



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**



FACULTAD DE MEDICINA

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS SUPERIORES
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA**

**SECRETARÍA DE SALUD PÚBLICA DEL ESTADO DE SONORA
HOSPITAL GENERAL DEL ESTADO DE SONORA
“Dr. Ernesto Ramos Bours”**

**“IDENTIFICACION SERICA DE MARCADORES MOLECULARES PARA
CELULAS PROGENITORAS DE CANCER DE COLON POR PCR”**

TESIS

PARA OBTENER EL DIPLOMA DE ESPECIALISTA EN:

CIRUGIA GENERAL

PRESENTA

DR. FERNANDO MURILLO MENDEZ

Hermosillo, Sonora, México, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

HOSPITAL GENERAL DEL ESTADO DE SONORA

“DR ERNESTO RAMOS BOURS”

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA GENERAL

**DR. FRANCISCO RENÉ PESQUEIRA
DIRECTOR GENERAL**

**DR. JORGE ISAAC CARDOZA AMADOR
DIRECTOR MÉDICO**

**DRA. CARMEN A. ZAMUDIO REYES
JEFE DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN**

**DR FRANCISCO CÉSAR GRACIA GÓMEZ
TUTOR DEL CURSO DE CIRUGÍA GENERAL**

**DR.MARCOS JOSÉ SERRATO FELIX
JEFE DE LA DIVISIÓN DE CIRUGÍA GENERAL**

**DR.JOAQUÍN SÁNCHEZ GONZÁLEZ
JEFE DEL SERVICIO DE CIRUGÍA GENERAL
ASESOR DE TESIS**

**MC. CARLOS GABRIEL GONZALEZ BECUAR
ASESOR DE TESIS**

**DR. FERNANDO MURILLO MENDEZ
RESIDENTE DE CUARTO AÑO DE CIRUGIA GENERAL**

Dedicado a:

A mis padres, por creer en mí y por haberme sacado adelante, dándome ejemplos dignos de superación y entrega, porque gracias a ustedes, hoy puedo ver alcanzada mi meta, ya que siempre estuvieron apoyándome en los momentos más difíciles de mi carrera, y porque el orgullo que sienten por mí, fue lo que me hizo ir hasta el final. Esto es por ustedes, por lo que valen, porque admiro su fortaleza y por lo que han hecho de mí.

A mi hermano gracias por haber fomentado en mí el deseo de superación y triunfo en la vida.

Contenido

CAPITULO I	8
1.1 ANTECEDENTES	8
1.2 DESCRIPCION DE LAS CELULAS PROGENITORAS DE CANCER.....	8
1.2.1 Marcadores para células progenitoras de cáncer.....	9
1.3 Marcadores moleculares para células progenitoras de cáncer de colon	9
1.3.1 CD44.....	9
1.3.2 EpCAM/TROP1	10
1.3.3 ALCAM/CD166.....	10
1.3.4 DPPIV/CD26.....	10
1.3.5 GLI-1	10
1.3.6 ALDH1A1	11
1.4 Relevancia de los marcadores moleculares para detección de células progenitoras de cáncer.....	11
CAPITULO II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
2.1 Planteamiento del problema.....	13
2.2 Hipótesis	13
2.3 Objetivo.....	13
2.4 Justificación.....	13
2.5 Diseño	14
2.6 Grupo de estudio.....	14
2.7 Tamaño de la muestra.....	14
2.8 Criterios de inclusión.....	14
2.9 Criterios de exclusión	14
2.10 Criterios de eliminación	14
2.11 Cedula de recolección de datos.....	14
2.12 Descripción general del estudio.....	15

2.13 Análisis de datos	16
1. RESULTADOS DESCRIPTIVOS	16
2.14 Recursos	18
2.15 Aspectos éticos	19
CAPITULO III DISCUSIÓN, CONCLUSIONES y RECOMENDACIONES	20
3.1 DISCUSIÓN	20
3.2 CONCLUSIÓN	21
3.3 RECOMENDACIÓN.....	22
ANEXOS.....	23
BIBLIOGRAFÍA.....	26

INTRODUCCION

El cáncer de colon es de las principales neoplasias en incidencia y mortalidad en Latinoamérica, a pesar de la frecuencia de esta patología y los avances médicos hasta un 50% de los pacientes presentan recidiva y la principal causa de morbimortalidad en estos pacientes es la aparición de metástasis hepáticas. Para la clasificación de estadio y toma de decisiones terapéuticas lo más aceptado es la clasificación TNM sin embargo esta dista de predecir adecuadamente la respuesta terapéutica de cada paciente. Nuevos estudios de biología molecular han tratado de proveer marcadores que identifiquen esta patología en estadios tempranos así como marcadores para determinar sensibilidad a las terapias convencionales ya que no había explicación de la variación de resultados aun en pacientes con variables similares.

A partir de esto se han realizado múltiples estudios de biología molecular para determinar marcadores para esta patología, en los últimos años ha adquirido relevancia la hipótesis de las células progenitoras de cáncer detectadas inicialmente en neoplasias hematológicas y su descubrimiento además en tumores sólidos dentro de estos el cáncer de colon; esta hipótesis plantea la existencia de células progenitoras tumorales que le dan capacidad a los tumores de autorenovación y la habilidad de diferenciarse en múltiples tipos de células, se atribuye también a esta población de células la aparición de metástasis así como las recidivas.

Con este estudio se plantea realizar estudio molecular por PCR para la detección de los siguientes marcadores moleculares ALCAM/CD166, ALDH1A1, CD44,

DPPIV/CD26, EpCAM/TROP1, GLI-1, los cuales se utilizan para la detección de células progenitoras de cáncer en cáncer de colon.

CAPITULO I

1.1 ANTECEDENTES

El cáncer de colon es la sexta neoplasia en incidencia y mortalidad en Latinoamérica (1), y a nivel mundial es la tercera neoplasia en incidencia y cuarta causa de muerte por neoplasia (2). Esto aun a pesar de los avances de investigación en diagnóstico y tratamiento para esta patología. La primer descripción de las células progenitoras de cáncer se atribuye a Bonnet y Dick (4) quienes descubren una subpoblación de células leucémicas que expresan un marcador superficial específico CD34, pero carecen del marcador CD38, además de demostrar que esta subpoblación de células era capaz de iniciar tumores en ratones NOD/SCID que son histológicamente similares al donante. En cuanto a cáncer de colon se han detectado dichas células a través del uso de múltiples marcadores moleculares. Identificándose inicialmente el marcador CD133 al cual se le atribuía la detección de las células progenitoras de cáncer sin embargo esto fue refutado al demostrarse que este marcador no está relacionado a este tipo de células sino a mutaciones de los oncogenes K-RAS y B-RAF (5).

1.2 DESCRIPCION DE LAS CELULAS PROGENITORAS DE CANCER

La hipótesis de las células progenitoras de cáncer o células iniciadoras de cáncer ha sido ampliamente aceptada, esta línea celular posee características similares a las células progenitoras normales, y su diferencia contra el resto de células tumorales es que estas poseen la capacidad de auto renovación, diferenciación y proliferación. Esta línea celular se divide relativamente despacio respecto al resto de células tumorales y básicamente son quimioresistentes, lo que lleva al fracaso con la quimioterapia convencional (18). Sin embargo esta línea celular no se expresa en la totalidad de los tumores siendo esto atribuido a la gran heterogeneidad genética se realizó una clasificación para cáncer de colon en 6 subtipos moleculares los cuales muestran efectivamente diferencia en sobrevida, recidiva y aparición de metástasis características atribuibles a las células

progenitoras de cáncer. Dentro de estos 6 subtipos moleculares (C1, C2, C3, C4, C5 Y C6) dos presentan peor pronóstico C4 (células progenitoras de cáncer) y C6 (inestabilidad cromosómica) (3).

1.2.1 Marcadores para células progenitoras de cáncer.

El estándar de oro para la detección de esta línea celular se define como la capacidad de iniciar tumores a través de xenoinjertos en ratones inmunocomprometidos sin embargo el tiempo y el costo lo vuelve impráctico (20) debido a esto para la detección de esta línea celular se proponen múltiples marcadores moleculares de superficie celular. En cuanto a la especificidad, estos marcadores se pueden expresar en tejido sano específicamente células progenitoras embrionarias, mas no se expresarían en las células progenitoras somáticas encontradas en niños y adultos (19).

1.3 Marcadores moleculares para células progenitoras de cáncer de colon

Para la línea de células progenitoras de cáncer en cáncer de colon inicialmente se describió el marcador CD133 al cual se le atribuía la detección de esta línea celular esto fue refutado posteriormente al demostrarse que este marcador no está relacionado a este tipo de células sino a mutaciones de los oncogenes K-RAS y B-RAF (5), actualmente los más utilizados son: ALCAM/CD166, ALDH1A1, CD44, GLI-1, DPPIV/CD26, EpCAM/TROP1.

1.3.1 CD44

La cual es una glicoproteína de la superficie celular implicada en las interacciones célula-célula, la adhesión celular y la migración, este se ha demostrado como

marcador para células progenitoras de cáncer en múltiples tumores sólidos como el de mama, próstata, páncreas y de colon (6).

1.3.2 EpCAM/TROP1

Al igual que CD44 es una glicoproteína de la superficie celular implicada en la adhesión celular, que se propone como un marcador tumoral para la identificación de células progenitoras de cáncer en tumores sólidos entre estos el cáncer de colon (7).

1.3.3 ALCAM/CD166

La molécula de adhesión de célula leucocitaria activada forma parte de la familia de las inmunoglobulinas, se relaciona a la invasividad del melanoma, y su sobre expresión se manifiesta en cáncer de colon se usa en específico como marcador para células progenitoras de cáncer (8).

1.3.4 DPPIV/CD26

La dipeptidil peptidasa IV es una proteína de superficie celular multifuncional relacionada a tumorigénesis y metástasis se expresa de manera aberrante en cáncer de colon asociado a células progenitoras de cáncer (9).

1.3.5 GLi-1

Esta proteína forma parte de la vía hedgehog la cual regula varios genes esenciales para la transcripción en la progresión tumoral se ha identificado esto en cáncer de mama en el cual la presencia de este oncogén se asocia a mayor número de

nódulos linfáticos axilares positivos y en relación al tamaño de la tumoración (10), en cáncer de colon se asocia a mayor agresividad clínica así como a metástasis a nódulos linfáticos (11) (12).

1.3.6 ALDH1A1

El aldehído deshidrogenasa es una enzima encargada de la oxidación intracelular de los aldehídos la cual se ha utilizado como factor pronóstico en diferentes tipos de cáncer entre ellos en cáncer de colon (13).

1.4 Relevancia de los marcadores moleculares para detección de células progenitoras de cáncer.

Si bien la presencia de estos marcadores de manera individual prometen la detección de células progenitoras de cáncer de colon la realidad es que de manera individual no se expresan en la totalidad de los pacientes esto debido a la heterogeneidad genética de la patología se plantea entonces la búsqueda en conjunto de estos marcadores haciendo énfasis en la expresión de más de 2 de estos marcadores para que sea factible determinar la presencia de células progenitoras de cáncer. Se plantean múltiples combinaciones entre estos marcadores, las reportadas con mayor frecuencia son CD44+/EpCAM así como EpCAM/CD166 ambas combinaciones relacionadas a estas células aunado a la expresión de ALDH1A1, CD26 y GLi-1 (14). Dentro de la hipótesis de las células progenitoras de cáncer se propone la identificación de estas células para realizar pruebas de diagnóstico temprano, identificar pacientes con riesgo alto de recidiva posterior a manejo quirúrgico y terapia adyuvante, y/o resistencia a quimioterapia así como a la aparición temprana de metástasis, se plantea además que si en efecto este tipo de células es la causa de cáncer significaría que el uso de terapia

especifica en contra de estas células proveerían una mejor sobrevida y en el mejor de los casos curación, sin embargo de momento se plantea el uso de estos marcadores para determinar que pacientes están en riesgo de recidiva y/o aparición de metástasis de manera temprana, y así llevar un control más estricto en estos pacientes. (15)(16)(17).

CAPITULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Planteamiento del problema

¿Existe expresión de marcadores moleculares para detección de células progenitoras de cáncer en población sana de sonora?

2.2 Hipótesis

No existirá expresión de marcadores moleculares para la detección de células progenitoras de cáncer en individuos sanos de Hermosillo, Sonora, México.

2.3 Objetivo

General: Detectar la expresión de marcadores moleculares para células progenitoras de cáncer (CD44, CD166, CD26, EpCAM, GLi-1, ALDH1A1) mediante la técnica de PCR en 10 muestras de suero sanguíneo de individuos de Hermosillo, Sonora, México.

2.4 Justificación

Se considera necesaria la búsqueda de nuevos métodos para diagnóstico temprano en cáncer de colon, el uso de nuevos marcadores moleculares para la detección de células progenitoras de cáncer ha ganado importancia en los últimos años sin embargo aún no se ha establecido su uso como herramienta diagnóstica a pesar de que se le atribuye a esta línea celular el inicio de las patologías neoplásicas, las pruebas para detección de esta línea celular no se utiliza como herramienta diagnóstica, de momento su utilidad es para determinar pronóstico en pacientes con diagnóstico de cáncer de colon.

2.5 Diseño

Prospectivo, transversal, descriptivo.

2.6 Grupo de estudio

10 pacientes referidos como sanos.

2.7 Tamaño de la muestra

Este estudio se realizó en Julio 2013 en la recolección de información y muestras, se integraron 10 individuos, esta muestra se tomó a juicio del investigador.

2.8 Criterios de inclusión

Se incluyeron 10 individuos mayores de 50 años sin antecedentes patológicos.

2.9 Criterios de exclusión

Se excluyeron aquellos individuos diagnosticados con cáncer en cualquier órgano o en estudio por probable patología neoplásica.

2.10 Criterios de eliminación

Se excluyeron aquellos individuos que no se presentaron a la cita para toma de muestra.

2.11 Cedula de recolección de datos

Se registraron las variables demográficas: Sexo y edad.

2.12 Descripción general del estudio

Se seleccionaron 10 individuos referidos como sanos mayores de 50 años sin antecedente de haber padecido cáncer.

Se utilizó sangre obtenida por punción venosa obteniendo una cantidad 3 mL con una jeringa. La sangre extraída se depositara en tubos Tempus™ Blood RNA Tubes y se agitará de manera manual o con vortex por 10 segundos y se almacenara en condiciones de 0°C a -20°C hasta que se procese la muestra.

Se descongelo la sangre a temperatura ambiente (\pm 15 min) y se colectaran 500 μ L con una pipeta a un tubo de 1.5 mL y se realizara la extracción de RNA utilizando el kit Stabilized Blood-to-CT™ Nucleic Acid Preparation Kit for qPCR siguiendo el protocolo de fábrica. Posterior a la extracción el producto se almacenara a -20°C hasta la conversión de RNA a cDNA.

Se descongelo el producto de la extracción de RNA a temperatura ambiente (\pm 15 min) y se utilizara el kit High Capacity RNA-to-cDNA™ según protocolo de fábrica y se almacenara producto a -20°C hasta el análisis con cebadores específicos.

Se amplificaron la presencia de los siguientes genes: ALCAM/CD166, ALDH1A1, CD44, DPPIV/CD 26, EpCAM/TROP1, GLI-1; mediante el kit Colon Cancer Stem Cell Multiplex (Cat # MG-0012) de Signosis Inc. (Sunnyvale, CA) utilizando el protocolo de fábrica.

Las condiciones de termociclador serán: 94°C por 30 seg, 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 58°C por 30 seg y 72°C por 30 seg, 72°C por 5 min.

Almacenar productos a -20°C.

Se cargaron 10 μ L de producto de PCR y 1 μ L de Buffer de Carga 1X (azul de bromofenol) en gel de agarosa (BIORAD) 1.5%. Se realizara electroforesis a 80W por 30 min y se teñirá gel con GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (incubación en lugar oscuro por 30 min). Los productos se visualizaron con un transiluminador a 302 nm. Tamaño de productos esperados: CD166 - 300 kb, ALDH1A1 - 200 kb, CD44 - 400 kb, CD26 - 100 kb, EPCAM/Trop1 - 600 kb y GLI-1 - 160 kb (kb=kilobases).

2.13 Análisis de datos

Se realizó la relación de edad, sexo y frecuencia de expresión de marcadores moleculares entre la población estudiada con el programa Microsoft Office Excel®.

1. RESULTADOS DESCRIPTIVOS

Se lograron amplificar los productos esperados en 4 muestras (40%) del total (fig.1). El marcador ALDH1A1 se presentó en cuatro muestras, siendo este el que se presenta con mayor frecuencia, el CD26 en tres muestras, el CD166 en una muestra así como CD44 (Tabla 1).

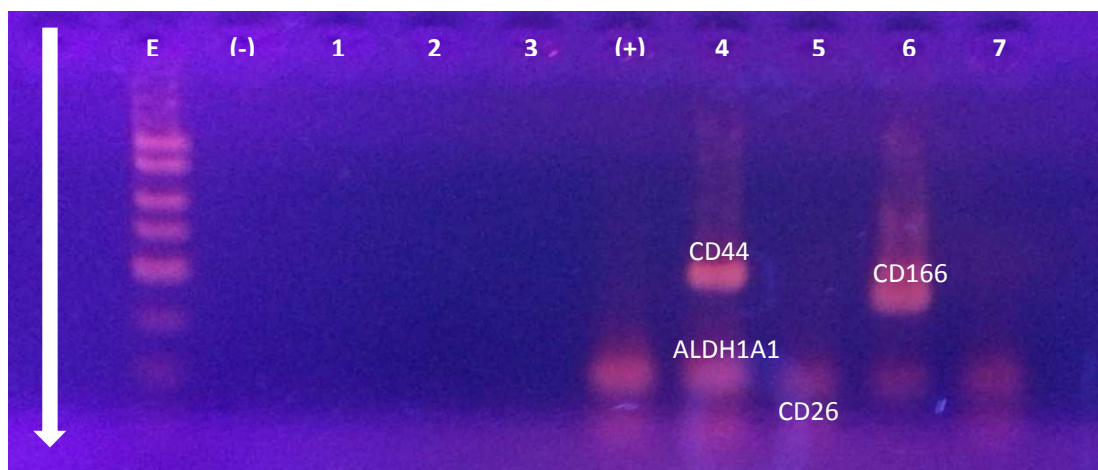
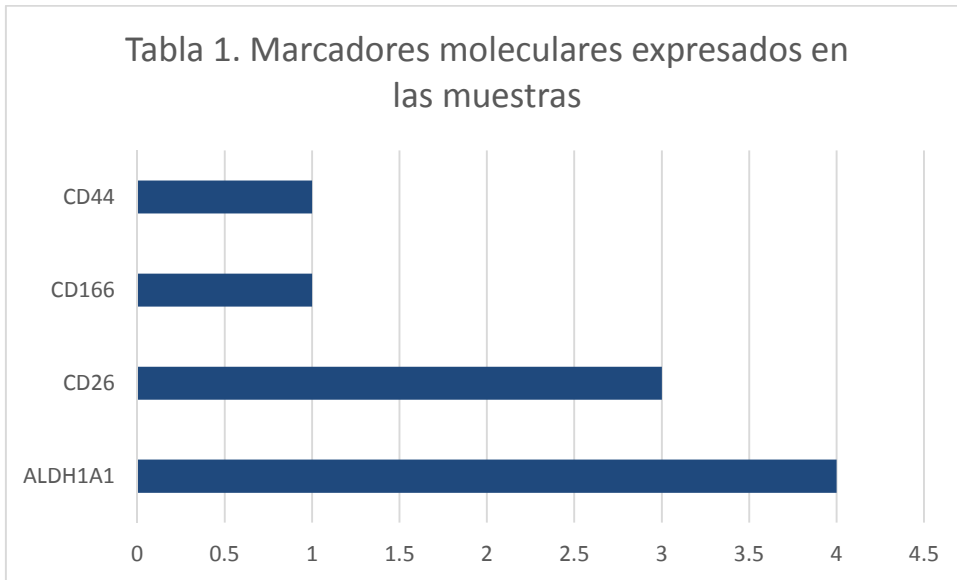
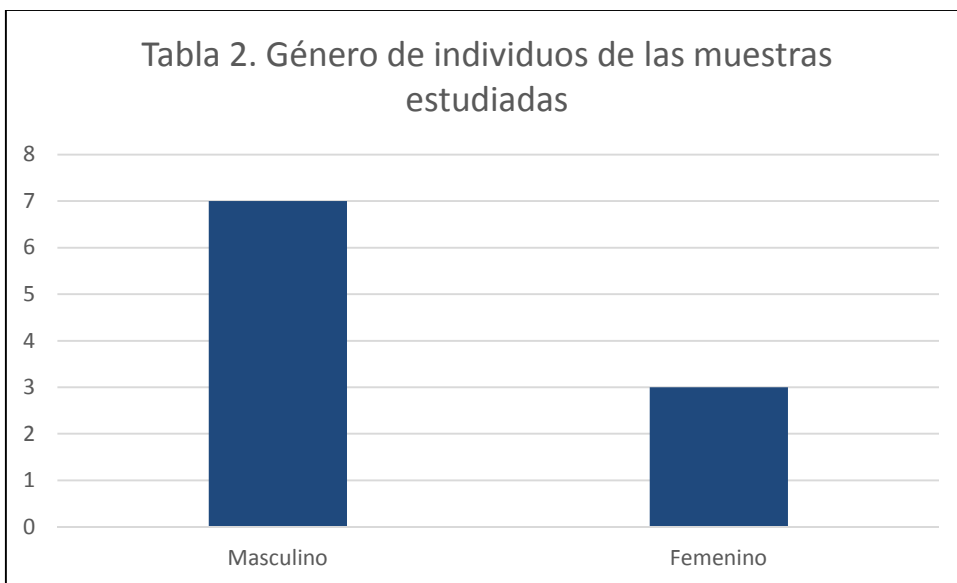
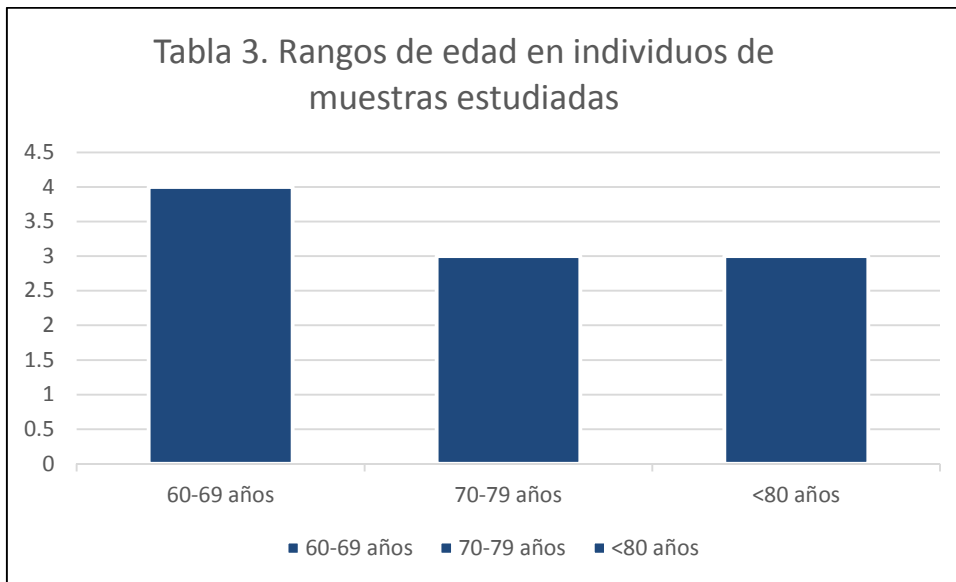


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa 1.7% a 80V por 30 min teñido con GelRed™ Nucleic Acid Stain. (E) Escalera Norgen PCRSizer 100 bp DNA Ladder Norgen Biotek Corp., (-) control negativo, (1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7) muestras, (+) control positivo.



Los individuos seleccionados en este estudio fueron en su mayoría del sexo masculino (7/10) (Tabla 2). La mayoría de los individuos tenían una edad en el rango de 60-69 años (40 %) (Tabla 3).





2.14 Recursos

Humanos: 5 pacientes diagnosticados con cáncer de colon, 5 pacientes sanos, medico cirujano asesor, médico residente de cuarto año de cirugía general, servicio de enfermería, asesor metodológico, laboratorio North Genetics para el proceso de la muestra.

Financieros: Sera autofinanciada.

Materiales: Tubos Tempus™ Blood RNA Tubes, kit Stabilized Blood-to- CT™ Nucleic Acid Preparation Kit for qPCR, kit High Capacity RNA-to-cDNA™, kit Colon Cancer Stem Cell Multiplex (Cat # MG-0012) de Signosis Inc. (Sunnyvale, CA), azul de bromofenol, gel de agarosa 1.5%, GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, termociclador y transiluminador.

2.15 Aspectos éticos

Se solicitó a los individuos seleccionados su firma de consentimiento informado, se les explicara a los individuos el procedimiento, toma de muestra a través de punción venosa.

CAPITULO III DISCUSIÓN, CONCLUSIONES y RECOMENDACIONES

3.1 DISCUSIÓN

La teoría de las células progenitoras de cáncer es ampliamente aceptada rompiendo el paradigma y suplantando el modelo estocástico el cual proponía que cualquier célula tumoral tiene la capacidad para iniciar nuevos tumores. El modelo actual de las células progenitoras de cáncer propone a esta línea celular con 3 características principales autorenovación, diferenciación e inmortalidad, sin embargo además presentan una resistencia inherente a la quimioterapia. Esto demostrado en múltiples estudios en los que han logrado aislar esta línea celular e iniciar tumores en ratones inmunocomprometidos a través de xenoinjertos convirtiéndose este método como el estándar de oro para la detección de estas células, observando además que efectivamente la quimioterapia convencional no logra erradicar esta línea celular. La implicación terapéutica es prometedora de encontrar una terapia que efectivamente elimine esta línea celular se podría entonces hablar de curación tomando en cuenta que esta línea celular tiene la capacidad de iniciar tumores su eliminación significaría sobrevida libre de enfermedad, ya que con la terapia actual la sobrevida a 5 años es del 64%, algunos autores incluso van más allá y proponen una reversión de la masa tumoral al eliminar esta línea celular, la implicaciones terapéuticas aún no han sido confirmadas sin embargo en la actualidad la detección de esta línea celular se ha asociado a un mal pronóstico.

Si bien se reportan múltiples estudios sobre esta línea celular no hay un consenso sobre el uso de marcadores moleculares para su detección, en cáncer de colon se propuso el CD133 como el primer marcador sin embargo se descubrió que su expresión va en relación a mutaciones en los oncogenes K-RAS y B-RAF, no se ha encontrado hasta el momento un solo marcador que posea la cualidad de detectar por si solo esta línea celular y en su mayoría son marcadores de superficie celular algunos incluso se expresan en tejido sano debido a la transición epitelio-mesénquima, en la que células epiteliales se transforman en células migratorias lo cual se observa en principalmente en tumores pero también en procesos como fibrosis y cicatrización momentos en los cuales existe señalización similar a etapas

embrionarias pudiendo generar falsos positivos, entonces se plantea el uso de múltiples marcadores y determinar la presencia de esta línea celular en la coexpresión de estos. La mayoría de estos marcadores no son específicos a cada tumoración pudiendo expresarse en diferentes neoplasias sin embargo en cáncer de colon los más utilizados son: CD44, CD166, CD26, EpCAM, GLi-1, ALDH1A1, ALDH1B1, LGR5 y CD24 (En este estudio se utilizaron los primeros 6 como parte de un múltiplex) y en los reportes sobre esta línea celular en cáncer de colon se reporta mayor especificidad en la coexpresión de CD44 y ALDH1A1.

Actualmente aún hay muchas dudas sobre esta línea celular, y aun no se comprueban las implicaciones terapéuticas de su existencia sin embargo en la actualidad si se ha demostrado que su identificación conlleva a un pobre pronóstico en los pacientes.

En cuanto a su utilidad como prueba para diagnóstico temprano en cáncer de colon como se reporta en este estudio hay expresión incluso en individuos referidos como sanos, lo cual puede significar la existencia de enfermedad neoplásica o que en el momento de la toma de muestra haya existido señalización similar a las encontradas en etapas embrionarias. Además su pobre especificidad en cuanto a detección de neoplasias específicas hacen estas pruebas inadecuadas para detección oportuna, ya que si bien su expresión puede significar presencia de enfermedad neoplásica, su expresión haría necesario la búsqueda del sitio de lesión generando un costo económico igual o mayor a los métodos de detección disponibles actualmente.

3.2 CONCLUSIÓN

Existe expresión de marcadores moleculares para detección de células progenitoras de cáncer en individuos referidos como sanos.

Se necesita realizar más estudios para determinar si en aquellos individuos en los que hubo expresión de estos marcadores presentan enfermedad neoplásica o si la expresión de estos marcadores represento falso positivo.

3.3 RECOMENDACIÓN

No se recomienda el uso de estos marcadores como prueba diagnóstica única ya que es necesario realizar pruebas adicionales confirmatorias para procesos neoplásicos.

Consentimiento informado.

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL USO DE MUESTRA DE SANGRE CON FINES DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

Este documento tiene como objeto solicitar su autorización escrita para la donación gratuita de la muestra de sangre, con el fin de utilizarla en investigación biomédica relacionada con nuevos marcadores para cáncer de colon, que entienda su contenido y el objeto de la misma y que, en su caso, haga todas las preguntas que crea preciso acerca de la misma.

Usted como paciente puede donar su muestra para que pueda ser utilizada en investigación sobre nuevos marcadores para cáncer de colon, la finalidad de la donación es dotar a los investigadores de sangre para investigar la prevalencia de nuevos marcadores para cáncer de colon y para disponer en un futuro de mejores herramientas predictivas y terapéuticas.

Finalidad y descripción del proceso de obtención de muestras biológicas

El tipo de muestra será sangre periférica: su obtención es en principio un procedimiento exento de riesgo, y sus posibles complicaciones son las mismas que las de cualquier extracción de sangre habitual.

La donación de esta muestra es voluntaria por lo que, si Ud. da el consentimiento para su uso, en cualquier momento puede revocarlo. En caso de producirse esta revocación ello no supondrá ningún cambio en la relación con su médico ni perjuicio alguno en su diagnóstico /tratamiento y/o seguimiento. En caso de revocación su muestra dejará de formar parte de la investigación aunque los datos obtenidos hasta ese momento sí formarán parte de la misma.

La donación tiene por disposición legal carácter altruista, por lo que Ud. no obtendrá ni ahora ni en el futuro ningún beneficio económico por la misma. No está previsto compensarle por los productos desarrollados a partir de esta investigación. En todo caso, Ud. renuncia a cualquier beneficio económico que pudiera corresponderle en el futuro y que sea, lógicamente, renunciabile. Tampoco obtendrá ningún otro beneficio directo como resultado de su participación en este estudio. Sin embargo, los conocimientos obtenidos gracias a los estudios llevados a cabo a partir de su muestra y de muchas otras pueden ayudar al avance médico y, por ello, a otras personas.

Los datos personales que se recojan sobre Ud., serán confidenciales por lo que cualquier relación entre la muestra y su identidad personal tienen carácter estrictamente confidencial. Asimismo, se informa que los resultados obtenidos de los diferentes estudios llevados a cabo con las muestras, pueden ser publicados en revistas científicas, sin embargo, nunca será facilitada su identidad o datos que le identifiquen o puedan llegar a identificarle.

Yo, _____ En calidad de donante, declaro bajo mi responsabilidad que:

(1) He recibido y leído la Hoja de Información para el donante relativo al procedimiento para la obtención de la muestra de sangre.

(2) He recibido y entendido suficiente la información sobre el proceso de obtención, procesamiento y posterior eventual aplicación de la muestra objeto del presente consentimiento.

(3) He podido hacer preguntas sobre el destino, pruebas y tratamiento al que será sometida la muestra, y he obtenido respuestas satisfactorias y completas.

Fecha _____

Firma _____

Testigo _____

Firma de testigo _____

Tabla 1. Clasificación TNM en cáncer colorrectal (AJCC)

Tumor primario (T)	
Tx	Tumor primario no evaluable
T0	Sin evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor invade la submucosa
T2	Tumor invade la muscular propia
T3	Tumor invade la grasa perirrectal
T4a	Tumor penetra la superficie del peritoneo visceral
T4b	Tumor invade o se adhiere a órganos o estructuras adyacentes
Linfonodos regionales (N)	
Nx	No se puede determinar
N0	Sin linfonodos comprometidos
N1	Compromiso de 1-3 linfonodos
N1a	Compromiso de 1 linfonodo
N1b	Compromiso de 2-3 linfonodos
N1c	Depósitos tumorales en subserosa, mesenterio, tejidos pericólico o perirrectal no cubiertos por peritoneo
N2	Compromiso de 4 o más linfonodos
N2a	Compromiso de 4 - 6 linfonodos
N2b	Compromiso de 7 o más linfonodos
Metástasis a distancia (M)	
M0	Sin metástasis a distancia
M1	Con metástasis a distancia
M1a	Metástasis confinada a un órgano o sitio
M1b	Metástasis en más de un órgano o sitio

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- GLOBOCAN 2008 <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp#BOTH>
- 2.- Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA (2000) Cancer statistics, 2000. *CA Cancer J Clin* 50: 7–33.
- 3.- Marisa L, de Reynie`s A, Duval A, Selves J, Gaub MP, et al. (2013) Gene Expression Classification of Colon Cancer into Molecular Subtypes: Characterization, Validation, and Prognostic Value. *PLoS Med* 10(5): e1001453. doi:10.1371/journal.pmed.1001453.
- 4.- Bonnet D and Dick JE. (1997) Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3:730-7. PubMed 9212098.
- 5.- Kristel Kemper et al. Mutations in the Ras–Raf Axis Underlie the Prognostic Value of CD133 in Colorectal Cancer *Clin Cancer Res* 2012;18:3132-3141.
- 6.- Ying-Jhen Su, Hsin-Mei Lai, Yi-Wen Chang, Guan-Ying Chen and Jia-Lin Lee (2011) Direct reprogramming of stem cell properties in colon cancer cells by CD44. *The EMBO Journal* 30, 3186–3199.
- 7.- Paola Zanna, Marco Trerotola, Giovanna Vacca, Veronica Bonasera, Barbara Palombo, et al. (2007) Trop-1 Are Conserved Growth Stimulatory Molecules That Mark Early Stages of Tumor Progression *American Cancer Society* DOI 10.1002/cncr.22785.
- 8.- Wiechert et al. ALCAM/CD166 is overexpressed in colorectal carcinoma and correlates with shortened patient survival. *J Clin Pathol* 2004;57:1160-1164.
- 9.- Tan et al. Adenosine downregulates DPPIV on HT-29 colon cancer cells by stimulating protein tyrosine phosphatase(s) and reducing ERK1/2 activity via a novel pathway. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006 vol. 291 no. 3 C433-C444.
- 10.- Ten Haaf A, Bektas N, von Serenyi S, et al. Expression of the glioma-associated oncogene homolog (GLI) 1 in human breast cancer is associated with unfavourable overall survival. *BMC Cancer*. 2009; 25:298.

- 11.- Xu M, Li X, Liu T, et al. Prognostic value of hedgehog signaling pathway in patients with colon cancer. *Med Oncol*. 2011; doi: 10.1007/s12032-011-9899-7.
- 12.- Yin-lu Ding, Yong Zhou, et al. Expression of Glioma-associated Oncogene Homolog 1 is Associated with Invasion and Postoperative Liver Metastasis in Colon Cancer. *International journal of medical sciences* 2012; 9(5):334-338.
- 13.- O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice *Nature*. 2007; 445:106–110.
- 14.- Piero Dalerba, Scott J. Dylla, et al. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 June 12; 104(24): 10158–10163.
- 15.- Russell C. Langan, John E. Mullinax, Itzhak Avital, et al. A Pilot Study Assessing the Potential Role of non-CD133 Colorectal Cancer Stem Cells as Biomarkers. *Journal Of Cancer* 2012; 3: 231-240.
- 16.- Armin Gerger, Wu Zhang, Dongyun Yang, et al. Common Cancer Stem Cell Gene Variants Predict Colon Cancer Recurrence. *Clin Cancer Res* 2011;17:6934-6943.
- 17.- Kemper et al. Molecular identification and targeting of colorectal cancer stem cells. 2010 *Oncotarget*, October, Vol.1, No 6.
- 18.- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414:105–111.
- 19.- Maenhaut C, Dumont JE, Roger PP, van Staveren WC. Cancer stem cells: a reality, a myth, a fuzzy concept or a misnomer? An analysis. *Carcinogenesis*. 2010;31:149–158.
- 20.- Maria Ausiliatrice Puglisi, Valentina Tesori, Wanda Lattanzi. Colon cancer stem cells: Controversies and perspectives. *World J Gastroenterol*. 2013 May 28; 19(20): 2997–3006.