



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**“PAPEL DE LA PROTEÍNA ATG16L1 EN LA RESPUESTA INMUNE EN
UN MODELO DE CÁNCER COLORECTAL ASOCIADO A COLITIS”**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOLOGO

P R E S E N T A:

RIVERA REYNOSO ALDO ROBERTO

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. José Luis Reyes Hernández



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México 2021



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.

El Trabajo aquí presentado fue realizado en el Laboratorio de inmunología experimental y regulación de la inflamación hepato-intestinal ubicado en la Unidad de Biomedicina (UBIMED), en la Facultad de estudios Superiores Iztacala bajo la dirección y tutela del Dr. José Luis Reyes Hernández.

Este trabajo fue apoyado por el programa de apoyo a proyectos de investigación e innovación tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, con el número de proyecto IN224520

Dedicatoria

Agradezco a Dios por otorgarme la vida que tengo, a mi familia, mi cuerpo, mi salud y mi ser; porque sin nada de esto éste ni otros muchos logros futuros podrían ser hechos realidad. Es por eso que todos mis logros siempre serán dedicados a ti.

A mi madre, que en cada día y en cada acción de superación, se encuentra presente en mi pensamiento tu imagen y el gran cariño y amor que te tengo. Cariño y amor que van impresos en este logro. Aunque te extraño sé que estarías muy orgullosa de mi y de todo lo que he construido. ¡Gracias por todo mamá!

A mi padre que sin todo el esfuerzo que ha puesto, que sin su trabajo y gran amor no me hubiera sido posible ser el hombre que ahora soy, alcanzar los logros que tengo y poder disfrutar de este éxito en mi vida.

A mis hermanitos por su infinito cariño y por haberme hecho sentir bien en más de una ocasión con todas sus ocurrencias. ¡Los quiero mucho!

A Dani que contigo hacemos el mejor equipo del mundo, que has tenido la paciencia, amor entrega y cariño para estar ahí cuando más lo necesito. Me inyectas energía y cada día quiero ser mejor, comerme el mundo gracias a ti. Te amo.

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por el increíble apoyo que me ha brindado en mi formación académica. A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala por otorgarme todos sus recursos para que pudiera terminar de formar mi carrera profesional.

Agradezco a el Dr. José Luis Reyes Hernández por brindarme la oportunidad y confianza de poder colaborar con el en este proyecto de investigación. De igual forma agradezco a todo mi comité tutorial por su inigualable atención en el proceso de escritura de mi trabajo de titulación; sobre todo a la Dra. Sara Rodríguez Enríquez quien me ha brindado todo su apoyo y atención en este proceso.

Agradezco a mis amigos Paola y Roberto que, aunque si bien llegaron en un punto en el que mi carrera estaba prácticamente concluida; con base a sus enseñanzas, apoyo y ejemplo, me brindaron el empuje necesario para concluir este proceso y a para crear otro igual de increíble.

Agradezco a mi familia, a mi padre a mi madre y a mis hermanitos por haberme acompañado y brindado su apoyo no solamente en este proceso si no a lo largo de mi vida. Sin ustedes, esto, ni ningún logro que tenga por delante pueden ser posibles.

Y te agradezco a ti Dani, quien has estado a mi lado, sin importar las circunstancias, que cuando muchas veces quise rendirme fuiste mi guía, mi soporte, mi apoyo. Quien desde que llegó a mi vida se ha encargado de hacerme brillar y hacerme dar siempre lo mejor de mí.

Abreviaturas

ACS: del inglés American Cancer Society.

AOM: Azoximetano

APC: Gen de la poliposis adenomatosa coli.

ATG: Proteína relacionada con autofagia

ATG16L1: Proteína tipo ATG16

BFB: Ciclos de puente de fusión-ruptura cromosómica.

CAC: Cáncer asociado a colitis

CCR: Cáncer colorrectal.

CDC: del inglés *Centers for Disease Control and Prevention*.

DSS: Dextran sulfato de sodio.

EII: Enfermedad inflamatoria intestinal.

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos.

FMICpG: Fenotipo de metilador de isla CpG.

GI: Gastrointestinal.

GM: -Ganglio linfático mesentérico.

IDH: Índice de Desarrollo Humano.

IMS: Inestabilidad de microsatélites.

INC: Inestabilidad cromosómica.

ip: intraperitoneal.

MEC: Matriz extracelular.

NAACR: North American Association of Central Cancer Registries.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PAF: Poliposis adenomatosa familiar.

PE: fosfatidiletanolamina

PECs: células de exudado peritoneal del inglés *peritoneal exudate cells*.

PJ: Síndrome de poliposis juvenil.

SNP: polimorfismo de un solo nucleótido del inglés *single nucleotide polymorphism*.

SPJ: Síndrome de Peutz-Jeghers.

TEM: Transición epitelio-mesénquima.

TSP-1: Trombospodina-1.

VEGFR-A: Factor de crecimiento endotelial vascular A.

Índice

1. INTRODUCCIÓN.	3
1.1 CÁNCER COLORRECTAL.	4
1.2 EPIDEMIOLOGIA DEL CÁNCER COLORRECTAL.	5
1.3 ETIOLOGÍA DEL CCR.	10
1.4 ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL.	12
1.5 LA PROTEÍNA ATG16L1 EN LA EII.	14
2. JUSTIFICACIÓN.	16
3. HIPÓTESIS.	17
4. OBJETIVOS.	17
OBJETIVO GENERAL.	17
OBJETIVOS PARTICULARES.	17
5. Materiales y métodos.	18
1. Inducción de CCR a través de modelo AOM/DSS.	¡Error! Marcador no definido.
2. Determinación del daño histopatológico de cortes histológicos por la tinción H&M	19
3. Determinación de la producción de citocinas TH1 y TH2 en células totales de ganglio linfático mesentérico, suero sanguíneo y bazo por la prueba ELISA SANDWICH.	20
4. Caracterización de células B de PEC´s y GM por citometría de flujo.	22
6. RESULTADOS.	24
ATG16L1 regula posee un papel regulador de la respuesta inflamatoria.....	¡Error! Marcador no definido.
ATG16L1 limita el crecimiento de neoplasias a la parte terminal del colon....	¡Error! Marcador no definido.
ATG16L1 regula la respuesta inmune limitando un ambiente inmunosupresor	34
7. DISCUSIÓN.	37
8. CONCLUSIONES.	41
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	41
ANEXOS.	47
1. HALLMARKS DEL CÁNCER. (HANAHAN & WEINBERG. 2011)	47
1.1.1 Sostiene la Señalización Proliferativa:.....	47
1.1.2 Evasión de supresores de crecimiento.....	48
1.1.3 Resistencia a la muerte celular	49
1.1.4 Evasión de señales anti-replicativas.....	52
1.1.5 Inducción a angiogénesis:	53

1.1.6 Invasión de tejidos y metástasis:.....	55
1.1.7 Inestabilidad genómica y mutación	58
1.1.8 Inflamación promovida por el tumor:	59
1.1.9 Desregulación energética celular	60
1.1.10 Evasión de la respuesta inmune:.....	61
2. CLASIFICACIÓN DE NEOPLASIAS EN CCR.....	62
3. AUTOFAGIA Y LAS PROTEÍNAS ATG.	63
3.1 Papel no autofágico de las proteínas ATG.	65

RESÚMEN

El cáncer colorrectal (CCR) actualmente se encuentra entre las tres primeras causas de muerte por neoplasia en el mundo y es el primer tipo de cáncer ubicado en el tracto gastrointestinal. Para que se lleve a cabo el proceso de carcinogénesis, las células tumorales crean mecanismos de evasión inmune que les permite sobrevivir al ataque continuo del sistema inmune. A pesar de los hallazgos relevantes que describen dichos mecanismos, no se conoce la participación de todas las células del sistema inmune en las diferentes etapas de desarrollo del cáncer. En este proyecto evaluamos los cambios en la respuesta inmune durante el desarrollo de CCR en un modelo murino. Comparamos la susceptibilidad de ratones silvestres (WT) de la cepa C57BL/6 con ratones hipomorficos de la proteína ATG16L1 (ATG16L1^{HM}) ante la inducción de CCR en un modelo modificado del protocolo original.

Encontramos que los ratones ATG16L1^{HM} presentaban prolapso rectal en mayor porcentaje comparado con los ratones WT, que no presentaron, además de una disminución significativa en la longitud del colon (de hasta 4 cm) Interesantemente, no hubo diferencias significativas en el número de adenomas entre ambos grupos experimentales, pero el análisis histopatológico reveló que los ratones ATG16L1^{HM} presentaban etapas del proceso carcinogénico más avanzadas, tumores y focos de criptas aberrantes, comparado con los ratones WT, en donde se observaba criptas aberrantes. En cuanto a los cambios en la respuesta inmune que acompañan el desarrollo de CCR, observamos una respuesta tipo Th2 exagerada en los ratones ATG16L1^{HM}, así como un el doble de células B reguladoras. Lo primero se determinó con base en altos niveles de interleucina (IL)-4 en muestras sanguíneas y en sobrenadante de cultivo de ganglios mesentéricos. Cuando se comparó el porcentaje de células B reguladoras (CD19+PDL1+), en cavidad peritoneal y ganglios mesentéricos, los ratones presentaron un mayor número de estas en los sitios mencionados, comparado con los ratones WT.

En conclusión, nuestros datos sugieren que bajos niveles de expresión de la proteína ATG16L1 resultan en un proceso acelerado de CCR, acompañado de la generación de un ambiente Th2/regulador que permite el avance del proceso de carcinogénesis.

1. INTRODUCCIÓN.

El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial. Se define como un conjunto de enfermedades que pueden comenzar en casi cualquier órgano o tejido del cuerpo por el crecimiento incontrolado y propagación de células anormales. Cuando las células anormales crecen sin control y van más allá de sus límites habituales para invadir partes adyacentes del cuerpo y / o extenderse a otros órganos, pueden provocar la muerte. A este último proceso se le conoce como metástasis y es una de las principales causas de muerte por cáncer. (Mayo Foundation for Medical Education and Research, s. f. & American Cancer Society, 2020 a.)

Las causas del cáncer no se entienden completamente, se sabe que numerosos factores promueven el desarrollo de la enfermedad, incluidos muchos que son modificables (consumo de tabaco y hábitos alimenticios) y otros que no lo son (mutaciones genéticas hereditarias). Estos factores de riesgo pueden actuar simultáneamente o de manera secuencial para iniciar y promover el proceso de carcinogénesis (American Cancer Society, 2020 a).

En el año 2000 Hanahan y Weinberg publicaron una revisión influyente sobre las características distintivas del cáncer (The Hallmarks of Cancer) en donde describían seis capacidades biológicas adquiridas durante del desarrollo de la enfermedad, no obstante, en el año 2011 dicho reporte se actualizó (The Hallmarks of Cancer: The next Generation) en la que se sumaron cuatro características más. En conjunto el cáncer comprende 10 características distintivas: 1) Sostiene la señalización proliferativa, 2) Desregulación de la energía celular, 3) resistencia a la apoptosis, 4) Inestabilidad genómica y mutación, 5) Inducción a la angiogénesis, 6) Invasión del tejido y metástasis, 7) Inflamación promovida por el tumor, 8) Evasión de señales anti-replicativas, 9) Evasión de la respuesta inmune y finalmente 10) Evasión de supresores de crecimiento (Anexo 1).

1.1 CÁNCER COLORRECTAL.

El cáncer colorrectal (CCR) es un tipo de cáncer que comienza en la parte final del tubo digestivo. Suele afectar a los adultos mayores, aunque puede ocurrir a cualquier edad. Por lo general, comienza como grupos pequeños de células carentes de malignidad llamados pólipos que se forman en el interior del colon. Con el tiempo, algunos de estos pólipos pueden convertirse en cáncer de colon. Los pólipos pueden ser pequeños y desarrollar pocos o ningún síntoma (Mayo Foundation for Medical Education and Research, s. f.). La mayoría de los CCR (> 90%) pertenecen al tipo de adenocarcinoma, una neoplasia maligna que se desarrolla a partir de células epiteliales glandulares del colon y el recto; otros tipos raros incluyen el carcinoma de células escamosas, el carcinoma adenoescamoso, el carcinoma de células fusiformes y el carcinoma indiferenciado (Ver Anexo 1) (Keum & Giovannucci. 2019).

En etapas tempranas, el CCR no presenta síntomas, por lo que su detección es muy importante. A medida que crece un tumor, se pueden observar síntomas como los que a continuación se enlistan:

- Sangrado del recto.
- Sangre en las heces
- Heces oscuras o negras.
- Cambio en los hábitos intestinales o la forma de las heces. (por ejemplo, más estrecho de lo habitual)
- Calambres, dolor o molestias en la parte inferior del abdomen.
- Impulso de evacuar cuando el intestino está vacío
- Estreñimiento o diarrea que dura más de unos pocos días
- Disminución del apetito
- Pérdida de peso involuntaria

En algunos casos, la pérdida de sangre producida por el CCR promueve anemia (bajo número de glóbulos rojos), causando síntomas tales como debilidad, fatiga excesiva (American Cancer Society, 2020 b).

1.2 EPIDEMIOLOGIA DEL CÁNCER COLORRECTAL.

Cómo ya se mencionó el cáncer es actualmente una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Representa la causa principal de muerte en la mayoría de los países con alto o muy alto Índice de Desarrollo Humano (IDH), incluido Canadá y los Estados Unidos, en América del Norte; (Wild, *et al.* 2020).

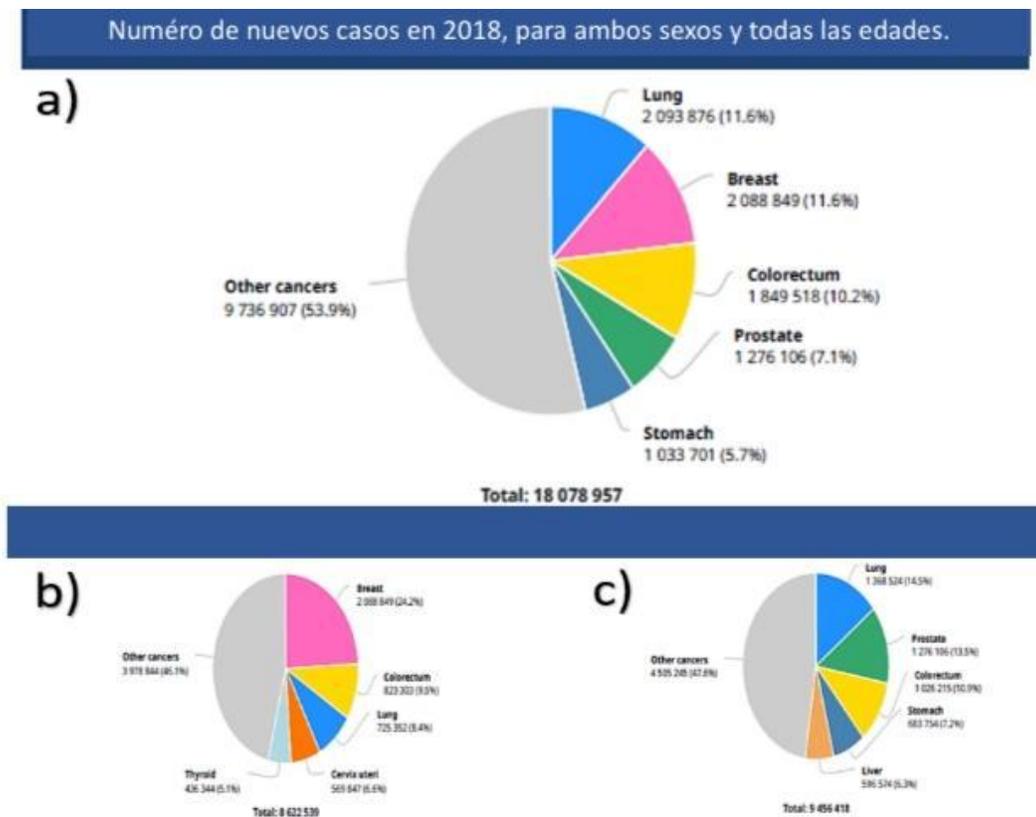


Figura 1. Casos nuevos a nivel mundial de diferentes tipos de cáncer en 2018 de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud.

a | Número de casos nuevos de cáncer para ambos sexos en el año 2018. b | Número de casos nuevos de cáncer en mujeres de todas las edades. c | Número de casos nuevos de cáncer en hombres de todas las edades. Se presentan los tipos de cáncer con mayor incidencia

A nivel mundial, en el año 2018 se presentaron un total de 18,078,957 casos de los cuales murieron 9,555,027 personas. La incidencia de cáncer fue mayor en varones con 9,456,418 casos en donde los cánceres más presentados fueron de pulmón, próstata y colorrectal; mientras que en mujeres se presentaron 8,622,539 casos, siendo el cáncer de mama, colorrectal y de pulmón los más incidentes (figura 1) (Wild, *et al.* 2020).

Tanto a nivel mundial como nacional el CCR es de los cánceres más frecuentes. (Wild, *et al.* 2020). El CCR era bastante raro en 1950, pero se ha convertido en un cáncer predominante en los países occidentales, y ahora representa aproximadamente el 10% de la mortalidad relacionada con el cáncer, ocupando el tercer lugar en incidencia y el segundo en mortalidad en el mundo con casi 900 000 muertes al año. A nivel mundial, el CCR es el tercer tipo de cáncer más común en hombres y el segundo más común en mujeres, representando un estimado 1.85 millones de casos nuevos y 881 000 muertes en 2018 (figura 1) (Kuipers *et al.*, 2015 & Dekker *et al.* 2019).

Dicha patología puede considerarse un marcador de desarrollo socioeconómico, ya que, las tasas de incidencia de CCR muestran un fuerte gradiente positivo con el IDH. En los países que experimentan una transición de desarrollo importante, las tasas de incidencia tienden a aumentar de manera uniforme con el aumento del IDH. Sin embargo, dichas tasas varían a nivel mundial (Keum & Giovannucci, 2019 & Wild, *et al.* 2020).

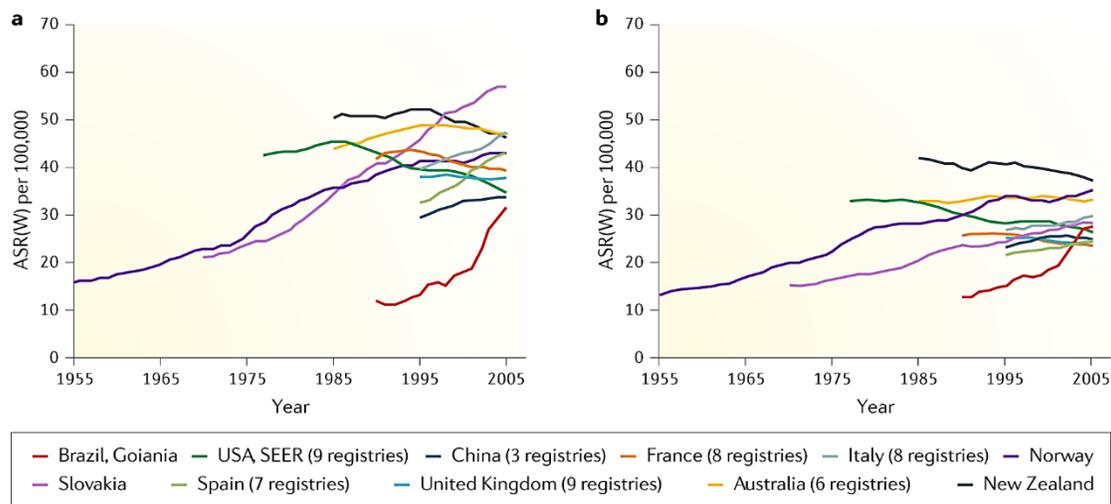


Figura 2. Tendencias temporales de las tasas de incidencia de CCR (Keum & Giovannucci, 2019).

a | Las tasas de incidencia de cáncer colorrectal (CCR) en los hombres a través en diferentes países. b | Las tasas de incidencia de CCR en las mujeres en diferentes países. Los países que experimentan crecimiento económico y occidentalización están experimentando tasas de incidencia crecientes (por ejemplo, Brasil, Eslovaquia y China). En los países de ingresos altos, las tasas de incidencia están disminuyendo después de alcanzar su punto máximo (por ejemplo, EE. UU., Francia y Nueva Zelanda), relativamente estables (por ejemplo, Reino Unido y Australia) o en aumento (por ejemplo, Italia, Noruega y España). ASR (W): tasa estandarizada por edad (casos incidentes por 100,000 personas por año) con el uso de pesos por edad de la población estándar mundial. SEER: Programa de Vigilancia, Epidemiología y Resultados Finales. Los países se seleccionaron en función del grupo (países económicamente en desarrollo versus países desarrollados) y la disponibilidad de datos de tendencias temporales en GLOBOCAN 2018. Datos de GLOBOCAN 2018

En América del Sur, Europa del Este y Asia, los países en transición económica están experimentando tasas de incidencia crecientes (por ejemplo, Brasil, Eslovaquia y China). En los países de ingresos altos de América del Norte, Europa y Oceanía, las tasas de incidencia disminuyen después de un pico (por ejemplo, EE. UU., Francia y Nueva Zelanda), son relativamente estables (por ejemplo, el Reino Unido y Australia) o aumentan (por ejemplo, Italia, Noruega y España) (figura 2). Estas notables fluctuaciones en las tasas de incidencia, que son más evidentes en los hombres que en las mujeres, probablemente se puedan atribuir a las distribuciones cambiantes de los factores de riesgo clave y captación de cribado del CCR. En particular, los países han experimentado un grado variable de cambios en la prevalencia de los factores de riesgo de CCR y de la práctica de detección de CCR, independientemente de la proximidad geográfica. Este aspecto podría ayudar a explicar los incrementos diferenciales de las tasas de incidencia de CCR en los países vecinos (Keum & Giovannucci, 2019).

Número de nuevos casos en 2018, para ambos sexos y todas las edades.

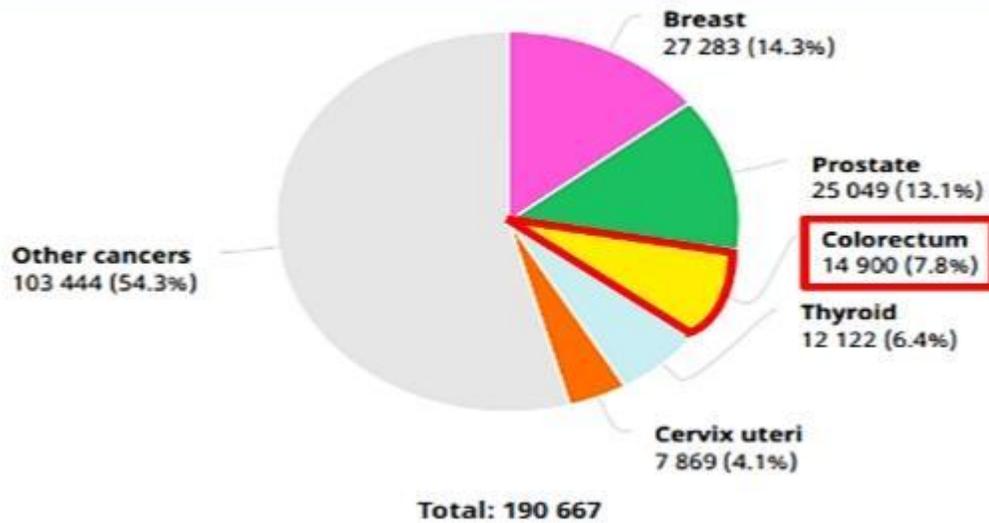


Figura 3. Casos nuevos en México de diferentes tipos de cáncer en 2018 de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud.

Se presentan los tipos de cáncer con mayor incidencia. El cáncer colorrectal ocupa el tercer lugar en mayor número de casos (marcado con rojo).

México presenta un preocupante aumento en el número de casos y mortalidad del CCR. En un estudio realizado en cuatro hospitales de la ciudad de México en el año 2006, el CCR constituyó el primer lugar en frecuencia de los tumores del tubo digestivo. Desde los años cuarenta se señalaba al CCR como la segunda causa de cáncer del tubo digestivo, por debajo del carcinoma gástrico, manteniéndose esta tendencia hasta finales de los años setenta, cuando se comenzó a notar un aumento significativo del CCR (Pérez *et al.*, 2006).

	Males	Females	Both sexes
Population	65 108 517	65 650 553	130 759 070
Number of new cancer cases	85 616	105 051	190 667
Age-standardized incidence rate (World)	136.5	149.6	142.7
Risk of developing cancer before the age of 75 years (%)	14.4	15.0	14.7
Number of cancer deaths	40 509	42 967	83 476
Age-standardized mortality rate (World)	62.8	60.2	61.1
Risk of dying from cancer before the age of 75 years (%)	6.5	6.6	6.5
5-year prevalent cases	192 706	278 791	471 497
Top 5 most frequent cancers excluding non-melanoma skin cancer (ranked by cases)	Prostate Colorectum Testis Lung Stomach	Breast Thyroid Cervix uteri Corpus uteri Colorectum	Breast Prostate Colorectum Thyroid Cervix uteri

Cuadro 1. Resumen estadístico nacional de cáncer en 2018 (Organización Mundial de la Salud 2018).

Se muestran el número de casos y muertes de cáncer en México en el año 2018 así como la prevalencia en 5 años de los tipos más comunes de cáncer. El cáncer colorrectal es uno de los más prevalentes en ambos sexos (marcado con rojo).

De acuerdo con datos de la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer perteneciente a la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que el CCR es el 3° más frecuente en México (cuadro1), incidencia que aumentó, ya que anteriormente se ubicaba en 4° lugar, de acuerdo a datos del Instituto Nacional de Salud Pública. Para el año 2018 se presentaron un total de 14'900 casos nuevos en el país (figura 3).

1.3 ETIOLOGÍA DEL CCR.

En las patologías un factor de riesgo es cualquier cosa que aumente la probabilidad de contraer una enfermedad. Los diferentes tipos de cáncer tienen diferentes factores de riesgo. Los factores ambientales y genéticos juegan un papel importante en la patogénesis del cáncer de colorrectal (American cancer society, s.f. & Thanikachalam & Khan 2019).

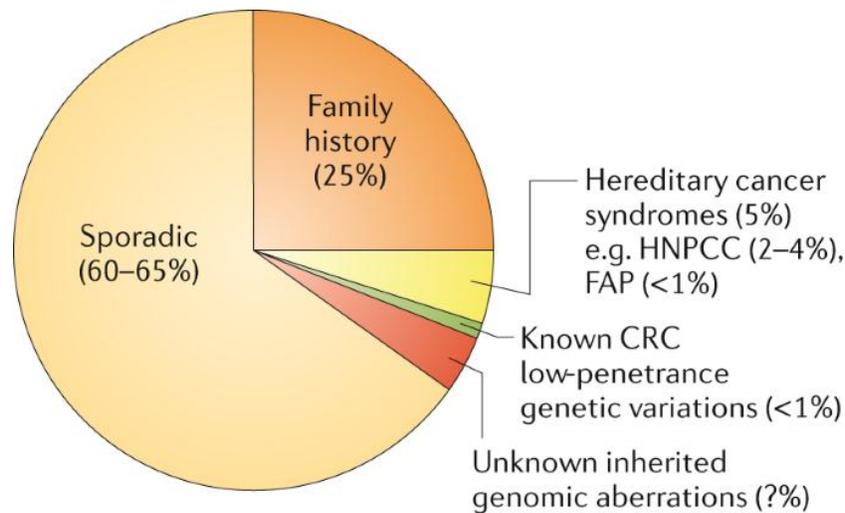


Figura 4. Proporción de casos de CCR asociados a factores esporádicos y hereditarios (Keum & Giovannucci, 2019).

La mayoría de los CCR surgen esporádicamente a través de alteraciones genómicas somáticas adquiridas, mientras que 35 a 40% de los casos se asocian con susceptibilidad hereditaria al CCR. Los componentes hereditarios se deben a los antecedentes familiares de CCR, síndromes de cáncer hereditario, variaciones genéticas conocidas comunes, pero de baja penetrancia y otras aberraciones hereditarias que aún no se han descubierto. Independientemente de si los CCR surgen esporádicamente o tienen componentes hereditarios, los factores ambientales pueden influir en su carcinogénesis. Por ejemplo, una proporción sustancial de CCR agrupados en individuos con antecedentes familiares positivos no se heredan, sino que ocurren a través de aberraciones genómicas adquiridas. FAP, poliposis adenomatosa familiar; HNPCC, cáncer colorrectal hereditario sin poliposis.

En el caso del CCR aproximadamente del 60-65% de los casos surgen esporádicamente (es decir, por factores ambientales) a través de aberraciones epigenéticas y genéticas somáticas adquiridas, en gran parte, atribuibles potencialmente a un riesgo de factores modificables tales como la dieta, alcoholismo, obesidad, actividad física, entre otros (cuadro 2). El CCR tiene un componente hereditario, y algunos estudios han estimado que la heredabilidad del

CCR es del 35 al 40% (Figura 5) siendo algunas enfermedades hereditarias las causantes de la aparición y progresión de dicha enfermedad (cuadro 1) (Keum & Giovannucci, 2019 & American Cancer Society 2020 b).

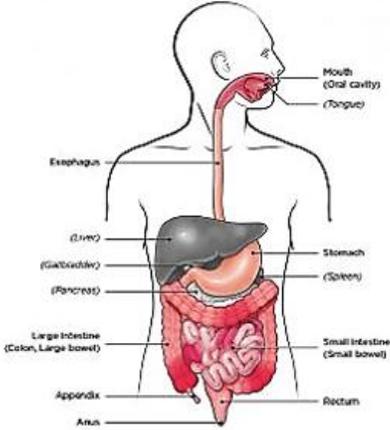
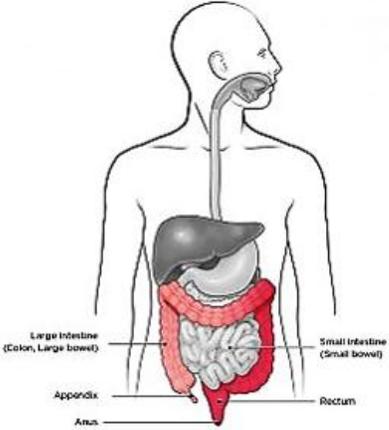
Factores que incrementan el riesgo:	Riesgo relativo
Factores de riesgo NO MODIFICABLES	
• Antecedentes familiares con CCR	
- 1 o más familiares de primer grado	2.2
- 1 o más familiares de primer grado diagnosticados antes de los 50 años	3.6
- 2 o más parientes de primer grado	4.0
- 1 o más parientes de segundo grado	1.7
• Antecedentes familiares de enfermedades adenomatosas	
- 1 o más familiares de primer grado	2.0
• Enfermedad inflamatoria intestinal	1.7
• Diabetes tipo 2	
- Hombres	1.4
- Mujeres	1.2
Factores de riesgo MODIFICABLES	
• Alto consumo de alcohol (en promedio >3 bebidas diarias)	1.3
• Obesidad (índice de masa corporal ≥ 30 kg/m ²)	1.3
- Riesgo de cáncer de colon, hombre	1.5
- Riesgo de cáncer de colon, mujer	1.1
- Riesgo de cáncer de recto, hombre	1.3
- Riesgo de cáncer de recto, mujer	1.0
• Consumo de carne roja (100g/día)	1.1
• Consumo de carne procesada (50g/día)	1.2
• Fumar	
- Fumador activo	1.5
- Exfumador	1.2
Factores que DISMINUYEN el riesgo	
• Actividad física	0.7
• Ingesta de lácteos (400g/día)	0.9

Cuadro 3. Riesgo relativo para los factores de riesgo de cáncer colorrectal establecidos.

El riesgo relativo compara el riesgo de enfermedad entre las personas con una "exposición" particular con el riesgo entre las personas sin esa exposición. Si el riesgo relativo es mayor a 1.0, entonces el riesgo es mayor entre personas expuestas que no expuestas. Los riesgos relativos inferiores a 1.0 indican un efecto protector. Datos tomados de (American Cancer Society 2020 b)

1.4 ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL.

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es uno de los factores de riesgo importantes que conducen al CCR. La EII se ubica como la tercera afección de mayor riesgo de CCR, solo detrás de PAF y el síndrome de cáncer colorrectal hereditario sin poliposis (HNPCC) (Kim & Chang, 2014). De acuerdo al Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2018) la EII es un término para dos afecciones (enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa) (cuadro 3) que se caracterizan por inflamación crónica del tracto gastrointestinal (GI). La inflamación prolongada daña el tracto GI.

Enfermedad de Crohn.	Colitis Ulcerosa.
<p>Puede afectar cualquier parte del tracto gastrointestinal (desde la boca hasta el ano): con mayor frecuencia afecta la porción del intestino delgado antes del intestino grueso / colon.</p>	<p>Ocurre en el intestino grueso (colon) y el recto.</p>
	
<p>La inflamación puede presentarse en las múltiples capas de las paredes del tracto gastrointestinal</p>	<p>La inflamación está presente solo en la capa más interna del revestimiento del colon.</p>

Cuadro 2. Diferencias entre la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa.

Las áreas afectadas se muestran en rojo. La intensidad del color indica mayor o menor afección. Datos e imágenes tomadas de Disease Control and Prevention 2018.

Las EII's comparten una etiología multifactorial de susceptibilidad genética, factores ambientales y desregulación inmunitaria, factores que son los causantes de una inflamación intestinal que compromete la integridad de la barrera epitelial y conduce a una mayor permeabilidad e infiltración de patógenos. Tanto la EC como la CU comparten características comunes, como roturas epiteliales, reducción de las uniones estrechas y atrofia glandular (Stidham, & Higgins 2018 & Munkholm, *et al.*, 1994).

Se sabe que el paso de antígenos o metabolitos lumbales a través de la barrera epitelial con una permeabilidad comprometida promueve la inflamación crónica y el CCR, pues al existir pérdida y rotura de las uniones estrechas, varios tipos de claudinas previamente asociadas con diferentes tipos de neoplasias, que incluyen carcinoma de mama, próstata, ovario, páncreas, gástrico y colorrectal; son expresadas. Tanto en CU como en EC existe un aumento sustancial de claudinas asociadas a la progresión del CCR. (Landy, *et al.*, 2016 & Webb, *et al.*, 2013).

Aunque se han realizado estudios sobre los mecanismos de patogenicidad de la EII en la aparición y progresión del CCR, aún falta investigación que nos ayude a tener completo entendimiento de dichos mecanismos. Un ejemplo de ello es el riesgo de CCR en la EC ya que se encuentra menos estudiado que en la CU. Hasta el momento se conoce que la EC está asociada con una mayor expresión de claudinas y de citocinas inmunorreguladoras, incluidas la leptina y la adiponectina. Se sabe que múltiples factores genéticos predisponen a la EC, pero no se comprende bien la relación específica entre la función de estos genes y las diversas patologías observadas en la EC (Stidham & Higgins 2018 & Cadwell, *et al.* 2008).

Múltiples estudios se han realizado con la finalidad de reconocer aquellas regiones génicas que se asocian a la predisposición de la EC (Rioux, *et al.*, 2007; Liu & Anderson, 2014 & Hampe, *et al.*, 2007) entre los que ha destacado, por su fuerte asociación con dicha enfermedad, al encontrarse ampliamente reproducida, es la variante rs2241880 que codifica un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) (Thr300A) para la proteína ATG16L1 en la región intergénica 10q21.1. (Hampe, *et*

al., 2007). Dicha mutación produce una síntesis disminuida de la proteína ATG16L1, ya que, se ha demostrado, que T300A aumenta la susceptibilidad de ATG16L1 a la escisión de caspasa-3 en un sitio de consenso vecino, lo que lleva a niveles reducidos de ATG16L1 de longitud completa en el contexto de una situación estresante y, en consecuencia, autofagia disfuncional.

Diferentes grupos de investigación han documentado que la relación entre el polimorfismo rs2241880 (Thr300Ala) en la proteína ATG16L1 y varios cánceres entre diferentes poblaciones étnicas, en los que se ha demostrado que la variante T300A juega un rol importante en el desarrollo y promoción de CCR asociado a EC de una forma en la que no altera la autofagia en masa en células humanas, sugiriendo que una función no autofágica de T300A puede ser la base de su asociación con la EC así como con otras enfermedades humanas (Grimm, *et al.*, 2016; Cadwell, *et al.* 2008; Subramani & Malhotra, 2013 & Moazeni-Roodi, *et al.*, 2019).

1.5 LA PROTEÍNA ATG16L1 EN LA EII.

La proteína relacionada con la autofagia 16-1 mejor conocida por sus siglas ATG16L1, desempeña un papel esencial en la autofagia; proceso catabólico que interactúa con ATG12-ATG5 para mediar en la conjugación de fosfatidiletanolamina (PE) a LC3 (MAP1LC3A, MAP1LC3B o MAP1LC3C), para producir una forma activada unida a la membrana de LC3 llamada LC3-II. De este modo, controla el alargamiento de la membrana autofagosomal naciente (Boada-Romero, *et al.*, 2013; Dooley, *et al.*, 2014 & Nishimura, *et al.*, 2013).

Aunque es bien conocido el papel de ATG16L1 en un proceso esencial de la autofagia, dicha proteína posee funciones no relacionadas con el proceso de formación del autofagosoma, como la regulación de la señalización inmune innata y el control de la replicación viral (Grimm, *et al.*, 2016).

En la EII la proteína ATG16L1 se ha relacionado con la aparición y progresión de la enfermedad. Cadwell y colaboradores detectaron en el año 2008 que ratones genéticamente modificados hipomórficos para esta proteína presentaban

anomalías en la vía de la exocitosis en células de Paneth encontradas en el colon, desde la formación de gránulos de péptidos antimicrobianos hasta su expulsión, cosa que posiblemente agravaba la progresión de la enfermedad de Crohn puesto a que los mismos resultados fueron encontrados en pacientes con EC poseedores del alelo de riesgo T300A para la proteína ATG16L1. En este contexto de las células de paneth se ha descrito que aquellos organoides intestinales que carecen de ATG16L1 reprodujeron esta pérdida en las células de Paneth y mostraron necroptosis mediada por TNF α , una forma de necrosis programada (Matsuzawa-Ishimoto, *et al.* 2017).

2. JUSTIFICACIÓN.

Aunque se han realizado estudios en los que se aprecia una clara asociación entre la progresión del CCR asociado a EII con la proteína ATG16L1, especialmente cuando la producción de esta se ve disminuida. Todavía se desconoce el papel de esta proteína en la progresión y aparición del CCR asociada a EC.

Es por ello que dada la posible importancia que tiene esta proteína en una problemática de salud actual como lo es el CCR asociado a EII's. En este trabajo se pretende buscar el papel que juega la proteína ATG16L1 en la enfermedad.

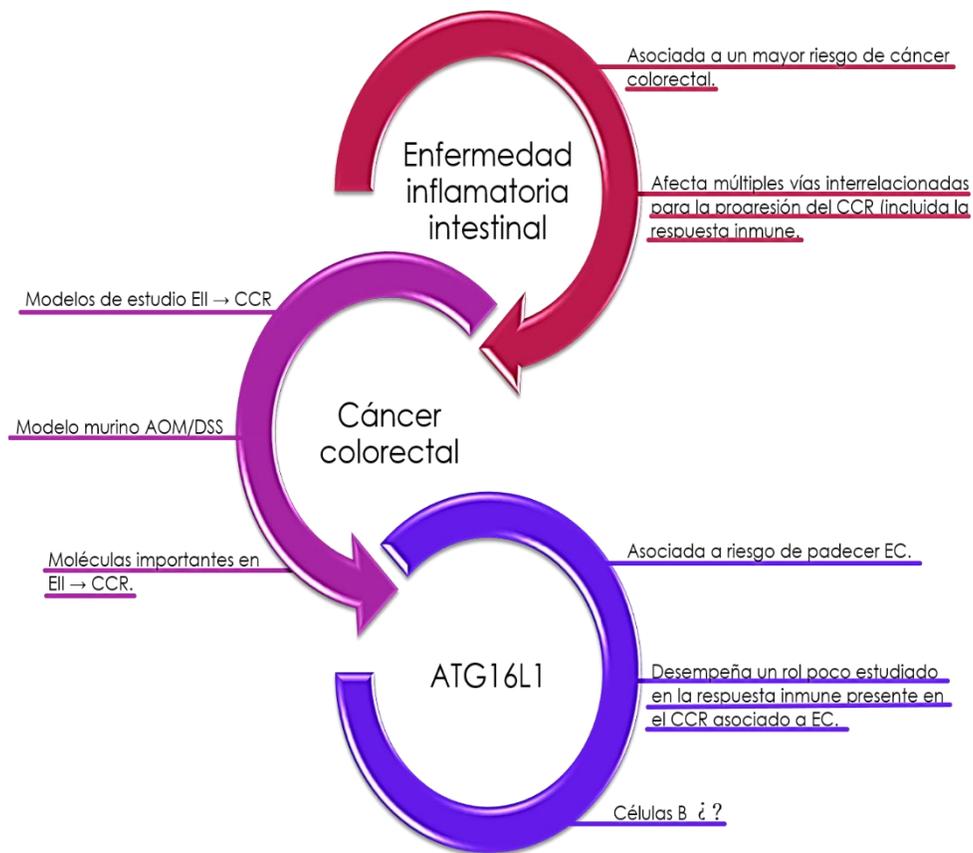


Figura 5. Resumen de los temas que condujeron la investigación presentada en este trabajo.

3. HIPÓTESIS.

Tras la inducción de cáncer colorrectal, aquellos ratones que presentan un fenotipo hipomórfico de la proteína ATG16L1(ATG16L1^{HM}) desarrollarán más tumores en comparación a los ratones silvestres (WT), debido a una respuesta inflamatoria aumentada en los ratones ATG16L1, comparada con la que presentarán los ratones WT.

4. OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

Determinar las diferencias histopatológicas y los cambios en la respuesta inmune en ratones con una expresión disminuida de la proteína ATG16L1 (ATG16L1^{HM}).

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Inducir cáncer colorrectal (modelo OM/DSS) en ratones con fondo genético C57BL/6 hipomórficos para la molécula ATG16L1 (ATG16L1^{HM}) y ratones con el gen de ATG16L1 intacto (WT).
- Monitorear durante la inducción de cáncer colorrectal el peso de ambos grupos experimentales.
- Determinar el daño histopatológico de muestras de colon de ambos grupos experimentales.
- Determinar la producción de citocinas TH1 y TH2 en células totales de ganglio linfático mesentérico y bazo.
- Caracterizar las células B de cavidad peritoneal (PEC's) y ganglio linfático mesentérico (GM).

5. MATERIALES Y MÉTODO

5.1 Inducción de CAC

Se utilizaron ratones hembra de 8-9 semanas de edad y peso corporal de 20-22 gr. en fondo genético C57BL/6. Los grupos experimentales consistieron en ratones hipomórficos para la molécula ATG16L1 (ATG16^{HM}) como los descritos en Cadwell K. 2008 y ratones con el gen de ATG16L1 intacto (WT). Los ratones se sometieron a un tratamiento modificado del previamente por (Tanaka *et al.* 2003) con la finalidad de producir un modelo más prolongado y un mayor número de neoplasias (Snider, *et al.* 2016). Dicho tratamiento consistió en una única inyección intraperitoneal (ip.) del reactivo carcinogenico azoxymetano (AOM), 12.5g/kg de peso corporal, (día 0) y posteriormente fueron sometidos a un tratamiento que consistió en 3 ciclos (de 5 días con sulfato de sodio dextran (DSS) en agua al 1% y 16 días con agua sin DSS como se muestra en la figura 6.

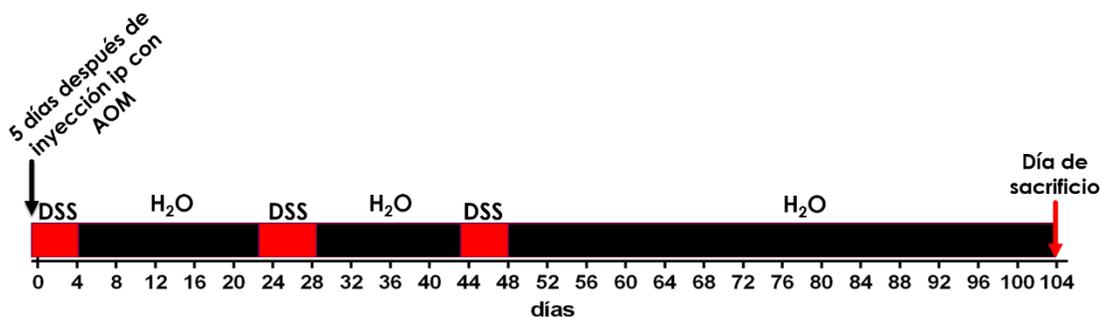


Figura 6. Representación esquemática de administración de tratamiento AOM/DSS para la inducción CAC

Para evaluar el transcurso de la enfermedad de acuerdo a Tanaka y col., se registró de manera periódica el peso de los ratones (cada segundo día). Durante este tiempo fueron visualmente evaluados. Se obtuvieron muestras de sangre a la mitad del experimento (día 45) y a días antes del término de éste

(día 86) con la finalidad de obtener el suero sanguíneo, obtenido tras la recuperación del sobrenadante resultante de la centrifugación a 3500rpm de las muestras durante 5 minutos. Las muestras fueron guardadas en tubos eppendorf y congeladas a -80°C para su posterior análisis.

Una vez cumplido el tratamiento, los ratones de ambos grupos experimentales se sacrificaron por dislocación cervical para la extracción de colon, bazo, hígado, los cuales fueron pesados, en el caso del colon fue medido y visualmente estudiados. De igual forma fueron extirpados los ganglios linfáticos mesentéricos (GM).

5.2 Determinación de la severidad de CAC.

El primer parámetro que se determinó, como indicador de daño, fue la longitud del colon de los grupos experimentales. Dichos órganos fueron medidos con una regla sobre papel milimétrico con la finalidad de determinar cambios en el tamaño de los mismo entre grupos experimentales. Con un microscopio estereoscópico se observaron las muestras y se cuantificaron las neoplasias. Adicionalmente, órganos como el hígado y el bazo de los animales se pesaron.

5.3 Determinación del daño histopatológico por medio de la tinción H&E

Se desecaron los cólores obtenidos, colocando en tubos falcon de 15mL que contenían paraformaldehído (PFA) durante 24 hrs. Posteriormente se lavaron los tejidos con agua y se pasaron por un tren de soluciones Alcohol/Xilol en tubos falcon de 15mL de la siguiente manera: 20' alcohol al 50%, 20' alcohol al 60%, 20' al 70%, 20' al 80%, 20' al 90%, 20' alcohol absoluto 1, 20' alcohol absoluto 2, 20' Xilol absoluto 1, 20' Xilol absoluto 2. Posteriormente se colocaron las muestras en un frasco con parafina en una estufa a 54°C, 24hrs en parafina 1 y 24hrs en parafina 2. Una vez pasado este tiempo se procedió a la inclusión de la muestra en cubos de parafina para realizar cortes de 5µM de tejido de las muestras colectados de cada grupo experimental. Las muestras se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E), de la siguiente forma. 5' Xilol 1, 5' Xilol 2, 3' alcohol absoluto, 3'

alcohol al 90%, 3' alcohol al 80%, 3' alcohol al 70%, 5' agua, 1' hematoxilina, 1' agua, 5' eosina, 1' alcohol al 70%, 2' alcohol al 80%, 3' alcohol al 90%, 5' alcohol absoluto, 3' Xilol 1, 5' Xilol 2. Las muestras fueron montadas con resina en portaobjetos etiquetados para determinar al microscopio los cambios en la arquitectura del colon, así como el grado de progresión de la enfermedad.

5.4 Cultivo de Bazo y Ganglio

El día del sacrificio de los ratones se extrajo el bazo y ganglio linfático mesentérico, ambos fueron macerados en filtros celulares (Falcon) de 70µm con ayuda de 5mL de medio de cultivo RPMI enriquecido con suero fetal bovino (SFB) al 10% (Gibco) en cajas Petri con la finalidad de obtener una suspensión celular, las muestras fueron centrifugadas durante 5 minutos a 3500rpm, se decantaron y a cada muestra se le colocó 3mL de solución hemolizante (Tris base 0.17M y NH₄CL 0.16M) durante 4 min. Posteriormente la reacción se detuvo con 3mL de medio. De nuevo las muestras fueron centrifugadas a 3500rpm, las muestras fueron decantadas y la suspensión celular se ajustó a una densidad de 3x10⁶/ml.

Las células fueron sembradas en placas de cultivo celular con 24 pozos, la organización de las muestras se realizó de acuerdo con el criterio de los investigadores. Cada muestra tenía al menos una repetición en donde las células fueron estimuladas con Concanavalina A.

Se incubaron las placas de cultivo durante 48h a 37°C y 5%CO₂, pasado este tiempo las muestras fueron colocadas en tubos eppendorf y centrifugadas a 3500rpm durante 5 minutos con la finalidad de recuperar los sobrenadantes, guardarlos en una temperatura de -80°C hasta que se usaran para ser analizados por prueba ELISA sándwich.

5.5 Determinación de la producción de citocinas TH1 y TH2 en células totales de ganglio linfático mesentérico, suero sanguíneo y bazo por la prueba ELISA SANDWICH

Se cuantificaron las citocinas IL-4, IL-15 e IFN- γ de suero sanguíneo y cultivos celulares de bazo y ganglio linfático mesentérico.

Se sensibilizó una placa Elisa (Costar) de 96 pozos. Se diluyó y homogenizó el anticuerpo de captura en buffer de pegado (0.1mL de Na_2HPO_4 en 1L de agua destilada), posteriormente se colocó 100 μL de esta solución en cada pozo de la placa con una pipeta multicanal (Gilson). La placa se cubrió con papel aluminio y se resguardó en un refrigerador a 4°C por 24 horas.

Posteriormente la placa fue lavada 3 veces en solución de lavado [0.5% de Tween 20 en 1L de PBS (83% de NaCl, 12% Na_2HPO_4 , 2.09% KH_2PO_4 , 2.09% KC)], después de cada lavado la placa era secada de manera manual agitándola. Al finalizar, se agregaron 300 μL de solución de bloqueo (150 mg de ABTS en 50mL de ácido cítrico a 0.1M en agua destilada, llevado a un pH de 4.3 con NaOH) a cada pozo, se envolvió la placa con papel aluminio y se dejó reposar durante 2h, con la finalidad de bloquear el pegado inespecífico, pasado dicho tiempo se volvió a lavar y secar la placa como se describió previamente.

Los cultivos de ganglio linfático mesentérico y bazo, así como el suero sanguíneo; fueron colocadas en los pozos en el orden establecido por los investigadores. Se realizó una curva patrón agregando la citocina recombinante murina correspondiente a cada pozo, las dos primeras columnas para agregar solución de bloqueo, iniciando con una concentración de 10,000 pg, en las columnas posteriores se realizaron diluciones al doble sucesivamente. La placa se envolvió en papel aluminio y se incubó a 4°C por 24 horas.

Al día siguiente la placa fue lavada 4 veces y secada de manera manual, para posteriormente agregar el anticuerpo marcado con biotina correspondiente a cada citocina. De una dilución de 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de anticuerpo con biotina en solución de bloqueo, se agregó un volumen de 100 μL en cada pozo y se incubó por una hora

a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se volvió a lavar la placa 4 veces y se secó de manera manual.

Se preparó una dilución de 1:5000 de enzima streptoavidin peroxidasa en solución de bloqueo, para obtener un volumen final de 10mL de esta dilución y colocar 100µL en cada pozo. Se dejaron incubar las placas por 45 minutos a temperatura ambiente.

Finalmente, la placa fue lavada y secada 5 veces para posteriormente colocar 100µL en cada pozo de solución de sustrato de la enzima que consistió en 100uL de H₂O₂ al 3% en 10mL de ABTS. Se envolvió la placa en papel aluminio y se dejó a temperatura ambiente por 3 minutos para que se llevara a cabo la reacción para posteriormente revelarla en el lector de placa (EPOCH) calibrado a una lectura de 405nm de longitud de onda.

5.5 Caracterización de células B de PECs y GM por citometría de flujo

El día del sacrificio con una jeringa, cuidando que no tuviera la aguja contacto con ningún órgano se inyectó 5mL de solución salina en la cavidad peritoneal de los ratones recién sacrificados con la finalidad de extraer las células de dicha cavidad. Una vez inyectada la solución salina, de manera manual se masajeó con fuerza el área abdominal para que las células pegadas a las paredes peritoneales se desprendieran, posteriormente con ayuda de la misma jeringa con la que se inyectó al ratón, se extrajo el mismo volumen de solución salina y se colocó en un tubo falcon de 15mL. Se realizó una dilución en un 1:2, 10µL de azul tripano en 10µL de muestra con la finalidad de realizar un conteo celular en la cámara de Neubauer.

Las muestras peritoneales, así como las células de GM fueron ajustadas a una densidad de 1×10^6 células, las cuales fueron incubadas en 300µL de buffer de FACS (0.1% de NaN₃, 1% de suero fetal bovino SFB en 1L de PBS) con los siguientes anticuerpos: APC Cy7 para MHCII, PECy7 para PDL-1 y PE para CD19; durante 30min. Pasado ese tiempo las muestras fueron centrifugadas por

5min a 3500rpm, se decantó y se lavaron en buffer de FACS una vez más. Finalmente, se fijaron las muestras en paraformaldehido (4%) en una dilución 1 a 4 en buffer de FACS y las muestras fueron analizadas en el citómetro de flujo Attune, life technologies).

6. RESULTADOS

ATG16L1 limita el crecimiento de neoplasias a la parte terminal del colon.

Con la finalidad de analizar el progreso de la enfermedad en el momento en el que los grupos experimentales fueron sometidos al tratamiento AOM/DSS. Se pesaron los ratones durante el tiempo que duró el tratamiento, como fue previamente realizado por Tanaka y col. Encontramos que tras el primer ciclo de DSS ambos grupos experimentales perdieron peso de manera muy similar, de la misma forma fueron recuperando peso en la primera semana de descanso. Para la segunda semana de descanso, previa al segundo ciclo de DSS se observó un comportamiento irregular en el cambio de peso, siendo los ratones ATG16L1^{HM} los que mostraban más cambios durante el tiempo de inducción. Tanto en el tercer ciclo de DSS como en la semana posterior a este, se registró un comportamiento parecido en ambos grupos, sin embargo, esto cambió en las siguientes semanas hasta el día de término del tratamiento en donde los ratones hipomórficos para ATG16L1 presentaron una mayor pérdida de peso comparado con los silvestres (Gráfico 1). La pérdida de peso tras la administración del agente inflamatorio es un síntoma de la colitis (Snider, *et al.*, 2016, De robertis,, *et al.* 2011, Tanaka *et al.*, 2003).

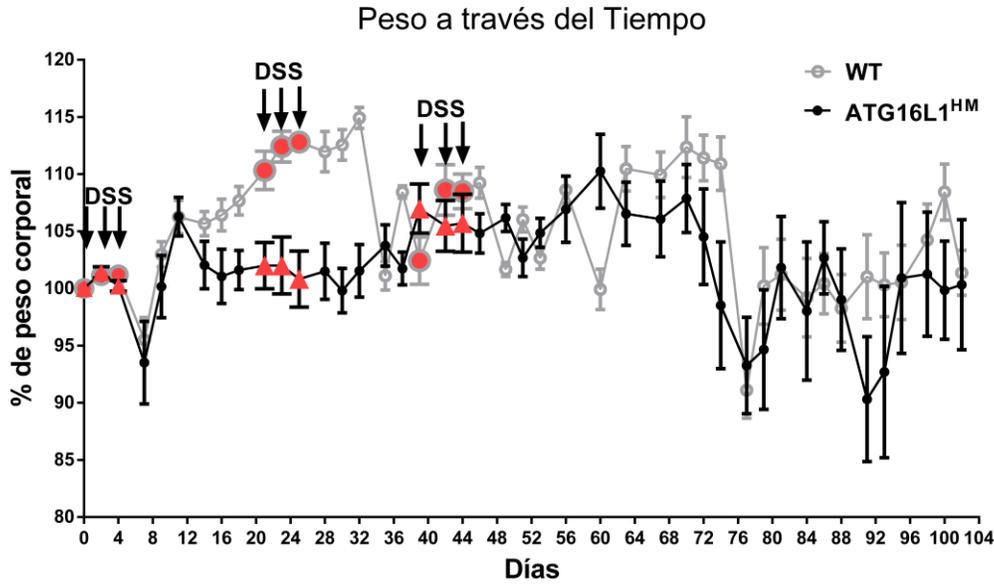


Gráfico 1. Gráfica del porcentaje de peso corporal a través del tiempo en comparación al día 0, de ratones WT y ATG16L1^{HM}, (n=5-6) de 2 experimentos. En símbolos rojos se muestra los días de registro de peso en ciclos de DSS. Ratones WT (barra gris), ratones ATG16L1^{HM} (barra negra).

Otros signos que caracterizan el progreso de la colitis como lo son el sangrado rectal, diarrea, heces sueltas, heces con sangre y prolapso rectal fueron presentados en el grupo ATG16L1^{HM} (figura 7). En el grupo WT solamente se encontraron heces sueltas y con rastros de sangre (no se presenta).

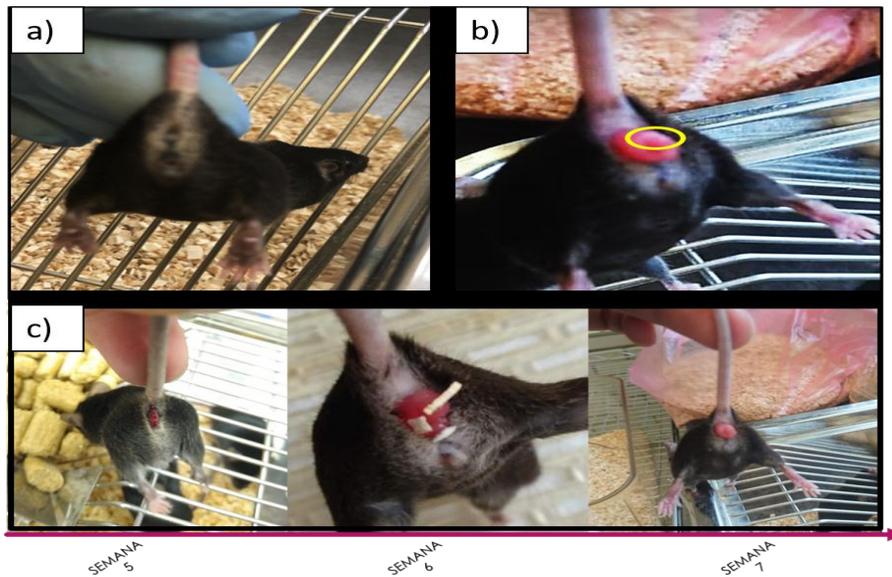


Figura 6. Padecimientos físicos visibles derivados de la inflamación crónica. Se muestran las imágenes representativas de grupos experimentales WT y ATG16L1^{HM} con tratamiento AOM/DSS. a) Ratón WT sin presencia de algún padecimiento

físico visible. b) Ratón ATG16L1^{HM} con presencia de prolapso rectal. c) secuencia de tiempo desde el primer padecimiento físico observable (sangrado) hasta el desarrollo del prolapso en ratón ATG16L1^{HM} (n=5-6) de 2 experimentos.

Es destacable que de acuerdo a la asignación de puntuaciones clínicas de colitis en ratones C57BL/6 (cuadro 5) el grupo experimental ATG16L1^{HM} presentara casi todas las características de una puntuación alta (puntuación de 4) a excepción del porcentaje e peso perdido.

Parámetro / puntuación	Pérdida de peso (%)	Consistencia de las heces	Sangrado oculto / macroscópico
0	Ninguna	Normal	Negativo
1	1-5	-	-
2	5-10	Heces sueltas	Hemocultivo positivo
3	10-20	-	-
4	> 20	Diarrea	Sangrado perianal macroscópico

Cuadro 5. Asignación de puntuaciones clínicas de colitis en ratones C57BL/6 (Snider et al., 2016)

Al término del tratamiento se sacrificaron a los individuos de ambos grupos más un control para inspeccionarlos cuidadosamente y detectar si existían lesiones macroscópicas existentes.

Se extirparon los órganos dónde el progreso de la enfermedad es más visible (colon, hígado y bazo) según lo establecido por Tanaka *et. al.*

Grupo	Medida colon	Peso colon	Peso hígado	Peso bazo
CONTROL				
WT	7.2cm	0.355g	0.993g	1.169g
ATG16L1 ^{HM}	6.85cm	0.365g	1.189g	1.107g
AOM/DSS				
WT	5.1cm	0.403g	1.512g	0.505g
ATG16L1 ^{HM}	5.23cm	0.406g	1.473g	0.313g

Cuadro 6. Datos promedio de medidas de colon, pesos de colon, hígado y bazo de todos los grupos experimentales. (n=5-6) de 2 experimentos.

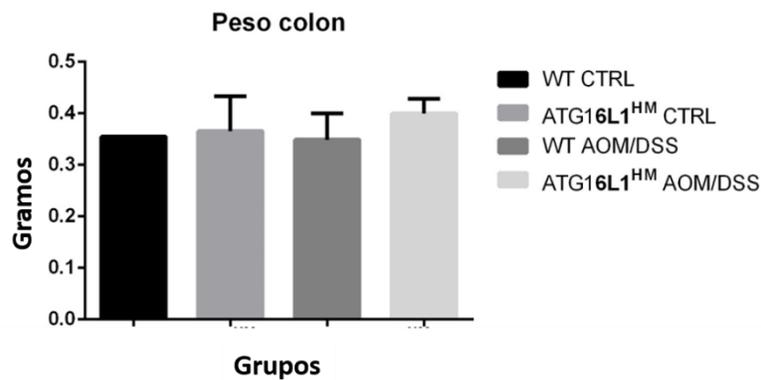


Gráfico 2. Peso de colon de todos los grupos experimentales. (n=5-6) de 2 experimentos.

En el caso del colon de los grupos control se aprecia diferencia en el peso y tamaño entre el grupo silvestre y el hipomórfico. El hígado se mantuvo sin diferencias entre grupos mientras que en el caso el bazo se presentó en algunos casos esplenomegalia en ratones ATG16L1^{HM} (figura 8).

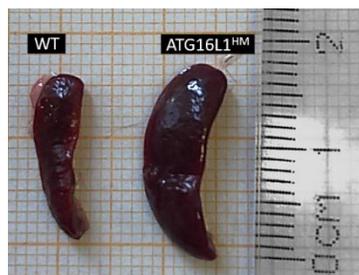


Figura 7. Imágenes representativas de los bazos obtenidos el día del sacrificio de los ratones. Se aprecia esplenomegalia en los ratones ATG16L1^{HM}, (n=5-6) de 2 experimentos.

En el caso del colon, se detectaron diferencias más evidentes entre los grupos. Se observó que el tamaño del colon cambia cuando se compara entre ratones ATG16L1^{HM} y WT sin tratamiento (figura 9, “a” y “b” control) mostrando una disminución en la longitud del colon de los ratones ATG16L1^{HM}. Las diferencias observadas en el colon de ratones con tratamiento son más marcadas, siendo que en la parte distal (recto y ano) se aprecia lo que pareciera ser la formación de adenomas en el grupo ATG16L1^{HM} (figura 9, “a” y “b” AOM/DSS). Para determinar si existían neoplasias se realizaron disecciones sagitales del colon de los grupos experimentales. Se observó en los dos grupos sometidos al tratamiento (figura 9, “c” y “d”) formación de neoplasias. Sin embargo aunque se encontraron neoplasias en ambos grupos, el tamaño, forma y distribución de las mismas cambiaba dependiendo del grupo, siendo de interés que si bien en el caso del grupo control se encontró una masa neoplásica más pronunciada en la parte terminal del colon, en el caso de los ratones ATG16L1^{HM} se encontraron neoplasias bien definidas a lo largo del intestino grueso, no sólo en la parte distal si no, en la media y aunque sólo se representó en un caso, en la región proximal(figura 9).

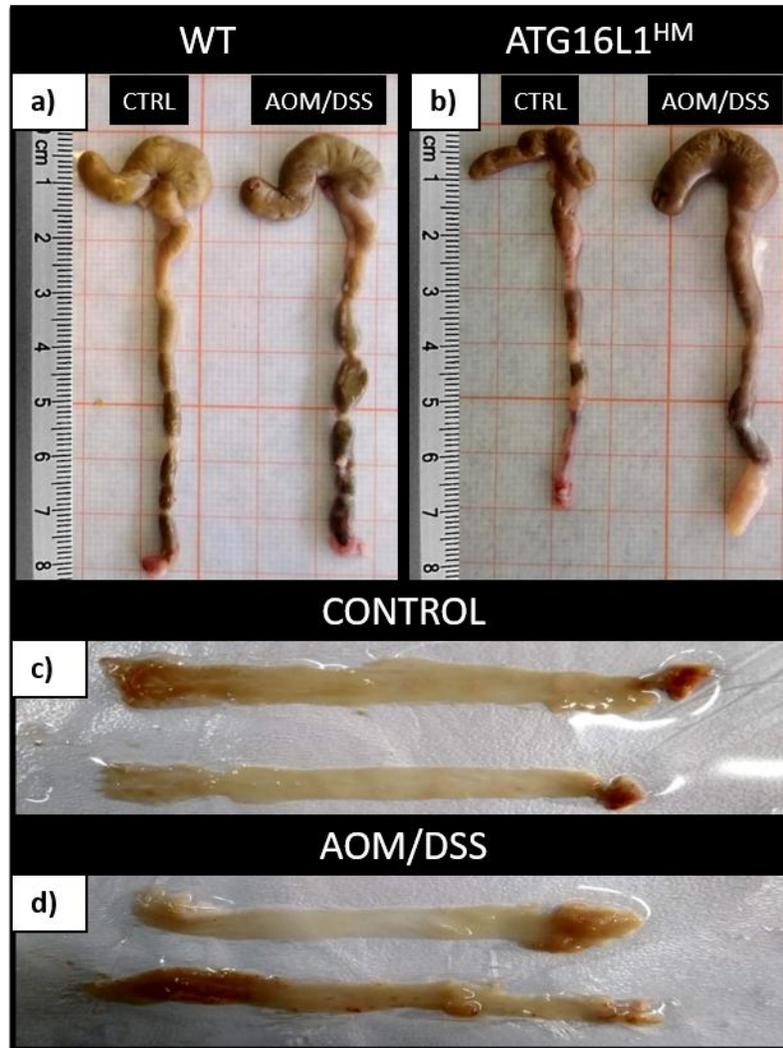


Figura 8. Imágenes representativas del estado morfológico en el que se encuentran los grupos experimentales.

a) se muestra los colon de ratones WT con y sin tratamiento AOM/DSS (control) b) se muestran los colon de ratones ATG16L1^{HM} con y sin tratamiento. c) colon de ratones control, WT (arriba) ATG16L1^{HM} (abajo).d) Colon de ratones con tratamiento AOM/DSS, WT (arriba) ATG16L1^{HM}(n=5-6) de 2 experimentos.

Se contó el número de neoplasias definidas con la finalidad de identificar la severidad de la enfermedad como fue realizado por Tanaka *et al* 2003. Se encontró que el grupo de los ATG16L1^{HM} presentó mayor número de neoplasias mayores a 2mm comparado con los WT, coso opuesto fue en las neoplasias menores a 2 mm en donde los WT presentaron más.

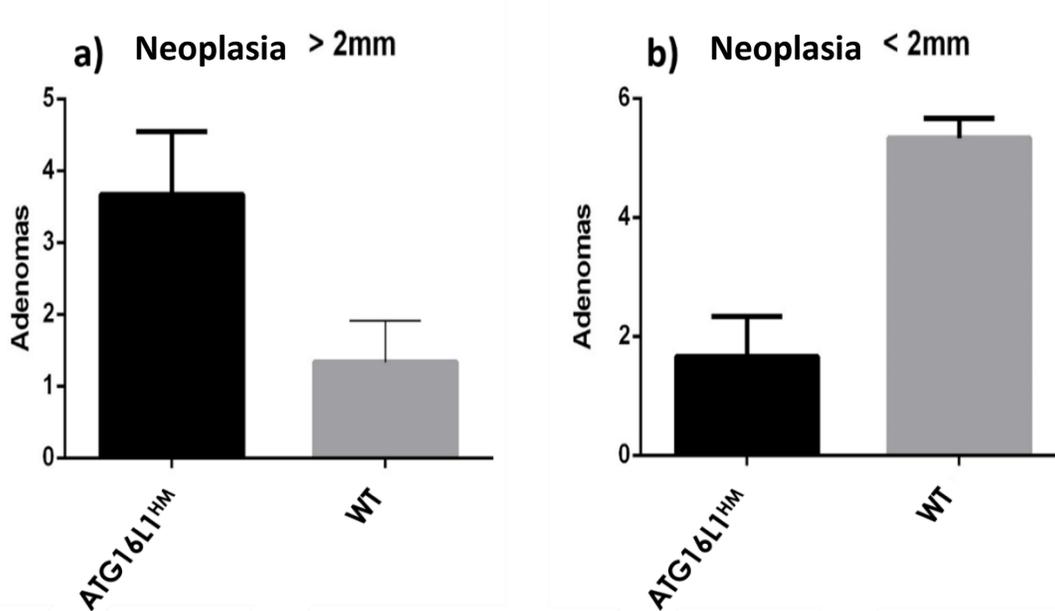


Gráfico 3. Presencia de adenomas > ó < 2mm en ambos grupos. Datos promedio de neoplasias encontradas en grupos WT y ATG16L1^{HM} con tratamiento AOM/DSS (n=5-6) de 2 experimentos.

Con la finalidad de conocer el daño sufrido a nivel microscópico y el tipo de neoplasia presentada, se observaron cortes de tejido colónico en el que se encontraron neoplasias malignas, teñidos con H&E. Para determinar el tipo de daño se usó de apoyo las imágenes descriptivas encontradas en De Robertis 2011 (ANEXO 2) (Figura 10).

En el grupo WT sometido a tratamiento AOM/DSS, se encontró la presencia de de criptas aberrantes (ver anexo) e invasión celular de tejido de mucosa se determinaron las neoplasias presentadas como de tipo adenocarcinoma moderadamente diferenciado que invade la mucosa. Por lo que se determinó que las neoplasias presentadas eran adenomas. En cuanto al grupo ATG16L1^{HM} se encontraron criptas aberrantes, focos de criptas aberrantes, e invasión celular en el tejido de mucosa por lo que se determinó que las neoplasias presentes son adenocarcinomas (Figura 10).

La deletérea producción de la proteína ATG16L1 produce una mayor formación de adenomas tubulares que no se limita a la región terminal del colon, sin embargo, la

producción normal parece limitar la aparición de neoplasias en la parte terminal del colon.

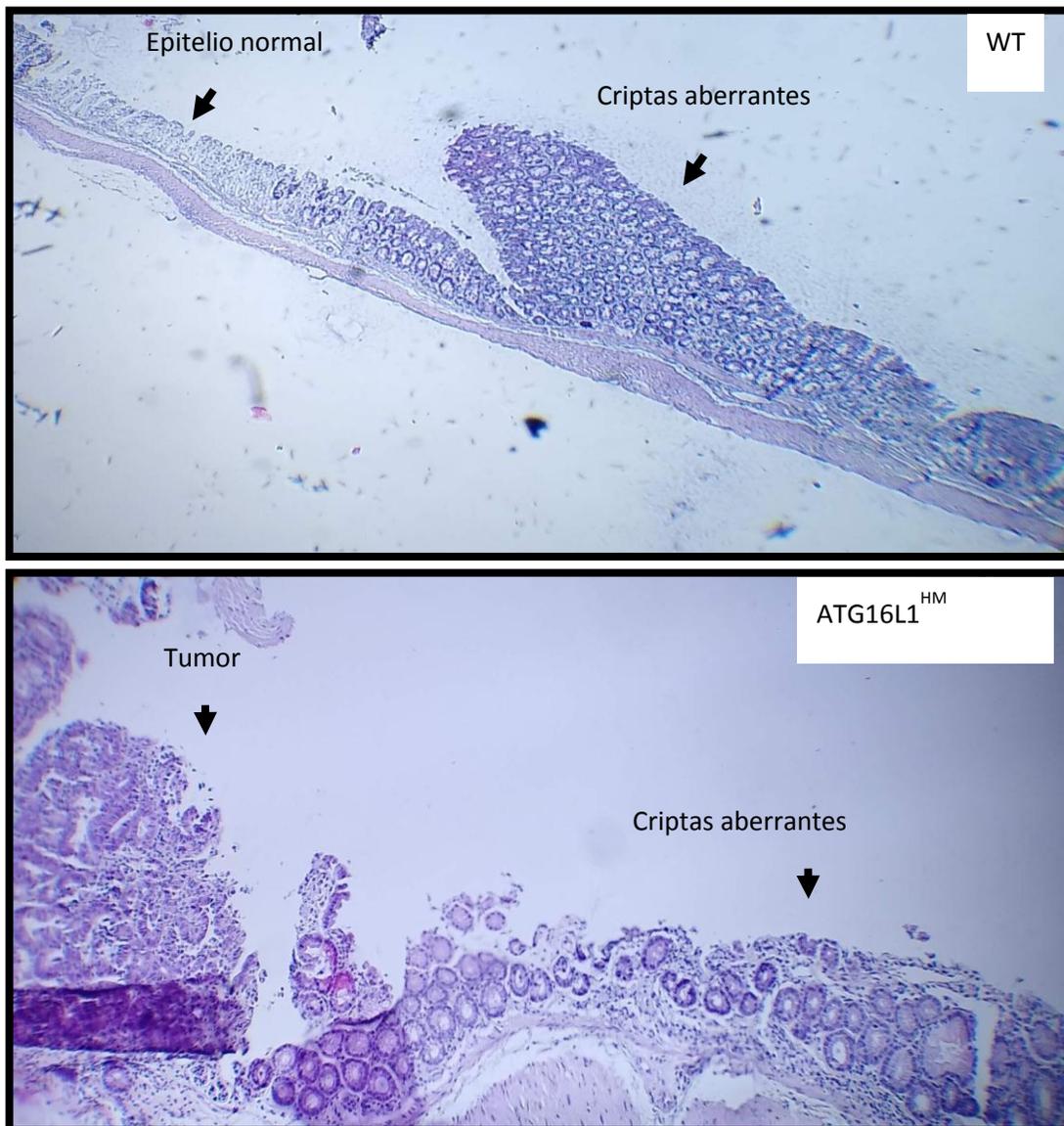


Figura 10. Diferencias macroscópicas y microscópicas observadas en tejido colonico. Se muestran imágenes representativas de cortes histológicos teñidos con H&E de grupos WT y ATG16L1 con tratamiento AOM/DSS (n=5-6) de 2 experimentos.

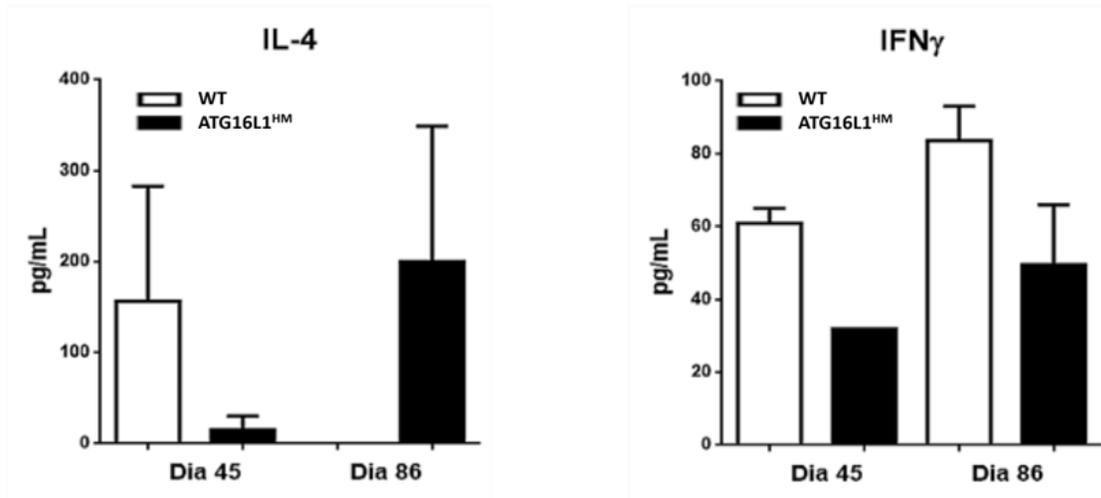
Con la finalidad de conocer la respuesta de tipo Th1 yTh2 se determinó la concentración de citocinas encontradas en suero sanguíneo, bazo y GM. En suero sanguíneo sólo se determinaron las citocinas IL-4 e IFN γ en dos diferentes tiempos, a mitad del experimento (día 45) y cerca del término de este (día 86). Se aprecia un aumento de IL-4 en el ATG16L1^{HM} al día 86, contrario a lo sucedido

con el grupo WT en donde los niveles estuvieron por debajo del nivel de detección. En cuanto a IFN γ en ambos grupos se nota un incremento de esta citocina en suero sanguíneo (Gráfico 4).

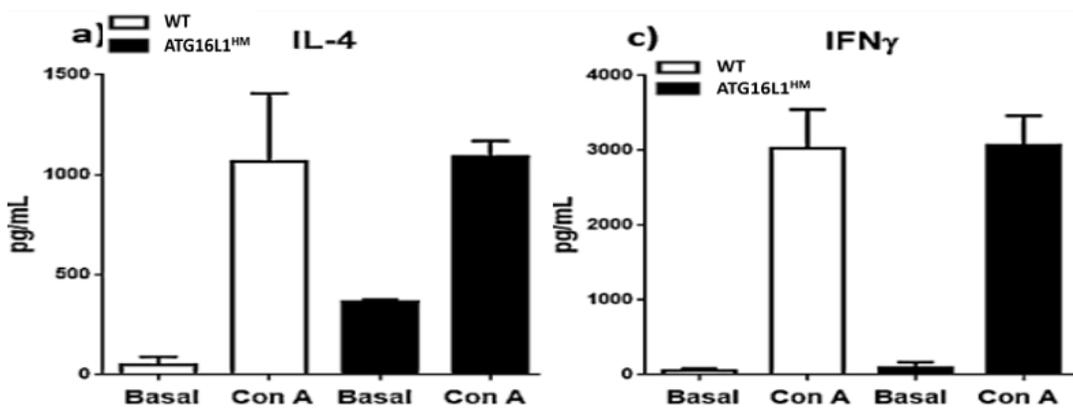
En el bazo la concentración de IL-4 de ambos grupos presentan un aumento cuando las células son estimuladas, sin embargo, este aumento es menor en ATG16L1^{HM} comparado con WT. El aumento en la concentración de IFN γ de estado basal y estimulado no parece variar entre grupos (Gráfico 4).

En GM la concentración de IL-4 es mayor en los sobrenadantes de las células de ratones ATG16L1^{HM} estimuladas con el mitógeno con A. La concentración de IFN γ de estado basal a estimulado no parece variar entre grupos (Gráfico 4).

Suero Sanguíneo



BAZO



GM

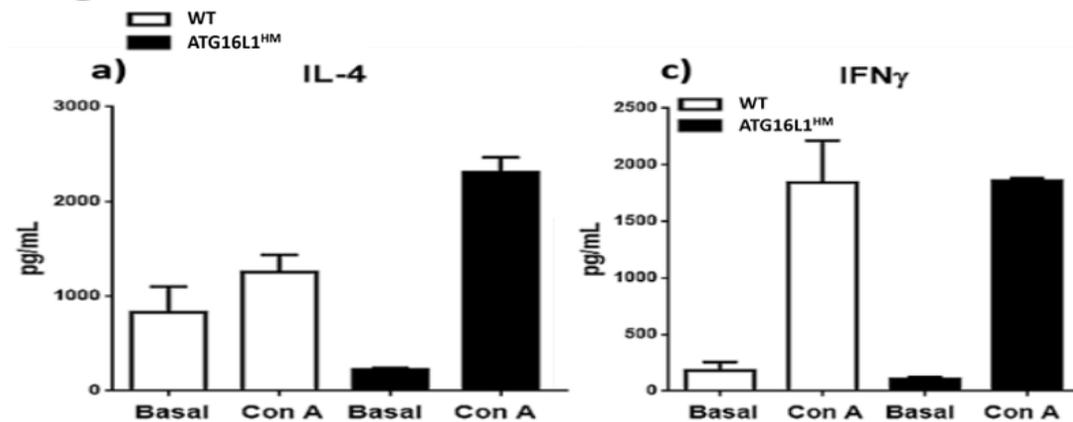


Gráfico 4. Caracterización de citocinas tipo Th1 y Th2 en bazo, GM, y suero sanguíneo. Se muestra la concentración en pg/mL de citocinas IL-4 e IFN γ en suero sanguíneo obtenido de ratones al día 45 (primer ciclo DSS) y al día 86 (último ciclo DSS)

ATG16L1 regula la respuesta inmune limitando un ambiente inmunosupresor

Con la finalidad de conocer el tipo de respuesta presentado por parte de las células B se contabilizó el número de linfocitos encontrados en cavidad peritoneal y ganglio linfático mesentérico (Gráfico 5).

Aunque no se encontraron diferencias significativas en el número de células totales en cavidad peritoneal entre grupos expuestos al tratamiento. En el GM se encontró que los ratones con producción deletérea de ATG16L1 poseían menor número de linfocitos (Gráfico 5).

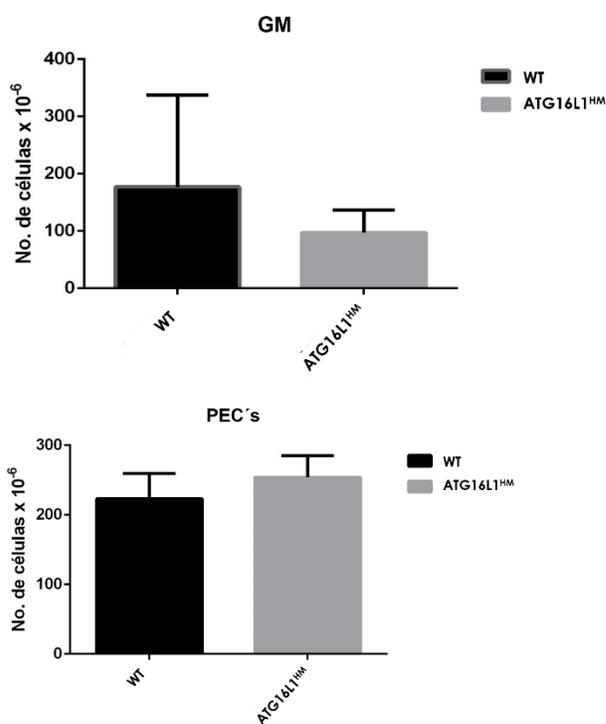


Gráfico 5. Número de linfocitos encontrados en GM y células intraperitoneales (PEC's). (n=5-6) de 2 experimentos.

Una vez conocido el número de linfocitos presentes en ambos sitios, se determinó mediante marcadores de superficie celular cuantas de estas células eran linfocitos B y qué tipo de respuesta inmune presentaron.

Se encontró que tanto en ganglio como en cavidad peritoneal existía un mayor número de linfocitos B con MHCII en ratones ATG16L1^{HM}, comparado con los linfocitos presentes en la cavidad peritoneal de los ratones WT

Dicho comportamiento fue observado también en linfocitos B con PDL1 activado en donde los ratones hipomórficos presentaron un mayor porcentaje de linfocitos B con PDL1.

Lo que indica un ambiente enriquecido de células B reguladoras a causa de la producción deletérea de ATG16L1.

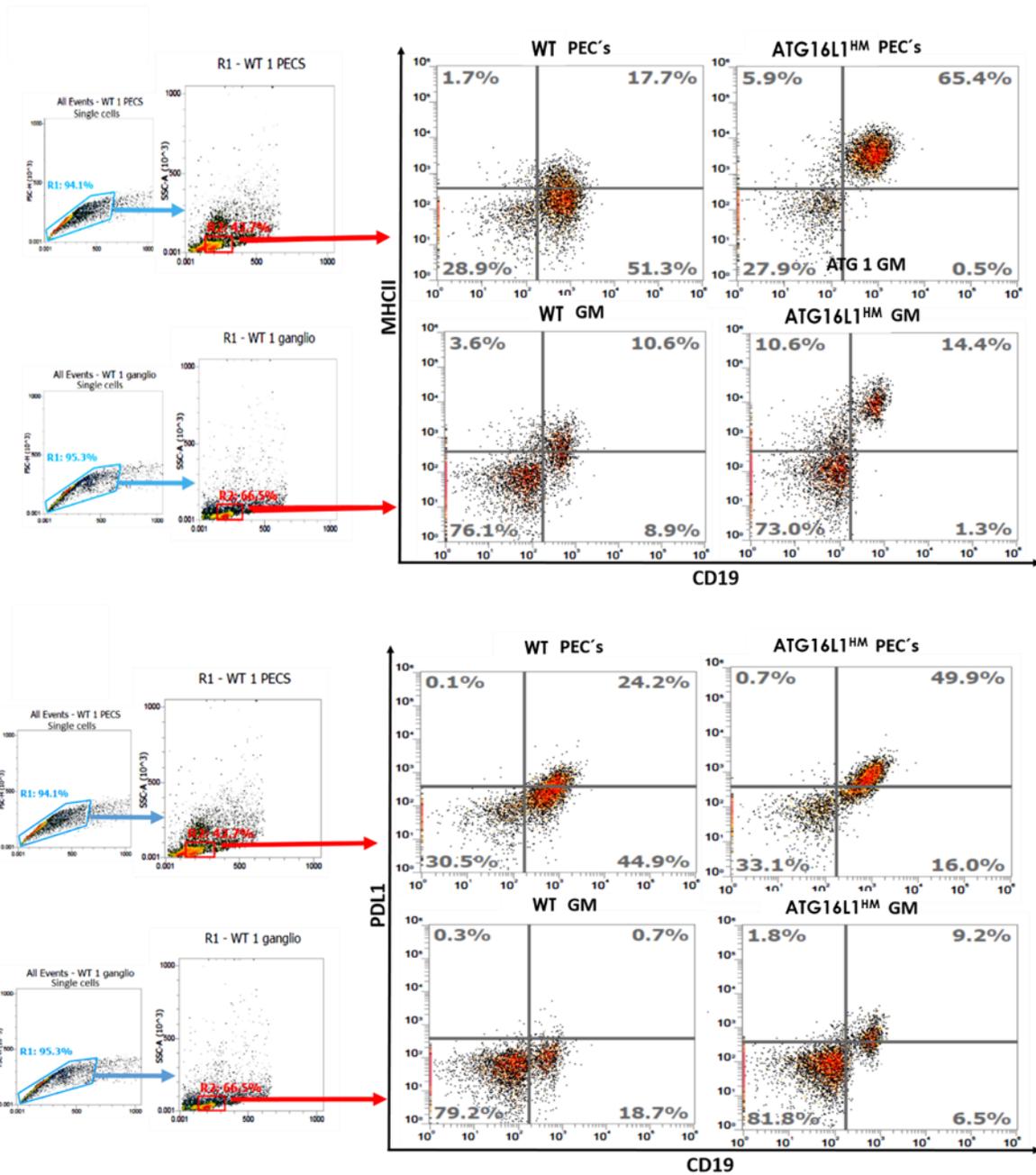


Gráfico 7. Expresión de MHCII y PDL-1 en linfocitos B. (n=5-6) de 2 experimentos. Se muestra un incremento de moléculas tipo MHCII y PDL-1 en ATG16L1^{HM} con tratamiento AOM/DSS a comparación de WT AOM/DSS.

7. DISCUSIÓN.

La enfermedad inflamatoria intestinal contribuye de manera significativa a un mayor riesgo de desarrollar cáncer colorrectal, principalmente como resultado de los efectos pro-neoplásicos de la inflamación intestinal crónica. Los estudios epidemiológicos continúan destacando el mayor riesgo de CCR en EII (Kim & Chang, 2014 & CDC, 2018)

En diversos estudios se ha identificado la existencia de alelos de riesgo que al verse mutados contribuyen en la aparición y desarrollo tanto de la EII como del CCR. La proteína ATG16L1 es uno de estos alelos de riesgo, pues, se ha detectado que la sustitución T300A en el extremo carboxilo de esta proteína regula de manera negativa la producción de la proteína autofágica ATG16L1. La producción reducida de esta proteína conduce al desarrollo de CCR asociado a colitis (Kuipers, *et al.*, 2015 & Hampe, *et al.*, 2007).

En este proyecto estudiamos la susceptibilidad al CCR de los ratones hipomórficos para la proteína ATG16L1 y los cambios en la respuesta inmune, específicamente en las células B. Nuestros resultados exponen que tras la exposición de un agente carcinogénico (AOM), seguido de 3 ciclos de un agente pro-inflamatorio (DSS) ambas cepas experimentales muestran pérdida de peso tras cada ciclo de DSS, sin embargo, los ratones hipomórficos para la proteína ATG16L1 mostraron una mayor disminución del mismo (gráfico 1). También se observó, de manera única en el grupo hipomórfico, la presencia de padecimientos físicos como lo son el sangrado rectal, sangrado en heces fecales y prolapso rectal (Figura 7). La pérdida de peso, así como la presencia de los padecimientos físicos ya descritos han sido reportados en numerosos trabajos como indicadores de la progresión de la EII (Snider, *et al.*, 2016, De robertis,, *et al.* 2011, Tanaka *et al.*, 2003).

Los daños a nivel histológico fueron claros y más marcados en el grupo ATG16L1^{HM} encontrándose una disminución en el peso y tamaño del colon en comparación con el grupo silvestre (cuadro 6 y gráfico 2), además de encontrar la presencia de esplenomegalia en el bazo (figura 8).

El peso y tamaño del colon no fueron las únicas características que se vieron modificadas pues se detectó de manera macroscópica en ambos grupos la presencia de neoplasias. En el grupo WT se encontraron neoplasias en la parte distal del colon, sin embargo, aunque existió la presencia de neoplasias mayores a 2mm, en su mayoría, estas no superaban este tamaño. Al contrario, en el grupo de los ratones ATG16L1 se presentaron un mayor número de neoplasias de mayor tamaño (>2mm) a lo largo de la parte proximal, media y distal del colon (gráfico 3). Tanto el tamaño como la localización de las neoplasias a lo largo del colon han sido descritos en trabajos previos como indicadores de la aparición, progresión y severidad del CCR (Tanaka et al., 2003). La distribución de las neoplasias ha sido descrita como un fuerte indicador de la severidad del CCR ya que las neoplasias son más comunes en la parte distal del colon. De todos los casos que se han observado de CCR en diversos estudios la aparición de neoplasias en la parte media y sobre todo proximal del colon es poco frecuente y está asociada a un mal pronóstico siendo que en estos casos la mortalidad aumenta (BaranB., et al., 2018; Hsu, Y. L., et al., 2019 & Mirón Fernández et al., 2021). De acuerdo con lo encontrado, la proteína ATG16L1 parece tener un importante papel en la enfermedad, limitando la progresión y severidad del CCR.

Posteriormente determinamos los cambios que hubo en los tejidos de colon tras la administración del modelo, de manera histológica. En ambos grupos existieron cambios morfológicos, se observaron cambios en la constitución del epitelio y mucosa colonica. Sin embargo, en el grupo hipomórfico se observaron cambios que indicaban la presencia de CCR.

Se ha descrito que de acuerdo al tipo de neoplasia y alteración del epitelio y mucosa intestinal se puede saber el nivel de progresión de la enfermedad con anterioridad (De Robertis, 2011; Fleming, M., et al., 2012). La presencia de criptas aberrantes, focos de criptas aberrantes, así como el ensanchamiento del epitelio intestinal son algunas de las características de adenomas (neoplasias no benignas) encontradas en el grupo WT (figura 10); el desorden arquitectónico sin una clara diferenciación de las partes que conforman el epitelio intestinal, así

como infiltrado celular en la mucosa son propios de carcinomas encontrados en el grupo ATG16L1, por lo que esta proteína limita el crecimiento y severidad del CCR.

Numerosos estudios han demostrado que el cáncer altera el equilibrio de la respuesta inmune tipo Th1 / Th2, y esto se conoce como "cambio de equilibrio". Se ha considerado que la inmunidad mediada por Th2 favorece el crecimiento tumoral, tanto al promover la angiogénesis como al inhibir la inmunidad mediada por células citotóxicas y la subsiguiente muerte de las células tumorales. El IFN- γ y la IL-4 son citocinas fundamentales que son producidas por las células Th1 y Th2, respectivamente. (Zhao, et al., 2019; Zhang, W., et al., 2018; Saxena, R., & Kaur, J. 2015 & Ma, J., Liu, H., & Wang, X. 2014). Nos dispusimos a medir los niveles de IL-4 e IFN- γ en suero sanguíneo (al inicio y al término de la administración de DSS), bazo y GM con la finalidad de conocer el tipo de respuesta inmune desarrollada (gráfico 4). Nuestros resultados indican un aumento de la citocina IL-4 al término de la inducción del DSS en suero sanguíneo y en GM en el grupo ATG16L1^{HM}. La citocina IL-4 es una citocina de importancia clínica al verse asociada con el progreso del cáncer. Es la encargada de la activación por fosforilación de la vía JAK-STAT6 la cuál promueve el fenotipo Th2 y a su vez mediante la producción de IL-4 limita la respuesta Th1 asociada a un mejor pronóstico de la enfermedad (Luzina, I. G., et al., 2012; Takeda, K., et al., 1996; Leon-Cabrera, et al., 2017). Por lo que ATG16L1 posee un papel importante en la regulación del CCR a través de la regulación de la citocina IL-4.

Las células B son células presentadoras de antígenos (APC) profesionales y pueden diferenciarse por distintas citocinas como IL-4 en diferentes tipos de células, por ejemplo, células plasmáticas capaces de producir anticuerpos. Las células B son responsables del comienzo de algunas enfermedades, por ejemplo, la mayoría de las enfermedades autoinmunes (Peng, B., Ming, Y., & Yang, C. 2018; Sun, X., et al. 2019; Guan, H., et al. 2016).

Además de tener un papel patogénico en enfermedades autoinmunes, las células B despliegan funciones supresoras mediante la secreción de citocinas como IL-10

e IL-35, debido a la presencia de moléculas citotóxicas como perforina y granzima (Sokolov, A. V., *et al.*, 2018; Liu, Y., *et al.* 2016). En general estas poblaciones se han categorizado como células B reguladoras (Bregs) y tienen la capacidad de inhibir a otras poblaciones de la respuesta inmune. Debido a esta función supresora, la inducción y/o expansión de B regs es una estrategia de evasión inmune de una gran diversidad de patógenos y se han encontrado en algunos tipos de neoplasias. En este estudio, nos interesamos en las células B regs, ya que poco se sabe acerca de como las proteínas ATG regulan a este subtipo de poblaciones (Guan, H., *et al.* 2016; He, Y., *et al.* 2014; Wang, W. W., *et al.* 2015).

Encontramos que los ratones ATG16L1 presentan un mayor porcentaje de células CD19+ MHCII+ y células CD19+PDL1+ tanto en la cavidad peritoneal así como en el ganglio drenante (mesentérico), dicho fenotipo es compatible con el reportado en células B regs, sugiriendo que el la gravedad del daño en el colon de los ratones ATG16L1 es resultado de un microambiente pro-tumoral representado por una respuesta de tipo Th2 exagerada así como un mayor número de células Bregs (Guan, H., *et al.* 2016; Khan, A. R., *et al.* 2015).

Por lo tanto, nuestros datos sugieren que cuando la proteína ATG16L1 no se expresa de manera normal se puede acelerar el proceso de carcinogénesis en el colon, lo cual se asocia con un ambiente Th2 combinado con poblaciones supresoras como células B reguladoras.

8. CONCLUSIONES.

- Los ratones hipomórficos para la proteína ATG16L1 mostraron un desarrollo más acelerado en el proceso de carcinogénesis en el colon, comparado con los ratones silvestres.
- El desarrollo del CCR en los ratones hipomórficos para la proteína ATG16L1 correlacionó con un aumento en la respuesta Th2 y un mayor número de células B reguladoras.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. American Cancer Society (2020) a. Cancer Facts and Figures 2020.
2. American Cancer Society (2020) b. Colorectal Cancer Facts and Figures 2020-2022.
3. American Cancer Society. (s. f.). Colorectal Cancer Risk Factors. Recuperado 23 de mayo de 2020, de <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/causes-risks-prevention/risk-factors.html>
4. Baran, B., Mert Ozupek, N., Yerli Tetik, N., Acar, E., Bekcioglu, O., & Baskin, Y. (2018). Difference Between Left-Sided and Right-Sided Colorectal Cancer: A Focused Review of Literature. *Gastroenterology research*, 11(4), 264–273. <https://doi.org/10.14740/gr1062w>
5. Bhattacharya, P. McHugh TW. (2020). Lynch Syndrome - StatPearls - NCBI Bookshelf. Recuperado 25 de mayo de 2020, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK431096/>
6. Boada-Romero, E., Letek, M., Fleischer, A., Pallauf, K., Ramón-Barros, C., & Pimentel-Muiños, F. X. (2013). TMEM59 defines a novel ATG16L1-binding motif that promotes local activation of LC3. *The EMBO journal*, 32(4), 566–582. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.8>
7. Botteri E, Iodice S, Raimondi S, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Cigarette smoking and adenomatous polyps: a meta-analysis. *Gastroenterology*. 2008;134(2):388-395. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.11.007>
8. Cadwell, K., Liu, J. Y., Brown, S. L., Miyoshi, H., Loh, J., Lennerz, J. K., Kishi, C., Kc, W., Carrero, J. A., Hunt, S., Stone, C. D., Brunt, E. M., Xavier, R. J., Sleckman, B. P., Li, E., Mizushima, N., Stappenbeck, T. S., & Virgin, H. W., 4th (2008). A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature*, 456(7219), 259–263. <https://doi.org/10.1038/nature07416>
9. Charifa A, Jamil RT, Zhang X. (s. f.). Gardner Syndrome - StatPearls - NCBI Bookshelf. Recuperado 29 de mayo de 2020, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482342/>
10. de Jong, A. E., Morreau, H., Nagengast, F. M., Mathus-Vliegen, E. M., Kleibeuker, J. H., Griffioen, G., Cats, A., & Vasen, H. F. (2005). Prevalence of adenomas among young individuals at average risk for colorectal cancer. *The American journal of gastroenterology*, 100(1), 139–143. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2005.41000.x>
11. De Robertis, M., Massi, E., Poeta, M. L., Carotti, S., Morini, S., Cecchetelli, L., Signori, E., & Fazio, V. M. (2011). The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis:

- From pathways to diagnosis and therapy studies. *Journal of carcinogenesis*, 10, 9. <https://doi.org/10.4103/1477-3163.78279>
12. Dekker, E., Tanis, P. J., Vleugels, J. L. A., Kasi, P. M., & Wallace, M. B. (2019). Colorectal cancer. *The Lancet*, 394(10207), 1467-1480.
 13. Dikic, I., & Elazar, Z. (2018). Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 19(6), 349–364. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0003-4>
 14. Disease Control and Prevention (2018). What is inflammatory bowel disease (IBD)? - Inflammatory Bowel Disease - Division of Population Health. Recuperado 25 de junio de 2020, de <https://www.cdc.gov/ibd/what-is-IBD.htm>
 15. Dooley, H. C., Razi, M., Polson, H. E., Girardin, S. E., Wilson, M. I., & Tooze, S. A. (2014). WIPI2 links LC3 conjugation with PI3P, autophagosome formation, and pathogen clearance by recruiting Atg12-5-16L1. *Molecular cell*, 55(2), 238–252. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.05.021>
 16. Fleming, M., Ravula, S., Tatishchev, S. F., & Wang, H. L. (2012). Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *Journal of gastrointestinal oncology*, 3(3), 153–173. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2078-6891.2012.030>
 17. Gatalica, Z., Vranic, S., Xiu, J., Swensen, J., & Reddy, S. (2016). High microsatellite instability (MSI-H) colorectal carcinoma: a brief review of predictive biomarkers in the era of personalized medicine. *Familial Cancer*, 15(3), 405-412. <https://doi.org/10.1007/s10689-016-9884-6>
 18. Grimm, W. A., Messer, J. S., Murphy, S. F., Nero, T., Lodolce, J. P., Weber, C. R., Logsdon, M. F., Bartulis, S., Sylvester, B. E., Springer, A., Dougherty, U., Niewold, T. B., Kupfer, S. S., Ellis, N., Huo, D., Bissonnette, M., & Boone, D. L. (2016). The Thr300Ala variant in ATG16L1 is associated with improved survival in human colorectal cancer and enhanced production of type I interferon. *Gut*, 65(3), 456–464. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-308735>
 19. Guan, H., Wan, Y., Lan, J., Wang, Q., Wang, Z., Li, Y., Zheng, J., Zhang, X., Wang, Z., Shen, Y., & Xie, F. (2016). PD-L1 is a critical mediator of regulatory B cells and T cells in invasive breast cancer. *Scientific reports*, 6, 35651. <https://doi.org/10.1038/srep35651>
 20. 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>
 21. Hampe, J., Franke, A., Rosenstiel, P., Till, A., Teuber, M., Huse, K., Albrecht, M., Mayr, G., De La Vega, F. M., Briggs, J., Günther, S., Prescott, N. J., Onnie, C. M., Häslner, R., Sipos, B., Fölsch, U. R., Lengauer, T., Platzer, M., Mathew, C. G., Krawczak, M., ... Schreiber, S. (2007). A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nature genetics*, 39(2), 207–211. <https://doi.org/10.1038/ng1954>
 22. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.
 23. Harken, A. H., & Moore, E. E. (2017). *Abernathy's Surgical Secrets E-Book*. (pp. 258-261) Elsevier Health Sciences. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-05711-0.00052-5>.
 24. He, Y., Qian, H., Liu, Y., Duan, L., Li, Y., & Shi, G. (2014). The roles of regulatory B cells in cancer. *Journal of immunology research*, 2014, 215471. <https://doi.org/10.1155/2014/215471>
 25. Hussain, T., & Church, J. M. (2019). Juvenile polyposis syndrome. *Clinical case reports*, 8(1), 92–95. <https://doi.org/10.1002/ccr3.2616>
 26. Hsu, Y. L., Lin, C. C., Jiang, J. K., Lin, H. H., Lan, Y. T., Wang, H. S., Yang, S. H., Chen, W. S., Lin, T. C., Lin, J. K., Lin, P. C., & Chang, S. C. (2019). Clinicopathological and molecular differences in colorectal cancer according to location. *The International journal of biological markers*, 34(1), 47–53. <https://doi.org/10.1177/1724600818807164>

27. INFOcáncer (2020). El cáncer en el mundo y México. Recuperado 24 de junio de 2020, de <https://infocancer.org.mx/?c=conocer-el-cancer&a=estadisticas-mundiales-y-locales>
28. Kang G. H. (2011). Four molecular subtypes of colorectal cancer and their precursor lesions. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 135(6), 698–703. <https://doi.org/10.1043/2010-0523-RA.1>
29. Khan, A. R., Hams, E., Floudas, A., Sparwasser, T., Weaver, C. T., & Fallon, P. G. (2015). PD-L1hi B cells are critical regulators of humoral immunity. *Nature communications*, 6, 5997. <https://doi.org/10.1038/ncomms6997>
30. Keum, N., & Giovannucci, E. (2019). Global burden of colorectal cancer: Emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 1-20.
31. Kiessling, P., Dowling, E., Huang, Y., Ho, M. L., Balakrishnan, K., Weigel, B. J., Highsmith, W. E., Jr, Niu, Z., & Schimmenti, L. A. (2019). Identification of aggressive Gardner syndrome phenotype associated with a de novo APC variant, c.4666dup. *Cold Spring Harbor molecular case studies*, 5(2), a003640. <https://doi.org/10.1101/mcs.a003640>
32. Kim, E. R., & Chang, D. K. (2014). Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the risk, pathogenesis, prevention and diagnosis. *World journal of gastroenterology*, 20(29), 9872–9881. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i29.9872>
33. Kuipers, E. J., Grady, W. M., Lieberman, D., Seufferlein, T., Sung, J. J., Boelens, P. G., van de Velde, C. J., & Watanabe, T. (2015). Colorectal cancer. *Nature reviews. Disease primers*, 1, 15065. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.65>
34. Landy, J., Ronde, E., English, N., Clark, S. K., Hart, A. L., Knight, S. C., Ciclitira, P. J., & Al-Hassi, H. O. (2016). Tight junctions in inflammatory bowel diseases and inflammatory bowel disease associated colorectal cancer. *World journal of gastroenterology*, 22(11), 3117–3126. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i11.3117>
35. Larsson, S. C., & Wolk, A. (2006). Meat consumption and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of prospective studies. *International journal of cancer*, 119(11), 2657–2664. <https://doi.org/10.1002/ijc.22170>
36. Leon-Cabrera, S. A., Molina-Guzman, E., Delgado-Ramirez, Y. G., Vázquez-Sandoval, A., Ledesma-Soto, Y., Pérez-Plasencia, C. G., Chirino, Y. I., Delgado-Buenrostro, N. L., Rodríguez-Sosa, M., Vaca-Paniagua, F., Ávila-Moreno, F., Gutierrez-Cirlos, E. B., Arias-Romero, L. E., & Terrazas, L. I. (2017). Lack of STAT6 Attenuates Inflammation and Drives Protection against Early Steps of Colitis-Associated Colon Cancer. *Cancer immunology research*, 5(5), 385–396. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-16-0168>
37. Liu, Y., Cheng, L. S., Wu, S. D., Wang, S. Q., Li, L., She, W. M., Li, J., Wang, J. Y., & Jiang, W. (2016). IL-10-producing regulatory B-cells suppressed effector T-cells but enhanced regulatory T-cells in chronic HBV infection. *Clinical science (London, England : 1979)*, 130(11), 907–919. <https://doi.org/10.1042/CS20160069>
38. Liu, J. Z., & Anderson, C. A. (2014). Genetic studies of Crohn's disease: past, present and future. *Best practice & research. Clinical gastroenterology*, 28(3), 373–386. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2014.04.009>
39. Luzina, I. G., Keegan, A. D., Heller, N. M., Rook, G. A., Shea-Donohue, T., & Atamas, S. P. (2012). Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of "alternatives". *Journal of leukocyte biology*, 92(4), 753–764. <https://doi.org/10.1189/jlb.0412214>
40. Ma, J., Liu, H., & Wang, X. (2014). Effect of ginseng polysaccharides and dendritic cells on the balance of Th1/Th2 T helper cells in patients with non-small cell lung cancer. *Journal of traditional Chinese medicine = Chung i tsa chih ying wen pan*, 34(6), 641–645. [https://doi.org/10.1016/s0254-6272\(15\)30076-5](https://doi.org/10.1016/s0254-6272(15)30076-5)
41. Matsuzawa-Ishimoto, Y., Shono, Y., Gomez, L. E., Hubbard-Lucey, V. M., Cammer, M., Neil, J., Dewan, M. Z., Lieberman, S. R., Lazrak, A., Marinis, J. M., Beal, A., Harris, P. A., Bertin, J., Liu, C., Ding, Y., van den Brink, M., & Cadwell, K. (2017). Autophagy protein

- ATG16L1 prevents necroptosis in the intestinal epithelium. *The Journal of experimental medicine*, 214(12), 3687–3705. <https://doi.org/10.1084/jem.20170558>
42. Mayo Foundation for Medical Education and Research. (s. f.). Cáncer de colon. Recuperado 21 de mayo de 2020, de <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/colon-cancer/symptoms-causes/syc-20353669>
 43. Moazeni-Roodi, A., Tabasi, F., Ghavami, S., & Hashemi, M. (2019). Investigation of ATG16L1 rs2241880 Polymorphism with Cancer Risk: A Meta-Analysis. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 55(8), 425. <https://doi.org/10.3390/medicina55080425>
 44. Mirón Fernández, I., Mera Velasco, S., Turiño Luque, J. D., González Poveda, I., Ruiz López, M., & Santoyo Santoyo, J. (2021). Right and Left Colorectal Cancer: Differences in Post-Surgical-Care Outcomes and Survival in Elderly Patients. *Cancers*, 13(11), 2647. <https://doi.org/10.3390/cancers13112647>
 45. Munkholm, P., Langholz, E., Hollander, D., Thornberg, K., Orholm, M., Katz, K. D., & Binder, V. (1994). Intestinal permeability in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis and their first degree relatives. *Gut*, 35(1), 68–72. <https://doi.org/10.1136/gut.35.1.68>
 46. National Cancer Institute. (2006). *What you need to know about cancer of the colon and rectum*. Department of Health, Education, and Welfare, Public Health Service, National Institutes of Health.
 47. NIH. (2013). Juvenile polyposis syndrome. Genetics Home Reference. Recuperado 29 de mayo de 2020, de <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/juvenile-polyposis-syndrome>
 48. NIH. (2020). Peutz-Jeghers syndrome. Genetics Home Reference. Recuperado 21 de mayo de 2020, de <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/peutz-jeghers-syndrome>
 49. Nishimura, T., Kaizuka, T., Cadwell, K., Sahani, M. H., Saitoh, T., Akira, S., Virgin, H. W., & Mizushima, N. (2013). FIP200 regulates targeting of Atg16L1 to the isolation membrane. *EMBO reports*, 14(3), 284–291. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.6>
 50. Ollberding, N. J., Nomura, A. M., Wilkens, L. R., Henderson, B. E., & Kolonel, L. N. (2011). Racial/ethnic differences in colorectal cancer risk: the multiethnic cohort study. *International journal of cancer*, 129(8), 1899–1906. <https://doi.org/10.1002/ijc.25822>
 51. Parés, D., Pera, M., González, S., Cruz, M. P., & Blanco, I. (2006). Poliposis adenomatosa familiar. *Gastroenterología y hepatología*, 29(10), 625-635.
 52. Peeters, P. J., Bazelier, M. T., Leufkens, H. G., de Vries, F., & De Bruin, M. L. (2015). The risk of colorectal cancer in patients with type 2 diabetes: associations with treatment stage and obesity. *Diabetes care*, 38(3), 495–502. <https://doi.org/10.2337/dc14-1175>
 53. Peng, B., Ming, Y., & Yang, C. (2018). Regulatory B cells: the cutting edge of immune tolerance in kidney transplantation. *Cell death & disease*, 9(2), 109. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0152-y>
 54. Pérez, J. J. V., Martínez, M. A. O., del Castillo, A. L., Villalobos, L., & Villalobos, G. M. T. (2006). Estudio de 25 años de cáncer del aparato digestivo en cuatro instituciones de la ciudad de México. *Revista de gastroenterología de México*, 71(4), 460-472.
 55. Pöschl, G., & Seitz, H. K. (2004). Alcohol and cancer. *Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*, 39(3), 155–165. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agh057>
 56. Rioux, J. D., Xavier, R. J., Taylor, K. D., Silverberg, M. S., Goyette, P., Huett, A., Green, T., Kuballa, P., Barmada, M. M., Datta, L. W., Shugart, Y. Y., Griffiths, A. M., Targan, S. R., Ippoliti, A. F., Bernard, E. J., Mei, L., Nicolae, D. L., Regueiro, M., Schumm, L. P., Steinhart, A. H., ... Brant, S. R. (2007). Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nature genetics*, 39(5), 596–604. <https://doi.org/10.1038/ng2032>
 57. 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>

58. Saxena, R., & Kaur, J. (2015). Th1/Th2 cytokines and their genotypes as predictors of hepatitis B virus related hepatocellular carcinoma. *World journal of hepatology*, 7(11), 1572–1580. <https://doi.org/10.4254/wjh.v7.i11.1572>
59. Sehgal, R., Sheahan, K., O'Connell, P. R., Hanly, A. M., Martin, S. T., & Winter, D. C. (2014). Lynch syndrome: an updated review. *Genes*, 5(3), 497–507. <https://doi.org/10.3390/genes5030497>
60. Shussman, N., & Wexner, S. D. (2014). Colorectal polyps and polyposis syndromes. *Gastroenterology report*, 2(1), 1–15. <https://doi.org/10.1093/gastro/got041>
61. Singh, M. P., Rai, S., Pandey, A., Singh, N. K., & Srivastava, S. (2019). Molecular subtypes of colorectal cancer: An emerging therapeutic opportunity for personalized medicine. *Genes & Diseases*. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2019.10.013>
62. Sokolov, A. V., Shmidt, A. A., & Lomakin, Y. A. (2018). B Cell Regulation in Autoimmune Diseases. *Acta naturae*, 10(3), 11–22.
63. Snider, A. J., Bialkowska, A. B., Ghaleb, A. M., Yang, V. W., Obeid, L. M., & Hannun, Y. A. (2016). Murine Model for Colitis-Associated Cancer of the Colon. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1438, 245–254. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3661-8_14
64. Stidham, R. W., & Higgins, P. (2018). Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Disease. *Clinics in colon and rectal surgery*, 31(3), 168–178. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1602237>
65. Sun, X., Zhang, T., Li, M., Yin, L., & Xue, J. (2019). Immunosuppressive B cells expressing PD-1/PD-L1 in solid tumors: A mini review. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*, hcz162. Advance online publication. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hcz162>
66. Subramani, S., & Malhotra, V. (2013). Non-autophagic roles of autophagy-related proteins. *EMBO reports*, 14(2), 143–151. <https://doi.org/10.1038/embor.2012.220>
67. Subramani, S., & Malhotra, V. (2013). Non-autophagic roles of autophagy-related proteins. *EMBO reports*, 14(2), 143–151. <https://doi.org/10.1038/embor.2012.220>
68. Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Program, SEER*Stat Database: NAACCR Incidence - CiNA Analytic File, 1995- 2016, for NHIaV2 Origin, Custom File With County, ACS Facts and Figures projection Project, North American Association of Central |Cancer Registries. 2019
69. Thanikachalam, K., & Khan, G. (2019). Colorectal Cancer and Nutrition. *Nutrients*, 11(1), 164. <https://doi.org/10.3390/nu11010164>
70. Tomas, C., Soyer, P., Dohan, A., Dray, X., Boudiaf, M., & Hoeffel, C. (2014). Update on imaging of Peutz-Jeghers syndrome. *World journal of gastroenterology*, 20(31), 10864–10875. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i31.10864>
71. Takeda, K., Tanaka, T., Shi, W., Matsumoto, M., Minami, M., Kashiwamura, S., Nakanishi, K., Yoshida, N., Kishimoto, T., & Akira, S. (1996). Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature*, 380(6575), 627–630. <https://doi.org/10.1038/380627a0>
72. 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. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2003.tb01386.x>
73. Tsong, W. H., Koh, W. P., Yuan, J. M., Wang, R., Sun, C. L., & Yu, M. C. (2007). Cigarettes and alcohol in relation to colorectal cancer: the Singapore Chinese Health Study. *British journal of cancer*, 96(5), 821–827. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603623>
74. Wang, W. W., Yuan, X. L., Chen, H., Xie, G. H., Ma, Y. H., Zheng, Y. X., Zhou, Y. L., & Shen, L. S. (2015). CD19+CD24hiCD38hiBregs involved in downregulate helper T cells and upregulate regulatory T cells in gastric cancer. *Oncotarget*, 6(32), 33486–33499. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5588>
75. Webb, P. G., Spillman, M. A., & Baumgartner, H. K. (2013). Claudins play a role in normal and tumor cell motility. *BMC cell biology*, 14, 19. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-14-19>

76. Wild, C. P., Weiderpass, E., & Stewart, B. W. (2020). World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention. *World Cancer Reports*. Lyon: International Agency for Research on Cancer.
77. World Health Organization: WHO. (2018). Cancer. Recuperado 21 de mayo de 2020, de <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (está en español en el texto)
78. Xavier, R. J., & Podolsky, D. K. (2007). Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 448(7152), 427–434. <https://doi.org/10.1038/nature06005>
79. Yao, C., Nash, G. F., & Hickish, T. (2014). Management of colorectal cancer and diabetes. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 107(3), 103–109. <https://doi.org/10.1177/0141076813512121>
80. Zhang, W., Pan, Y., Gou, P., Zhou, C., Ma, L., Liu, Q., Du, Y., Yang, J., & Wang, Q. (2018). Effect of xanthohumol on Th1/Th2 balance in a breast cancer mouse model. *Oncology reports*, 39(1), 280–288. <https://doi.org/10.3892/or.2017.6094>
81. Zhao, X., Liu, J., Ge, S., Chen, C., Li, S., Wu, X., Feng, X., Wang, Y., & Cai, D. (2019). Saikosaponin A Inhibits Breast Cancer by Regulating Th1/Th2 Balance. *Frontiers in pharmacology*, 10, 624. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00624>
82. Zisman, A. L., Nickolov, A., Brand, R. E., Gorchow, A., & Roy, H. K. (2006). Associations between the age at diagnosis and location of colorectal cancer and the use of alcohol and tobacco: implications for screening. *Archives of internal medicine*, 166(6), 629–634. <https://doi.org/10.1001/archinte.166.6.629>

ANEXOS.

1. HALLMARKS DEL CÁNCER. (HANAHAN & WEINBERG. 2011)



Figura 9. Hallmarks of Cancer. Editado de (Hanahan & Weinberg. 2011).

1

1.1.1 Sostiene la Señalización Proliferativa: Los tejidos normales controlan de manera cuidadosa la producción y liberación de señales promotoras de crecimiento, las cuales entran al ciclo celular, permitiéndoles asegurar la homeostasis celular de los tejidos. Dicha homeostasis resulta en el buen funcionamiento y mantenimiento del tejido.

En células cancerosas éstas señales se ven desreguladas, confiriéndoles la facultad de autorregularse, lo que les permite adquirir la capacidad de mantener la señalización proliferativa de varias maneras:

- Pueden producir ligandos de factores de crecimiento, a los que pueden responder mediante la expresión de receptores afines, dando como resultado la estimulación proliferativa autócrina.

- A través del envío de señales, las células cancerosas pueden estimular las células normales dentro del estroma asociado al tumor de soporte, lo que provoca que las células normales suministren a las cancerosas de varios factores de crecimiento.
- Al existir en la superficie de la célula cancerosa proteínas receptoras, que hacen que dichas células sean hiperreactivas a cantidades mínimas de ligando del factor de crecimiento, lo que conduce a alteraciones estructurales en las moléculas receptoras facilitando la activación independiente del ligando.
- La independencia del factor de crecimiento a través de la activación constitutiva de los componentes de las vías de señalización que operan aguas debajo de los receptores, lo que evita la necesidad de estimular estas vías mediante la activación del receptor mediada por ligando,
- Las mutaciones somáticas activan vías adicionales aguas abajo, generalmente por la activación de receptores de crecimiento.
- La interrupción de los mecanismos de retroalimentación negativa, atenúa la señalización proliferativa. Normalmente los circuitos de retroalimentación negativa funcionan para amortiguar varios tipos de señalización y, por lo tanto, garantizar la regulación homeostática del flujo de señales que circulan a través de los circuitos intracelulares. Sin embargo, al existir defectos en estos mecanismos de retroalimentación, son capaces de mejorar la señalización proliferativa.

2

1.1.2 Evasión de supresores de crecimiento: Las células cancerosas poseen estrategias que regulan de manera negativa la proliferación celular, muchas de estas estrategias dependen de las acciones de los genes supresores de tumores. Se han descubierto docenas de ellos, que operan de diversas formas para limitar el crecimiento y la proliferación celular a través de su inactivación.

- Mecanismos de Inhibición de genes de contacto y su evasión: Los contactos de célula a célula formados por densas poblaciones de células normales propagadas en cultivo bidimensional operan para suprimir una mayor proliferación celular, siendo esto un mecanismo que funciona para garantizar la homeostasis celular. Esta inhibición al contacto se elimina en varios tipos de células cancerosas.
- La corrupción de la vía TGF- β promueve la malignidad: TGF- β es una vía de señalización anti proliferativa, sin embargo, en muchos tumores de etapa tardía la señalización en la vía TGF- β no suprime la proliferación celular y, en cambio, activa un programa celular denominado “Transición Eitelio-Mesénquima” que confiere rasgos de células cancerosas asociadas con alto grado de malignidad.

1.1.3 Resistencia a la muerte celular. La muerte celular programada por apoptosis sirve como una barrera natural para el desarrollo del cáncer. La apoptosis se desencadena en respuesta a diversas tensiones fisiológicas que sufren las células cancerosas, causadas por la terapia contra el cáncer. Además, la alta señalización de oncogenes y el daño al ADN asociado con la hiperproliferación, son principales inductores de dicho programa. Sin embargo, se ha observado que conforme se progresa a estados de malignidad más altos en el proceso de carcinogénesis, se atenúa el proceso de apoptosis.

La maquinaria apoptótica se componen de dos tipos de reguladores, uno que recibe y procesa señales extracelulares, y el otro que detecta e integra una variedad de señales de origen intracelular (programa intrínseco). Ambos culminan en la activación de proteasas conocidas como Caspasas 8 y 9, las cuales inician una cascada de proteólisis, en la cual la célula se desarma progresivamente y luego es consumida tanto por sus vecinos como por las células fagocíticas. El programa apoptótico intrínseco está más implicado como una barrera para la patogénesis del cáncer.

EL desencadenante apoptótico se regula mediante miembros pro y antiapoptóticos de la familia de las proteínas reguladoras Bcl-2. Bcl-2, Bcl-w, Mcl-1 y A1 son inhibidores apoptóticos, que cumplen su función al unirse a las proteínas Bax y Bak, incrustadas en la membrana mitocondrial. Estas últimas son pro apoptóticas. Dichas proteínas comparten dominios de interacción proteína-proteína, denominados BH3

Se han identificado varios sensores de anomalías que desempeñan funciones claves en el desarrollo del tumor. TP53 induce la apoptosis regulando al alza la expresión de las proteínas Noxa y Puma con dominio BH3 ante daño al ADN u otras anomalías cromosómicas. Las proteínas transductoras de estrés juegan un papel importante en la regulación apoptótica. Niveles inadecuados de interleucina 3 en los linfocitos o del factor de crecimiento similar a la insulina $\frac{1}{2}$ en células epiteliales pueden provocar apoptosis a través de una proteína llamada Bim con dominio BH3. Otra condición que conduce a la muerte celular implica la señalización hiperactiva de ciertas oncoproteínas, como Myc.

Las células tumorales desarrollan una gran variedad de estrategias para evitar o limitar la apoptosis. La más común de ellas es la pérdida de la función supresora de tumores mediada por TP53, que elimina este sensor de daño crítico al DNA.

La autofagia es inducida por ciertos estados de estrés celular, el más representativo de ellos es la deficiencia de nutrientes. El programa autofágico permite que las células descompongan orgánulos celulares, como los ribosomas y las mitocondrias, permitiendo que los catabolitos resultantes sean reciclados, y, por lo tanto, utilizados para la biosíntesis y el metabolismo energético. Al igual, se generan metabolitos por la fusión de lisosomas con vesículas intracelulares conocidas como autofagosomas. Dichos metabolitos de bajo peso molecular apoyan a la supervivencia en entornos estresados y limitados de nutrientes, experimentados por muchas células cancerosas.

La vía de señalización que involucran las P13-quinasas, AKT Y mTOR quinazas, es estimulada por señales de supervivencia para bloquear la apoptosis, inhibe de manera similar la autofagia; cuando las señales de supervivencia son insuficientes, la vía de señalización de P13K se regula negativamente, con el resultado de que se puede inducir autofagia y/o apoptosis.

Las moléculas ya antes mencionadas como Bid, Bad, Puma, junto con otras pueden inducir a apoptosis y/o autofagia dependiendo del estado fisiológico de la célula,

Beclin-1 es una importante proteína reguladora ya que, en conjunto con las proteínas BH3 acopladas al sensor de estrés, es capaz de inducir autofagia y/o apoptosis dependiendo del estado fisiológico en el que se encuentre la célula, gracias.

Estudios refieren a la autofagia como una barrera para el cáncer. En ratones con alelos inactivados del gen Beclin-1 o de otros ciertos componentes de la maquinaria de autofagia exhiben una mayor susceptibilidad al cáncer, lo que sugiere que la autofagia puede servir como barrera para la tumorigénesis, ya sea de forma aislada o en conjunto con la apoptosis. Quizás, paradójicamente, la inanición de nutrientes, la radioterapia y ciertos medicamentos citotóxicos pueden inducir niveles elevados de autofagia que aparentemente son citoprotectores para las células cancerosas, perjudicando en lugar de acentuar las acciones asesinas de éstas situaciones inductoras de éstas.

La muerte celular por necrosis es un proceso que está bajo control genético en algunas circunstancias, y a diferencia de la apoptosis, en el que la célula es consumida por sus vecinas, las células necróticas se hinchan y explotan, liberando su contenido al microambiente del tejido local. Dicho contenido proinflamatorio recluta células del sistema inmune cuya función específica es examinar la extensión del daño tisular y eliminar las enfermedades asociadas a desechos necróticos. Sin embargo, en el contexto de la

neoplasia, múltiples líneas de evidencia indican que las células inmunitarias inflamatorias pueden promover activamente al tumor, dado que tales células son capaces de promover la angiogénesis, proliferación de células cancerosas e invasividad.

Las neoplasias incipientes y los tumores potencialmente invasivos y metastásicos son beneficiados al tolerar en cierto grado la muerte celular necrótica, para reclutar células inflamatorias promotoras de tumores que aporten factores estimulantes del crecimiento a las células sobrevivientes.

4

1.1.4 Evasión de señales anti-replicativas: Las células cancerosas poseen un potencial replicativo limitado. En células normales se presentan dos barreras que limitan los ciclos sucesivos de crecimiento y división celular, dichas barreras son la senescencia, una entrada típicamente irreversible en un estado no proliferativo pero viable, y la crisis, que implica la muerte celular. Los ciclos repetidos de división celular conducen primero a la senescencia y luego, aquellas células que logran eludir esta barrera entran a una fase de crisis, en la que muere la gran mayoría de células de la población. En raras ocasiones, cuando las células emergen de una población en crisis y exhiben un potencial replicativo ilimitado, entran en un estado conocido como cromosómico de las fusiones de extremo a extremo y esto resulta en una mezcla del cariotipo que amenaza la viabilidad celular. La longitud del ADN telomérico en una célula dicta cuantas generaciones celulares sucesivamente puede pasar su progenie antes de que los telómeros se erosionen en gran medida y en consecuencia pierdan sus características protectoras, lo que desencadena la crisis.

En células inmortalizadas se expresa hasta en un 90% de estas, incluyendo células cancerosas, una enzima ADN polimerasa especializada en agregar segmentos repetidos de telómeros a los extremos del ADN telomérico, conocida como telomerasa. La cual se encuentra casi ausente en células no inmortalizadas. Al extender el ADN telomérico, la telomerasa puede contrarrestar la erosión progresiva de los telómeros por lo que la actividad

de esta enzima se correlaciona con la resistencia a la inducción tanto de senescencia como de crisis/apoptosis.

El proceso de inmortalización en células que procederán a formar tumores, se ha atribuido a su capacidad de mantener el ADN telomérico en longitudes suficientes para evitar desencadenar la senescencia o la apoptosis a través del alza en la expresión de la telomerasa. Al igual, se ha observado que, en clones de células cancerosas incipientes, a menudo, se experimenta una crisis inducida por la pérdida relativamente temprana de los telómeros durante el curso de la progresión tumoral, debido a su incapacidad para expresar niveles significativos de telomerasa. De igual forma la ausencia de la vigilancia genómica por TP53 puede permitir que otras neoplasias incipientes sobrevivan a la erosión inicial de los telómeros y a los ciclos de puente de fusión-ruptura cromosómica (BFB). Las alteraciones genómicas resultantes de estos ciclos de BFB, incluidas las deleciones y amplificaciones de segmentos cromosómicos, evidentemente sirven para aumentar la mutabilidad del genoma, acelerando así la adquisición de oncogenes mutantes y genes supresores de tumores.

A parte de la importancia que tiene la telomerasa para mantener y alargar el ADN telomérico, ejerce otras funciones que son relevantes para la proliferación celular pero que no están relacionadas con el mantenimiento de telómeros. La subunidad TERT de la telomerasa juega un papel relevante en dichas funciones, al participar en procesos de amplificación de señales en vías de señalización pro-cáncer como en la vía Wnt/ β -catenina, en la proliferación celular y/o resistencia a la apoptosis, a través de la reparación del daño al ADN entre otros. Sin embargo, las contribuciones de estas funciones adicionales de la telomerasa a la tumorigénesis quedan por dilucidar por completo.

5

1.1.5 Inducción a angiogénesis: Al igual que los tejidos normales, los tumores requieren sustento en forma de nutrientes y oxígeno, así como

capacidad de evacuar desechos metabólicos y el dióxido de carbono. La neovasculatura asociada al tumor, generada por el proceso de angiogénesis, aborda estas necesidades. Durante la embriogénesis, el desarrollo de la vasculatura implica el nacimiento de nuevas células endoteliales y su ensamblaje en tubos (vasculogénesis) además del brote (angiogénesis) de nuevos vasos a partir de los existentes. Después de esta morfogénesis, la vasculatura normal se vuelve en gran parte inactiva. En el adulto, como parte de procesos fisiológicos como la curación de heridas y el ciclo reproductivo femenino, la angiogénesis se activa, pero solo de manera transitoria. Por el contrario, durante la progresión tumoral, un “interruptor angiogénico” casi siempre se activa y permanece encendido.

El cambio angiogénico se rige por factores compensatorios que inducen o se oponen a la angiogénesis. Algunos de estos reguladores angiogénico son proteínas de señalización que se unen a receptores estimulantes o inhibidores de la superficie celular que muestran células endoteliales vasculares. Los prototipos bien conocidos de inductores e inhibidores de la angiogénesis son, el factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGFR-A), la trombospodina-1 (TSP-1) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Cada uno desempeña labores diferentes en el proceso de angiogénesis durante el desarrollo embrionario y postnatal, y luego en la supervivencia homeostática de las células endoteliales en el adulto, en situaciones fisiológicas y patológicas, ya sea como reguladores, inhibidores o activadores. En el proceso de carcinogénesis la angiogénesis se ve activada de manera aberrante por el desequilibrio de señales proangiogénicas de manera temprana, durante el desarrollo de etapas múltiples de cánceres invasivos tanto en modelos humanos como animales, la neovasculatura tumoral está marcada por brotes capilares precoces, ramificación de vasos enrevesada y excesiva, vasos distorsionados y agrandados, flujo sanguíneo errático, microhemorragia, fugas y niveles anormales de proliferación y apoptosis de células endoteliales.

A demás de factores reguladores, la angiogénesis en células tumorales se ve beneficiada por células de soporte encontradas muy cerca de las superficies externas de los tubos endoteliales, en la vasculatura del tejido normal, dichas células son conocidas como los pericitos. Los pericitos proporcionan un importante soporte mecánico y fisiológico a las células endoteliales. La vasculatura asociada al tumor, en contraste, se describió como carente de una cobertura apreciable por estas células auxiliares. Sin embargo, se ha revelado que los pericitos están asociados, aunque de manera flexible, con la neovasculatura de la mayoría de los tumores, si no es que, en todos, siendo importante la cobertura que tienen estas células para el mantenimiento de una neovasculatura tumoral funcional. Sin embargo, los pericitos no son las únicas células presentes en el proceso angiogénico en la metástasis tumoral. Un repertorio de células que se originan en la médula ósea desempeñan funciones cruciales en la angiogénesis patológica. Estas incluyen células del sistema inmune innato, especialmente macrófagos, neutrófilos, mastocitos y progenitores mieloides, que se infiltran en lesiones premalignas y tumores progresivos, ensamblándose en los márgenes de tales lesiones. Las células inflamatorias peritumorales ayudan a disparar el interruptor angiogénico en el tejido previamente inactivo y a mantener la angiogénesis en curso asociada con el crecimiento tumoral, además de facilitar la invasión local. A demás, pueden ayudar a proteger la vasculatura de los efectos de los medicamentos dirigidos a la señalización de las células endoteliales, y se ha observado que varios tipos de células progenitoras vasculares derivadas de la médula ósea migraron en ciertos casos a lesiones neoplásicas y se intercalaron en la neovasculatura como pericitos y células endoteliales.

1.1.6 Invasión de tejidos y metástasis: A medida que los carcinomas epiteliales progresan en malignidad, se presenta un estado de invasión local y metástasis a distancia. Las células cancerosas asociadas al tumor generalmente se ven alteradas en su forma, así como en la unión a otras células y a la matriz extracelular (MEC). Un ejemplo de ello es la pérdida de

una molécula clave en la adhesión célula-célula como la E-cadherina, que se ha descrito como un antagonista de la invasión y metástasis al verse regulada de manera negativa en células de carcinoma. Contrario a la situación de la E-cadherina, moléculas de adhesión asociadas a migraciones se ven reguladas al alza.

La llamada “cascada de invasión-metástasis”, prevé una sucesión de cambios biológicos celulares, comenzando con la invasión local, luego la invasión de las células cancerosas a los vasos sanguíneos y linfáticos cercanos, el tránsito de las células cancerosas a través de los sistemas linfáticos cercanos y hematógenos, seguido del escape de las células cancerosas de la luz de tales células, vasos en el parénquima de tejidos distantes (extravasación), la formación de pequeños nódulos de células cancerosas (micrometástasis), y finalmente, el crecimiento de lesiones micrometastásicas en tumores macroscópicos, este último paso se denomina colonización.

A través del programa regulador del desarrollo “transición epitelio-mesénquima” (TEM) las células epiteliales, adquiriendo la capacidad adquieren la capacidad de invadir, resistir la apoptosis y difundirse. Este programa puede activarse de manera transitoria o estable, y en diferentes grados, por células de carcinoma durante el curso de la invasión y metástasis. Dentro de este proceso se involucra una serie de factores transcripcionales, autoregulables, que son capaces de orquestar la mayoría de los pasos de la cascada de invasión-metástasis, salvo el paso final de la colonización. Tales factores de transcripción se caracterizan por llevar a cabo en la célula la pérdida de uniones adherentes y la conversión asociada de una morfología poligonal a una epitelial, morfológica o fibroblástica, la expresión de enzimas degradantes de la matriz, el aumento de la motilidad y mayor resistencia a la apoptosis: todos los rasgos implicado en los procesos de invasión y metástasis.

Se requiere de un microambiente tumoral para que se lleven a cabo los procesos de invasión y metástasis. La diafonía entre células del estroma neoplásico y las células cancerosas trae como consecuencia la capacidad adquirida para el crecimiento invasivo y metástasis, por lo que la capacidad de crecimiento invasivo implica la posibilidad de reversibilidad, ya que las células cancerosas que se han diseminado desde un tumor primario a un sitio de tejido más distante ya no pueden beneficiarse del estroma activado y la invasión al no recibir señales inductoras de TEM por las células estromales del tumor primario. En ausencia de exposición continua a estas señales, las células de carcinoma pueden revertir, en sus nuevos hogares, a un estado no invasivo. Por lo tanto, las células de carcinoma que se han sometido a una TEM durante la invasión inicial y la diseminación metastásica pueden pasar por el proceso inverso, denominado transición mesenquimatoso-epitelial TME.

A demás de la llamada invasividad "mesenquimatoso", regulada particularmente por el programa TEM, existen otros dos modos distintos de invasión. La "invasión colectiva" involucra nódulos de células cancerosas que avanzan en masa hacia tejidos adyacentes y es característica de carcinomas de células escamosas sin embargo estos tipos de cánceres rara vez son metastásicos, lo que sugiere que esta forma de invasión carece de ciertos atributos funcionales que facilitan la metástasis. La invasión "ameboide" se caracteriza por la plasticidad morfológica que muestran las células cancerosas individuales, lo que les permite deslizarse a través de los intersticios existentes en la matriz extracelular en lugar de despejar un camino para ellas mismas, como ocurre en las formas de invasión mesenquimatosas y colectivas. Actualmente no se ha resuelto si las células cancerosas que participan en las formas de invasión colectiva y ameboides emplean componentes del programa EMT, o si programas biológicos celulares completamente diferentes son responsables de la coreografía de estos programas de invasión alternativos.

La metástasis se puede dividir en dos fases principales: la diseminación física de las células cancerosas del tumor primario a los tejidos distantes, y la adaptación de estas células a los microambientes de tejidos extraños que resulta en una colonización exitosa, es decir, el crecimiento de micrometástasis en tumores macroscópicos. Dichas fases se comportan de manera diferente en distintos tipos de cáncer. Más allá del momento de su diseminación, aún no ha quedado de manera clara cuándo y dónde es que las células cancerosas desarrollan la capacidad de colonizar tejidos extraños como tumores macroscópicos. Esta capacidad puede surgir durante la formación de tumores primarios como resultado de la ruta de desarrollo particular de un tumor antes de cualquier diseminación, de modo que las células tumorales primarias que ingresan a la circulación están fortuitamente dotadas de la capacidad de colonizar ciertos sitios de tejido distantes. Alternativamente, la capacidad de colonizar tejidos específicos solo puede desarrollarse en respuesta a la presión selectiva sobre las células cancerosas ya diseminadas para adaptarse al crecimiento en microambientes de tejidos extraños.

7

Es poco probable que la colonización dependa exclusivamente de procesos celulares autónomos, pues como ya se ha visto, se requiere el establecimiento de un microambiente tumoral. Por estas razones, es probable que el proceso de colonización abarque una gran cantidad de programas biológicos celulares que, en conjunto, son considerablemente más complejos y diversos que los pasos anteriores de diseminación metastásica.

1.1.7 Inestabilidad genómica y mutación: Ciertos genotipos mutantes confieren una ventaja selectiva a los subclones de las células, lo que les permite su crecimiento y eventual dominio en un entorno tisular local. Aunque está garantizado que la tasa de mutación espontánea durante cada generación celular sea baja, por la gran capacidad del genoma para resolver defectos en el ADN, cuando se adquieren genes mutantes

necesarios para orquestar la tumorigénesis, las células cancerosas a menudo aumentan las tasas de mutación. Para que esto se lleve a cabo deben verse afectados varios genes involucrados en el mantenimiento del ADN, a menudo llamados “cuidadores del genoma” que poseen la facultad de detectar daños en el ADN y activar la maquinaria de reparación, reparar directamente el ADN dañado e inactivar o interceptar moléculas mutagénicas antes de que dañen al ADN. Se ha detectado que los genes cuidadores, al igual que los genes supresores de tumores, pueden perder sus funciones durante el curso de la progresión tumoral, y esta pérdida se logra mediante mutaciones inactivadoras o mediante represión epigenética. Los defectos en el mantenimiento y reparación del genoma son selectivamente ventajosos y, por lo tanto, instrumentales para la progresión del tumor, aunque solo sea porque aceleran la velocidad a la que las células premalignas en evolución pueden acumular genotipos favorables. Como tal, la inestabilidad del genoma es claramente una característica habilitadora que está asociada causalmente con la adquisición de capacidades distintivas.

1.1.8 Inflamación promovida por el tumor: La mayoría de las lesiones neoplásicas contienen densos infiltrados de células inmunes, lo que produce afecciones inflamatorias que surgen en tejidos no neoplásicos. dicha respuesta inmunológica se presenta como un intento del sistema inmunitario para erradicar tumores, se sabe que de manera paradójica la respuesta inflamatoria asociada al tumor. La inflamación puede contribuir a múltiples capacidades distintivas al suministrar moléculas bioactivas al microambiente tumoral, incluidos los factores de crecimiento que sostienen la señalización proliferativa, los factores de supervivencia que limitan la muerte celular, los factores proangiogénicos, las enzimas modificadoras de la matriz extracelular que facilitan la angiogénesis, la invasión y la metástasis, y la inductiva. señales que conducen a la activación de EMT y otros programas que facilitan el sello distintivo. Por dichas razones la

9

inflamación se puede considerar una característica habilitadora por sus contribuciones a la adquisición de capacidades centrales distintivas.

1.1.9 Desregulación energética celular. Se ha detectado que en el cáncer existe un desajuste metabólico con el fin de alimentar el crecimiento y la división celular. En las células cancerosas se ve reprogramado el metabolismo de glucosa y, por lo tanto, en su producción de energía, al limitar su metabolismo en gran medida a la glucólisis, lo que lleva a un estado denominado “glucólisis aeróbica”. Se ha documentado un aumento elevado de la absorción y utilización de glucosa en muchos tipos de tumores y que dicho aumento está asociado con la activación de oncogenes y supresores tumorales mutantes. Esta dependencia de la glucólisis puede acentuarse aún más bajo las condiciones hipóxicas que operan dentro de muchos tumores: el sistema de respuesta a la hipoxia actúa pleiotrópicamente para regular al alza los transportadores de glucosa y las enzimas múltiples de la vía glucolítica.

10

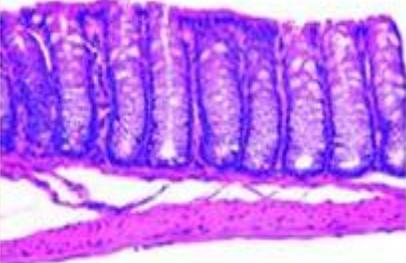
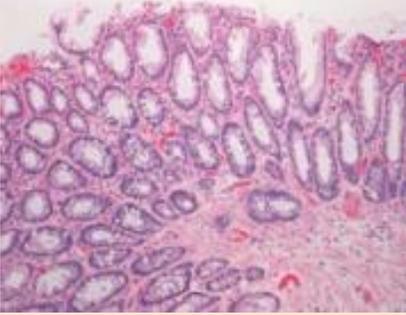
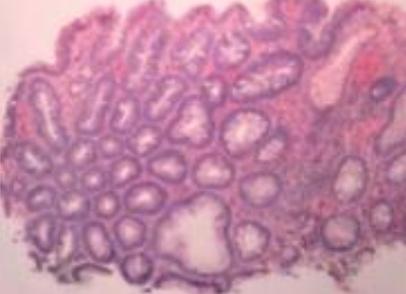
Se ha encontrado que algunos tumores contienen dos subpoblaciones de células cancerosas que difieren en sus vías generadoras de energía. Una subpoblación consiste en células dependientes de glucosa que secretan lactato, mientras que las células de la segunda subpoblación importan y utilizan preferentemente el lactato producido por sus vecinos como su principal fuente de energía, empleando parte del ciclo del ácido cítrico para hacerlo. Entonces, estas dos poblaciones funcionan simbióticamente: las células cancerosas hipóxicas dependen de la glucosa como combustible y secretan lactato como desecho, que es importado y utilizado preferentemente como combustible por sus hermanos mejor oxigenados. La cooperación entre las células secretoras de lactato y las que utilizan lactato para alimentar el crecimiento tumoral no es, de hecho, una invención de tumores, sino que refleja de nuevo la cooptación de un mecanismo fisiológico normal, en este caso uno operando en músculo. Además, se ha hecho evidente que la oxigenación, que va desde la normoxia a la hipoxia,

no es necesariamente estática en los tumores, sino que fluctúa temporal y regionalmente, probablemente como resultado de la inestabilidad y la organización caótica del tumor. neovascularización asociada.

1.1.10 Evasión de la respuesta inmune: Las células y los tejidos son monitoreados constantemente por el sistema inmune, que se encuentra siempre alerta. Dicha vigilancia inmune es responsable de reconocer y eliminar la gran mayoría de las células cancerosas incipientes y, por lo tanto, los tumores nacientes. Los tumores sólidos que aparecen de alguna manera han logrado evitar ser detectados por el sistema inmune o han sido capaces de limitar el alcance de la muerte inmunológica, evitando así la erradicación.

Lo antes descrito parece ser validado por el sorprendente aumento de ciertos cánceres en individuos inmunocomprometidos. Se ha detectado en pacientes inmunocompetentes, que clones de células cancerosas altamente inmunogénicas se eliminan rutinariamente, un proceso que se ha denominado "inmunoedición", dejando atrás solo variantes débilmente inmunogénicas, evadiendo de esta forma la destrucción inmune al deshabilitar los componentes del sistema inmune que se han enviado para eliminarlos, para así crecer y generar tumores sólidos. Por el contrario, cuando surgen en huéspedes inmunodeficientes, las células cancerosas inmunogénicas no se agotan selectivamente y pueden prosperar junto con sus contrapartes débilmente inmunogénicas.

2. CLASIFICACIÓN DE NEOPLASIAS EN CCR.

Diagnóstico tisular	Descripción	Histología
Mucosa colorectal normal	<ul style="list-style-type: none"> • Glándulas uniformes, criptas del mismo tamaño, forma y calibre luminal en toda la imagen. • Sin expansión del epitelio y la lámina propia. 	
Pólipos hiperplásicos	<ul style="list-style-type: none"> • Glándulas ligeramente distorsionadas de diferentes tamaño, forma y calibre luminal. • Arquitectura dentada en "diente de sierra" (flecha). • Expansión o ensanchamiento ocasional del epitelio. 	
Adenoma Tubular	<ul style="list-style-type: none"> • Criptas más lineales. • Núcleos alargados, ocasionalmente visibles y alineados en paralelo. • Mayor proporción de epitelio a cripta evidenciado por epitelio expandido y estrechamiento luminal de la cripta. 	
Adenoma tubulovelloso	<ul style="list-style-type: none"> • Igual que el adenoma tubular con adicional ensanchado o incluso abierto lúmenes de la cripta. • Estructuras villiformes visibles. 	

Carcinoma medular

- Desorden arquitectónico.
- Grandes, densos, superpuestos y núcleos pleomórficos.

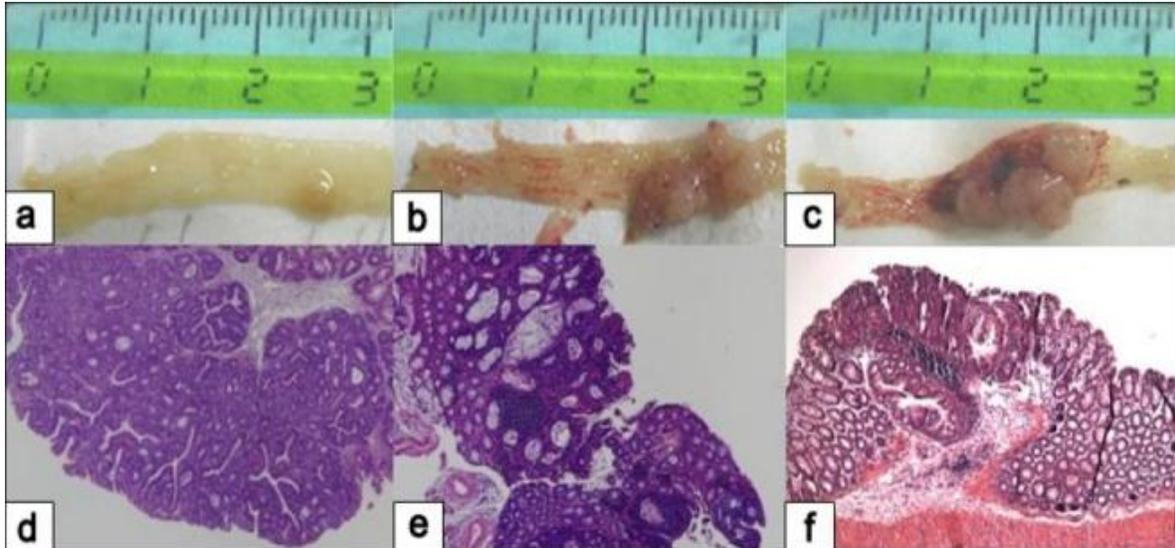
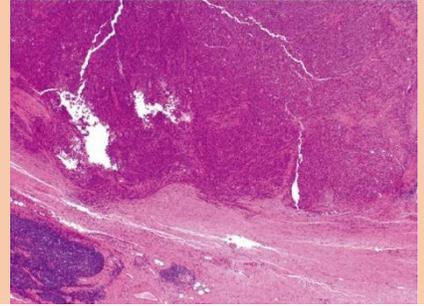
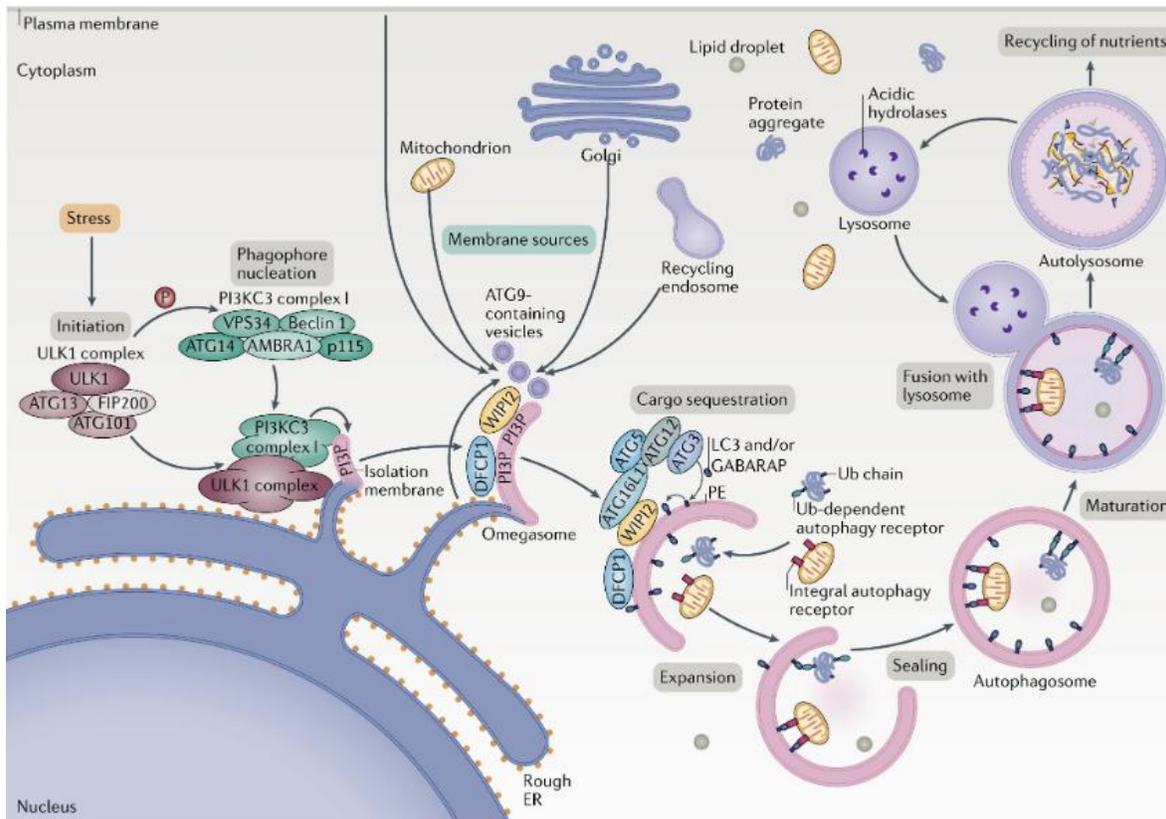


Figura 10. Observación macroscópica e histopatología que muestra neoplasias de colon tardías desarrolladas en ratones tratados con AOM / DSS (de Robertis, 2011).

Adenoma tubular (a, d); adenocarcinoma moderadamente diferenciado (b, e); y adenocarcinoma moderadamente diferenciado que invade la mucosa (c, f). Análisis macroscópico en necroscopia (a, b, c) y tinción con hematoxilina-eosina (d, e, f).

3. AUTOFAGIA Y LAS PROTEÍNAS ATG.

La autofagia es un proceso catabólico altamente conservado inducido bajo diversas condiciones de estrés celular, que previene el daño celular y promueve la supervivencia en caso de escasez de energía o nutrientes y responde a diversas agresiones citotóxicas. Por lo tanto, la autofagia tiene principalmente funciones citoprotectoras y necesita ser estrictamente regulada para responder correctamente a los diferentes estímulos que experimentan las células, lo que le confiere adaptación al entorno en constante cambio.



Todo comienza cuando son detectadas las señales que activan el proceso autofágico (iniciación) que generalmente se originan en diversas condiciones de estrés, como inanición, hipoxia, estrés oxidativo, agregación de proteínas, estrés del retículo endoplásmico (RE) y otros. El objetivo común de estas vías de señalización es el complejo quinasa 1 similar a Unc-51 (ULK1) (que consta de ULK1, proteína 13 relacionada con la autofagia (ATG13), proteína 1 de bobina en espiral inducible por RB1 (FIP200) y ATG101), que luego desencadena la nucleación del fagóforo mediante la fosforilación de componentes del complejo I de clase III PI3K (PI3KC3) (que consta de clase III PI3K, clasificación de proteínas vacuolares 34 (VPS34), Beclin 1, ATG14, molécula activadora en la proteína 1 de autofagia regulada por Beclin 1 (AMBRA1) y factor de transporte vesicular general (p115)), que a su vez activa la producción local de fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P) en una estructura característica del ER llamada omegasoma. PI3P luego recluta las proteínas efectoras de PI3P WD, proteínas que interactúan con fosfoinosítidos de dominio repetido (WIPI, aquí WIPI2) y la proteína 1 que contiene el dominio FYVE con dedos de zinc (DFCP1) en el omegasoma a través de la interacción con

sus dominios de unión a PI3P. Recientemente se demostró que WIPI2 se une directamente a ATG16L1, por lo que recluta el complejo ATG12 ~ ATG5-ATG16L1 que mejora la conjugación mediada por ATG3 de las proteínas de la familia ATG8 (ATG8), incluidas las proteínas de cadena ligera 3 (LC3) asociadas a microtúbulos y el ácido γ -aminobutírico proteínas asociadas a receptor (GABARAP) a fosfatidiletanolamina (PE) residente en la membrana, formando así las formas lipidadas unidas a la membrana; por ejemplo, en esta reacción de conjugación, LC3-I se convierte en LC3-II, la firma característica de las membranas autofágicas. Los ATG8 no solo atraen aún más componentes de la maquinaria autofágica que contienen una región de interacción LC3 (LIR), sino que también son necesarios para el alargamiento y cierre de la membrana del fagophore. Además, en la autofagia selectiva, LC3 participa de manera crítica en el secuestro de carga específicamente marcada en autofagosomas a través de receptores de carga que contienen LIR. Varias membranas celulares, incluida la membrana plasmática, las mitocondrias, los endosomas de reciclaje y el complejo de Golgi, contribuyen a la elongación de la membrana autofagosómica mediante la donación de material de membrana (parte de estas bicapas lipídicas se liberan mediante vesículas que contienen ATG9, pero el origen del resto de la bicapa lipídica se desconoce actualmente). El sellado de la membrana autofagosómica da lugar a una vesícula de doble capa llamada autofagosoma, que madura (incluida la eliminación de las proteínas ATG) y finalmente se fusiona con el lisosoma. Las hidrolasas ácidas en el lisosoma degradan la carga autofágica y los nutrientes recuperados se liberan al citoplasma para ser utilizados nuevamente por la célula. Ub, ubiquitina.

3.1 Papel no autofágico de las proteínas ATG.

Proteínas Atg	Papel no autofágico
Atg8 / LC3-PE	GTPasas: equilibran la autofagia con otros procesos celulares GAP: muchas proteínas de la familia TBC (plataformas de señalización, redireccionamiento de componentes endosomales a autofagosomas,

	reclutamiento de reguladores de la autofagia) GEF: LC3 regula la actividad Rho-GEF de AKAP-Lbc
Atg8 no lipidado	Componente de vesículas de doble membrana involucrado en la replicación de ciertos virus Fusión de vacuola en levadura
Atg5 o Atg12 – Atg5	Regulación de la producción de IFN tipo I generado por isRNA a través de interacciones Atg12-Atg5 con CARD de helicasas RIG1, MDA5 Funciones desconocidas: interacciones Atg5 con otras proteínas CARD
Atg5 escindido con calpaína	Apoptosis: inserción mitocondrial, activación de Bcl-xL, liberación de citocromo c
Gusano Unc-51 (Atg1)	Guía de axones
Atg16L	La interacción con Rab33A es necesaria para la secreción de hormonas en las células neuroendocrinas PC12; requerido para la vía de exocitosis de gránulos en las células de Paneth intestinales
Atg5, Atg7, Atg4B y LC3	Requerido para la secreción de catepsina K en osteoclastos óseos
Atg4B y Atg5	Requerido para el mantenimiento del equilibrio (equilibriocepción) e indirectamente para la secreción de otoconinas por las células epiteliales sensoriales vestibulares del oído interno en ratones
Muchas proteínas Atg pero no hidrolasas vacuolares o	Necesario para la secreción no convencional de ciertas proteínas, como

proteínas necesarias para la fusión del autofagosoma con la vacuola	Acb1, que carecen de péptidos señal clásicos
Atg5, LC3, Atg16L y membranas autofagosómicas	Apoptosis dependiente de caspasa 8
Atg4, beclin 1	La escisión por caspasas suprime la autofagia e induce la apoptosis
Atg5, Atg7	Necesario para la adipogénesis en ratones.
LC3, Atg2	Formación de gotitas de lípidos en ratones
Atg12 – Atg5, Atg7 y Atg16L1	Requerido para la defensa del huésped mediada por IFN γ contra la replicación del norovirus murino
Beclin 1, LC3, Atg4B, Atg5, Atg7 y Atg12	Crucial para la traducción del ARN viral de la HepC, la replicación del virus y la salida de las células
Actividad de ULK1, beclin 1, Atg14L y PI3K	Compartimento de membrana necesario para la replicación de <i>Brucella abortus</i>
Atg7	Detención del ciclo celular mediante la interacción de p53 y la expresión de p21 ^{CDK1N1A}

