



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

EVALUACIÓN DE LA HETEROGENEIDAD INTRATUMORAL
EN POBLACIONES CELULARES
DE UN MODELO *in vivo* DE CANCER COLORRECTAL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA:

MARIA FERNANDA LARGO FERNANDEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. FELIPE VACA PANIAGUA



Los Reyes Iztacala, Edo. de México 2018.





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.

Dedicatoria

A mi familia por ser mi apoyo e impulsarme siempre a ser la mejor.

A mi padre por ser mi ejemplo, por ser mi maestro todas esas tardes que nos sentábamos a estudiar en la biblioteca, por haberme inculcado el valor de la perseverancia y despertado en mí la curiosidad científica. Gracias por tu paciencia y amor. Te amo papá.

A mi madre, eres un pilar de mi vida, mi ejemplo de una mujer fuerte que siempre lucha por sus sueños. Gracias por tu amor, dedicación y apoyo en cada paso de mi vida. Te amo mamá.

A mi hermana Eloísa por ser mi compañera de vida y mi mayor inspiración a ser mejor cada día.

A mi abuelita Carmen por su amor y dedicación, eres mi segunda madre.

Agradecimientos

Al doctor Felipe Vaca, por haberme aceptado en su equipo de trabajo y confiado en mí para el desarrollo de este proyecto, por su dirección y apoyo total para la elaboración de este trabajo.

Dra. Clara por sus invaluable consejos que apoyaron y enriquecieron no solo este trabajo, también mi crecimiento profesional.

Al doctor Efraín Olguín por su apoyo y asesoría con la técnica de citometría de flujo.

A los profesores José del Carmen Benítez y Ma. Del Rosario Gonzáles Valle por haberme aceptado como miembro del laboratorio de Histología de la UMF, por sus consejos y su apoyo que enriquecieron mi crecimiento profesional y el desarrollo de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio: Stef, Karla, Ernesto, Hector, Rosie, Pao, Boni y Cristal por su amistad, en especial a Ernesto por su valioso apoyo y asesoría para llevar a cabo este trabajo.

A mis amigos del laboratorio de histología: Alejandro, Hector y Frank por todas esas risas y su valiosa amistad.

A mis amigas: Irma, Sandra, Cristina, Astrid y Leslie por sus consejos y siempre sacarme una sonrisa en aquellos momentos cuando pensaba que no podía más. Las quiero mucho.

A mis colegas del grupo 51 por haberme aceptado como una más de su grupo y esas tardes tan divertidas que pasamos.

A Pepe por ser mi compañero en este gran viaje, por tus consejos y no soltar mi mano por más oscuro que se puso el camino. Gracias por tu apoyo incondicional y tu cariño. Eres mi equipo.

El científico no tiene por objeto un resultado inmediato. El no espera que sus ideas avanzadas sean fácilmente aceptadas. Su deber es sentar las bases para aquellos que están por venir, y señalar el camino.

Nikola Tesla

Tabla de contenido

INDICE DE FIGURAS.....	vii
Tabla de abreviaturas	xi
RESUMEN	xii
2. INTRODUCCIÓN	1
2.1 Cáncer.....	1
2.1.2 Definición	1
2.1.3 Epidemiología del cáncer	1
2.2 Cáncer colorrectal	4
2.2.1 Epidemiología del CCR	4
2.2.2 Factores de riesgo	5
2.2.3 Proceso de carcinogénesis colorrectal.....	6
2.2.4 Alteraciones moleculares del CCR.....	8
2.4. Heterogeneidad tumoral	16
3. ANTECEDENTES.....	24
4. JUSTIFICACIÓN.....	26
5. HIPOTESIS.....	27
6. OBJETIVOS	28
6.1 Objetivo general.....	28
6.2 Objetivos particulares	28
7. MATERIALES Y METODOS	29
7.1. Modelo AOM-DSS.....	29
7.2 Estandarización de la técnica de extracción de núcleos de muestras embebidas en parafina.....	32
7.2.1 Ajuste del número de cortes en las muestras.....	32
7.2.2 Desparafinación y rehidratación de los cortes de tejido.....	32
7.2.3 Disociación enzimática del tejido.....	32
7.2.4 Purificación de las muestras.....	33
7.2.5 Análisis de las muestras	33
7.2.6 Conteo del número de núcleos	33
7.2 Análisis y separación de núcleos en poblaciones por citometría de flujo.....	35
7.2.1 Ajuste de la concentración de núcleos y flourocromo en las muestras.....	35
7.2.2 Análisis estadístico del contenido de ADN en las poblaciones.....	35
8. Resultados	35
8.1 Estandarización de la técnica de extracción de núcleos de las muestras de tejido embebido en parafina	35
8.2 Análisis y separación de los núcleos en poblaciones subclonales en citometría de flujo..	38

9. Discusión	45
10. Conclusiones	51
11. Perspectivas	51
13. Literatura citada.....	52

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Incidencia y mortalidad del cáncer a nivel mundial (para ambos sexos).** Se muestra el porcentaje del número de casos durante el año 2012. Tomada de Globocan, 2012.2
- Figura 2. Incidencia y mortalidad del cáncer en México (para ambos sexos).** Se muestra el porcentaje del número de casos durante el año 2012. Tomada de Globocan, 2012.3
- Figura 3. Desarrollo tumoral.** Se esquematizan los pasos implicados en el proceso de tumorigénesis, iniciación, progresión y promoción tumoral. CAF: Fibroblastos asociados a cáncer; IMC: células mieloides inmaduras (Modificada de Barcellos-Hoff *et al.*, 2013).7
- Figura 4. El botón de las criptas colon contiene células madre replicativas con altos niveles de β -catenina.** Los niveles β -catenina son normalmente altos en esas células porque son señales Wnt paracrinas de células estromales. (Dentro de los enterocitos individuales en el botón de la cripta, la molécula de β -catenina migra al núcleo y se asocia con el factor de transcripción Tcf/Lef; esos conductores incrementan la proliferación de esas células y al mismo tiempo previenen su diferenciación). En el intestino normal (Lado izquierdo de la cripta), algunas de esas células progenitoras de esas células madre migran hacia arriba de la cripta sobre el lumen. Eso sucede porque decrementan los niveles de Wnt y los niveles intracelulares de APC incrementan; esos dos cambios en conjuntos dirigen el incremento en la degradación de β -catenina en enterocitos individuales, que resulta en el cese de la proliferación celular y el incremento de la diferenciación, al cabo de 3 a 4 días esas células irán a apoptosis (pequeñas flechas verdes). En contraste cuando la proteína APC se encuentra alterada (lado derecho de la cripta), los niveles de β -catenina se permanecen altos, aun en la ausencia de señales de Wnt, y proliferan, permanecen como células no diferenciadas (células moradas) que fallan en la migración y se acumulan dentro de la cripta y pueden generar un pólipo adenomatoso. Como indica una degradación mutante de β -catenina también puede producir el mismo problema (Tomada de Weinberg, 2013).9
- Figura 5. Representación esquemática de la Vía de señalización Wnt.** En la izquierda la vía de señalización está apagada en ausencia del ligando Wnt o cuando existen factores que inhiben la unión de Wnt al receptor de membrana Frizzled (Frz) o a los correceptores de baja densidad lipoteica (LRP), lo que promueve la fosforilación dual de β -catenina por CK1 y GSK3 y como consecuencia es degradada en el citoplasma por el complejo de destrucción B-Trcp. De lado derecho la vía de señalización está prendida con la estimulación del ligando Wnt mediante la unión al receptor Frz y LRP5/6 que induce la fosforilación de LRP6 por CK1 y GSK3 β y su conjunta translocación del complejo proteico Axina del citoplasma a la membrana plasmática. Dsh es reclutada a

la membrana para unirse a Fz y Axina por la LRP5/6. Ese complejo armado Fz/LRP5/6 induce la estabilización de β -catenina, la cual es translocada al núcleo y promueve la proliferación celular por la fosforilación y mutaciones en los genes APC y β -catenina causan desregulación en esta vía, promoviendo la hiperproliferación celular y diferenciación celular como un factor de transcripción (Tomada de (Komiyama & Habas, 2008)).10

Figura 6. Modelo descriptivo de la carcinogénesis de CCR. El desarrollo tumoral en el CCR inicia con una mutación en APC o CTNNB1 con frecuencias diferentes, seguida de una serie de alteraciones epigenéticas y mutaciones en los diferentes oncogenes y genes supresores de tumores que contribuyen en los diferentes estadios de la progresión tumoral hasta la formación del carcinoma *in situ* (Tomada y modificada de (Weinberg, 2013 y Subramaniam, Mizoguchi, & Mizoguchi, 2016)).13

Figura 7. Alteraciones genéticas alternativas durante la carcinogénesis del CCR. La pérdida de la función de APC representa un punto de inicio que es común en la mayoría de los tipos de CCR, seguida de otras posibles alteraciones que potencian la función de β -catenina en las primeras etapas de tumorigénesis e igualmente involucrados en la misma vía Wnt. Consecuentemente, se observan cambios genéticos alternativos en vía Ras-Raf-PI3K que funcionan como una alteración subsecuente que potencia la proliferación celular y sobrevivencia celular dentro del tumor. Posteriormente, existen alteraciones en genes involucrados en la vía TGF β que se relacionan con la vascularización y angiogénesis dentro del tumor. Para finalizar existen alteraciones opcionales dentro de la vía de señalización P53, las cuales están involucradas al error por reparación por daño al ADN. El porcentaje indica el número de casos de CCR que muestran alteraciones en estos genes (Cancer Genome Atlas Network, 2012). Tomada y modificada de (Weinberg, 2013).14

Figura 8. La gran diversidad genética y epigenética dentro de las células tumorales se expresa en un mosaísmo fenotípico único que les confiere a las células clonalidad y progresión (Tomada y modificada de Almendro, Marusyk, & Polyak, 2013).19

Figura 9. Modelo de evolución clonal del cáncer propuesto por Nowell en 1976. El círculo gris representa una célula normal, el punto central representa la mutación somática inicial que dirige la clona fundadora en el tumor. Los diferentes círculos de colores representan las subclonas que han acumulado mutaciones sucesivas. En el tumor primario coexisten diversas subclonas y aunque algunas se expandan otras se inactivan o extinguen. La metástasis se puede originar a partir de la clona inicial del tumor primario (metástasis 1), o de subclonas menores (metástasis 2). La metástasis además puede someterse a evolución clonal (como en la metástasis 1) (Modificada de Caldas, 2012).21

Figura 10. Modelos de evolución tumoral. Gradualismo (A) contra puntualismo (B). En la imagen A se observa el modelo de evolución gradual, la cual a partir de una mutación inicial A se desencadena la adquisición de mutaciones B, C, D, E y F, que a lo largo del tiempo genera una masa tumoral homogénea. En contraste, el modelo evolutivo del Big Bang, se observa en la imagen B) clonas iniciales en A, B, C, y D que generan a lo largo del tiempo subclonas con diferente frecuencia alélica, que enriquece la gran heterogeneidad dentro del tumor.22

- Figura 11. Activación metabólica del azoximetano.** El AOM es metabolizado por el hígado a través del citocromo P450, específicamente por la enzima CYP2E1 para producir MAM también es metabolizado por la luz del colon, el cual se conjuga con ácido glucorónico para generar MAM-GlcUA generando MAM, este compuesto es inestable por 12 horas, produciendo formaldehído y un ion metildiazonio, el agente carcinógeno que promueve la formación de CCR. En el colon se puede metabolizar el AOM debido a la presencia de la enzima P450 aunque a una concentración más baja que en el hígado (Tomado de Martínez, 2017).31
- Figura 12. Cámara de Neubauer vista a 100 aumentos (10x).**34
- Figura 13. Imagen de núcleos teñidos con Hoechst 33342. Las fotografías corresponden a los diferentes aumentos 10x, 20x, 40x y 60x respectivamente de la muestra de 3 horas y 18 horas.**36
- Figura 14. Gráfica del número de núcleos en los diferentes pesos de tejido 9.9 mg, 8 mg, 4 mg y 1 mg, en la muestra filtrada y la malla.** En la línea azul correspondiente a la muestra del filtrado se observa una tendencia creciente en de 0 a 5 mg de tejido; sin embargo, en este último punto se observa que la gráfica decae para aumentar en 10 mg. Por otra parte, la línea roja que representa gráficamente el conteo de núcleos en la muestra de la malla se ve menor concentración de núcleos en comparación con la muestra filtrada. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambas muestras con respecto a la media de núcleos obtenida ($P= 0.0034$; $P<0.05$).37
- Figura 15. Imagen de núcleos teñidos con Hematoxilina vistos a diferentes aumentos 4x, 10x, 20x y 40x respectivamente de la muestra filtrada a, b, c, d y la malla e, f, g y h.** 38
- Figura 17. Diagrama de dispersión de luz del contenido de ADN y ciclo celular de los núcleos aislados de tejido tumoral y tejido sano.** Ambos diagramas muestran los núcleos considerados dentro de los parámetros de la variante independiente $X=$ PerCP-W (tamaño) y la variable independiente $Y=$ PerCP-A (complejidad), se tomaron en cuenta los núcleos dentro de los intervalos de 50k a 250k de ambas variables. 15 a) Los núcleos considerados para la separación de las poblaciones del tejido sano fue el 7.05% del total de la muestra. En el tejido tumoral 15b) solo se consideraron el 27.1%.39
- Figura 18. Histogramas de las poblaciones aisladas de ambos tejidos: sano y tumoral.** Histograma 16 a muestra un pico adicional de lado izquierdo de G0-G1 con un incremento en la fracción de la fase S de un 9.47%, un $DI= 0.8$ y un $CV=12.4\%$. 16 b histograma de las poblaciones aisladas de tejido tumoral con el 2.95% de los núcleos en fase S, $DI=1.23$ y un $CV=10.4\%$40
- Figura 19. Diagrama de dispersión de luz del contenido de ADN y ciclo celular de los núcleos aislados de tejido sano.** Los diagramas a) 10 μ g de IP/mg de tejido, b) 25 μ g de IP/mg de tejido, c) 50 μ g de IP/mg de tejido y d) 100 μ g de IP/mg de tejido muestran los núcleos considerados dentro de los parámetros de la variante independiente $X=$ PerCP-W (tamaño) y la variable independiente $Y=$ PerCP-A (complejidad), se tomaron en cuenta los núcleos dentro de los intervalos de 50k a 250k de ambas variables. 17a) Los núcleos considerados para la separación de las poblaciones del tejido sano fue el 42.6% del total de la muestra. En diagrama 17b) solo

se consideraron el 39.1%, 47.5% fueron considerados en el diagrama 17c) y por último en la gráfica 17 d) se consideraron 16.2%.....42

Figura 20. Histogramas de las poblaciones aisladas del tejido sano por concentración de yoduro de propidio μg de IP/mg de tejido sano. La figura del inciso a) pertenece al histograma de la concentración de IP 10 $\mu\text{g}/\text{mg}$ tejido sano, la gráfica muestra un pico adicional de lado izquierdo de 2N, también muestra un incremento en la fracción 4N del 17.5%, $\text{DI}= 1.5$ y un $\text{CV}=23.5\%$. b) La imagen muestra el histograma correspondiente a la concentración 25 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tejido con el 21.5% de los núcleos en 4N, $\text{DI}=1.06$ y un $\text{CV}=21.5\%$. c) el histograma correspondiente a la concentración de IP 50 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tejido el cual presento el 9.04% de los núcleos en 4N con un $\text{DI}= 1.49$ y un $\text{CV}= 10.8\%$. d) Por último el histograma de la concentración de IP 100 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tejido con 11.3% de los núcleos en 4N, un $\text{DI}= 0.914$ y un $\text{CV}= 18.1\%$42

Figura 21. Diagrama de dispersión de luz del contenido de ADN y ciclo celular de los núcleos aislados de tejido tumoral. Los diagramas a) 10 μg de IP/mg de tejido, b) 25 μg de IP/mg de tejido, c) 50 μg de IP/mg de tejido y d) 100 μg de IP/mg de tejido muestran los núcleos considerados dentro de los parámetros de la variante independiente $X= \text{PerCP-W}$ (tamaño) y la variable independiente $Y= \text{PerCP-A}$ (complejidad), se tomaron en cuenta los núcleos dentro de los intervalos de 50k a 250k de ambas variables. 17a) Los núcleos considerados para la separación de las poblaciones del tejido sano fue el 42.6% del total de la muestra. En diagrama 17b) solo se consideraron el 39.1%, 47.5% fueron considerados en el diagrama 17c) y por último en la gráfica 17 d) se consideraron 16.2%.....43

Figura 22. Histogramas de las poblaciones aisladas del tejido tumoral por concentración de yoduro de propidio μg de IP/mg de tejido. La figura del inciso a) pertenece al histograma de la concentración de IP 10 $\mu\text{g}/\text{mg}$ tejido, muestra un incremento en la fracción de la fase S del 18.7%, $\text{DI}= 1.55$ y un $\text{CV}=14.9\%$. b) La imagen muestra el histograma correspondiente a la concentración 25 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tejido en el que se observa que el 8.39% de los núcleos están en fase S, $\text{DI}=0.93$ y un $\text{CV}=20.6\%$. El inciso c) muestra el histograma correspondiente a la concentración de IP 50 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tejido, el cual presentó el 11.5% de los núcleos en fase S con un $\text{DI}= 0.66$ y un $\text{CV}= 14.4\%$. d) Por último este inciso muestra el histograma de la concentración de IP 100 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tejido con 7.61% de los núcleos en fase S, un $\text{DI}= 1.09$ y un $\text{CV}= 20.4\%$43

Figura 23. Porcentaje de núcleos teñidos en las muestras de tejido sano y tejido tumoral correspondientes a las concentraciones de IP (μg) / concentración de tejido (mg). No existieron diferencias estadísticamente significativas entre ambas muestras en cuanto al porcentaje de núcleos teñidos ($P=0.1913$, $P>0.05$).44

Figura 24. Índice de ADN por concentración de IP en tejido sano y tumoral. No existieron diferencias estadísticamente significativas entre ambas muestras en cuanto al ID ($P=0.4735$, $P>0.05$)45

Tabla de abreviaturas

%	Por ciento
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AH	Ácido hialuronico
CCR	Cáncer Colorrectal
AOM	azoximentano
APC	Del inglés Adenomatous Poliposis Coli
CaCl ₂	Cloruro de calcio
CDU	Del inglés collagen digestion units
CIN	Del inglés Chromosomal instability
CTNNB1	Del inglés Catenin Beta 1
DSS	Disulfato de sodio
EDTA	Del inglés ethylenediaminetetraacetic acid
FAP	Del inglés familiar Adenomatous Poliposis
FCA	Focos de criptas aberrantes
HNPCC	Del inglés Hereditary nonpolyposis colorrectal cáncer
DI	Del inglés Index of DNA
INEGI	Instituto nacional de Geografía y estadística
IP	yoduro de propidio
ITH	Del inglés Intratumoral Heterogeneity
LOH	Loss of Heterozygosity
MAM	Metalazoximetanol
MAM-GICUA	Metilazoximetanol- β-D-glucopiranosiduronico.
MAPK	Del inglés mitogen-actived protein kinase
MMR	Del inglés mismatch repair
NGS	Del inglés Next generation sequencing
OMS	Organización mundial de la salud
PBS	Del inglés phosphate buffered saline
SNS	Del inglés Single Nuclei Sequencing
μL	Microlitro
μM	Micrometro

1. RESUMEN

El cáncer colorrectal (CCR) es un problema de salud pública, en el mundo y en nuestro país.

El desarrollo de esta enfermedad lleva alrededor de 10 a 20 años, lo que la hace un proceso largo, que conlleva la adquisición de múltiples alteraciones genéticas y epigenéticas, que les confiere a las células variación clonal o también llamada “heterogeneidad intratumoral” (ITH).

La ITH está relacionada con el relapso y supervivencia en los pacientes, debido a la variación clonal dentro de las neoplasias. El diagnóstico mediante métodos moleculares convencionales es complicado y no alcanzan a detectar alteraciones genéticas presentes en la masa tumoral en bajas frecuencias alélicas, implicadas en la resistencia a la terapia. Actualmente, se han desarrollado técnicas de análisis que permiten enriquecer la detección de estas mutaciones en baja frecuencia con valor diagnóstico, a través de la separación física en poblaciones de los núcleos de las células tumorales y la evaluación de la ITH por el contenido de ADN en las muestras, se puede realizar la caracterización genética célula por célula tumoral por métodos de análisis como es la secuenciación de un solo núcleo (SNS).

En el presente proyecto se evaluó el nivel de ITH, por medio de la estandarización de una técnica de extracción de núcleos de tejido embebido en parafina. Posteriormente, se realizó la separación física en poblaciones subclonales y el análisis de las poblaciones con base en su contenido de ADN.

Este trabajo permitirá analizar muestras tumorales de pacientes obtenidas de archivos de patología para definir sus niveles de ITH y alteraciones genéticas subclonales por métodos como la SNS.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Cáncer

2.1.2 Definición

El cáncer es un conjunto de enfermedades de origen genético, causadas por la acumulación de alteraciones en genes que controlan el crecimiento, división y muerte celular (National Cancer Institute, 2015). Esta, enfermedad se distingue por provocar cambios en la homeostasis celular, la expresión génica y un fenotipo heterogéneo (Grady and Markowitz, 2002, Ruddon, 2007, Hanahan & Weinberg, 2011 y Matchett & Lappin, 2014).

El desarrollo de esta patología es un proceso a largo plazo que toma alrededor de 20 a 30 años, donde ocurre la adquisición de alteraciones genéticas en genes conductores (Mut-Driver gene) y epigenéticas (Epi-Driver gene) (Vogelstein & Kinzler, 2015).

Tomando en consideración, las características antes mencionadas, el cáncer no puede ser tomado como una sola enfermedad: es un conjunto muy amplio de enfermedades, con más de 100 tipos diferentes; la mayoría toman el nombre del órgano o del tipo celular del que se originan (Nee, 2013).

2.1.3 Epidemiología del cáncer

2.1.3.1 Global

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo; es la segunda causa de muerte, después de las enfermedades cardiovasculares en países desarrollados y en los países en vías de desarrollo; figura entre las tres principales causas de muerte en adultos (WHO, 2008).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2008, estimó que un 12.5% del total de causas de muerte se atribuye al cáncer que supera al total de muertes ocasionadas por el virus de inmunodeficiencia humana, la tuberculosis y la malaria juntas.

Según el último informe de 2012 realizado por la OMS se estimó que existieron 8.2 millones de muertes y 14.1 millones de nuevos casos (Figura 1) (GLOBOCAN, 2012).

En los países en desarrollo y en los países de industrialización reciente, se observa las mayores tasas de aumento del cáncer. Se estima que en 2020 los casos de cáncer incrementarán un 50% por 15 millones de nuevos casos (GLOBOCAN, 2012).

En el año 2013 se estimaron 7.5 billones de personas diagnosticadas y 12 millones de personas muertas por este mal en todo el mundo (Siegel, Miller, & Jemal, 2016).

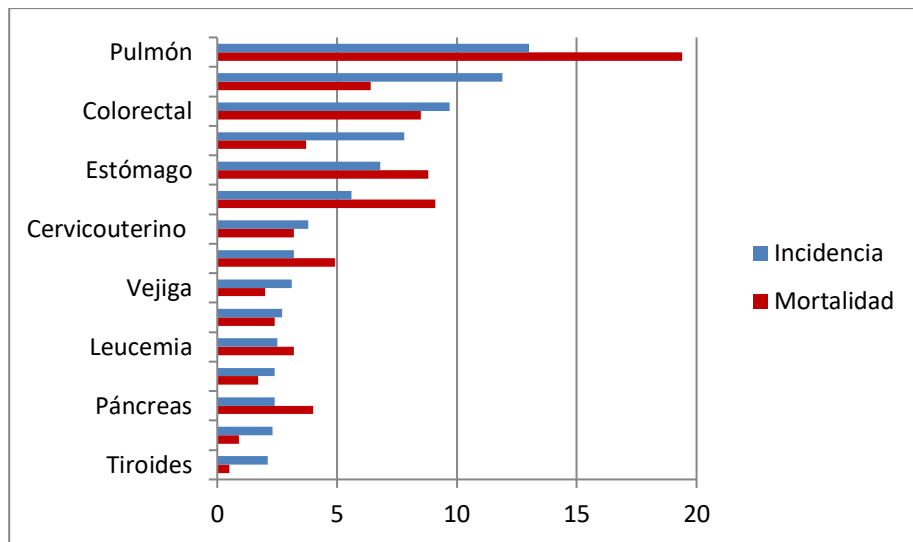


Figura 1. Incidencia y mortalidad del cáncer a nivel mundial (para ambos sexos). Se muestra el porcentaje del número de casos durante el año 2012. Tomada de Globocan, 2012.

2.1.3.2 México

Al igual que en el mundo, en México el cáncer se ha convertido en un problema de salud pública, el cual constituye la tercera causa de muerte a nivel nacional (Figura 2) (Globocan, 2012). En los últimos 30 años, entre 1980 y 2011 la tasa de mortalidad por cáncer creció un 56%, la cual pasó de un 39.5% a 61.7%, según datos de la Secretaría de Salud.

Pese a los esfuerzos de la Secretaría de Salud en diagnosticar y atender a las personas con cáncer, muchos mexicanos mueren por esta causa, cada año se suman 128 mil casos nuevos y el 60% son detectados en etapas avanzadas (SSA-SPPS, 2013).

En 2015 del total de defunciones en el país 85,201 personas fallecieron a causa de este mal, cifra que representa 13% del total de muertes registradas ese año (“Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI),” 2017.).

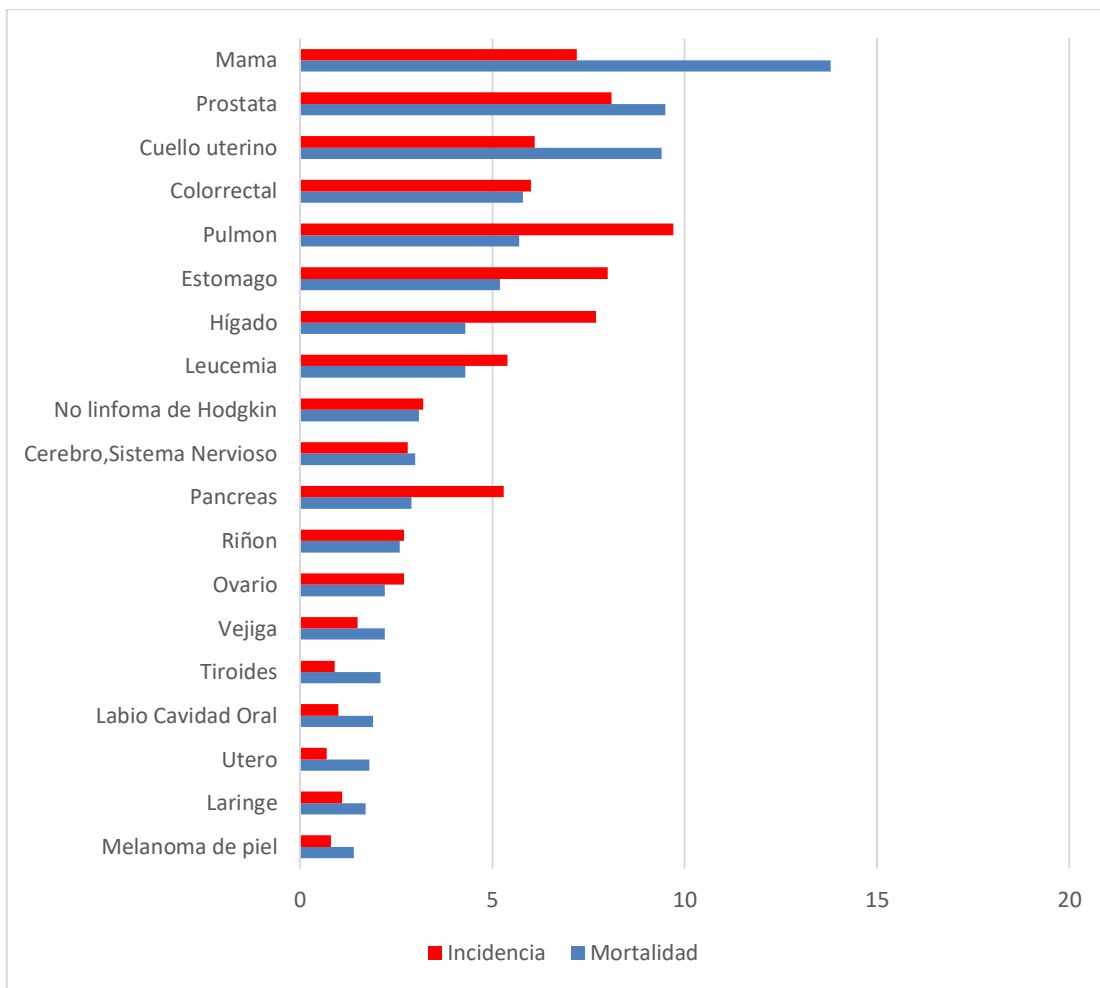


Figura 2. Incidencia y mortalidad del cáncer en México (para ambos sexos). Se muestra el porcentaje del número de casos durante el año 2012. Tomada de Globocan, 2012.

Los tipos de cáncer con mayor número de muertes son: el de mama (13.8%), próstata (9.5%), cuello uterino (9.4%) y colorrectal (5.8%) (Globocan, 2012).

2.2 Cáncer colorrectal

El cáncer de colon (CCR) es una enfermedad heterogénea y compleja. Que durante su desarrollo las células epiteliales gastrointestinales adquieren una serie de alteraciones genéticas y epigenéticas que le confieren avance selectivo en proliferación y renuevo celular (Pancione, Remo, & Colantuoni, 2012).

Se sabe que el CCR es un proceso que toma alrededor de 10 a 20 años, en el cual el epitelio se convierte en mucosa hiperproliferativa y posteriormente en un adenoma benigno, después en un carcinoma y por último en metástasis (Vogelstein et al., 1988).

2.2.1 Epidemiología del CCR

2.2.1.2 Global

En el último reporte realizado por la organización mundial de la salud (OMS), en el 2012, puntualiza que el CCR fue la segunda y la tercera neoplasia más común en hombres y mujeres respectivamente. En cifras: 614,304 mujeres (el 9.2% de todos los casos de cáncer) y 746,298 hombres (10% de todos los casos de cáncer) (GLOBOCAN, 2012).

En 2013, 771,000 personas murieron a causa del CCR, haciendo esta enfermedad la cuarta causa más común de muerte relacionada a cáncer en todo el mundo después de pulmón, hígado y estómago (GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators, 2015).

2.2.1.2 México

En México se estima que 3,995 mujeres (4.8% de todos los casos de cáncer) y 4,656 hombres (7.1% de todos los casos de cáncer) fueron diagnosticados con CCR, siendo en ambos casos el tercer cáncer más común en la población mexicana (Ferlay et al., 2015).

2.2.2 Factores de riesgo

Debido a la alta tasa de incidencia y mortalidad, se han caracterizado los factores de riesgo que provocan esta neoplasia (Hagggar & Boushey, 2009).

En el cáncer de colon al igual que la mayoría de otros tipos de cáncer, existen diversos factores ambientales y genéticos que actúan como causa y/o contribuyen al proceso tumorigénico (Hagggar & Boushey, 2009).

Dentro de los factores ambientales o factores adquiridos, se ha encontrado que el consumo de alcohol (Moskal, Norat, Ferrari, & Riboli, 2007; Seitz & Becker, 2007 y Secretan et al., 2009), una dieta rica en alimentos procesados y frituras (Santarelli, Pierre, & Corpet, 2008), el tabaco (Samowitz et al., 2006) y el estilo de vida (Giovannucci, 1995) pueden actuar en conjunto a la progresión tumoral del CCR.

Existen estudios que demuestran que los factores ambientales aportan el 90% o más al desarrollo del CCR y que solo el 10% es debido a la genética (Lichtenstein et al., 2000; Hemminki & Chen, 2004; Anand et al., 2008; Ferlay et al., 2010 y Hanahan *et al.*, 2011).

Algunos estudios se han enfocado en determinar el riesgo genético de contraer CCR por historia familiar, en específico se han centrado en entender la patogénesis y la genética de los tumores de colon asociados a la herencia (Kinzler & Vogelstein, 1998; Lynch & de la Chapelle, 2003; Jasperson, Tuohy, Neklason, & Burt, 2010).

El CCR usualmente ocurre en uno de tres patrones: esporádico, hereditario o familiar. Donde del 70% al 75% de los casos de CCR son esporádicos y aproximadamente del 20% al 25% ocurre en pacientes que tienen un familiar con cáncer de colon (Fuchs et al., 1994).

Un paciente es considerado de primer grado si tiene un familiar con historia de cáncer de colon, con pólipos de colon después de los 60 años y/o haber sido diagnosticado con uno o dos pólipos en alguna edad (Søndergaard, Bülow, & Lynge, 1991). Cerca del 30% de los casos de CCR son por algún componente hereditarios y solo el 5% de esos casos están asociados con la alta penetrancia de mutaciones de línea germinal clínicamente caracterizadas (Lichtenstein et al., 2000).

Dentro de los casos asociados a mutaciones con alta penetrancia de línea germinal se encuentra: el síndrome de poliposis adenomatosa familiar (FAP), el cual es un síndrome autosómico dominante, caracterizado por mutaciones en el gen *APC* que provoca truncaciones en la proteína APC. Estas alteraciones están asociadas al desarrollo de pólipos colónicos y algunos extra colónicos, que incluyen lesiones en la retina, osteomas, desmoides en la piel y tumores cerebrales (Jasperson, Patel, & Ahnen, 1993; Kinzler and Vogelstein, 1996). Individuos que padecen este síndrome tienen un riesgo del 90% a

desarrollar CCR en edades mayores a los 45 años en ambos sexos (Brensinger et al., 1998).

Existe otro síndrome autosómico dominante que predispone al CCR, llamado síndrome hereditario no polipósico (HNPCC), el cual presenta lesiones germinales en genes implicados en la reparación por daño al ADN (MMR) como: MLH1 (32%), MSH2 (39%), MSH6 (14%) PMS2 (15%), que promueven el desarrollo de adenomas no polipósicos en edades tempranas (Hewish et al., 2010; Rowley, 2005; Vilar and Gruber, 2010). Las personas portadoras de HNPCC tiene un riesgo del 40% al 80% a desarrollar CCR después de los 50 años (Lynch and de la Chapelle, 2003). Se ha visto que esta condición no solo influye en lesiones colonicas, sino también en la adquisición de neoplasias extracolonicas como en: endometrio, pelvis renal, uréter, estómago, intestino delgado, ovario, cerebro y tumores sebáceos (Lynch, 2017).

2.2.3 Proceso de carcinogénesis colorrectal.

Existen diversos estudios que han descrito las etapas de desarrollo del CCR, ellos definen tres estados de desarrollo neoplásico: a) iniciación, b) promoción y c) progresión (Fearon & Vogelstein, 1990).

La iniciación del tumor es el resultado de alteraciones genéticas y epigenéticas irreversibles en genes y proteínas que pueden estar asociados a proliferación celular, sobrevivencia y diferenciación (Pitot, 1993; Trosko, 2003).

En esta etapa de iniciación tumoral, las células pueden permanecer en estado latente durante semanas, meses o años; o pueden crecer de manera autónoma y clonal (Player *et al.*, 2004).

La promoción del tumor comprende la expansión clonal selectiva de células iniciales y la inhibición de la apoptosis (Barcellos-Hoff *et al.*, 2013), debido a que la tasa de acumulación de mutaciones es proporcional a la tasa de división celular en esta etapa, se produce una mayor población de células que presentan nuevos cambios genéticos (Holland-Frei *Cáncer Medicine*, 2003).

El siguiente paso es la progresión tumoral que se determina como un proceso donde las células neoplásicas adquieren el conocido fenotipo mutador, caracterizado por la adquisición de alteraciones genéticas en genes implicados en la estabilidad genética (Yao & Dai, 2014). Estas alteraciones llegan a incrementar considerablemente la tasa del proceso mutacional en puntos de inserción, delección, amplificación genética, re arreglo

cromosómico y ganancia o pérdida de algunos cromosomas (Loeb, 2001; Roschke & Kirsch, 2010).

Este fenotipo aberrativo en particular puede ayudar a la ganancia de un alto grado de variabilidad genética que está asociado a la selección de clonas por el micro ambiente tumoral y promueve el relapso y metástasis de los pacientes (Lengauer, Kinzler, & Vogelstein, 1998; Dixon y Kopras. 2004) (Figura 3).

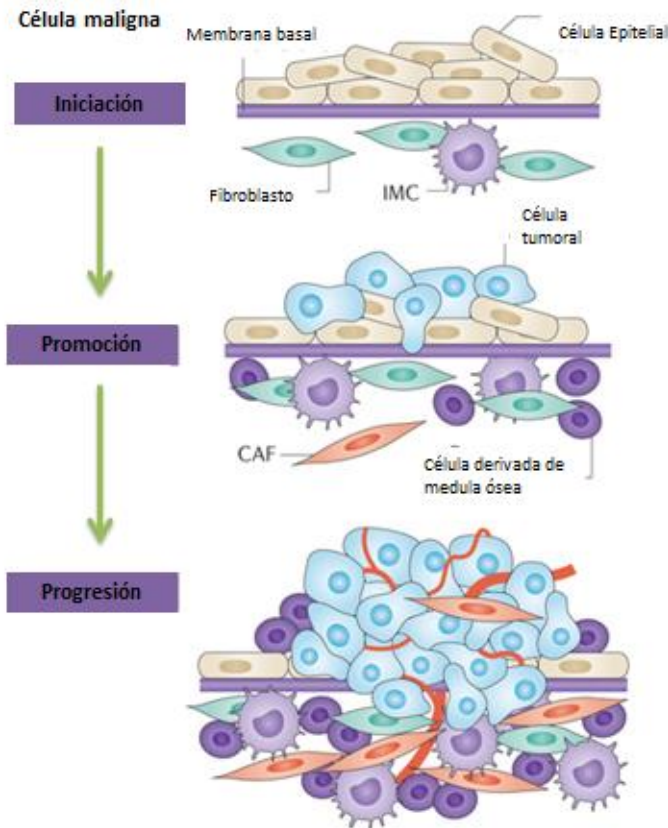


Figura 3. Desarrollo tumoral. Se esquematizan los pasos implicados en el proceso de tumorigénesis, iniciación, progresión y promoción tumoral. CAF: Fibroblastos asociados a cáncer; IMC: células mieloides inmaduras (Modificada de Barcellos-Hoff *et al.*, 2013).

El número de mutaciones que son necesarias para que una célula normal progrese a un cáncer avanzado, han sido sugeridos por modelos matemáticos basados en la relación entre la edad e incidencia, donde se propone que algunas neoplasias requieren seis o siete mutaciones en genes específicos (Nordling, 1953; Armitage y Doll, 1954).

2.2.4 Alteraciones moleculares del CCR

El CCR presenta alteraciones moleculares que participan en sus mecanismos de patogenicidad. Estas alteraciones se clasifican:

- 1) Mutaciones en genes supresores tumorales tales como: *APC*, *DCC*, *TP53*, *SMAD2*, *SMAD4*, *p16INK4*
- 2) Mutaciones en proto-oncogenes como: *K-ras* o *N-ras*
- 3) Mutaciones en genes encargados en la reparación del ADN como: MMR (genes de reparación por daño al ADN) y *MUTYH* (reparación por recombinación homóloga) (Worthley & Leggett, 2010).
- 4) Hipometilación localizada: Ocurre en regiones repetidas del ADN, como regiones satélite, centroméricas, pericentroméricas, yuxtacentroméricas, LINE y SINEs como las ALU (Feinberg & Vogelstein, 1983; Narayan et al., 1998; Qu, Dubeau, Narayan, Yu, & Ehrlich, 1999).
- 5) Hipermetilación global: la cual se ha visto que ocurre en promotores de genes como *APC*, *p16INK4a*, *TIMP3* y está asociada con el silenciamiento inapropiado de esos genes (Gonzalo et al., 2010; Ashktorab et al., 2014).

Las primeras alteraciones identificadas dentro de la carcinogénesis colorrectal son las del gen supresor tumoral *APC* (Diergaarde et al., 2007). Este gen está localizado en el cromosoma 5q21-q22 (Fearon & Vogelstein, 1990). Se han detectado alteraciones en este gen desde etapas muy tempranas en la tumorigénesis, cerca del 60% de ellas ocurren en ambos alelos del gen y son afectados por mutaciones puntuales o delección alélica en regiones codificantes (Laurent-Puig, Bérout, & Soussi, 1998).

Estas alteraciones llegan a provocar inactivación de la proteína APC en la vía de señalización Wnt, la cual tiene una función importante en la adhesión celular, migración celular, segregación cromosómica y en la apoptosis ocurrida en las criptas del colon (Fearon, 2011).

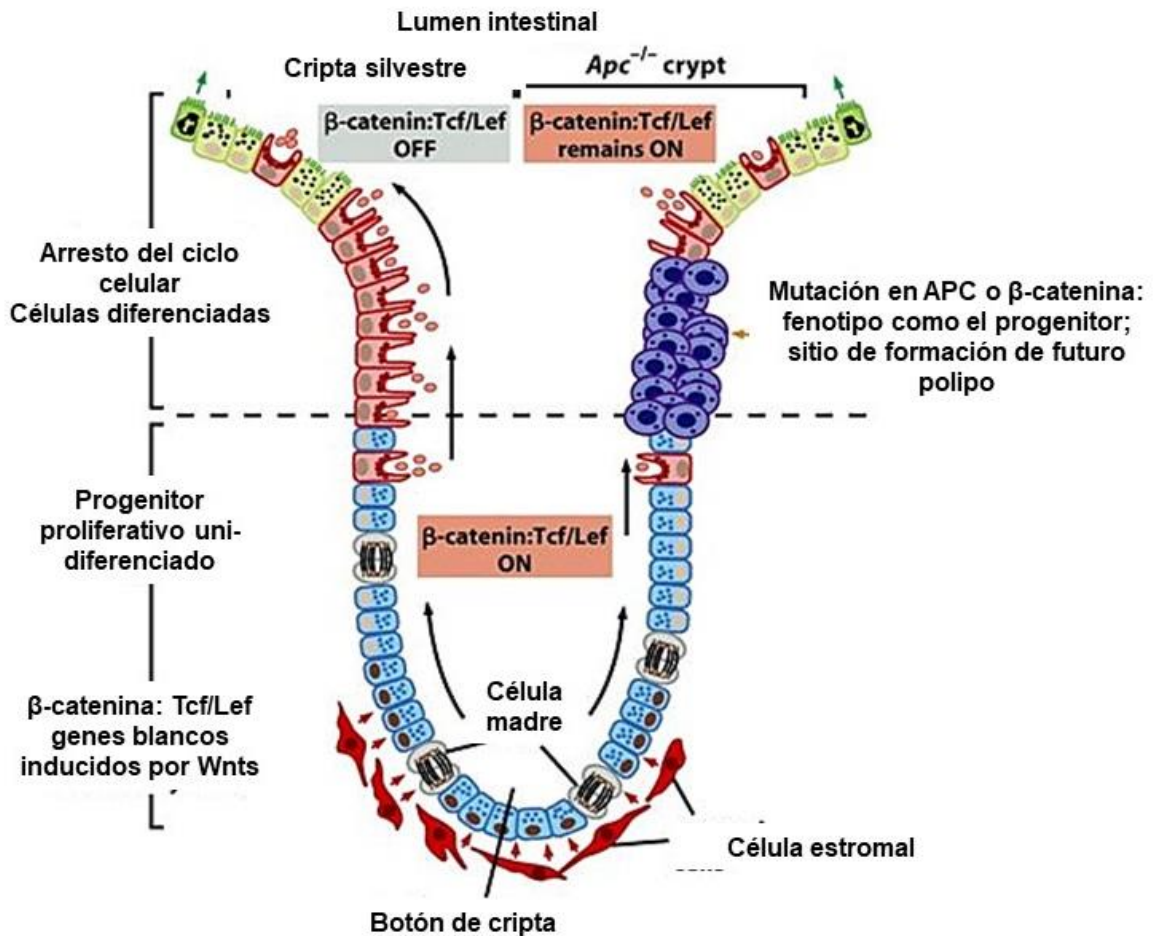


Figura 4. El botón de las criptas colon contiene células madre replicativas con altos niveles de β-catenina. Los niveles β-catenina son normalmente altos en esas células porque son señales Wnt paracrinas de células estromales. (Dentro de los enterocitos individuales en el botón de la cripta, la molécula de β-catenina migra al núcleo y se asocia con el factor de transcripción Tcf/Lef; esos conductores incrementan la proliferación de esas células y al mismo tiempo previenen su diferenciación). En el intestino normal (Lado izquierdo de la cripta), algunas de esas células progenitoras de esas células madre migran hacia arriba de la cripta sobre el lumen. Eso sucede porque decrementan los niveles de Wnt y los niveles intracelulares de APC incrementan; esos dos cambios en conjuntos dirigen el incremento en la degradación de β-catenina en enterocitos individuales, que resulta en el cese de la proliferación celular y el incremento de la diferenciación, al cabo de 3 a 4 días esas células irán a apoptosis (pequeñas flechas verdes). En contraste cuando la proteína APC se encuentra alterada (lado derecho de la cripta), los niveles de β-catenina se mantienen altos, aun en la ausencia de señales de Wnt, y proliferan, permanecen como células

uni diferenciadas (células moradas) que fallan en la migración y se acumulan dentro de la cripta y pueden generar un pólipo adenomatoso. Como indica una degradación mutante de β -catenina también puede producir el mismo problema (Tomada de Weinberg, 2013).

APC es un gen supresor tumoral que controla la proliferación celular y la diferenciación en el intestino. La función de *APC* en la vía de señalización canónica Wnt es regular los niveles intracelulares de B-catenina (CTNNB1) (Schneikert & Behrens, 2007).

En ausencia del ligando Wnt, *APC* interactúa con el andamiaje de la proteína Axina para promover la fosforilación secuencial por caseína cinasa 3 β (GSK-3 β) de β -catenina, blanco para su ubiquitinización y su subsecuente destrucción proteolítica (He, Semenov, Tamai, & Zeng, 2004).

La unión del ligando Wnt regula negativamente la unión del complejo Axina/*APC*/GSK3 a β -catenina, como resultado β -catenina se acumula en el citoplasma y se transloca al núcleo, donde se dirige la transcripción de múltiples genes implicados en la proliferación y diferenciación celular (Fearon, 2011; Pino y Chung, 2010) (Figura 4).

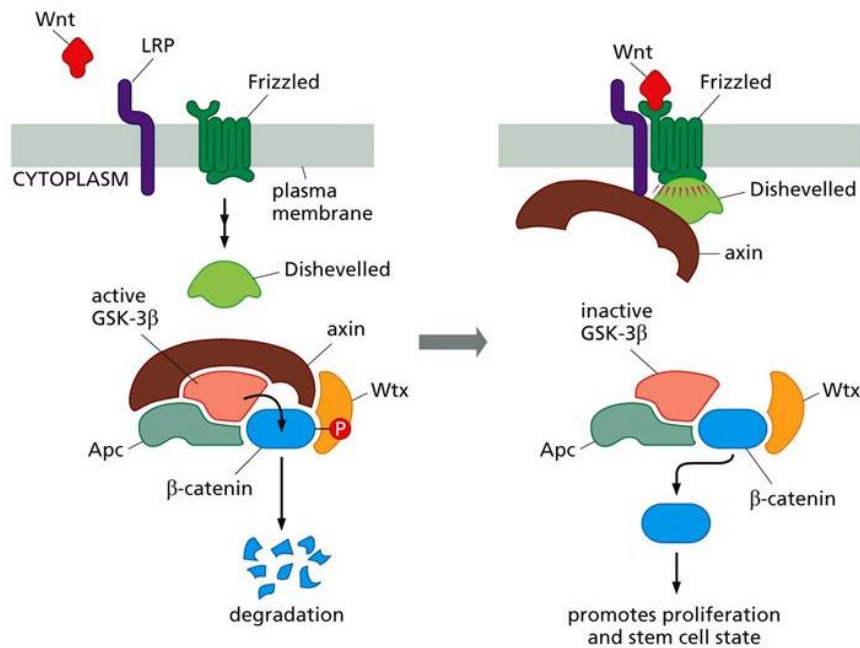


Figure 5.23 The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

Figura 5. Representación esquemática de la Vía de señalización Wnt. En la izquierda la vía de señalización está apagada en ausencia del ligando Wnt o cuando existen factores que inhiben la unión de Wnt al receptor de membrana Frizzled (Frz) o a los correceptores de baja densidad lipoproteica

(LRP), lo que promueve la fosforilación dual de B-catenina por CK1 y GSK3 y como consecuencia es degradada en el citoplasma por el complejo de destrucción B-Trcp. De lado derecho la vía de señalización esta prendida con la estimulación del ligando Wnt mediante la unión al receptor Fz y LRP5/6 que induce la fosforilación de LRP6 por CK1 y GSK3 β y su conjunta translocación del complejo proteico Axina del citoplasma a la membrana plasmática. Dsh es reclutada a la membrana para unirse a Fz y Axina por la LRP5/6. Ese complejo armado Fz/LRP5/6 induce la estabilización de β -catenina, la cual es translocada al núcleo y promueve la proliferación celular por la fosforilación y mutaciones en los genes APC y β -catenina causan desregulación en esta vía, promoviendo la hiperproliferación celular y diferenciación celular como un factor de transcripción (Tomada de Komiya & Habas, 2008).

Mutaciones registradas en el desarrollo neoplásico del CCR generan la truncación prematura de la proteína APC, que remueven los sitios de interacción con axina/conductina (Kinzler & Vogelstein, 1996; Segditsas & Tomlinson, 2006; Polakis, 2012), los cuales son muy importantes para promover la fosforilación secuencial por caseína cinasa 1 (CK1) y glucogéno cinasa 3 β de β -catenina para su ubiquitinización y su degradación proteosomal (Fearon, 2011; Mantilla et al., 2015). Esto genera la interrupción de la fosforilación coordinada y la destrucción de β -catenina. Como resultado β -catenina se acumula en el citoplasma, se transloca al núcleo y promueve la proliferación tumoral e invasión celular, a través de su interacción con el factor celular T (Tcf) (Fearon, 2011; Pino and Chung, 2010).

En ausencia de mutaciones en el gen *APC* en CCR, existe evidencia que *Beta-Catenina* (*CTNNB1*) sufre mutaciones con una frecuencia del 7.14% en estadios tempranos de la carcinogénesis y posiblemente sustituye a *APC* en los estados de iniciación del tumor (Cancer Genome Atlas Network, 2012). Estas alteraciones regularmente se encuentran en los codones 32, 41 y 45 que codifican para la región consenso de la fosforilación por GSK-3 β , impidiéndose la regulación de los niveles intracelulares de *CTNNB1* en el citoplasma (Grady y Markowitz, 2002).

Después de la adquisición de mutaciones en el gen *APC* o *CTNNB1*, la mutación más común presentada en esta patogénesis es la del gen *KRAS*, producida en eventos tardíos de la tumorigénesis que afecta principalmente a los codones 12 y 13 de este gen, cerca del 95% de las mutaciones encontradas para este gen en CCR, donde solo el 5% pertenece a otro tipo de mutaciones en otros sitios del gen (Forbes et al., 2006).

Mutaciones en este gen se presentan con frecuencia en alrededor del 40% de los tumores de CCR (Arrington et al., 2012). Esta alteración se ha visto principalmente en focos de criptas aberrantes (FCA) y en tumores adenomatosos (Pretlow & Pretlow, 2005).

El producto génico de *KRAS* pertenece a un pequeño grupo de proteínas conocido como la super familia RAS, las cuales tienen unión a GTP/GDP. La fluctuación entre la forma inactiva de unión a GDP y la activa de unión a GTP promueve señales intracelulares río abajo de la proteína cinasa activada por mitógenos (*MAPK*) dentro de la célula que regulan la proliferación y diferenciación celular. Ras normalmente está inactiva en su forma de unión a GDP, la cual puede ser activada por estímulos externos como la presencia de mitógenos, citosinas y factores de crecimiento (Vogelstein & Kinzler, 2004; Schubert, Shannon, & Bollag, 2007; Jančík, Drábek, Radzioch, & Hajdúch, 2010).

Aunado a estas alteraciones genéticas también se ha encontrado evidencia que existen mutaciones en otros genes importantes para la carcinogénesis, como son las adquiridas en el gen proteína de tumor 53 (*TP53*) (Gryfe et al., 1997). Se ha encontrado alterado este gen en aproximadamente el 40% al 50% de los pacientes que padecen CCR (Takayama, Miyanishi, Hayashi, Sato, & Niitsu, 2006). La mayoría de esas mutaciones ocurren en el exón 5 al 8 (Dominio de unión al ADN) comprometiendo el cambio de G por A, la transición de C por T que provoca la sustitución de un solo aminoácido en la proteína p53 (López et al., 2012; Russo et al., 2005). Esta sustitución provoca un cluster en el dominio de unión al ADN lo que causa la disrupción de la unión específica al ADN y la secuencial inactivación (Russo et al., 2005; Zandi et al., 2011).

En la literatura se ha descrito la función de este gen, donde se le ha acuñado el término de “regulador maestro” ya que controla la transcripción de un gran número de genes involucrados en el metabolismo y reparación del DNA, la apoptosis, la regulación del ciclo celular, la senescencia, la respuesta inmune, la diferenciación celular, la motilidad y la migración (Pino and Chung, 2010; Li, Zhou, Chen, & Chng, 2015). Alteraciones en este gen supresor tumoral tiene un rol crítico en la progresión de adenoma a carcinoma durante el proceso de tumorigénesis (Lengauer, Kinzler, & Vogelstein, 1998). Diferentes tipos de *TP53* juegan un rol importante en la prognosis del tumor donde se ha registrado que pacientes con estas alteraciones en *p53* parecen ser más quimio-resistentes y tener una pobre prognosis que los que presentan *p53* silvestre (Lacopetta, 2003) (Figura 6).

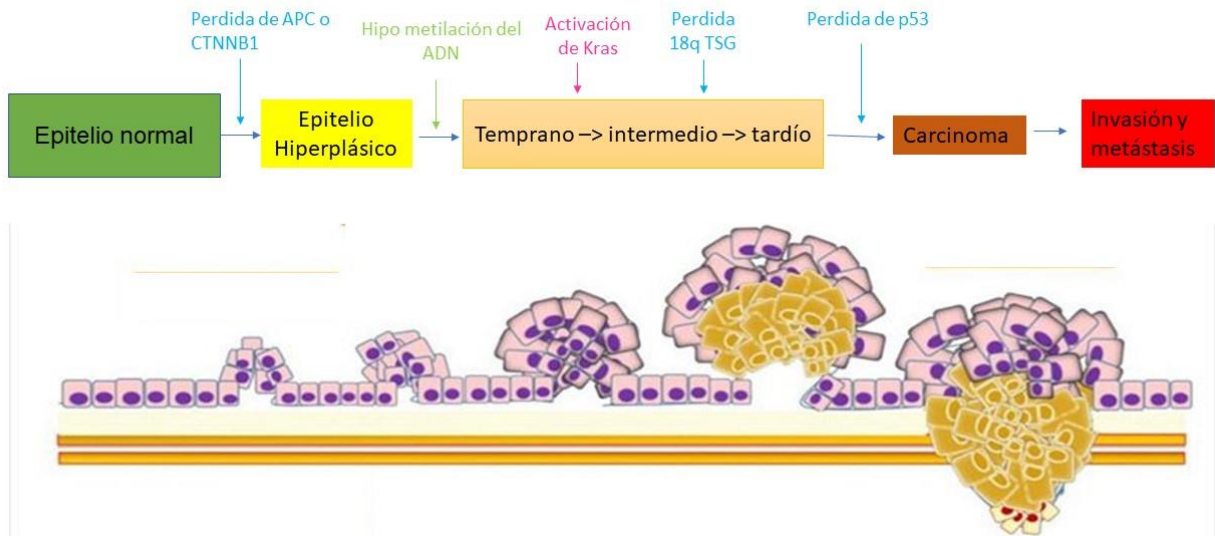


Figura 6. Modelo descriptivo de la carcinogénesis de CCR. El desarrollo tumoral en el CCR inicia con una mutación en *APC* o *CTNNB1* con frecuencias diferentes, seguida de una serie de alteraciones epigenéticas y mutaciones en los diferentes oncogenes y genes supresores de tumores que contribuyen en los diferentes en los estadios de la progresión tumoral hasta la formación del carcinoma *in situ* (Tomada y modificada de (Weinberg, 2013 y Subramaniam, Mizoguchi, & Mizoguchi, 2016).

Además de las alteraciones descritas en el modelo clásico de CCR como son *APC*, *CTNNB1*, *KRAS* y *TP53*, se han encontrado otras implicadas en la evolución del CCR como son las alteraciones en el gen supresor tumoral *AXIN2*, las cuales se han descrito en un 1.90% de los casos de CCR (Cancer Genome Atlas Network, 2012) y el gen *WTX* en 1% (Weinberg, 2013), estas alteraciones tienen una relación estrecha con la degradación de β -catenina en la vía de señalización Wnt. Subsecuentemente, se tiene evidencia que los genes *Tirosina Cinasa (TKs)* se pueden encontrar mutados en un 15%, *BRAF (B-Raf proto-oncogen, serina treonina cinasa)* en un 5.71% (Cancer Genome Atlas Network, 2012) y *PI3K* en un 32% (Weinberg, 2013), los cuales están involucrados en la vía de señalización *Ras-Raf-PI3K*, relacionada con la diferenciación, supervivencia, y crecimiento celular (De Luca, Maiello, D'Alessio, Pergameno, & Normanno, 2012). Consecuentemente, se han encontrado mutaciones en los genes *TGF β RII* en un 2.38% (Cancer Genome Atlas Network, 2012) y *SMAD4* (Cancer Genome Atlas Network, 2012) en un 16.19%, donde ambos genes están involucrados en la vía de señalización *TGF β* (Neuzillet et al., 2015), esta vía tiene una implicación en el crecimiento, diferenciación, desarrollo celular vascularización tumoral y metástasis (Grady & Carethers, 2008), alteraciones en genes relacionados a esta vía se han asociado a pobre prognosis, (Derynck, Akhurst, & Balmain,

2001). Por último, se ha observado alteraciones asociadas a la vía de señalización *P53*, en genes como *p14* en un 14% (Cancer Genome Atlas Network, 2012) y *MDM2* en un 72.86% (Cancer Genome Atlas Network, 2012), esta vía tiene importancia en la respuesta al daño celular, llevando a las células a apoptosis o arresto del crecimiento celular (Hall Peter A., Meek David, & Lane David P., 1999; Harris, 1996; Ko & Prives, 1996; Agarwal, Taylor, Chernov, Chernova, & Stark, 1998), pacientes con alteraciones en esta vía tienen poca prognosis (Samowitz et al., 2002) (Figura 7).

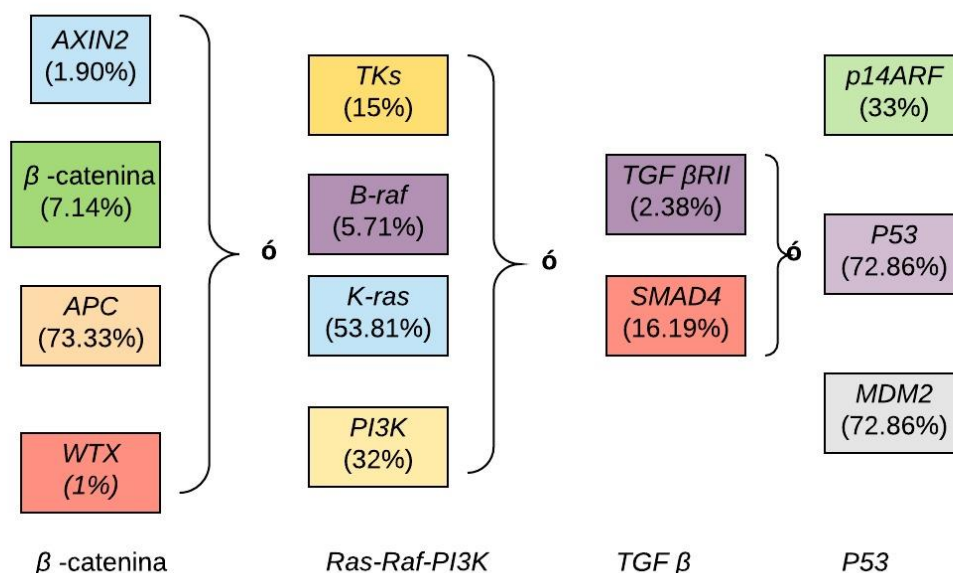


Figura 7. Alteraciones genéticas alternativas durante la carcinogénesis del CCR. La pérdida de la función de APC representa un punto de inicio que es común en la mayoría de los tipos de CCR, seguida de otras posibles alteraciones que potencian la función de β-catenina en las primeras etapas de tumorigénesis e igualmente involucrados en la misma vía Wnt. Consecuentemente, se observan cambios genéticos alternativos en vía *Ras-Raf-PI3K* que funcionan como una alteración subsecuente que potencia la proliferación celular y supervivencia celular dentro del tumor. Posteriormente, existen alteraciones en genes involucrados en la vía *TGFβ* que se relacionan con la vascularización y angiogénesis dentro del tumor. Para finalizar existen alteraciones opcionales dentro de la vía de señalización *P53*, las cuales están involucradas al error por reparación por daño al ADN. El porcentaje indica el número de casos de CCR que muestran alteraciones en estos genes (Cancer Genome Atlas Network, 2012). Tomada y modificada de (Weinberg, 2013).

Además de estas alteraciones genéticas, en la iniciación y promoción del CCR pueden ocurrir alteraciones epigenéticas, que son definidas como cambios en los mecanismos epigenéticos heredables en la función de genes, que no están relacionados con cambios

en la secuencia del ADN (Jones & Baylin, 2002). Estos mecanismos incluyen: la metilación de regiones en el ADN ricas en secuencias C-G, llamadas también islas CpG; modificación post-transcripcional de histonas (proteínas que forman el nucleosoma), en microRNAs y RNAs no codificantes (Sharma, Kelly, & Jones, 2010).

Los patrones de metilación en el ADN están relacionados con el control de la expresión genética, el mantenimiento de la integridad cromosómica y la regulación en la recombinación del ADN en mamíferos (Peinado, 2011). En el CCR están reconocidas dos tipos de metilación: la hipometilación y la hipermetilación (Frigola et al., 2005). La hipometilación refiere a la pérdida del grupo 5-metil citosina en regiones CpG de secuencias que normalmente están metiladas (Peinado, 2011). Desde 1980 se ha definido la hipometilación como una alteración clave en el desarrollo del CCR y en otros tipos de tumores (Feinberg & Vogelstein, 1983). Donde se ha descrito que este tipo de alteraciones ocurre en un alto grado en regiones repetidas del genoma, como son los elementos LINE, los cuales actúan como retrotransposones en el genoma y al ser hipometiladas aumentan la tasa de inestabilidad genética, lo cual está relacionado con la pérdida de la heterocigocidad (Hur et al., 2014; Vaiopoulos, Athanasoula, & Papavassiliou, 2014; Nagai et al., 2017). En un estudio realizado por Hur y colaboradores en 2014, determinaron que la región LINE-1 al ser hipometilada durante la tumorigenesis induce la transcripción de oncogenes como MET en líneas celulares de CCR. Además, existe evidencia que este gen se encuentra alterado epigenéticamente en diferentes tipos de cáncer, debido a que su región promotora rica en islas CpG es hipometilada durante la carcinogénesis y activa la transcripción de este gen (Fujita & Sugano, 1997; Zeng et al., 2008; Huang, Yu, & Chen, 2015; Chen, Wang, & Chen, 2017). Por otro lado, la hiper metilación refiere a la adición de un grupo 5 metil-citosina a regiones CpG promotoras de genes supresores tumorales como: septin 9 (*SEPT9*) (Lofton-Day et al., 2008), *THBD* (Herbst & Kolligs, 2012), *NEUROG1* (Lange et al., 2012), *HIC1*, *DAPK*, *APC*, *MDG1* Y *TPEF* (Herbst et al., 2011), supresores de metástasis: *AOX-1* (Strand, Orntoft, & Sorensen, 2014) y *RARB2* (Poulain et al., 2009)), inhibidores de angiogénesis: *RERG* (Finlin et al., 2001) y *ADAMTS9* (Zhang et al., 2010)) y factores de transcripción: *IRF4* (Forero, McCormick, Jenkins, & Sarkar, 2014) y *FOXE-1* (Papadia et al., 2014). Esta alteración provoca el silenciamiento constitutivo de estos genes, la cual está ligada a la tumorigenesis del CCR (Vaiopoulos, Athanasoula, & Papavassiliou, 2014).

Este conjunto de alteraciones adquiridas durante la evolución tumoral provoca una alta heterogeneidad molecular. Debido a esto se considera que el CCR es una enfermedad altamente heterogénea y compleja (Vogelstein & Kinzler, 1993).

2.4. Heterogeneidad tumoral

La heterogeneidad tumoral se define como las diferencias que existen morfológica, genética y fenotípicamente entre las células tumorales. Estas diferencias que pueden estar determinadas por procesos como la respuesta a fármacos, angiogénesis, alteraciones genéticas, potencial metastásico, entre otros (Figura 6) (Dick, 2008; Marusyk & Polyak, 2010; Dagogo-Jack & Shaw, 2018)

La capacidad anormal y heterogénea de proliferación celular dentro del tumor, se ha comprobado con la existencia de ciertas subpoblaciones de células cancerígenas, que tienen capacidad totipotencial de renuevo y sobrevivencia, llamadas células madre cancerígenas o stem cells (Tomasetti & Vogelstein, 2015). Existen modelos matemáticos que relacionan la tasa de división de las stem cells cancerígenas con el riesgo de desarrollar cáncer (Tomasetti & Vogelstein, 2015; Zhu et al., 2016). En un estudio realizado por Zhu y colaboradores en 2016, demostraron que mutaciones presentes en stem cells CD133⁺ generan susceptibilidad a la transformación neoplásica, esta transformación a largo plazo puede generar disturbio en la tasa de división celular o el bloqueo en la diferenciación celular (Li et al., 2013). También, se ha demostrado que dentro de las alteraciones adquiridas en las stem cells está la expresión de genes que regulan la respuesta inmune como CTLA4 y CD274 (PD-L1) (Zhu et al., 2016). Este hecho sugiere que en etapas tempranas de la tumorigénesis las stem cells transformadas no solo se propagan, si no, también instalan un mecanismo de protección inmunológica, que les permite evadir la muerte celular y les confiere la capacidad de proliferación (Li et al., 2013).

Las células no pueden vivir sin un gradiente adecuado de oxígeno (Achilles et al., 2001), por lo que el crecimiento tumoral va de la mano con la vascularización del tejido y tiene una correlación indirecta con la apoptosis celular (Jain, 1994; Achilles et al., 20014). Diversos autores han confirmado que existe una heterogeneidad angiogénica dentro de un solo tumor (heterogeneidad intratumoral ITH) y entre diferentes metástasis en un solo órgano (intertumoral) (Kumar, Kuniyasu, Bucana, Wilson, & Fidler, 1998; Yu et al., 2001). En una investigación realizada por Kumar, Kuniyasu, Bucana, Wilson y Fidler en 1998, demostraron que el xenotransplante de células cancerígenas de humanos en ratones desnudos,

progresivamente genera el crecimiento local de tumores, con diferente expresión de factores pro angiogénicos. Observaron, además, que existe una heterogeneidad intertumoral, en donde los tumores menores a 4 mm de diámetro tenían más expresados el factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF) e interleucina 8 (IL-8), en comparación con las neoplasias que median 10 mm de diámetro. También, demostraron que la distribución de estos factores angiogénicos era considerable en la periferia del tumor, donde la división celular es mayor y que la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) era mayor en el centro del tumor, donde constantemente las células están en un ambiente hipóxico y se necesita la vascularización del tejido.

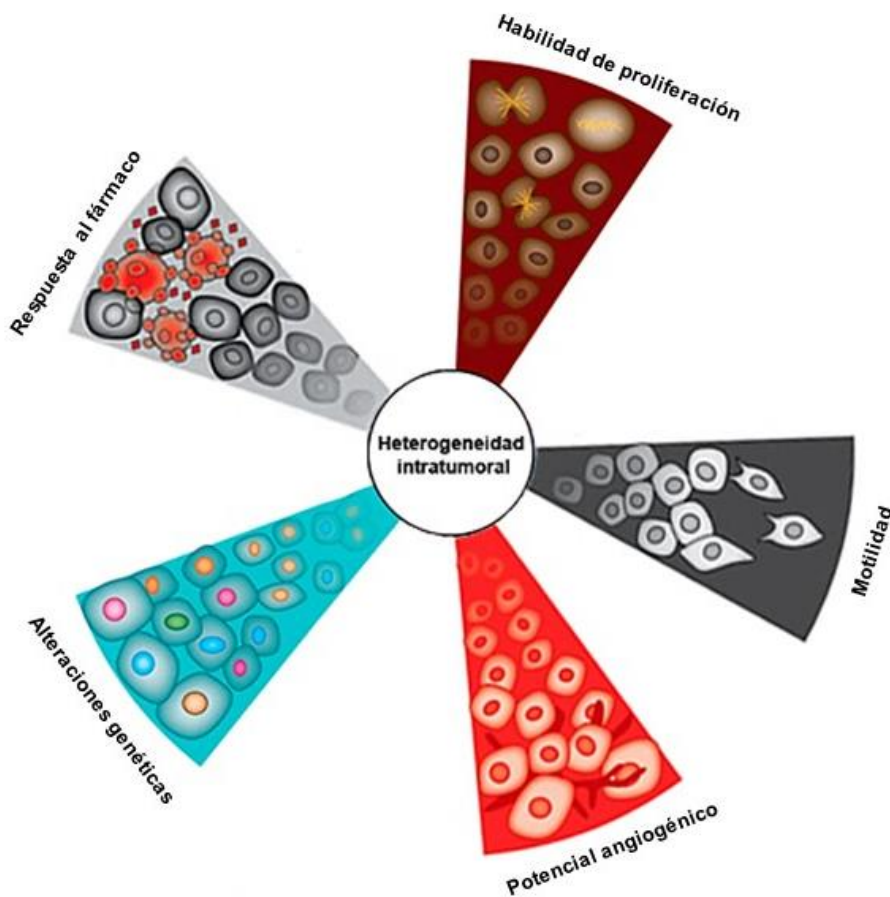
Otro de los procesos antes mencionados es la heterogeneidad genética tumoral, se sabe que existen diferencias en la frecuencia de las mutaciones en oncogenes y genes supresores tumorales entre diferentes tipos de tejido, este hecho refleja la importancia de distintas vías de señalización dentro del contexto celular (Vogelstein et al., 2013; Weigelt & Reis-Filho, 2009; Lawrence et al., 2013). Un ejemplo, es la alta presencia de alteraciones genéticas en el gen supresor tumoral *APC*, presente en neoplasias gastro intestinales y colorrectales, debido a la importancia de la vía de señalización WNT en el renuevo celular del epitelio gastro intestinal (Cancer Genome Atlas Network, 2012). Por otro lado, se ha observado un alto porcentaje de mutaciones en los genes *EGFR*, *BRAF* y *PIK3CA* en cáncer de pulmón de célula no pequeña (NSLC) (Eberhard, Giaccone, Johnson, & Non-Small-Cell Lung Cancer Working Group, 2008; Schmid et al., 2009; Yip et al., 2011; Russell et al., 2013; Paik et al., 2011), debido a la importancia de estas vías de señalización en el renuevo celular del epitelio pulmonar (Naoki, Chen, Richards, Sugarbaker, & Meyerson, 2002; Sarris, Saif, & Syrigos, 2012; Li et al., 2014). El tipo celular dentro de un mismo órgano también afecta en la biología y las alteraciones adquiridas dentro de un tumor, por ejemplo, en tumores pancreáticos varía el espectro mutacional en el desarrollo neoplásico depende del origen celular, ya sea endocrino o exocrino (Jiao et al., 2011). Estas diferencias intrínsecas tienen una gran importancia en la respuesta a la terapia, debido muchas veces a la habilidad que tengan las células a la reparación por daño al ADN (Burrell, McGranahan, Bartek, & Swanton, 2013).

Sin duda, uno de los aspectos importantes en la respuesta a los tratamientos, son la frecuencia de las alteraciones genéticas dentro del tumor. En diversos estudios se ha observado resistencia a la terapia por parte de células con alteraciones genéticas en menor proporción alélica, presentes en las neoplasias y que no fueron vistas en el momento del diagnóstico (Blair Brian G, Bardelli Alberto, & Park Ben Ho, 2013; Holohan, Schaeybroeck, Longley, & Johnston, 2013; Stiehl, Baran, Ho, & Marciniak-Czochra, 2014), como es el caso

de la mutación T790M, del gen EGFR, la cual se encuentra en menos del 5% de los casos de cáncer de pulmón de célula no pequeña (NSCLC) (Weigelt & Reis-Filho, 2009) y genera resistencia a gefitinib después del tratamiento (Roche-Lestienne, Lai, Darré, Facon, & Preudhomme, 2003; Inukai et al., 2006). Además de esto, se sabe que el tratamiento puede desencadenar otro tipo alteraciones diferentes a las iniciales en el tumor, un ejemplo de esto son las mutaciones somáticas adquiridas durante el tratamiento con temozolamida en el gen *MSH6* en pacientes con glioblastoma multiforme, estas alteraciones generan una variación en la tolerancia a agentes alquilantes citotóxicos por parte de las células (Hunter et al., 2006; Cahill et al., 2007).

Aunado a esto, se ha demostrado por diversos estudios que las células cancerígenas pueden expresar una variedad de mutaciones en baja frecuencia alelica en vías involucradas en el potencial metastásico (Győrffy et al., 2015; Pongor, Harami-Papp, Méhes, Czirik, & Győrffy, 2017). En un estudio realizado por Pongor, Harami-Papp, Méhes, Czirik, & Győrffy en 2017, demostraron que existen mutaciones con baja frecuencia alélica que no son detectadas por métodos convencionales, pero con técnicas como la NGS (Secuenciación de siguiente generación) se vieron enriquecidas y fueron detectadas en dos líneas celulares SK-MEL-28 proveniente de melanoma y MEWO proveniente de metástasis de melanoma, donde encontraron diferencias estadísticamente significativas para las alteraciones encontradas en cada una de estas líneas celulares, lo que sugiere que existe una heterogeneidad intertumoral en cuanto las mutaciones encontradas en genes que dirigen la motilidad de las células en ambas líneas.

Esto confirma que la masa neoplásica es heterogénea y tiene propiedades biológicas diferentes. El crecimiento tumoral depende de la interacción de todos estos aspectos y la invasión de las células tumorales a otros órganos va de la mano junto con la adquisición de las diferentes alteraciones durante la historia del tumor (Burrell, McGranahan, Bartek, & Swanton, 2013).



Almendro V, et al. 2013.
Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. 8:277-302

Figura 8. La gran diversidad genética y epigenética dentro de las células tumorales se expresa en un mosaísmo fenotípico único que les confiere a las células clonalidad y progresión (Tomada y modificada de Almendro, Marusyk, & Polyak, 2013).

Todos los tipos de cáncer en la actualidad son reconocidos por consistir en una alta diversidad de poblaciones celulares (Marusyk, Almendro, & Polyak, 2012), que son detectables a niveles genéticos, epigenéticos y fenotípicos. Una de las causas de la adquisición de esta heterogeneidad son las mutaciones y metilaciones en genes implicados en la reparación por daño al ADN y la regulación del ciclo celular, estas alteraciones generan inestabilidad genómica dentro del tumor (Fisher, Puztai, & Swanton, 2013).

En el caso del CCR se describen tres vías de inestabilidad genómica principales, implicadas en el desarrollo de la carcinógenesis:

- 1) La inestabilidad cromosómica (CIN), descrita en el 65% al 70% de los casos de CCR, generada por alteraciones en genes implicados en la reparación por daño al ADN, que provoca cambios en el número cromosómico, aneuploidía, amplificación subcromosómica de genes y la pérdida de la heterocigocidad (LOH) (Pino & Chung, 2010)
- 2) La inestabilidad microsatélite (MSI), descrita en el 15% de los casos de CCR, es caracterizada por pequeñas deleciones o expansiones dentro de regiones repetidas en el ADN, que se ha visto que genera alteraciones en el producto génico (Markowitz et al., 1995; McGranahan, Burrell, Endesfelder, Novelli, & Swanton, 2012),
- 3) La metilación de islas CpG (CIMP), reconocida en el 30% al 40% de los casos de CCR, provoca el silenciamiento de genes implicados en la reparación por daño al ADN, supresores tumorales, entre otros. Esta última es descrita como un tipo de inestabilidad epigenética (Hawkins et al., 2002 y Barault et al., 2008).

Existe evidencia que un alto nivel de estos aspectos de inestabilidad genómica aumenta la adquisición de mutaciones dentro del tumor y con esto la variabilidad genética (Campbell et al., 2010; de Bruin et al., 2014; Jamal-Hanjani et al., 2017). Aspecto que repercute directamente en la supervivencia y resistencia a la terapia por parte de las células (Weaver, Silk, Montagna, Verdier-Pinard, & Cleveland, 2007; Andor et al., 2016).

La heterogeneidad presente entre las células tumorales tiene una repercusión clínica y puede ser usada para descifrar el orden de esos eventos y poder formar la historia del tumor (Navin et al., 2010).

En 1976 Nowell publicó una perspectiva del desarrollo tumoral vista como un proceso evolutivo Darwiniano, donde las células tumorales pasan por un proceso de variación genética ramificada y una subsecuente selección, originando una evolución clonal de poblaciones celulares neoplásicas llamadas también subclonas, esta variación se ve influenciada por agentes carcinogénicos exógenos y endógenos durante la historia tumoral (Campbell et al., 2010; Russnes, Navin, Hicks, & Borresen-Dale, 2011; Schmitt, Prindle, & Loeb, 2012; Fisher, Pusztai, & Swanton, 2013) (Figura 7).

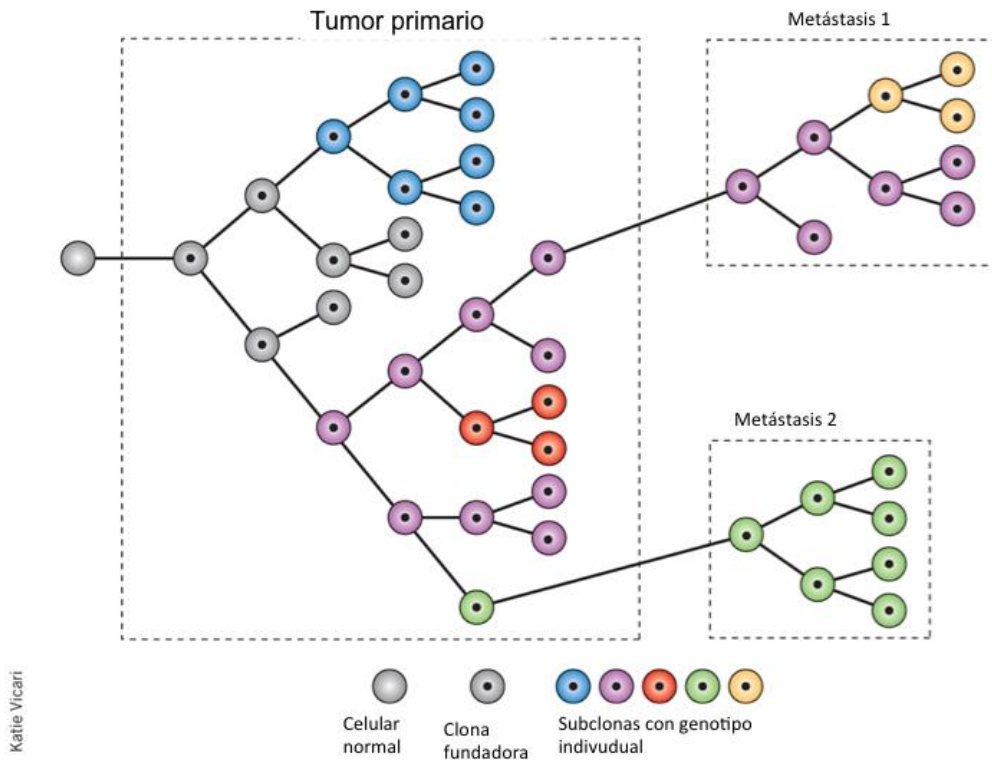


Figura 9. Modelo de evolución clonal del cáncer propuesto por Nowell en 1976. El círculo gris representa una célula normal, el punto central representa la mutación somática inicial que dirige la clona fundadora en el tumor. Los diferentes círculos de colores representan las subclonas que han acumulado mutaciones sucesivas. En el tumor primario coexisten diversas subclonas y aunque algunas se expandan otras se inactivan o extinguen. La metástasis se puede originar a partir de la clona inicial del tumor primario (metástasis 1), o de subclonas menores (metástasis 2). La metástasis además puede someterse a evolución clonal (como en la metástasis 1) (Modificada de Caldas, 2012).

En la biología y genómica del cáncer actual, se han propuesto diversos a modelos alternos de evolución y desarrollo tumoral (Alexandrov et al., 2013; Alexandrov et al., 2015), basados en diversos estudios de la genética del cáncer (Humphries et al., 2013; Alexandrov et al., 2013; Alexandrov et al., 2015), En los cuales se demuestra que la evolución tumoral es una mezcla de evolución gradual, descrita como la acumulación gradual de mutaciones a través del tiempo (Alexandrov et al., 2015), con evolución puntal, la cual es un fenómeno estocástico de procesos mutacionales en las células que repercute en la frecuencia de las subclonas, haciendo más heterogénea la masa tumoral. La mezcla de ambas teorías se propone como un modelo llamado “Big Bang”, en el cual inicialmente existen mutaciones no solo en un gen, si no en varios genes que generan un hiper variación clonal inicial, que ayuda al avance tumoral y la adquisición de mutaciones por parte las subclonas (Cross

William CH, Graham Trevor A, & Wright Nicholas A, 2016). Este modelo apoya los recientes estudios, en los que se ha observado que existen subclonas con baja frecuencia alélica con mutaciones que le ayudan a generar resistencia al tratamiento y no son detectadas al momento del diagnóstico (Alexandrov et al., 2013; Humphries et al., 2013; Ling et al., 2015). (Figura 10).

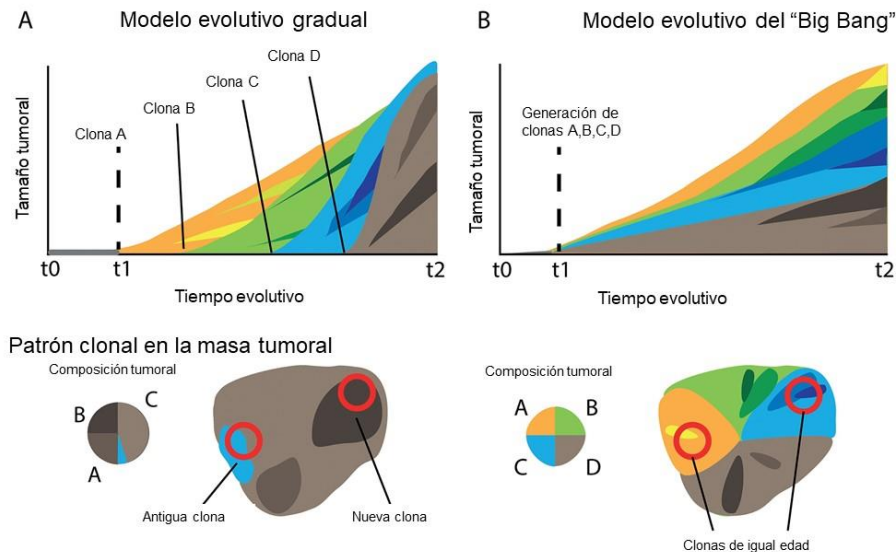


Figura 10. Modelos de evolución tumoral. Gradualismo (A) contra puntualismo (B). En la imagen A se observa el modelo de evolución gradual, la cual a partir de una mutación inicial A se desencadena la adquisición de mutaciones B, C, D, E y F, que a lo largo del tiempo genera una masa tumoral homogénea. En contraste, el modelo evolutivo del Big Bang, se observa en la imagen B) clonas iniciales en A, B, C, y D que generan a lo largo del tiempo subclonas con diferente frecuencia alélica, que enriquece la gran heterogeneidad dentro del tumor (Cross William CH, Graham Trevor A, & Wright Nicholas A, 2016).

En el caso del CCR se ha descrito que este tipo de evolución implica resistencia por parte de las células tumorales a la terapia, uno de los fármacos más usados en la clínica y el tratamiento de esta neoplasia es el agente inhibidor de síntesis del ADN 5-flouracil (5FU). El mecanismo de resistencia se da por mutaciones en genes implicados en la reparación por daño al ADN, tal como MLH1 (0.95%), MSH2 (0.95%) y PMS1 (1.43%), las cuales desencadenan problemas de inestabilidad genética, como inestabilidad microsatelite (Sottoriva et al., 2013) ("cBioPortal for Cancer Genomics, consultado el 19 de abril del 2018). Otra de las terapias utilizadas en gran frecuencia en el tratamiento de esta neoplasia es el anticuerpo monoclonal dirigido a EGFR, cetuximab, se ha reportado resistencia a esta terapia debido a mutaciones en genes como *KRAS*, la cual ocurre en los codones 2, 13 y

61, que le proporcionan activación constitutiva en la vía de señalización en la que participan rio abajo (Karapetis et al., 2008; Richman et al., 2011). Diversos análisis con herramientas como es la secuenciación masiva de siguiente generación (NGS) han provisto de evidencias de un alto número de mutaciones en otros genes, donde se han observado alrededor de 75 mutaciones de baja frecuencia por tumor que tienen predisponen a la resistencia de ciertas terapias (Wood et al., 2007; Network, 2012).

3. ANTECEDENTES

Al momento del diagnóstico se analizan biomarcadores que son decisivos para la selección del tratamiento, se tiene evidencia que existe una variación de estos biomarcadores dentro de diferentes regiones del mismo tumor y las células, por lo que se han desarrollado nuevos análisis de investigación para evaluar la heterogeneidad genética dentro de un tumor y poder enriquecer la detección de las subclonas con baja frecuencia alélica (Teixeira, Pandis, Bardi, Andersen, & Heim, 1996; Aubele et al., 1999; Pertschuk et al., 1999; Volante et al., 1999; Francis et al., 2005; Bachtiry et al., 2006; Taniguchi, Okami, Kodama, Higashiyama, & Kato, 2008; Siegmund, Marjoram, Woo, Tavaré, & Shibata, 2009; Varley, Mutch, Edmonston, Goodfellow, & Mitra, 2009; Barry et al., 2010; Navin et al., 2010; Park, Gönen, Kim, Michor, & Polyak, 2010; Yachida et al., 2010; Faratian et al., 2011; Kalinsky, Heguy, Bhanot, Patil, & Moynahan, 2011; Navin et al., 2011; Yancovitz et al., 2012).

Navin y colaboradores en 2011, utilizaron un método de análisis llamado secuenciación de un sólo núcleo (SNS). El cual permite caracterizar genéticamente las muestras tumorales célula por célula, esto con el fin de poder identificar y enriquecer la detección de alteraciones genéticas en baja frecuencia. En este estudio, dichos autores utilizaron muestras de tumores frescos de alto grado histológico (con mayor ITH), provenientes de carcinoma ductal (T10,716P), particularmente fueron muestras de cáncer de mama triple negativo (ER-, PR-, HER2) y carcinoma metastásico de hígado. Compararon el nivel ITH, en cuanto al contenido de ADN y las alteraciones genéticas presentes en las células de las muestras. Este método permitió enriquecer la detección y analizar subclonas de baja frecuencia alélica en el tumor primario, que no fueron identificadas en la metástasis, pero que ayudan a la expansión clonal de otras subclonas.

Las muestras de tejido embebido en parafina son un vasto recurso de archivo clínico que preserva las características morfológicas de las células y son ampliamente utilizadas por patólogos para el diagnóstico y pronóstico de los pacientes con cáncer. En un estudio realizado por Holley y colaboradores en 2012 y 2013 demostraron que el análisis de la ITH por SNS a muestras embebidas en parafina de adenocarcinoma pancreático ductal permite identificar clonas resistentes a la terapia en carcinomas avanzados de próstata, no dependientes de andrógenos, además demostraron la coexistencia de poblaciones clonales con alto contenido de genoma aberrante.

Posteriormente Martelotto en 2017 realizó el mismo análisis a muestras frescas y muestras embebidas en parafina de carcinoma ductal *in situ*, donde encontraron que existía un

enriquecimiento en la detección de alteraciones en baja frecuencia descritas para esta neoplasia y que tienen implicación importante en la resistencia a la terapia.

En nuestro laboratorio Martínez en 2017 evaluó la prevalencia de mutaciones en baja frecuencia en los genes *KRAS* y *CTNNB1* en plasma sanguíneo proveniente de ratones con CCR inducido por AOM-DSS. En este estudio se identificaron hasta cuatro mutaciones patogénicas en *KRAS* en algunos ratones, lo cual sugiere la coexistencia de un igual número de subclonas tumorales en estos ratones.

4. JUSTIFICACIÓN

El CCR es un problema de salud pública en el mundo y en nuestro país ocupa el tercer lugar de incidencia y mortalidad (GLOBOCAN IARC, 2012). Se reconoce como una enfermedad altamente heterogénea y compleja.

Debido a la gran heterogeneidad celular dentro de las muestras tumorales algunas veces no es posible detectar estas alteraciones presentes en las neoplasias con baja presencia alélica que podrían llegar a generar recurrencia en los pacientes. En la actualidad se ha buscado la implementación de técnicas que ayuden a mejorar la detección de estas variantes dentro de la masa tumoral, como es el análisis por SNS.

Tomando en cuenta la naturaleza de las muestras de tejido embebido en parafina que son un amplio recurso de archivo clínico y nos permite dar seguimiento a la historia tumoral.

En el presente proyecto se estandarizó una técnica de extracción de núcleos en muestras de tejido embebido en parafina, provenientes de muestras tumorales de colon de ratón murino inducido a CCR por AOM-DSS. Posteriormente se realizó la evaluación de la ITH con base en el contenido de ADN de los núcleos tumorales y a su vez se realizó la separación física por poblaciones con base en este mismo parámetro.

Con esto en un futuro se busca realizar la caracterización genotípica dentro de las poblaciones tumorales y así poder analizar con herramientas altamente sensibles las alteraciones genéticas en bajas frecuencia alélica en genes que se han visto que están implicados en el relapso de pacientes con CCR.

5. HIPOTESIS

El CCR del modelo de AOM/DCS es altamente heterogéneo y es posible separar las células tumorales individuales en poblaciones subclonales homogéneas con base en su contenido total de ADN, con el propósito de realizar un análisis detallado de la ITH.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Implementar un método de separación y análisis de núcleos individuales por medio de citometría de flujo a partir de tejido tumoral de CCR, para evaluar la heterogeneidad intratumoral en el modelo *in vivo* de AOM/DSS.

6.2 Objetivos particulares

- Estandarizar la técnica de extracción de núcleos de tejido tumoral embebido en parafina.
- Determinar la heterogeneidad intratumoral de los tumores del modelo de AOM/DSS, mediante la separación de los núcleos en poblaciones subclonales con base en su contenido de ADN total.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1. Modelo AOM-DSS

El desarrollo del CCR es un proceso que lleva alrededor de 10 a 15 años para su progresión y formación de metástasis (McIntyre, Buczacki, Arends, & Adams, 2015). Debido a esto se han desarrollado una variedad de modelos *in vivo* de CCR que nos ayudan a entender los cambios y/o alteraciones moleculares ocurridos en el desarrollo tumoral desde sus primeras etapas. Las cuales abarcan desde alteraciones genéticas y epigenéticas por parte de las células tumorales hasta los cambios ocurridos en el ambiente celular. Estos modelos son de amplia ayuda para generar nuevos conocimientos sobre la etiología y los mecanismos fisiopatológicos del CCR en humanos (Cheon & Orsulic, 2011; Tong, Yang, & Koeffler, 2011; Karim & Huso, 2013; McIntyre, Buczacki, Arends, & Adams, 2015),

Uno de los modelos comúnmente usados para el estudio de la evolución tumoral es la utilización de ratones debido a sus ventajas sobre otros modelos *in vivo*: a) son de tamaño pequeño; b) manutención barata; c) reproducción rápida; d) son fáciles de manipular genéticamente e) su extensiva similaridad molecular con los humanos (Cheon y Orsulic, 2011).

La inducción de tumorigénesis en modelos de ratón incluye desde el trasplante de tumores derivados de líneas celulares o tejido humano; modificación genética; uso de agentes químicos o carcinógenos virales (Berenblum, 1954; Duran-Reynals, 1957; Martin, *et al.*, 1961; Rowson *et al.*, 1961; Tanaka y Southam, 1962, 1965; Stoker, 1963; Salaman y Roe, 1964; Garrett *et al.*, 1993; Richmond & Su, 2008).

Un modelo químico utilizado comúnmente para la inducción a CCR en ratones es mediante el uso de agentes químicos como el azoximetano y el sulfato de sodio dextrán (AOM-DSS), los cuales se usan como inductor mutagénico y como promotor de inflamación, respectivamente, estos químicos generan las condiciones y características aproximadas en las que se desarrolla el CCR esporádico en humanos. (Rosenberg *et al.*, 2009, Robertis *et al.*, 2011).

El DSS es un polisacárido cargado negativamente, soluble en agua, de alto peso molecular que varía de los 5 a los 1400 kDA (Okayasu *et al.*, 1990). Se sabe que el uso de dextrán sodio sulfato (DSS) en ratones tiene la capacidad de inducir inflamación crónica en el colon (Okayasu *et al.*, 1990). El mecanismo por el cual el DSS induce colitis no es muy claro,

pero es resultado del daño que ocasiona a la monocapa de revestimiento celular del intestino, aumentando la permeabilidad de la mucosa del colon, lo que causa daño a las células epiteliales (Clapper et al., 2007; Perše and Cerar, 2012).

Por otra parte, el azoximetano (AOM) es un procarcinógeno que requiere activación metabólica en el hígado principalmente por el citocromo P450 por enzimas CYP2E1 para generar metilazoximetanol (MAM) (Sohn, Fiala, Requeijo, Weisburger, & Gonzalez, 2001). El MAM subsecuentemente se conjuga con el ácido glucurónico para generar MAM-GlcUA que es almacenado en la vesícula biliar y liberado posteriormente a la luz del intestino donde las bacterias de la flora intestinal con actividad enzimática β -glucuronidasa rompen el enlace glucosídico para la liberación de MAM (Megaraj et al., 2014; Sohn et al., 2001). MAM es un compuesto inestable con un tiempo de vida media de 12 horas que se descompone espontáneamente en el colon para generar formaldehído y ion metildiazonio, es un agente altamente reactivo que produce alquilación de bases de ADN para la formación del CCR, induce preferencialmente tumores en el colon distal. (Figura 10) (Megaraj et al., 2014; Sohn et al., 1991). El AOM también se metaboliza directamente en el colon para generar el ion metildiazonio (Megaraj et al., 2014).

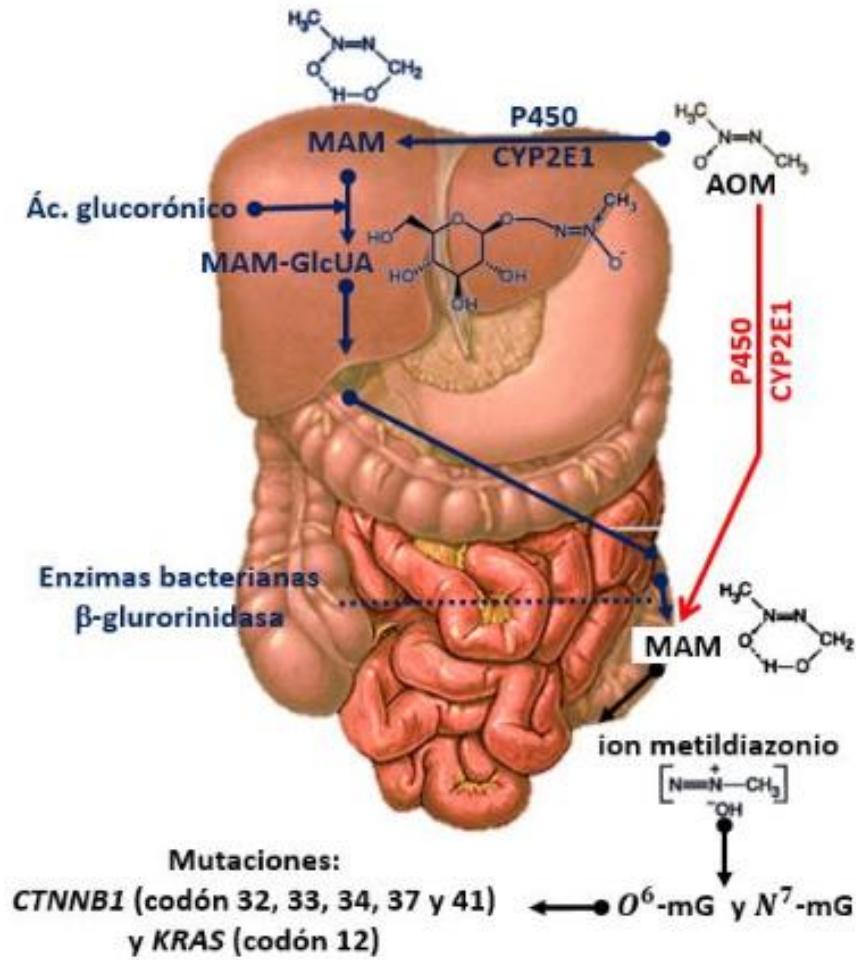


Figura 11. Activación metabólica del azoximetano. El AOM es metabolizado por el hígado a través del citocromo P450, específicamente por la enzima CYP2E1 para producir MAM también es metabolizado por la luz del colon, el cual se conjuga con ácido glucorónico para generar MAM-GlcUA generando MAM, este compuesto es inestable por 12 horas, produciendo formaldehído y un ion metildiazonio, el agente carcinógeno que promueve la formación de CCR. En el colon se puede metabolizar el AOM debido a la presencia de la enzima P450 aunque a una concentración más baja que en el hígado (Tomado de Martínez, 2017).

7.2 Estandarización de la técnica de extracción de núcleos de muestras embebidas en parafina

7.2.1 Ajuste del número de cortes en las muestras

Se realizaron cortes de 50 µm en pergamino con un micrótomo marca *Leica*. Cada corte se colocó en tubos de microcentrifuga individuales de 1.5 mL. Se ajustó el número de cortes de 5-10 cortes por tubo con la finalidad de obtener un número óptimo de núcleos en las muestras tomando en cuenta los antecedentes de Holley y colaboradores 2012 y 2013 (1×10^6 núcleos/mL).

7.2.2 Desparafinación y rehidratación de los cortes de tejido.

Se desparafinó cada muestra de tejido con dos lavados de xilol (300 µL) con tiempos de 5 minutos, se rehidrató con dos cambios graduales de etanol cada 5 minutos (500µL) 100%, 95%, 70%, 50% y 30%, después se agregó a cada tubo PBS (Sigma Cat. P4417)-Ácido acetildiaminotetraacético EDTA (Gold biotechnology Cat. E-210-500) (1mM) pH 8 (1 mL).

7.2.3 Disociación enzimática del tejido

Se incubaron a 95°C durante 80 minutos. Posteriormente se adicionó PBS-Cloruro de Calcio (CaCl_2) (5 mM) (pH 7.4), se centrifugó a 3600 x g por dos minutos, se removió el sobrenadante y se lavó la pastilla con PBS- CaCl_2 nuevamente.

Se estandarizó la cantidad de colagenasa y hialuronidasa utilizado para la disociación del tejido comenzando con una concentración de 80 CDU (unidades de colagenasa cruda) (Sigma-Aldrich Cat. C0130), 50 CDU de colagenasa tipo III y 100 U de Hialuronidasa (Sigma Aldrich Cat.H3506).

Finalmente se ajustó a una concentración de 250 CDU de colagenasa cruda y 100 U de hialuronidasa en 800 µL de PBS CaCl_2 .

El tiempo de disociación se ajustó tras varios ensayos realizados y se determinó un tiempo final de 18 horas y treinta minutos a una temperatura de 37 °C.

7.2.4 Purificación de las muestras.

Se re suspendió con NST (146 mM NaCl, 10 mM Tris base at pH 7.8, 1 mM CaCl₂, 21 mM MgCl₂, 0.05% BSA, 0.2% Nonidet P-40), 10% suero fetal bovino (100 µL). Para la purificación de la muestra se pasó el volumen por una jeringa 35G, 30 veces. Posteriormente la muestra se filtró usando una malla 35 µm.

7.2.5 Análisis de las muestras

Antes del análisis de las muestras por citometría de flujo se comprobó la calidad de la extracción de núcleos del tejido.

Se tomaron 10 µL de muestra, se pusieron en un portaobjeto lisinizado y se dejó secar al aire, posteriormente se incubo por 15 minutos en un vaso coplin con metanol frio a -20°C. Se retiró el metanol y se lavaron las laminillas 2 veces por 5 min en PBS. Por último, se pusieron 10 µL Hoechst 33342 (10 µg/mL) y las muestras se incubaron por 1 minuto, después se lavaron con PBS limpio 2 veces por espacio de 5 minutos para poder ser observadas por microscopio de fluorescencia.

Para su observación en microscopio óptico, en lugar de poner Hoechst 33342 las muestras fueron sumergidas en un vaso coplin con Hematoxilina por 5 minutos, después fueron lavadas con PBS o agua corriente hasta eliminar el exceso de colorante.

7.2.6 conteo del número de núcleos

7.1.6.1 Cámara de Neubauer

Para el conteo de los núcleos se hizo una dilución con azul tripano en una proporción 1:10, se tomó 10 µL de muestra, lo cual fue contrastada con 10 µL de azul tripano (In vitro s.a, SR-15) al 0.08% en buffer salino (PBS)

Posteriormente se tomaron 10 µL de esta dilución y se pusieron en una cámara de Neubauer. Para realizar el conteo de los núcleos se utilizó un microscopio óptico a 40x, donde se contaron los núcleos de los cuadrantes de 1 mm de las esquinas (Figura 11).

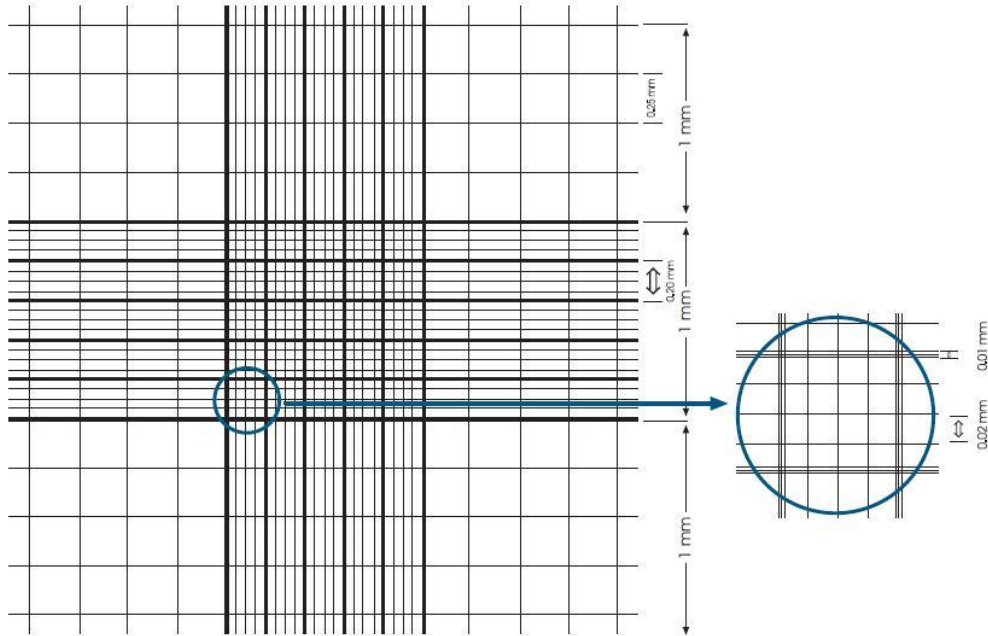


Figura 12. Cámara de Neubauer vista a 100 aumentos (10x).

El número total de células suspendidas en la muestra se determinó con la siguiente formula:

$$\text{numero de núcleos en 0.5 mL} = \frac{\text{numero de nucleos}(0.5)(10)(10000)}{4}$$

7.1.6.3 Análisis estadístico de los ensayos de la estandarización de la técnica de extracción de núcleos

La evaluación de las diferencias significativas dentro de la estandarización de la técnica de extracción de núcleos se realizó mediante un análisis de varianza ANOVA de una sola vía, aplicando una prueba de t student y de correlación no lineal, respectivamente por la plataforma de GraphPad Prism®Prism 5 (Graph Pad Software).

7.2 Análisis y separación de núcleos en poblaciones por citometría de flujo.

7.2.1 Ajuste de la concentración de núcleos y flourocromo en las muestras

Los núcleos se tiñeron con yoduro de propidio (IP) a diferentes concentraciones (10, 25, 50 y 100 µg/mg de tejido) con la finalidad de determinar la concentración óptima para el análisis separación de los núcleos en diferentes poblaciones con base en su contenido de ADN por un citómetro de flujo (BD FACSAria™ Fusion).

7.2.2 Análisis estadístico del contenido de ADN en las poblaciones.

Para el análisis estadístico de los ensayos se determinó el CV de la población 2N, el promedio de núcleos en fase S y por último el índice de ADN para determinar el nivel de ploídia en las muestras (Duque, Andreeff, Braylan, Diamond, & Peiper, 1993; Eudey, 1996; Shankey et al., 1993).

Para la obtención de estos parámetros se utilizó la plataforma FlowJo®.

8. Resultados

8.1 Estandarización de la técnica de extracción de núcleos de las muestras de tejido embebido en parafina

En los resultados se muestra los datos recabados y analizados durante la estandarización de la técnica.

En primera instancia se determinó el tiempo de disgregación óptimo en las muestras tomando un tiempo control de 3 h de incubación y 18 h experimental.

A simple vista en las imágenes de los núcleos de la figura 11, se observa que la muestra perteneciente a las 3 horas de incubación tuvo baja presencia de núcleos en comparación con la muestra de 18 horas de incubación donde se observa una mayor concentración de estos y de manera detallada su morfología en contraste con la muestra de 3 horas de disgregación.

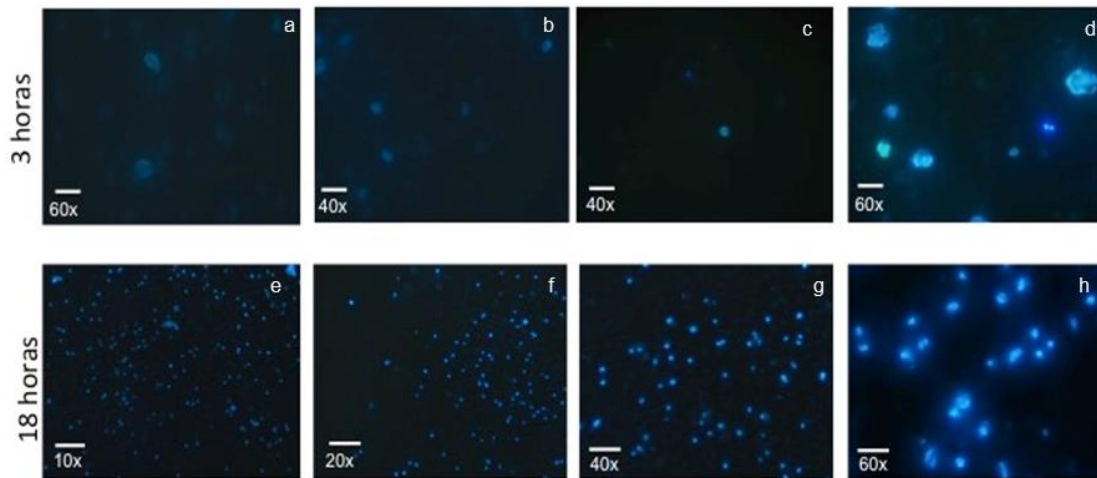


Figura 13. Imagen de núcleos teñidos con Hoechst 33342. Las fotografías corresponden a los diferentes aumentos 10x, 20x, 40x y 60x respectivamente de la muestra de 3 horas y 18 horas.

Posteriormente se hizo un ajuste en la concentración de enzima colagenasa, donde se determinó que la concentración óptima fue de 250 CDU, en la cual se muestra una mayor concentración de núcleos en la muestra. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las tres concentraciones de colagenasa ($P=0.2101$) (Figura 14).

Número de núcleos por concentración de enzima

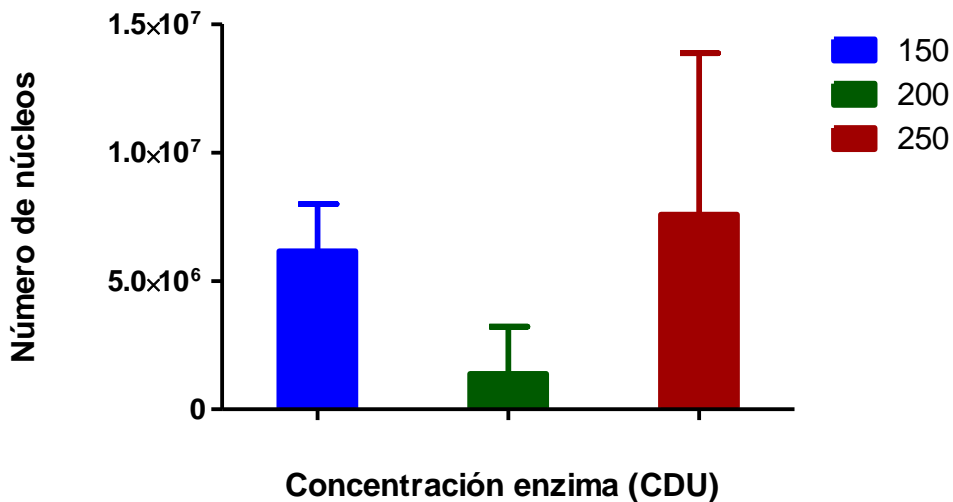


Figura 14. Número de núcleos por concentración de enzima (CDU). Se observa un mayor número de núcleos en la concentración de enzima de 250 CDU de colagenasa cruda. No se observan diferencias estadísticamente significativas ($P=0.2101$).

También se ajustó la concentración de tejido, con la finalidad de tener una relación cuantitativa del número de núcleos por mg, se realizó un conteo de los núcleos por mg de tejido partiendo de un peso de 10 mg a 1 mg se realizó una curva (Figura 12). En la curva de la muestra proveniente de la muestra filtrada se puede observar una relación ascendente entre el número de núcleos y mg de tejido, aunque en 5 y 10 mg la cantidad de núcleos decae y en este último punto la concentración aumenta por mg de tejido.

En cuanto a la muestra de la malla en la gráfica se puede observar una concentración de núcleos estable en el intervalo entre 1 y 5 mg, que es más baja considerando la cantidad de núcleos que se registraron a mayor peso de tejido (Figura 12).

En el análisis estadístico de la curva se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambas muestras en cuanto al número de núcleos contados en la malla y la muestra filtrada ($P= 0.0034$; $P<0.05$).

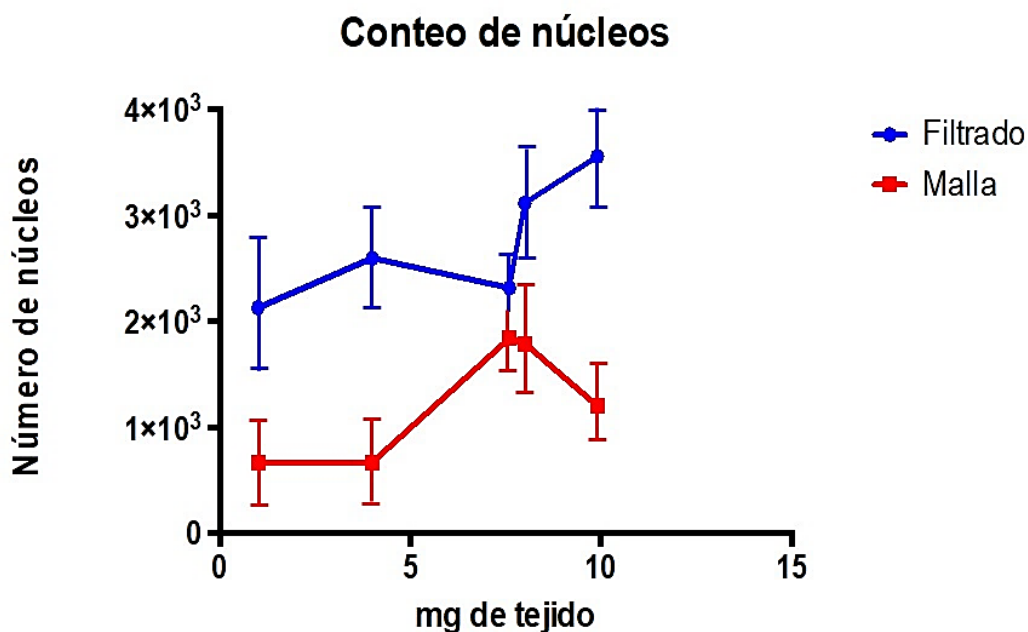


Figura 15. Gráfica del número de núcleos en los diferentes pesos de tejido 9.9 mg, 8 mg, 4 mg y 1 mg, en la muestra filtrada y la malla. En la línea azul correspondiente a la muestra del filtrado se observa una tendencia creciente en de 0 a 5 mg de tejido; sin embargo, en este último punto se observa que la gráfica decae para aumentar en 10 mg. Por otra parte, la línea roja que representa gráficamente el conteo de núcleos en la muestra de la malla se ve menor concentración de núcleos

en comparación con la muestra filtrada. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambas muestras con respecto a la media de núcleos obtenida ($P= 0.0034$; $P<0.05$).

Dados estos resultados se tomó en cuenta la disgregación de muestras de tejido entre 1 a 2 mg. Para lo que se observó la presencia de núcleos en estas muestras, tanto en la malla como en la muestra purificada. En la figura 13, se muestran fotografías de ambas muestras, en la imagen 12a que corresponde a la muestra filtrada se puede observar una alta concentración de núcleos y en el acercamiento a 40x de la imagen 12d se observa además de la presencia de núcleos pocos detritos de tejido.

En cuanto a la muestra de la malla se observa baja presencia de núcleos en la imagen 12e y muchos pedazos de tejido no disgregado en la imagen 12h.

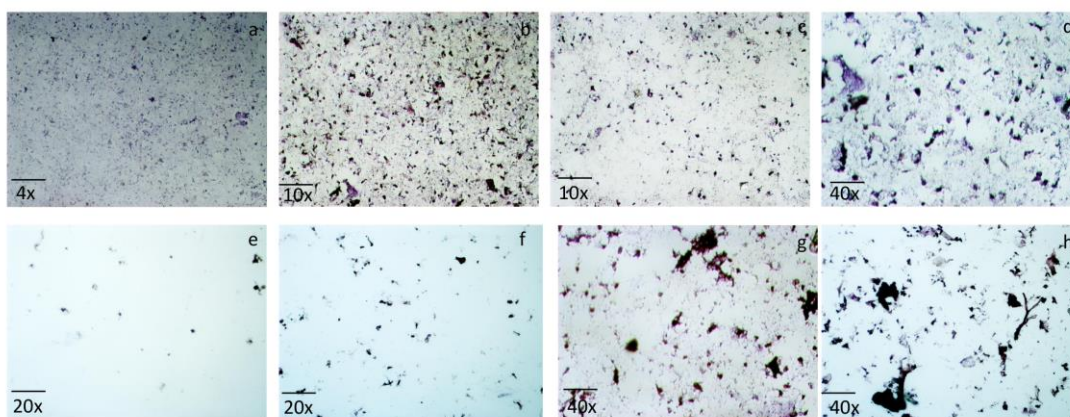


Figura 16. Imagen de núcleos teñidos con Hematoxilina vistos a diferentes aumentos 4x, 10x, 20x y 40x respectivamente de la muestra filtrada a, b, c, d y la malla e, f, g y h.

Además, se pudo observar detalladamente la morfología de los núcleos en ambas muestras y se le tomaron medidas al diámetro de estos, los cuales en promedio tuvieron entre 5 y 10 μm (Figura 14).

8.2 Análisis y separación de los núcleos en poblaciones subclonales en citometría de flujo.

Tomando en cuenta los resultados de la estandarización de la técnica de extracción de núcleos, se realizó la separación física y la evaluación de la heterogeneidad intratumoral de los núcleos por citometría de flujo en muestra de tejido sano y tejido tumoral.

Los diagramas de dispersión de luz de la figura 15 demuestran que solo el 7.05% (15,877 núcleos) del total de núcleos (225,128 núcleos) de tejido sano fueron detectados dentro de los canales 50k a 250k de ambos ejes (X,Y). De la misma manera se observa que el 27.1% del total de los núcleos de tejido tumoral están dentro de estos rangos (15 a) f.

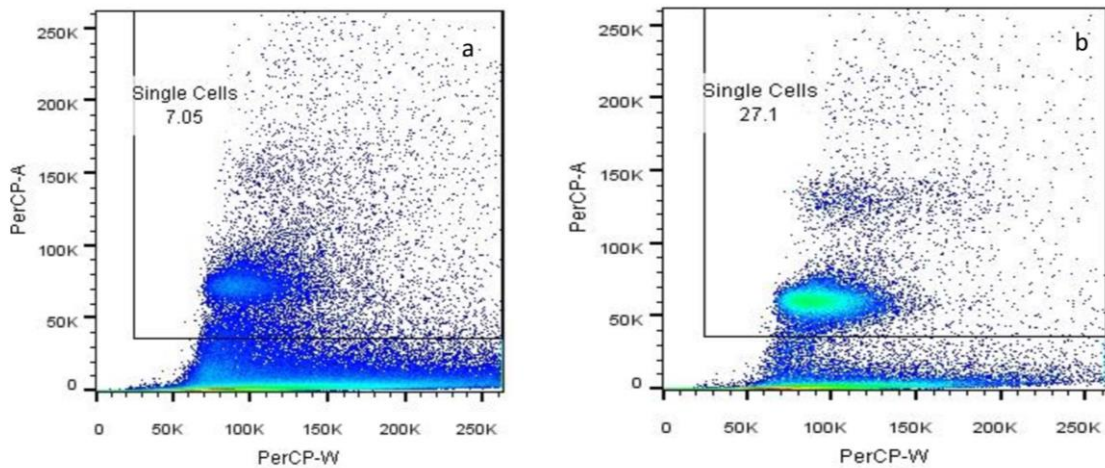


Figura 17. Diagrama de dispersión de luz del contenido de ADN y ciclo celular de los núcleos aislados de tejido tumoral y tejido sano. Ambos diagramas muestran los núcleos considerados dentro de los parámetros de la variante independiente X= PerCP-W (tamaño) y la variable independiente Y= PerCP-A (complejidad), se tomaron en cuenta los núcleos dentro de los intervalos de 50k a 250k de ambas variables. 15 a) Los núcleos considerados para la separación de las poblaciones del tejido sano fue el 7.05% del total de la muestra. En el tejido tumoral 15b) solo se consideraron el 27.1%.

Por otra parte, el histograma de la separación de poblaciones de la figura 16, muestra el contenido de ADN de los núcleos de ambas muestras.

En el histograma 16 a) que corresponde al tejido sano se puede apreciar la presencia de un pico de lado izquierdo al de 2N, el cual fue tomado como pedacería de núcleos mal cortados.

Posterior, se realizó el análisis estadístico y se obtuvo un índice de DNA (DI) de 0.8, 9.47% de los núcleos estuvieron en el pico 4N y se obtuvo un coeficiente de variación igual a 12.4%.

En cuanto al histograma del tejido tumoral 16b) se determinó que el 2.95% de los núcleos estuvieron en el pico 4N, tuvieron un DI de 1.23 y un CV igual a 10.4%.

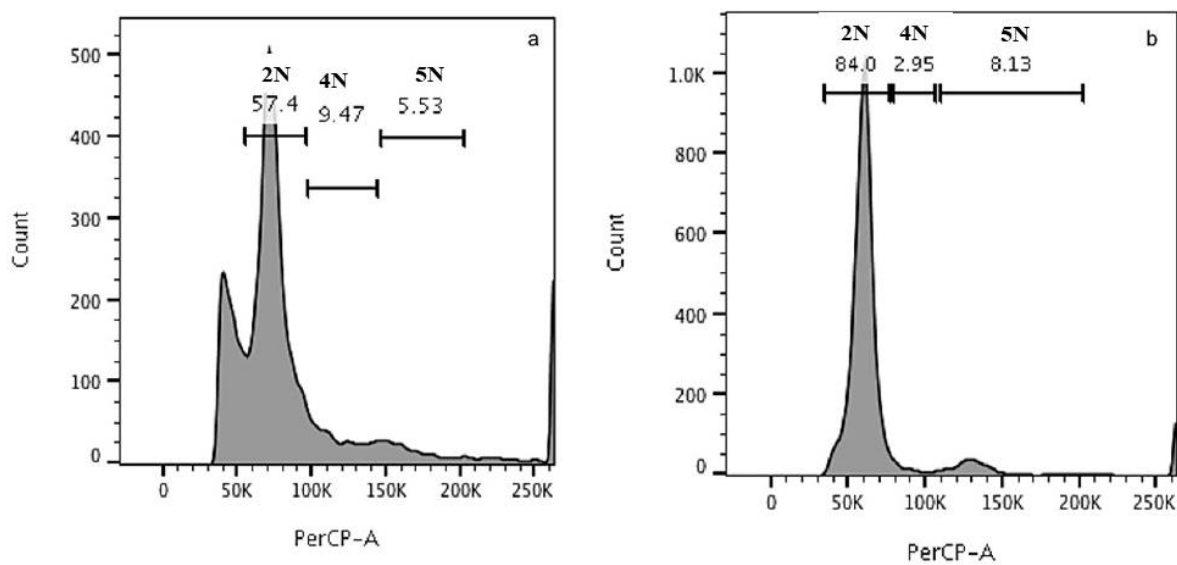


Figura 18. Histogramas de las poblaciones aisladas de ambos tejidos: sano y tumoral.

Histograma 16 a muestra un pico adicional de lado izquierdo de G0-G1 con un incremento en la fracción de la fase S de un 9.47%, un DI= 0.8 y un CV=12.4%. 16 b histograma de las poblaciones aisladas de tejido tumoral con el 2.95% de los núcleos en fase S, DI=1.23 y un CV=10.4%.

Debido al bajo porcentaje de núcleos teñidos con IP y los pocos eventos generados en el análisis por citometría de flujo se realizó una modificación en la concentración de yoduro de propidio, donde se hizo una curva de concentración de IP: 10, 25, 50 y 100 μg , contra la concentración de tejido (mg tejido). Esto con el fin de elegir la concentración óptima para elevar los núcleos teñidos en las muestras.

En la figura 17 se observa los diagramas de dispersión de luz de cada concentración de IP contra mg de tejido sano. Donde se obtuvieron 32.64% (11,718 núcleos) de núcleos teñidos del total de la muestra (35,961) en 10 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tejido (17a), 16.8% (10,085) de un total de 59,881 núcleos en la gráfica correspondiente a 25 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (17b), 13.3% (10,007 núcleos) de un total de 75,487 núcleos (17c) y 16.8% (10,633 núcleos) de un total de 63,226 núcleos (17d).

En cuanto al porcentaje de núcleos teñidos en la muestra de tejido tumoral, la figura 19 muestra los diagramas de dispersión de luz para las concentraciones, donde 42.6% de los núcleos (10,604 núcleos) del total de la muestra (24,864) fueron teñidos en una concentración de 10 μg de IP/mg de tejido, 39.1% de los núcleos (10,543 núcleos) de 26,970 núcleos, fueron teñidos en una concentración de 25 μg de IP/mg de tejido, 47.5%

de los núcleos fueron teñidos (10,540 núcleos), (total= 22,202), en 50 µg de IP/mg de tejido, 16.2% de los núcleos fueron teñidos (11,335 núcleos), (total= 70,113), en 100 µg de IP/mg de tejido.

Comparando ambas muestras en cuanto al porcentaje de núcleos teñidos se observa en la figura 21 que la mejor concentración fue 100 µg de IP/mg de tejido ya que ambas muestras tienen un porcentaje de núcleos teñidos muy similar (16.2 y 16.8 respectivamente), en ambas muestras no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al porcentaje de núcleos teñidos por concentración de IP ($P=0.1913$, $P>0.05$).

En cuanto al análisis de los histogramas generados por cada concentración de IP en tejido sano y tejido tumoral. En la figura 18 que corresponde a los histogramas de tejido sano, donde la imagen 18a pertenece a la concentración 10 µg de IP/mg de tejido se observa un pico adicional a 2N, un incremento en 4N del 17.5%, un $DI=1.5$ y $CV=23.5\%$. La imagen 18b corresponde a la concentración 25 µg de IP/mg de tejido, en dicho histograma se observa que el 21.5% de los núcleos se encuentran en la población 4N, $DI= 1.06$ y un $CV=21.5\%$. El histograma 18c corresponde a la concentración 50 µg de IP/mg de tejido muestra una fracción del 9.04% en 4N, $DI=1.49$ y $CV=10.8\%$. Por último, en el histograma que pertenece a la concentración 100 µg de IP/mg de tejido (18d) se observa que 11.3% de los núcleos se encontraron en la población 4N, $DI=0.914$ y un $CV=18.1\%$.

Por otro lado, la figura 20 muestra el análisis de la distribución de las poblaciones de tejido tumoral, el histograma 20a corresponde a la concentración 10 µg de IP/mg de tejido, muestra que el 13.1% de los núcleos se encontraron en la población 4N, con un $DI=1.55$ y un $CV=14.9\%$. El histograma de la figura 20b pertenece a la concentración de 25 µg de IP/mg de tejido se nota una fracción del 11% de núcleos en la población 4N, un DI de 0.93 y un CV de 20.6%. El histograma 20c pertenece a la concentración de a la concentración de 59 µg de IP/mg de tejido, muestra un porcentaje del 9.94% de núcleos en la población 4N, un DI de 0.66% y un CV de 14.4%. Por último, el histograma 20d que corresponde a la concentración de 100 µg de IP/mg de tejido, muestra que el 8.52% de los núcleos se encontró en la población 4N, con un DI del 1.09 y un CV del 20.4%.

Con el proposito de comparar el porcentaje de núcleos teñidos por concentración de IP se realizó una gráfica de puntos (Figura 22), la cual muestra que la mejor concentración de IP para teñir los núcleos en la muestras en cuanto a 1 mg de concentración de tejido fue de 100 µg, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de los núcleos teñidos en la muestra de tejido sano y tejido tumoral.

Tambien se hizo la comparación de los ID en las diferentes concentraciones de IP y se observa en ambas que la mejor concentración es la de 100 µg de IP/mg de tejido, debido a

que el ID registrado a esta concentración en tejido sano fue de 0.96, cifra cercana a 1 que indica que el tejido es diploide y en el tejido tumoral fue de 1.09 cifra mayor a 1 que indica aneuploidía.

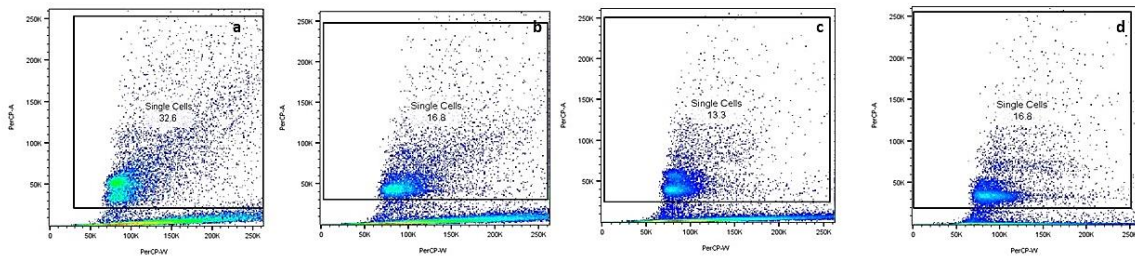


Figura 19. Diagrama de dispersión de luz del contenido de ADN y ciclo celular de los núcleos aislados de tejido sano. Los diagramas a) 10 μg de IP/mg de tejido, b) 25 μg de IP/mg de tejido, c) 50 μg de IP/mg de tejido y d) 100 μg de IP/mg de tejido muestran los núcleos considerados dentro de los parámetros de la variante independiente X= PerCP-W (tamaño) y la variable independiente Y= PerCP-A (complejidad), se tomaron en cuenta los núcleos dentro de los intervalos de 50k a 250k de ambas variables. 17a) Los núcleos considerados para la separación de las poblaciones del tejido sano fue el 42.6% del total de la muestra. En diagrama 17b) solo se consideraron el 39.1%, 47.5% fueron considerados en el diagrama 17c) y por último en la gráfica 17 d) se consideraron 16.2%.

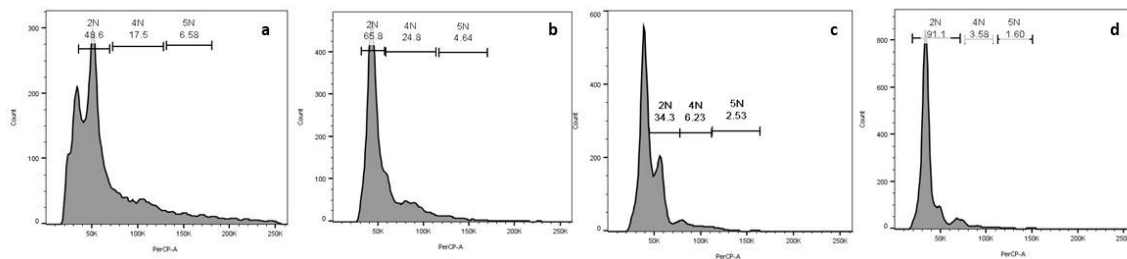


Figura 20. Histogramas de las poblaciones aisladas del tejido sano por concentración de yoduro de propidio μg de IP/mg de tejido sano. La figura del inciso a) pertenece al histograma de la concentración de IP 10 $\mu\text{g}/\text{mg}$ tejido sano, la gráfica muestra un pico adicional de lado izquierdo de 2N, también muestra un incremento en la fracción 4N del 17.5%, $\text{DI}=1.5$ y un $\text{CV}=23.5\%$. b) La imagen muestra el histograma correspondiente a la concentración 25 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tejido con el 21.5% de los núcleos en 4N, $\text{DI}=1.06$ y un $\text{CV}=21.5\%$. c) el histograma correspondiente a la concentración de IP 50 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tejido el cual presento el 9.04% de los núcleos en 4N con un $\text{DI}=1.49$ y un $\text{CV}=\dots$

10.8%. d) Por último el histograma de la concentración de IP 100 µg/ mg de tejido con 11.3% de los núcleos en 4N, un DI= 0.914 y un CV= 18.1%.

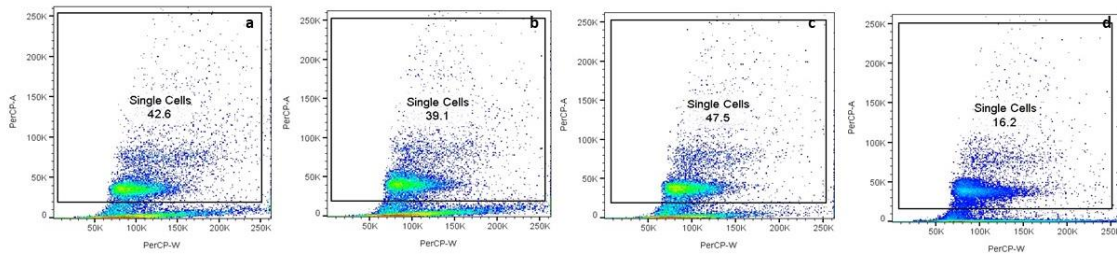


Figura 21. Diagrama de dispersión de luz del contenido de ADN y ciclo celular de los núcleos aislados de tejido tumoral. Los diagramas a) 10 µg de IP/mg de tejido, b) 25 µg de IP/mg de tejido, c) 50 µg de IP/mg de tejido y d) 100 µg de IP/mg de tejido muestran los núcleos considerados dentro de los parámetros de la variante independiente X= PerCP-W (tamaño) y la variable independiente Y= PerCP-A (complejidad), se tomaron en cuenta los núcleos dentro de los intervalos de 50k a 250k de ambas variables. 17a) Los núcleos considerados para la separación de las poblaciones del tejido sano fue el 42.6% del total de la muestra. En diagrama 17b) solo se consideraron el 39.1%, 47.5% fueron considerados en el diagrama 17c) y por último en la gráfica 17 d) se consideraron 16.2%.

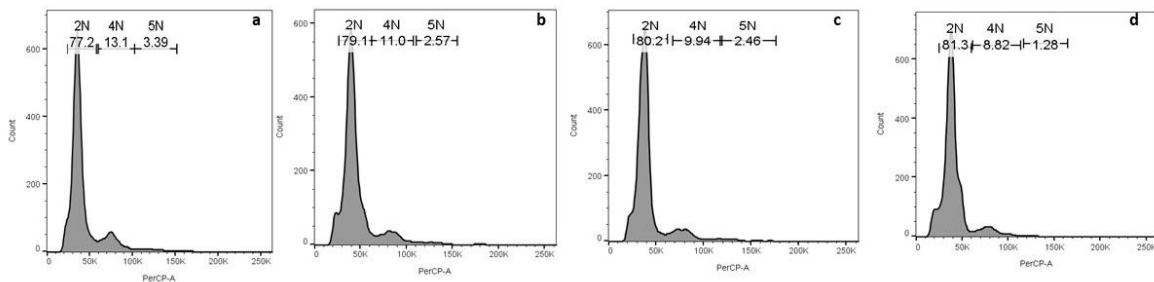
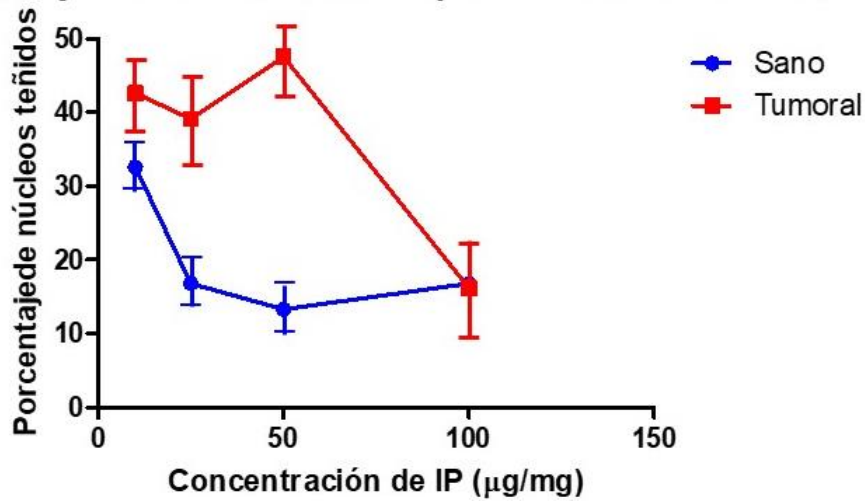


Figura 22. Histogramas de las poblaciones aisladas del tejido tumoral por concentración de yoduro de propidio µg de IP/mg de tejido. La figura del inciso a) pertenece al histograma de la concentración de IP 10 µg/mg tejido, muestra un incremento en la fracción de la fase S del 18.7%, DI= 1.55 y un CV=14.9%. b) La imagen muestra el histograma correspondiente a la concentración 25 µg/mg de tejido en el que se observa que el 8.39% de los núcleos están en fase S, DI=0.93 y un CV=20.6%. El inciso c) muestra el histograma correspondiente a la concentración de IP 50 µg/ mg de tejido, el cual presentó el 11.5% de los núcleos en fase S con un DI= 0.66 y un CV= 14.4%. d) Por último este inciso muestra el histograma de la concentración de IP 100 µg/ mg de tejido con 7.61% de los núcleos en fase S, un DI= 1.09 y un CV= 20.4%.

Concentración de IP ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Sano	Tumoral
10	32.6	42.6
25	16.8	39.1
50	13.3	47.5
100	16.8	16.2

Porcentaje de núcleos teñidos por concentración de IP



bhg878

Figura 23. Porcentaje de núcleos teñidos en las muestras de tejido sano y tejido tumoral correspondientes a las concentraciones de IP (μg) / concentración de tejido (mg). No existieron diferencias estadísticamente significativas entre ambas muestras en cuanto al porcentaje de núcleos teñidos ($P=0.1913$, $P>0.05$).

Yoduro de Propidio (IP)	Sano	Tumoral
10	1.500	1.55
25	1.060	0.93
50	1.490	0.66
100	0.914	1.09

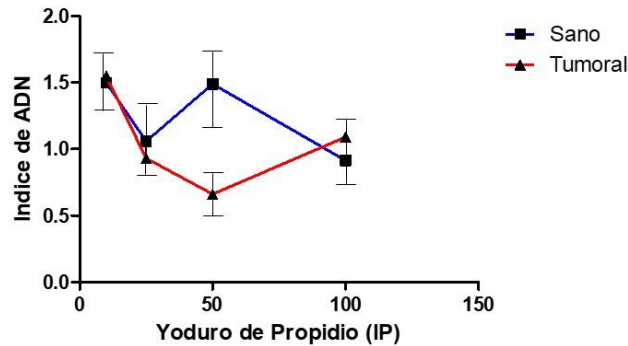


Figura 24. Índice de ADN por concentración de IP en tejido sano y tumoral. No existieron diferencias estadísticamente significativas entre ambas muestras en cuanto al ID ($P=0.4735$, $P>0.05$)

9. Discusión

El cáncer colorrectal (CCR) fue la segunda y la tercera neoplasia más común en hombres y mujeres, respectivamente en el 2012. En cifras, su incidencia fue de 614,304 casos en mujeres (el 9.2% de todos los casos de cáncer) y 746,298 en hombres (10% de todos los casos de cáncer) (GLOBOCAN, 2012).

Se sabe que los tumores son el resultado de la adquisición secuencial de alteraciones genéticas y epigenéticas, las cuales confieren a las células variación genética distribuida en diferentes subclonas intratumorales, concepto conocido como ITH.

La ITH está íntimamente ligada a la recurrencia y a la pobre supervivencia, ya que se ha descrito que dentro de la masa tumoral heterogénea existen alteraciones genéticas en baja frecuencia alélica que no son detectadas al momento del diagnóstico y pueden generar resistencia a la terapia (Nowell, 1976; Leonart, Martin-Duque, Sanchez-Prieto, Moreno, & Ramon y Cajal, 2000; Parsons, 2008; Barrett et al., 2013; Davis, Gao, & Navin, 2017).

Por eso se han desarrollado métodos de análisis para la detección de estas alteraciones o subclonas presentes en bajas frecuencias alélicas, como es el caso de la técnica de SNS (Navin & Hicks, 2011). Esta metodología se basa en el aislamiento físico de poblaciones de núcleos de células del tejido tumoral, con base en su contenido de ADN, por medio de

citometría de flujo (Boyd, Raja, Johnson, Eberhard, & Lackner, 2009; Navin et al., 2010; Navin et al., 2011; Holley et al., 2012; Barrett et al., 2013; Bolognesi et al., 2016; Martelotto et al., 2017).

Para analizar la ITH en este trabajo se estandarizó un método de extracción de núcleos provenientes de tejido embebido en parafina (Holley et al., 2012 y Barrett et al., 2013), obtenido a partir de un modelo de CCR inducido con AOM-DSS en ratones BALB/c.

En primer lugar, se utilizaron dos enzimas para la degradación de la matriz extracelular: la colagenasa cruda y la hialuronidasa. La colagenasa se empleó para digerir el colágeno de la matriz extracelular, presente en más del 90% de la misma (Alberts et al., 2002). Las colagenasas son una familia de endopeptidasas que digieren diferentes tipos de colágeno fibrilar (Balbín et al., 1998). En este trabajo se utilizó una mezcla de la colagenasa bacteriana obtenida de la bacteria *Clostridium histolyticum*, debido a que esta mezcla tiene actividad de digestión de todos los tipos de colágenos (Bond & Van Wart, 1984; Wessel & Flügge, 1984; Hatheway, 1990; Matsushita & Okabe, 2001; Brüggemann & Gottschalk, 2004; Ducka et al., 2009; Eckhard, Schönauer, Nüss, & Brandstetter, 2011; Holley et al., 2012; Barrett et al., 2013).

Para digerir el tejido se ajustó el tiempo de reacción, empleando los valores descritos en la literatura. Usando como referencia reportes previos se definió el tiempo óptimo de digestión enzimática de 18 horas a 37°C (Holley et al., 2012; Barrett et al., 2013 y Martelotto et al., 2017)

Otro componente importante de la matriz extracelular es el ácido hialurónico (AH), el cual consiste en cerca de 50,000 repeticiones de un disacárido simple llamado ácido glucurónico, con el nombre químico β (1→3) *N*-acetilglucosamina β (1→4) (Laurent & Fraser, 1992). Esta molécula forma un gel en la matriz extracelular, debido a que es de carácter hidrofílico. Lo anterior les confiere hidratación y viscosidad a las células y las hace resistentes a la compresión (Lodish et al., 2000; Buhren et al., 2016).

La función del AH es dependiente de su localización en los tejidos y tiene aproximadamente un día de vida media, es degradado en pequeños fragmentos por hialuridasas, las cuales hidrolizan sus enlaces hexosaminidicos (Csoka, Frost, & Stern, 2001; Stern & Jedrzejak, 2006). Existen dos isoformas de la hialuronidasa, las cuales se expresan en los testículos de mamíferos, en la superficie de la cabeza del espermatozoide. En la fertilización estas enzimas facilitan la penetración del espermatozoide al cúmulo de células que rodean el oocito, que tiene una matriz extracelular rica en AH (Lin, Mahan, Lathrop, Myles, & Primakoff, 1994). Debido a que el tejido testicular presenta una alta concentración de

hialuronidasa bioactiva, la hialuronidasa comercial es extraída de testículo bovino (Buhren et al., 2016).

En el presente proyecto se utilizaron 100 U de hialuronidasa, tomando en cuenta los antecedentes de Holley et al (2012) y Barrett et al (2013), en combinación con la colagenasa cruda. La hialuronidasa es usada usualmente en combinación con la colagenasa para la disociación de matriz extracelular (Martelotto et al., 2017).

Como elemento adicional en la purificación de los núcleos, se utilizó una malla de 35 μm para filtrar en dos ocasiones los núcleos y eliminar detritos celulares (Holley et al., 2012; Barrett et al., 2013 y Martelotto et al., 2017). Y por último elemento, se tomó en consideración la masa del tejido a disgregar. Se realizó una curva de cantidad de tejido con concentraciones de colagenasa y hialuronidasa constantes. En estos ensayos se cuantificó el rendimiento, expresado en número de núcleos extraídos, para contar con un parámetro de referencia para futuros experimentos. Estas modificaciones mejoraron visiblemente la pureza de los núcleos en las muestras, evaluada mediante microscopía de luz y de fluorescencia.

En cuanto a los resultados del conteo de núcleos, se observaron variaciones importantes en el número de núcleos por mg de tejido. Estas variaciones pueden ser causadas por variaciones en la celularidad de cada muestra, así como por diferencias en la captación de núcleos por la malla en el proceso del filtrado.

La disgregación del tejido y la liberación de los núcleos del tejido se confirmó por microscopía electrónica y de fluorescencia. Una vez obtenidos los núcleos aislados del tejido, se procedió a su caracterización mediante ensayos de citometría de flujo. La citometría de flujo es una herramienta de análisis que puede ser usada para discriminar partículas, células y/o núcleos (como en este caso), con base en la medición de parámetros o características de cada partícula (Eudey, 1996). Esta técnica tiene diversas aplicaciones en el área biológica y médica, incluyendo hematológicas, inmunológicas y análisis del contenido del ADN en cáncer (Dressler & Bartow, 1989). El primer uso médico de esta herramienta es el análisis del contenido de ADN en células provenientes de muestras tumorales, el cual provee datos sobre la proliferación celular dentro del tumor y puede ser tener un valor pronostico en estudios clínicos de cáncer (Dressler & Bartow, 1989). Actualmente, esta herramienta de análisis se ha utilizado para discriminar e identificar poblaciones celulares de distintas fracciones del tumor y separarlas de poblaciones no tumorales en cada muestra de interés (Ruiz et al., 2011; Liu et al., 2012).

En 1983 Hedley y colaboradores (Hedley, Friedlander, Taylor, Rugg, & Musgrove, 1983), describieron un método de análisis del contenido de ADN celular usando muestras

tumorales embebidas en parafina. El desarrollo de esta técnica abrió la puerta para estudios retrospectivos del análisis por citometría de flujo del contenido de ADN en muestras de pacientes. Desde entonces se han desarrollado numerosos estudios de valor pronóstico en diferentes tipos de cáncer (Hedley, Friedlander, Taylor, Rugg, & Musgrove, 1983; Heiden, Wang, & Tribukait, 1991; Holley et al., 2012; Barrett et al., 2013).

Para el desarrollo de esta técnica las células tumorales son preparadas, aisladas y teñidas con fluorocromos específicos a ADN y analizadas por citometría de flujo. Existen una variedad de fluorocromos afines al ADN que pueden teñir células fijas, los más comunes son el 4',6 diamidino-2-fenilidol (DAPI), el yoduro de propidio (IP) y el 7-amino-actinomicina D (7-AAD) (Darzynkiewicz, Halicka, & Zhao, 2010).

En este proyecto se utilizó el fluorocromo de marcaje de ADN IP, el cual es excitado con luz azul a 488 nm (Darzynkiewicz, Halicka, & Zhao, 2010). En la figura 15 se consideró un porcentaje relativamente bajo de núcleos teñidos con IP, en tejido sano 7.05% y tejido tumoral 27.1%.

En cuanto al análisis de los histogramas, se tomó en consideración diferentes parámetros como el CV de la población 2N, el porcentaje de células en 4N y el índice de ADN (DI) definido como el contenido de células tumorales sobre el contenido de células normales, que su resultado expresa la ploidia del ADN en los tejidos (Grogan & Collins, 1990). En los histogramas de tejido sano, en la figura 16 se puede observar la presencia de un pico adicional de lado izquierdo a la población 2N, el cual puede explicarse como pedacería de núcleos dentro de la muestra. Diversos autores describen que muestras de núcleos provenientes de tejido embebido en parafina frecuentemente tienen presencia de fragmentos nucleares, explican que estos pueden ser generados por la degradación o fragmentación de los núcleos por la técnica de corte del tejido por el micrótopo, creando de esta manera pedazos pequeños de núcleos con ADN. Este aspecto, disminuye la confiabilidad del análisis, ya que producen eventos que son visibles en la parte izquierda de los histogramas, que pueden ser significativos para el cálculo de la fracción de núcleos en la población 4N, formando un incremento de núcleos en esta población como se observa en la gráfica del tejido sano de la figura 18a, lo que repercute en la distribución del histograma. (Joensuu, Alanen, Klemi, & Aine, 1990; Price & Herman, 1990; Esteban et al., 1991; Fosså et al., 1992; Frierson, 1991; Heiden, Wang, & Tribukait, 1991; Holley et al., 2012 y Barrett et al., 2013)

Prosiguiendo con el análisis estadístico de los histogramas de ambos tejidos, el reporte del análisis de tejido sano arroja un CV elevado del 12.4% y en el tejido tumoral también se

observa un coeficiente de variación alto $CV=11.7\%$ (Figura 16), valores comparados con los descritos en la guía de citometría de flujo de Grogan & Collins de 1990, donde determinan que un CV de confianza para este tipo de análisis debe ser menor al 3% en muestra fresca y en muestras de tejido embebido en parafina debe ser menor al 5% o un valor inferior al 10%. Los valores tan altos obtenidos en el análisis se justifican por el bajo número de núcleos analizados por el citómetro de flujo, que fue del 7.05% y del 27.1% para tejido sano y tejido tumoral, respectivamente. Hedley en 1993 describió en la guía del consenso de citometría del ADN, un mínimo de 10, 000 a 20,000 eventos por histograma para generar una menor fluctuación estadística en el histograma y tener una sobre estimación de células en áreas de pocas células, especialmente en la población 4N, hecho que también describe Rabinovitch en 1994 y Holley et al., 2012.

En cuanto a los DI se tomó como referencia los valores que describen Hedley en 1993 en la guía, donde describen un $DI=1$ para tejido sano y un $1 < D < 1$ para tejido tumoral, en la figura 16, en el tejido sano se observa un $DI=0.8$, el cual está bajo del rango de 1 que indica un tejido subdiploide (Darzynkiewicz et al., 1997). En tejido tumoral se muestra un $DI=1.23$, que indica aneuploidía (Grogan & Collins, 1990).

Existen antecedentes que indican índices de ADN de tejido embebido en parafina menores a los reportados generalmente en tejido fresco. Este hecho se debe a la técnica de fijación de células, ya que el formaldehído, genera entrecruzamientos en el ADN y proteínas como las histonas, lo que algunas veces impide la interacción del ADN con el flourocromo (Darzynkiewicz, Traganos, Kapuscinski, Staiano-Coico, & Melamed, 1984; Zalupski et al., 1993).

Debido al bajo porcentaje de núcleos teñidos en la figura 16, se realizó una curva de concentración de IP (10, 25, 50 y 100 μg) por mg de tejido disgregado. En la figura 21 se observa el porcentaje de núcleos teñidos por concentración de IP en ambos tejidos: sano y tumoral, la cual muestra que la mejor concentración es 100 μg de IP sobre mg de tejido disgregado, puesto que en ese punto coinciden la fracción de núcleos teñidos en ambas muestras, no se muestran diferencias estadísticamente significativas ($P>0.05$).

Así mismo, en el análisis de la gráfica de la figura 22, se observa de igual manera que el ID óptimo está asociado a la concentración de 100 μg de IP, en la cual se observa que el tejido sano tiene un $ID=0.914$ "seudo diploide" y el tejido sano un $DI=1.09$ ($DI \neq 1$), aneuploide, no se observan diferencias estadísticamente significativas ($P>0.05$).

Se ha reportado que el ID tiene relación con la sobrevivencia de pacientes con CCR. En un estudio realizado por Giaretti y colaboradores en 1991, observaron que pacientes con ID diploide ($ID=1$) tienen mayor sobrevivencia que pacientes con un ID aneuploide ($DI \neq 1$), la

mayoría de las muestras tumorales tuvieron un $DI=1$, por lo que se determinaron como neoplasias diploides.

Otro aspecto observado fue una mayor proporción de núcleos en la población $2N$ en los histogramas analizados de tejido tumoral, lo que sugiere un arresto celular en fase G_0 - G_1 del ciclo celular por parte de las células. Esta situación se puede explicar a través de la acción de los agentes químicos utilizados para la inducción a carcinogénesis colorrectal en murinos. Se sabe que el azoxymetano, uno de los procarcinogenos utilizados en este modelo, es metabolizado en el hígado en mayor proporción y otra parte en el colon, específicamente por el citocromo p450 (CYP2E) es convertido a methylazodium que es altamente reactivo y alquilante ya que genera aductos en el O^6 de los residuos de guanina del ADN lo que genera una base promutagenica O^6 metil guanina (O^6 -mdGua) la cual causa mutaciones del tipo G:C a A:T que son transiciones generadas durante la replicación que resultan en aductos que son comunes en cáncer de colon esporádico en humanos (Sohn, Ishizaki, Yang, & Fiala, 1991; Al-Saleh et al., 2008 y Tan et al., 2011).

Ante esto daño al ADN se ha visto la respuesta inmediata del gen *P53*, el cual es un factor de transcripción de unión al ADN que activa o reprime la transcripción de genes blanco que están involucrados con el arresto celular, la reparación por daños al ADN y apoptosis. Su expresión y regulación depende del tipo celular, el microambiente celular, así como de las alteraciones oncogénicas que estén involucradas (Harris, 1996; Agarwal, Taylor, Chernov, Chernova, & Stark, 1998; Meek, 2004; Wang et al., 2014). Se ha observado que *P53* actúa directamente inhibiendo el crecimiento celular mediante el arresto celular (senescencia), tras la activación de *P21* que es un inhibidor de las ciclinas *E/Cdk2* y *D/Cdk4*, con esto regula negativamente la transcripción de genes requeridos para activar la fase *S* del ciclo celular, de este modo suprime la hiperproliferación celular y la formación tumoral (Meek, 2004; Yao & Dai, 2014). También se ha visto involucrado en este aspecto el factor nuclear $NF-\kappa\beta$ (factor nuclear kappa acelerador de la cadena ligera de células de la cadena ligera de células β activadas), en respuesta al daño celular por estrés oxidativo, este factor es un promotor de la resistencia para la muerte celular programada (Kwon y Magnuson en 2007; Robertis et al., 2011; Cooks et al., 2013)

Otro de los porcarcinogenos utilizados durante el protocolo de inducción a CCR en murinos es el DSS, el cual es una heparina, que consiste en un anhidro D-glucosa (enlace-1,6-glucosídico) y sulfato. Este polisacárido contiene 17% de azufre con hasta 3 sulfatos por molécula de glucosa que administrada a murinos induce a colitis y daño en el epitelio colónico (Okayasu et al., 1990). Tessner, Cohn, Schloemann, & Stenson, 1998 demostraron que el DSS decrementa el número de células epiteliales proliferativas en un 90%. Además,

la administración crónica de DSS induce a la apoptosis, en particular decremента la proliferación celular (G1, S, G2, M Y G2) e incrementa el arresto celular en fase G0 en modelos *in vitro* usando la línea celular Caco-2 e *in vivo* con ratones Balb/C (Araki, Sugihara, & Hattori, 2006; Araki, Mukaisyo, Sugihara, Fujiyama, & Hattori, 2010). Por lo tanto, podría provocar subsecuentemente un descontrol en la proliferación celular. Es reconocido que el DSS está relacionado con el arresto celular a razón del daño al ADN. Se ha reportado que la exposición a pro inflamatorios como el DSS promueve la tumorigénesis a partir del daño al ADN causado por las EROs generadas durante la respuesta biológica inflamatoria (Meira et al., 2008). Estos aspectos antes mencionados explicarían el alto número de núcleos en esta fase en el tejido tumoral.

Este trabajo genero las bases para la caracterización de las poblaciones de tejido tumoral de CCR por citometría de flujo y su separación física en cuanto a su contenido de ADN.

10. Conclusiones

- 1.- Se estandarizó la técnica de extracción de núcleos de tejido embebido en parafina.
- 2.- Se separaron los núcleos en tres poblaciones subclonales por citometría de flujo con base en su contenido de ADN, se obtuvo el análisis del ciclo celular con datos subóptimos por el origen de las muestras y el bajo índice de núcleos en las muestras.
- 3.- La mejor concentración de yoduro de propidio para teñir los núcleos provenientes de 1 mg de tejido sano y tumoral disociado es de 100 µg/mg de tejido disgregado.
4. Se determino índice de ploídia del ADN en ambos tejidos, donde se observó que el tejido sano fue “seudo diploide” ($DI \approx 1$) y el tejido tumoral fue aneuplide ($DI \neq 1$).
5. El porcentaje alto de núcleos en la población 2N en el tejido tumoral, se explica como un arresto celular en la fase G0-G1, en respuesta a los procarcinógenos utilizados en el modelo murino.

11. Perspectivas

Los resultados que se presentan en este trabajo sugieren que la técnica de extracción de núcleos permitió la separación en poblaciones de los núcleos y la caracterización de las poblaciones por el ID. En un futuro se pretende aumentar el número de núcleos en las muestras y con esto aumentar la confiabilidad del análisis, disminuyendo la pedacearía de núcleos. Posteriormente, se busca caracterizar genéticamente estas poblaciones por

técnicas de alta sensibilidad para detectar mutaciones en genes específicos de la carcinogénesis colorrectal

13. Literatura citada

- Achilles, E.-G., Fernandez, A., Allred, E. N., Kisker, O., Udagawa, T., Beecken, W.-D., ... Folkman, J. 2001. Heterogeneity of Angiogenic Activity in a Human Liposarcoma: a Proposed Mechanism for “No Take” of Human Tumors in Mice. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 93(14), 1075–1081. <https://doi.org/10.1093/jnci/93.14.1075>.
- Albertson, D. G. 2006. Gene amplification in cancer. *Trends in Genetics: TIG*, 22(8), 447–455.
- Alexander C., Puchalski J., Klos K., Badders N., Ailles L., Kim C. 2009. *Separating Stem Cells By Flow Cytometry: Reducing Variability for Solid Tissues*. *Cell Stem Cell*; 5(6):579–83.
- Anand, P., Kunnumakara, A. B., Sundaram, C., Harikumar, K. B., Tharakan, S. T., Lai, O. S., Aggarwal, B. B. 2008. Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. *Pharmaceutical Research*, 25(9), 2097–2116
- Armitage, P., & Doll, R. (1954). The Age Distribution of Cancer and a Multi-stage Theory of Carcinogenesis. *British Journal of Cancer*, 8(1), 1–12.
- Ashktorab, H., Darempouran, M., Goel, A., Varma, S., Leavitt, R., Sun, X., & Brim, H. 2014. DNA methylome profiling identifies novel methylated genes in African American patients with colorectal neoplasia. *Epigenetics*, 9(4), 503–512. <https://doi.org/10.4161/epi.27644>.
- Barcellos-Hoff, M. H., Lyden, D., & Wang, T. C. 2013. The evolution of the cancer niche during multistage carcinogenesis. *Nature Reviews. Cancer*, 13(7), 511–518. <http://doi.org/10.1038/nrc3536>.
- Beaugerie, L., & Itzkowitz, S. H. 2015. Cancers complicating inflammatory bowel disease. *The New England Journal of Medicine*, 372(15), 1441–1452. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1403718>.

- Belpomme, D., Irigaray, P., Hardell, R., Clapp, R., Montaigner, L., Epstein, S., Sasco, J. 2007. *The multitude and diversity of enviromental carcinogens*. *Environ. Res*, 105: 414-429.
- Böttger, T. C., Potratz, D., Stöckle, M., Wellek, S., Klupp, J., & Junginger, T. 1993. Prognostic value of DNA analysis in colorectal carcinoma. *Cancer*, 72(12), 3579–3587.
- Baretton G., Guille J., Oevermann E. y Lhørs U. 1991. *Flow-cytometric analysis of the DNA-content in paraffin-embedded tissue from colorectal carcinomas and its prognostic significance*. *Cell Path.* 60:123-131.
- Bray F., Jemal A., Grey N., Ferlay J., Forman D. 2012. *Global cancer transitions according to the Human Development Index 2008–2030: a population-based study*. *The Lancet Oncology*. 13:790-801.
- Brensinger, J. D., Laken, S. J., Luce, M. C., Powell, S. M., Vance, G. H., Ahnen, D. J., ... Giardiello, F. M. (1998). Variable phenotype of familial adenomatous polyposis in pedigrees with 3' mutation in the APC gene. *Gut*, 43(4), 548–552.
- Calbo, J., van Montfort, E., Proost, N., van Drunen, E., Beverloo, H.B., Meuwisen, R., y Berns, A. 2011. *A functional role for tumor cell heterogeneity in a mose model of small cell lung cancer*. *Cancer cell*.19: 244-256.
- Cancer Genome Atlas Network. 2012. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*, 487(7407), 330–337. <https://doi.org/10.1038/nature11252>.
- Calle, E., Rodriguez, C., Walker-Thurmond, K., Thun, M. 2003. *Overweight, obesity, and mortality from cáncer in a prospectively studied cohort of U.S. adults*. *N Engl J Med*. 348: 1625-1638.
- Cheon, D.-J., & Orsulic, S. 2011. Mouse models of cancer. *Annual Review of Pathology*, 6, 95–119.
- Dick, J. E. 2008. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood*, 112(13), 4793–4807. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-08-077941>
- Dixon, K., & Kopras, E. 2004. Genetic alterations and DNA repair in human carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 14(6), 441–448. <https://doi.org/10.1016/j.semcaner.2004.06.007>.

- Feinberg, A. P., & Vogelstein, B. 1983. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*, 301(5895), 89–92.
- Ferlay, J., Shin, H., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., Parkin, D. 2010. *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008* Int J Cancer, 127:2893-2917.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., ... Bray, F. 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), E359-386. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM. GLOBOCAN 2012 v1.0, cáncer incidence and mortality Worldwide: IARC Cancer Incidence and Mortality Worldwilde: CancerBase No.11 [Internet]. Lyon, France: International Agency of Research on Cancer; 2013.
- Forman D, Bray, F. 2012. GLOBOCAN v1.0, *Cancer Incidence and Mortality Worldwide:IARC CancerBase* No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013.
- Frank, S. A. 2007. *Dynamics of Cancer: Incidence, Inheritance, and Evolution*. Princeton (NJ): Princeton University Press.
- Fu, Y., Yu J-C, Cheng T-C, Lou MA, Hsu G-C, Wu C-Y. 2003. *Breast cancer risk associated with genotypic polymorphism of the nonhomologous end-joining genes: a multigenic study on cancer susceptibility*. *Cancer Res*. 10:2440–2446.
- Fuchs, C. S., Giovannucci, E. L., Colditz, G. A., Hunter, D. J., Speizer, F. E., & Willett, W. C. 1994. A prospective study of family history and the risk of colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine*, 331(25), 1669–1674. <https://doi.org/10.1056/NEJM199412223312501>
- GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. 2015. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet (London, England)*, 385(9963), 117–171. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61682-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61682-2)
- Gerlinger, M., Rowan, A. J., Horswell, S., Larkin, J., Endesfelder, D., Gronroos, E., Swanton, C. 2012. Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. *NEJM*, 366(10), 883-892.

- Gerlinger, M., Horswell, S., Larkin, J., Rowan, A.J., Salm, M.P., Varela, I., Fisher, R., McGranahan, N., Matthews, N., Santos, C.R., et al. 2014. *Genomic architecture and evolution of clear cell renal cell carcinomas defined by multiregion sequencing. Nat. Genet.* 46: 225-233.
- Giovannucci, E., Ascherio, A., Rimm, E. B., Colditz, G. A., Stampfer, M. J., & Willett, W. C. 1995. Physical activity, obesity, and risk for colon cancer and adenoma in men. *Annals of Internal Medicine*, 122(5), 327–334.
- GLOBOCAN [Internet]. Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide: Prediction 2030 Breast Cancer incidence in Mexico. 2013 [cited 2015 septiembre 1].
- Gonzalo, V., Lozano, J. J., Muñoz, J., Balaguer, F., Pellisé, M., Rodríguez de Miguel, C., ... Gastrointestinal Oncology Group of the Spanish Gastroenterological Association. 2010. Aberrant gene promoter methylation associated with sporadic multiple colorectal cancer. *PLoS One*, 5(1), e8777. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008777>
- Grady, W. M., & Markowitz, S. D. 2002. Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 3, 101–128. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.3.022502.103043>.
- Gryfe, R., Swallow, C., Bapat, B., Redston, M., Gallinger, S., & Couture, J. 1997. Molecular biology of colorectal cancer. *Current Problems in Cancer*, 21(5), 233–300.
- Hagggar, F. A., & Boushey, R. P. 2009. Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clinics in Colon and Rectal Surgery*, 22(4), 191–197. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1242458>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57–70.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. 2011. *Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell*, 5: 144, 646–674.
- Hewish, M., Lord, C. J., Martin, S. A., Cunningham, D., & Ashworth, A. 2010. Mismatch repair deficient colorectal cancer in the era of personalized treatment. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 7(4), 197–208. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2010.18>
- Hemminki, K., & Chen, B. 2004. Familial risk for colon and rectal cancers. *International Journal of Cancer*, 111(5), 809–810. <https://doi.org/10.1002/ijc.20341>

- Holder, J. W., Elmore, E., & Barrett, J. C. 1993. Gap junction function and cancer. *Cancer Research*, 53(15), 3475–3485.
- *Holland-Frei Cancer Medicine*. 2003. 6th ed. BC Decker.
- Holley, T., Lenkiewicz, E., Evers, L., Tembe, W., Ruiz, C., Gsponer, J. R., Barrett, M. T. 2012. *Deep Clonal Profiling of Formalin Fixed Paraffin Embedded Clinical Samples*. PLoS ONE, 11:7.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (n.d.). Retrieved March 13, 2018, from <http://www.inegi.org.mx/inegi/default.aspx?c=274>.
- Irigaray, P., Newby, J., Clapp, R., Hardell, L., Howard, V., Montaigner, L., Epstein, S., Belpomme, D. 2007. *Lifestyle-related factors and environmental agents causing cancer: an overview*. Biomed. Pharmacother, 61: 640-658.
- Jančík, S., Drábek, J., Radzich, D., & Hajdúch, M. (2010). Clinical Relevance of KRAS in Human Cancers [Research article]. <https://doi.org/10.1155/2010/150960>.
- Jain, R. K. 1994. Barriers to Drug Delivery in Solid Tumors. *Scientific American*, 271(1), 58–65.
- Jasperson, K. W., Tuohy, T. M., Neklason, D. W., & Burt, R. W. (2010). Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2044–2058. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.01.054>
- Kandoth, C., McLellan, M. D., Vandin, F., Ye, K., Niu, B., Lu, C., Ding, L. 2013. *Mutational landscape and significance across 12 major cancer types*. *Nature*, 7471:502, 333–339.
- Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. 1998. Landscaping the cancer terrain. *Science (New York, N.Y.)*, 280(5366), 1036–1037.
- Komiya, Y., & Habas, R. 2008. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*, 4(2), 68–75.
- Kumar, R., Kuniyasu, H., Bucana, C. D., Wilson, M. R., & Fidler, I. J. 1998. Spatial and Temporal Expression of Angiogenic Molecules During Tumor Growth and Progression. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, 10(6), 301–311.
- Lackner, M. R., Wilson, T. R., & Settleman, J. 2012. *Mechanisms of acquired resistance to targeted cancer therapies*. *Future Oncology*, 8:8, 999–1014.

- Lengauer, C., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. 1998. Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, 396(6712), 643–649. <https://doi.org/10.1038/25292>.
- Ley, T. J., Mardis, E. R., Ding, L., Fulton, B., McLellan, M. D., Chen, K., ... Wilson, R. K. 2008. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature*, 456(7218), 66–72.
- Lichtenstein, P., Holm, N. V., Verkasalo, P. K., Iliadou, A., Kaprio, J., Koskenvuo, M., ... Hemminki, K. 2000. Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *The New England Journal of Medicine*, 343(2), 78–85. <https://doi.org/10.1056/NEJM200007133430201>
- Linnekamp J.F., Wang X., Medema J.P., Vermeulen L. 2015. *Colorectal cancer heterogeneity and targeted therapy: A case for molecular disease subtypes*. *Cancer Res.*, 75. 2:245-249.
- Loeb, L. A. (2001). A mutator phenotype in cancer. *Cancer Research*, 61(8), 3230–3239.
- Lynch, H. T., & de la Chapelle, A. 2003. Hereditary colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine*, 348(10), 919–932. <https://doi.org/10.1056/NEJMra012242>
- Lynch, P. M. 2017. HISTORIA DEL CÁNCER COLORRECTAL HEREDITARIO NO POLIPÓDICO (HNPCC). *Revista Médica Clínica Las Condes*, 28(4), 512–523. <https://doi.org/10.1016/j.rmcl.2017.07.006>
- Matchett, K. B., & Lappin, T. R. 2014. Concise reviews: cancer stem cells: from concept to cure. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 32(10), 2563–2570. <https://doi.org/10.1002/stem.1798>
- McGranahan, N., & Swanton, C. 2015. *Biological and Therapeutic Impact of Intratumor Heterogeneity in Cancer Evolution*. *Cancer Cell*, 1:27, 15–26.
- Q., McMichael, J.F., Wyczalkowski, M.A. 2013. *Mutational landscape and significance across 12 major cancer types*. *Nature*. 502: 333–339.
- Martelotto, G., Charlotte K., Picuoglio, S., Weigelt, B., Reis, S. 2014. *Breast Cancer intra-tumor heterogeneity*. *Breast cancer research*. 16: R-48.
- Martelotto, L. G., Baslan, T., Kendall, J., Geyer, F. C., Burke, K. A., Spraggon, L., ... Reis-Filho, J. S. (2017). Whole-genome single-cell copy number profiling from

formalin-fixed paraffin-embedded samples. *Nature Medicine*, 23(3), 376–385.
<https://doi.org/10.1038/nm.4279>.

- Marusyk, A., & Polyak, K. (2010). Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1805(1), 105–117.
<https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2009.11.002>
- Mitelman, F., Johansson, B., & Mertens, F. 2007. The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nature Reviews. Cancer*, 7(4), 233–245.
- Moskal, A., Norat, T., Ferrari, P., & Riboli, E. 2007. Alcohol intake and colorectal cancer risk: A dose–response meta-analysis of published cohort studies. *International Journal of Cancer*, 120(3), 664–671.
- Narayan, A., Ji, W., Zhang, X. Y., Marrogi, A., Graff, J. R., Baylin, S. B., & Ehrlich, M. 1998. Hypomethylation of pericentromeric DNA in breast adenocarcinomas. *International Journal of Cancer*, 77(6), 833–838.
- Nee, P. W. 2013. *The Key Facts on Cancer Prevention: Everything You Need to Know About Cancer Prevention*. Patrick Nee.
- Nowell, P. 2004. *The clonal evolution of tumor cell population*. *Science*. (New York) 194: 23–28.
- Nordling, C. O. 1953. A New Theory on the Cancer-inducing Mechanism. *British Journal of Cancer*, 7(1), 68–72.
- Organizacion Mundial de la Salud, febrero 2014, Consultada el 1 de septiembre del 2015.
- Pancione, M., Remo, A., & Colantuoni, V. 2012. Genetic and epigenetic events generate multiple pathways in colorectal cancer progression. *Pathology Research International*, 2012, 509348. <https://doi.org/10.1155/2012/509348>
- Parkin, D. 2002. *The global Health burden of infection-associated cancers in the year 2002*. *Int. J. Cáncer*, 118: 3030–3044.
- Pretlow, T. P., & Pretlow, T. G. 2005. Mutant KRAS in aberrant crypt foci (ACF): initiation of colorectal cancer? *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1756(2), 83–96.
<https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2005.06.002>.

- Pitot, H. C., Rubin, J., Kovach, J. S., Schutt, A. J., & Adamson, P. C. 1993. all-trans retinoic acid: a dose-seeking study in solid tumors. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 691, 250–252.
- Qu, G., Dubeau, L., Narayan, A., Yu, M. C., & Ehrlich, M. 1999. Satellite DNA hypomethylation vs. overall genomic hypomethylation in ovarian epithelial tumors of different malignant potential. *Mutation Research*, 423(1–2), 91–101.
- Robertis, M., Massi, E., Poeta, L., Carotti, S., Morini, S., Cecchetelli, L., Signori, E. y Fazio M. 2011. *The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies. Carcinogenesis*. 9:10.
- Rosenberg, W., Giardana, C. y Tanaka T. 2009. *Mouse models for the study of colon carcinogenesis. Carcinogenesis*. 2:30,183-196.
- Roschke, A. V., & Kirsch, I. R. 2010. Targeting karyotypic complexity and chromosomal instability of cancer cells. *Current Drug Targets*, 11(10), 1341–1350.
- Rowley, P. T. 2005. Inherited susceptibility to colorectal cancer. *Annual Review of Medicine*, 56, 539–554. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.56.061704.135235>
- Ruddon, R. 2007. *Cancer Biology*. Oxford University Press. Pp. 530
- Russell W., Newman C., Williamson D. 1975. A simple cytochemical technique for demonstration of DNA in cells infected with mycoplasmas and viruses. *Nature* 253: 461-462.
- Russo, A., Bazan, V., Iacopetta, B., Kerr, D., Soussi, T., Gebbia, N., & TP53-CRC Collaborative Study Group. 2005. The TP53 colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of p53 mutation: influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(30), 7518–7528. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.00.471>.
- Samowitz, W. S., Albertsen, H., Sweeney, C., Herrick, J., Caan, B. J., Anderson, K. E., ... Slattery, M. L. 2006. Association of smoking, CpG island methylator phenotype, and V600E BRAF mutations in colon cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 98(23), 1731–1738. <https://doi.org/10.1093/jnci/djj468>
- Samowitz, W. S., Albertsen, H., Sweeney, C., Herrick, J., Caan, B. J., Anderson, K. E., ... Slattery, M. L. (2006). Association of smoking, CpG island methylator

- phenotype, and V600E BRAF mutations in colon cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 98(23), 1731–1738. <https://doi.org/10.1093/jnci/djj468>
- Santarelli, R. L., Pierre, F., & Corpet, D. E. 2008. Processed meat and colorectal cancer: a review of epidemiologic and experimental evidence. *Nutrition and Cancer*, 60(2), 131–144. <https://doi.org/10.1080/01635580701684872>.
 - Schubbert, S., Shannon, K., & Bollag, G. 2007. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 7(4), 295–308. <https://doi.org/10.1038/nrc2109>.
 - Secretan, B., Straif, K., Baan, R., Grosse, Y., El Ghissassi, F., Bouvard, V., ... WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. 2009. A review of human carcinogens--Part E: tobacco, areca nut, alcohol, coal smoke, and salted fish. *The Lancet. Oncology*, 10(11), 1033–1034.
 - Secretaria de Salud (SSA) y Subsecretaria de Prevención y Promoción de la Salud (SPPS). 2013. Los 5 tipos de cáncer que más afectan a mexicanos. (s/f). Recuperado el 12 de mayo de 2016, a partir de <http://www.spps.gob.mx/noticias/1445-5-tipos-cancer-mas-afectan-mexicanos.html>
 - Seitz, H. K., & Becker, P. 2007. Alcohol Metabolism and Cancer Risk. *Alcohol Research & Health*, 30(1), 38-47.
 - Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. 2016. Cancer statistics, 2016. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 66(1), 7–30.
 - Søndergaard, J. O., Bülow, S., & Lynge, E. 1991. Cancer incidence among parents of patients with colorectal cancer. *International Journal of Cancer*, 47(2), 202–206.
 - Tanaka, T., Kohno, H., Suzuki, R., Yamada, Y., Sugie, S., & Mori, H. (2003). A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Science*, 94(11), 965–973.
 - Takayama, T., Miyanishi, K., Hayashi, T., Sato, Y., & Niitsu, Y. (2006). Colorectal cancer: genetics of development and metastasis. *Journal of Gastroenterology*, 41(3), 185–192. <https://doi.org/10.1007/s00535-006-1801-6>.
 - The global burden of disease: 2004 update. Geneva, World Health Organization, 2008.
 - Trosko, J. E. 2003. Human stem cells as targets for the aging and diseases of aging processes. *Medical Hypotheses*, 60(3), 439–447.

- Pitot, H. C., Rubin, J., Kovach, J. S., Schutt, A. J., & Adamson, P. C. 1993. all-trans retinoic acid: a dose-seeking study in solid tumors. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 691, 250–252
- Tomasetti, C., & Vogelstein, B. 2015. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science*, 347(6217), 78–81. <https://doi.org/10.1126/science.1260825>
- Vilar, E., & Gruber, S. B. 2010. Microsatellite instability in colorectal cancer-the stable evidence. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 7(3), 153–162. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2009.237>
- Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Preisinger, A. C., Leppert, M., ... Bos, J. L. 1988. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *The New England Journal of Medicine*, 319(9), 525–532. <https://doi.org/10.1056/NEJM198809013190901>
- Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. 1993. The multistep nature of cancer. *Trends in Genetics*, 9(4), 138-141.
- Vogelstein B., Papadopoulos N., Velculescu E., Zhou S., Diaz L., Kinzler K. 2013. *Cancer genome Landscapes. Cancer genomics*. 339: 1546-1558.
- Weinberg, R. 2013. *The Biology of Cancer, Second Edition*. Garland Science.
- Weigelt, B., & Reis-Filho, J. S. 2009. Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? *Nature Reviews Clinical Oncology*, 6(12), 718–730. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2009.166>.
- Weinstein, I. B. 2002. Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heal of cancer. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5578), 63–64.
- Worthley, D. L., & Leggett, B. A. 2010. Colorectal cancer: molecular features and clinical opportunities. *The Clinical Biochemist. Reviews*, 31(2), 31–38.
- Yao, Y., & Dai, W. 2014. Genomic Instability and Cancer. *Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis*, 5. <https://doi.org/10.4172/2157-2518.1000165>
- Yu, J. L., Rak, J. W., Carmeliet, P., Nagy, A., Kerbel, R. S., & Coomber, B. L. (2001). Heterogeneous Vascular Dependence of Tumor Cell Populations. *The American*

Journal of Pathology, 158(4), 1325–1334. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64083-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64083-7)

- Zandi, R., Selivanova, G., Christensen, C. L., Gerds, T. A., Willumsen, B. M., & Poulsen, H. S. 2011. PRIMA-1Met/APR-246 induces apoptosis and tumor growth delay in small cell lung cancer expressing mutant p53. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 17(9), 2830–2841. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-3168>
- Zhu, L., Finkelstein, D., Gao, C., Shi, L., Wang, Y., López-Terrada, D., ... Gilbertson, R. J. 2016. Multi-organ Mapping of Cancer Risk. *Cell*, 166(5), 1132-1146.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.045>