**, e99412 (2014).



92. Han, S.-A., Jang, J. H., Won, K. Y., Lim, S.-J. & Song, J.-Y. Prognostic value of putative cancer stem cell markers (CD24, CD44, CD133, and ALDH1) in human papillary thyroid carcinoma. *Pathol.-Res. Pract.* **213**, 956–963 (2017).
93. Li, W. *et al.* Unraveling the roles of CD44/CD24 and ALDH1 as cancer stem cell markers in tumorigenesis and metastasis. *Sci. Rep.* **7**, 13856 (2017).
94. Davies, S., Beckenkamp, A. & Buffon, A. CD26 a cancer stem cell marker and therapeutic target. *Biomed. Pharmacother.* **71**, 135–138 (2015).
95. Beckenkamp, A., Davies, S., Willig, J. B. & Buffon, A. DPPIV/CD26: a tumor suppressor or a marker of malignancy? *Tumor Biol.* **37**, 7059–7073 (2016).
96. Lam, C. S.-C. *et al.* Prognostic significance of CD26 in patients with colorectal cancer. *PLoS One* **9**, e98582 (2014).
97. Chen, W. *et al.* Identification of CD44+ cancer stem cells in human gastric cancer. *Hepatogastroenterology.* **60**, 949–954 (2013).
98. Senbanjo, L. T. & Chellaiah, M. A. CD44: a multifunctional cell surface adhesion receptor is a regulator of progression and metastasis of cancer cells. *Front. Cell Dev. Biol.* **5**, 18 (2017).
99. Pitule, P. *et al.* Immunohistochemical detection of cancer stem cell related markers CD44 and CD133 in metastatic colorectal cancer patients. *BioMed Res. Int.* **2014**, (2014).
100. Lin, J. & Ding, D. The prognostic role of the cancer stem cell marker CD44 in ovarian cancer: a meta-analysis. *Cancer Cell Int.* **17**, 8 (2017).
101. Jordan, A. R., Racine, R. R., Hennig, M. J. & Lokeshwar, V. B. The role of CD44 in disease pathophysiology and targeted treatment. *Front. Immunol.* **6**, 182 (2015).
102. Barzegar Behrooz, A., Syahir, A. & Ahmad, S. CD133: beyond a cancer stem cell biomarker. *J. Drug Target.* 1–13 (2018).
103. Li, Z. CD133: a stem cell biomarker and beyond. *Exp. Hematol. Oncol.* **2**, 17 (2013).
104. Schmohl, J. U. & Vallera, D. A. CD133, selectively targeting the root of cancer. *Toxins* **8**, 165 (2016).
105. Glumac, P. M. & LeBeau, A. M. The role of CD133 in cancer: a concise review. *Clin. Transl. Med.* **7**, 18 (2018).
106. Huang, L. *et al.* Functions of EpCAM in physiological processes and diseases. *Int. J. Mol. Med.* **42**, 1771–1785 (2018).
107. Imrich, S., Hachmeister, M. & Gires, O. EpCAM and its potential role in tumor-initiating cells. *Cell Adhes. Migr.* **6**, 30–38 (2012).
108. Dana, H., Marmari, V., Mahmoodi, G., Mahmoodzadeh, H. & Ebrahimi, M. CD166 as a Stem Cell Marker. *Potential Target Ther. Colorectal Cancer* (2016).



109. Levin, T. G. *et al.* Characterization of the intestinal cancer stem cell marker CD166 in the human and mouse gastrointestinal tract. *Gastroenterology* **139**, 2072–2082 (2010).
110. Patriarca, C., Macchi, R. M., Marschner, A. K. & Mellstedt, H. Epithelial cell adhesion molecule expression (CD326) in cancer: a short review. *Cancer Treat. Rev.* **38**, 68–75 (2012).
111. Smith, N. R. *et al.* Cell adhesion molecule CD166/ALCAM functions within the crypt to orchestrate murine intestinal stem cell homeostasis. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **3**, 389–409 (2017).
112. Fitzgerald, T. L., Rangan, S., Dobbs, L., Starr, S. & Sigounas, G. The impact of Aldehyde dehydrogenase 1 expression on prognosis for metastatic colon cancer. *J. Surg. Res.* **192**, 82–89 (2014).
113. Deng, Y. *et al.* ALDH1 is an independent prognostic factor for patients with stages II–III rectal cancer after receiving radiochemotherapy. *Br. J. Cancer* **110**, 430 (2014).
114. Holah, N. S., Aiad, H. A.-E.-S., Asaad, N. Y., Elkhoully, E. A. & Lasheen, A. G. Evaluation of the role of ALDH1 as cancer stem cell marker in colorectal carcinoma: an immunohistochemical study. *J. Clin. Diagn. Res. JCDR* **11**, EC17 (2017).
115. Kudinov, A. E., Karanicolas, J., Golemis, E. A. & Bumber, Y. Musashi RNA-binding proteins as cancer drivers and novel therapeutic targets. *Clin. Cancer Res.* **23**, 2143–2153 (2017).
116. Chiou, G.-Y. *et al.* Musashi-1 promotes a cancer stem cell lineage and chemoresistance in colorectal cancer cells. *Sci. Rep.* **7**, 2172 (2017).
117. Abbaszadegan, M. R. *et al.* Isolation, identification, and characterization of cancer stem cells: A review. *J. Cell. Physiol.* **232**, 2008–2018 (2017).
118. Hurt, E. M. & Farrar, W. L. *Purification and characterization of cancer stem cells.* **1**, (Chapter, 2010).
119. Moghbeli, M., Moghbeli, F., Forghanifard, M. M. & Abbaszadegan, M. R. Cancer stem cell detection and isolation. *Med. Oncol.* **31**, 69 (2014).
120. Martín-Lacave, I. & García-Caballero, T. *Atlas de inmunohistoquímica: caracterización de células, tejidos y órganos normales.* (Ediciones Díaz de Santos, 2012).
121. Tomita, H., Tanaka, K., Takahashi, K., Suga, A. & Hara, A. Double-Staining Immunohistochemistry of Stem Cell Markers in Human Liver Cancer Tissues. *Adv Tech Biol Med* **3**, 173 (2015).
122. Miller, T. J. *et al.* Objective analysis of cancer stem cell marker expression using immunohistochemistry. *Pathology (Phila.)* **49**, 24–29 (2017).



123. Lee, H. J. *et al.* Sa1659 The ATP-Based Doublet Chemotherapy Response Assay for Un-Resectable Advanced Gastric Cancer; A Single Center, Prospective, Randomized Controlled Study. *Gastrointest. Endosc.* **75**, AB236 (2012).
124. Lee, J. H. *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. Off. J. Korean Cancer Assoc.* **43**, 117–123 (2011).
125. Rodríguez González, M. S. Potencial terapéutico de medicamentos antineoplásicos alternativos sobre la línea COLO 320 y cultivos primarios de adenocarcinoma colorrectal. (Universidad Autónoma de Nuevo León, 2012).
126. Begicevic, R.-R. & Falasca, M. ABC Transporters in cancer stem cells: Beyond chemoresistance. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 2362 (2017).
127. Moitra, K. Overcoming Multidrug Resistance in Cancer Stem Cells. *BioMed Research International* (2015). doi:10.1155/2015/635745
128. Andersen, V. *et al.* Novel understanding of ABC transporters ABCB1/MDR/P-glycoprotein, ABCC2/MRP2, and ABCG2/BCRP in colorectal pathophysiology. *World J. Gastroenterol.* **21**, 11862 (2015).
129. Katayama, K., Noguchi, K. & Sugimoto, Y. Regulations of P-glycoprotein/ABCB1/MDR1 in human cancer cells. *New J. Sci.* **2014**, (2014).
130. Weng, Y.-R., Cui, Y. & Fang, J.-Y. Biological functions of cytokeratin 18 in cancer. *Mol. Cancer Res.* **10**, 485–493 (2012).
131. Pastuszak, M. *et al.* Cytokeratins in gastroenterology. Systematic review. *Przegląd Gastroenterol.* **10**, 61 (2015).
132. Moll, R., Divo, M. & Langbein, L. The human keratins: biology and pathology. *Histochem. Cell Biol.* **129**, 705 (2008).
133. Zhang, B. *et al.* Cytokeratin 18 knockdown decreases cell migration and increases chemosensitivity in non-small cell lung cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **142**, 2479–2487 (2016).
134. Gustafsson, VAAsa B. Bnip3 as a dual regulator of mitochondrial turnover and cell death in the myocardium. *Pediatr. Cardiol.* **32**, 267–274 (2011).
135. Ney, P. A. Mitochondrial autophagy: origins, significance, and role of BNIP3 and NIX. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Mol. Cell Res.* **1853**, 2775–2783 (2015).
136. Zhang, J. & Ney, P. A. Role of BNIP3 and NIX in cell death, autophagy, and mitophagy. *Cell Death Differ.* **16**, 939–946 (2009).
137. Song, C. *et al.* Inhibition of BMK1 pathway suppresses cancer stem cells through BNIP3 and BNIP3L. *Oncotarget* **6**, 33279 (2015).



138. Shukla, G. *et al.* Therapeutic potential, challenges and future perspective of cancer stem cells in translational oncology: a critical review. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* **12**, 207–224 (2017).
139. De Angelis, M. L. *et al.* Cancer Stem Cell-Based Models of Colorectal Cancer Reveal Molecular Determinants of Therapy Resistance. *STEM CELLS Transl. Med.* **5**, 511–523 (2016).
140. Kondo, J. *et al.* Retaining cell–cell contact enables preparation and culture of spheroids composed of pure primary cancer cells from colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201015938 (2011).
141. Árnadóttir, S. S. *et al.* Characterization of genetic intratumor heterogeneity in colorectal cancer and matching patient-derived spheroid cultures. *Mol. Oncol.* **12**, 132–147 (2018).
142. Jeppesen, M. *et al.* Short-term spheroid culture of primary colorectal cancer cells as an in vitro model for personalizing cancer medicine. *PloS One* **12**, e0183074 (2017).
143. Kaseb, H. O., Fohrer-Ting, H., Lewis, D. W., Lagasse, E. & Gollin, S. M. Identification, expansion and characterization of cancer cells with stem cell properties from head and neck squamous cell carcinomas. *Exp. Cell Res.* **348**, 75–86 (2016).
144. Olejniczak, A., Szaryńska, M. & Kmiec, Z. In vitro characterization of spheres derived from colorectal cancer cell lines. *Int. J. Oncol.* **52**, 599–612 (2018).
145. Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J. & Clarke, M. F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 3983–3988 (2003).
146. Choi, H. S. *et al.* Screening of breast cancer stem cell inhibitors using a protein kinase inhibitor library. *Cancer Cell Int.* **17**, 25 (2017).
147. Vermeulen, L. *et al.* Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 13427–13432 (2008).
148. Butler, S. J., Richardson, L., Farias, N., Morrison, J. & Coomber, B. L. Characterization of cancer stem cell drug resistance in the human colorectal cancer cell lines HCT116 and SW480. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **490**, 29–35 (2017).
149. Rybak, A. P., He, L., Kapoor, A., Cutz, J.-C. & Tang, D. Characterization of sphere-propagating cells with stem-like properties from DU145 prostate cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Mol. Cell Res.* **1813**, 683–694 (2011).
150. Steffensen, K. D. *et al.* Prevalence of epithelial ovarian cancer stem cells correlates with recurrence in early-stage ovarian cancer. *J. Oncol.* **2011**, (2011).
151. Grillet, F. *et al.* Circulating tumour cells from patients with colorectal cancer have cancer stem cell hallmarks in ex vivo culture. *Gut* gutjnl–2016 (2016).



152. Arnold, M. *et al.* Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut* **66**, 683–691 (2017).
153. Grothey, A. *et al.* Duration of adjuvant chemotherapy for stage III colon cancer. *N. Engl. J. Med.* **378**, 1177–1188 (2018).
154. Agrawal, D. Diagnosis and treatment of colorectal cancer: a review. *J. Drug Deliv. Ther.* **2**, (2012).
155. Chen, X., Cho, D.-B. & Yang, P.-C. Double staining immunohistochemistry. *North Am. J. Med. Sci.* **2**, 241 (2010).



CAPÍTULO 14. ANEXOS

14.1. Medios y soluciones para cultivo celular

❖ Solución salina amortiguada por fosfatos (PBS) 1X pH 7.4

En 500 mL de agua miliQ, disolver:

▪ Cloruro de Potasio (KCl)	0.106 g
▪ Fosfato de Potasio Monobásico (KH ₂ PO ₄)	0.102 g
▪ Cloruro de Sodio (NaCl)	4.090 g
▪ Fosfato de Disódico (Na ₂ HPO ₄)	0.798 g

Se colocan las sales en un vaso de precipitados adecuado para el volumen de la solución a preparar, se añade el 80% del agua miliQ y se mezcla con ayuda de un agitador magnético hasta diluir las sales. Ajustar el pH a 7.4 con ácido clorhídrico (HCl) 1 M e Hidróxido de Sodio (NaOH) 10 M. Aforar la solución al volumen final requerido y filtrar a través de una unidad de filtración de 45 µm y/o esterilizar en autoclave. Bajo técnica aséptica distribuir en alícuotas de 50 mL en tubos cónicos y almacenar a 4°C.

❖ Ácido clorhídrico 1 M

▪ HCl concentrado	8.62 mL
▪ Agua destilada	91 mL

No agregar el agua destilada al ácido. Mezclar en una plancha agitadora por 5 min. Aforar a 100 mL con agua destilada.

❖ Hidróxido de sodio 10 M

▪ NaOH	40 g
▪ Agua destilada	40 mL

Mezclar en una plancha agitadora con una barra magnética hasta disolver el NaOH por completo. Aforar a 100 mL.

❖ PBS 1x suplementado con antibiótico y antimicótico para uso de cultivo celular

Para preparar 50 mL:

▪ PBS 1x a pH 7.4, estéril	50 mL
▪ Gentamicina -10 mg/mL- a concentración final de 50 µg/mL	250 µL
▪ Anfotericina B -2.5 mg/mL- a concentración final de 2.5 µg/mL	50 µL

**❖ Colagenasa tipo I al 0.2%**

▪ PBS 1x a pH 7.4, estéril	20 mL
▪ Colagenasa tipo I -285 U/mg-	40 mg
▪ Anfotericina B -2.5 mg/mL- a concentración final de 2.5 µg/mL	50 µL

Filtrar la solución y esterilizar mediante filtración con un filtro de jeringa con poros de 45 µm. Después agregar gentamicina y anfotericina B a las concentraciones descritas anteriormente. Proteger de la luz y almacenar a 4°C.

❖ Medio de cultivo para disgregación de tejido y tumores colorrectales

▪ Medio RPMI 1640	20 mL
▪ Gentamicina -10 mg/mL- a concentración final de 50 µg/mL	100 µL
▪ Anfotericina B -2.5 mg/mL- a concentración final de 2.5 µg/mL	20 µL

No suplementar medio con suero fetal bovino (SFB).

❖ Medio de cultivo IMDM

Para preparar 50 mL, agregar:

▪ Medio IMDM	45 mL
▪ Gentamicina -10 mg/mL- a concentración final de 50 µg/mL	250 µL
▪ Anfotericina B -2.5 mg/mL- a concentración final de 2.5 µg/mL	50 µL
▪ Suero Fetal Bovino (SFB) al 10%	5 mL

Realizar en campana de cultivo celular. Mezclar con agitación manual por unos segundos y almacenar a 4 °C hasta su uso.

❖ Medio de aislamiento y mantenimiento de CMT

Para preparar 50 mL, agregar:

▪ Medio DMEM 1x	50 mL
▪ Gentamicina -10 mg/mL- a concentración final de 50 µg/mL	250 µL
▪ Anfotericina B -2.5 mg/mL- a concentración final de 2.5 µg/mL	50 µL
▪ EGF	1 µL
▪ FGF-β	10 µL
▪ Nicotinamida	0.061 g

Realizar en campana de cultivo celular. Primero agregar nicotinamida a los 50 mL del medio DMEM 1x y esterilizar mediante filtración con un filtro de jeringa con poros de 45 µm. Después agregar gentamicina y anfotericina B, EGF y FGF- β, a las concentraciones



descritas anteriormente. Mezclar con agitación manual por 10 seg. y almacenar a 4 °C hasta su uso.

❖ Medio de diferenciación de CMT a células epiteliales

Para preparar 50 mL, agregar:

- | | |
|--|--------|
| ▪ Medio RPMI 1640 | 45 mL |
| ▪ Gentamicina -10 mg/mL a concentración final de 50 µg/mL | 250 µL |
| ▪ Anfotericina B -2.5 mg/mL a concentración final de 2.5 µg/mL | 50 µL |
| ▪ Suero fetal bovino (SFB) dependiendo el porcentaje a usar | |

Realizar en campana de cultivo. Mezclar los componentes y almacenar a 4 °C

❖ Azul tripano al 0.2%

- | | |
|-----------------------|-------|
| ▪ Azul tripan al 0.4% | 0.5 g |
| ▪ PBS 1x | 1 mL |

-Modo de empleo: Se toman 16 µL de esta solución y se mezclan con 4 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. Después, se determina el porcentaje de viabilidad celular y la concentración (número de células/mL aplicando la siguiente ecuación:

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

14.2. Reactivos para preparación de hematoxilina y eosina

❖ Hematoxilina de Gill

- | | |
|--------------------------|--------|
| ▪ Agua destilada | 730 mL |
| ▪ Etilenglicol | 250 mL |
| ▪ Hematoxilina anhídrida | 2 g |
| ▪ Yodato de potasio | 0.2 g |
| ▪ Sulfato de aluminio | 17.6 g |
| ▪ Ácido acético glacial | 2 mL |
| ▪ Agua destilada | 6 min |



La solución se prepara en el orden en que están listado los reactivos y se mezclan con ayuda de un agitador magnético a temperatura ambiente durante 1 h. Filtrar (papel filtro Whatman® 20-30 µM) la primera vez antes de usar.

❖ Eosina

▪ Eosina amarillenta	1 g
▪ Agua destilada	20 mL
▪ Etanol 96%	80 mL

De esta solución concentrada, tomar una parte y agregarla en tres partes de etanol 80%. Antes de usar, agregar 0.5 mL de ácido acético glacial por cada 100 mL de colorante preparado, agitar

❖ Solución alcohol-ácido

▪ Ácido clorhídrico concentrado	1 mL
▪ Etanol 70%	99 mL

❖ Agua amoniacal

▪ NaH ₄ OH	1 mL
▪ Agua destilada	99 mL

14.3. Fijadores de células y tejidos

❖ Fijador metanol-acetona

Se prepara una mezcla 1:1 de metanol y acetona absolutos, se mezcla y posteriormente se almacena en refrigeración a -20 °C hasta su uso.

❖ Solución de Carnoy

Para preparar 100 mL, agregar:

▪ Etanol absoluto	60 mL
▪ Cloroformo	30 mL
▪ Ácido acético	10 mL

Mezclar en un frasco de vidrio y conservar a 4°C hasta su uso.



14.4. Soluciones y reactivos para inmunohistoquímica

❖ Tris buffer – salino + Tween 20 (TBST)

TBST 1x		TBST 1x -opción comercial-	
▪ TBS 10x	100 mL	▪ TBST 20x	50 mL
▪ Agua miliQ	900 mL	▪ Agua miliQ	950 mL
▪ Tween 20	500 µL		

Para preparar TBS 10x: Aforar 1 L de agua miliQ y agregar 102.66 g de cloruro de sodio (NaCl) y 14.45 g de Tris base, ajustar pH a 7.4 y conservar a 4°C hasta su uso.

❖ Hematoxilina de Mayer

▪ Agua destilada	1000 mL
▪ Sulfato aluminico potásico o sulfato aluminico de amonio	50 mL
▪ Hematoxilina cristalizada	1 g
▪ Yodato de sodio	0.2 g
▪ Ácido cítrico	1 g
▪ Hidrato de cloral	50 g

Añadir el sulfato aluminico hasta que esté completamente disuelto y posteriormente añadir la hematoxilina. Cuando la hematoxilina esté completamente disuelta se añade el ácido cítrico, el hidrato de cloral y yodato de sodio. Hervir durante 5 min, enfriar y filtrar. Puede ser usada de inmediato.

❖ Silanizado de laminillas

▪ Poly-L lysine	5 mL
▪ Agua miliQ	45 mL

Mezclar los componentes y pasar a un frasco de Coplin de polipropileno -no utilizar vidrio-, sumergir las laminillas a tratar por 10 min y después dejar secar a temperatura ambiente.



CAPÍTULO 15. RESUMEN BIOGRÁFICO

ORLANDO DANIEL SOLIS CORONADO

Candidato para el Grado de Maestro en Ciencias
con orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética

Tesis: “ADENOCARCINOMA COLORRECTAL: ANÁLISIS DE CORRELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE CÉLULAS MADRE DE TUMOR ABCB1⁺/BNIP3⁺/KRT18⁺, FARMACORRESISTENCIA Y RESPUESTA CLÍNICA A FOLFOX-6”.

Campo de estudio: Medicina y Patología Humana - Patología Gastrointestinal.

Datos personales: Nacido en San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, el 4 de diciembre de 1991, hijo de Javier Solis García y Elia Guadalupe Coronado Carrizales.

Educación: Egresado de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León, con el título de Médico Cirujano y Partero (2009-2016), obteniendo el testimonio de desempeño sobresaliente. Estudiante del Programa de Licenciatura en Gerencia de Servicios de Salud por la División de Ciencias de la Salud, Biológicas y Ambientales de la Universidad Abierta y a Distancia de México (Generación 2017-2). Durante sus estudios de Maestría en Ciencias, obtuvo el nombramiento de “Estudiante de Posgrado distinguido” en el año 2018.

Experiencia Profesional: Internado Rotatorio de Pregrado realizado en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, UANL (Agosto 2012 - Julio 2015). Servicio Social en vinculación con Secretaria de Salud – UANL, en el Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, Facultad de Medicina, UANL (Agosto 2015 - Julio 2016). Auxiliar de Investigador Nacional Nivel III (Marzo -Julio 2016) por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), asignado al proyecto “Análisis del transcriptoma de células madre de adenocarcinoma colorrectal resistentes a 5-fluorouracilo, oxaliplatino y leucovorina”, bajo la dirección del Dr. Salvador Luis Said y Fernández (Expediente No. 13083).

Miembro de sociedades y/o asociaciones: Socio Activo del Colegio de Médicos Cirujanos del Estado de Nuevo León. Miembro del Colegio Mexicano para la Investigación del Cáncer (Membresía No. 271809).

Educación continua y presentaciones en congresos: Participación como asistente a 42 cursos de educación continua (2012 - Actualidad) y Expositor de 8 trabajos libres en cartel en congresos nacionales e internacionales.