



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Evaluación de 5-fluorouracilo y tamoxifeno sobre la expresión de las
mCRP en CTT de un modelo de cáncer colorrectal**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

SOFIA ALVAREZ LORENZO



Ciudad Universitaria, CD.MX.

AÑO 2023



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Profesor: LÓPEZ GONZÁLEZ JOSÉ SULIVAN
VOCAL: Profesor: HERNANDEZ LUIS FRANCISCO
SECRETARIO: Profesor: SALINAS JAZMÍN NOHEMÍ
1er. SUPLENTE: Profesor: PÉREZ MONTESINOS GIBRÁN
2° SUPLENTE: Profesor: CENTENO LLANOS SANDRA MARÍA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio de Farmacología molecular, Departamento de Farmacología,
Facultad de Medicina, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Nohemí Salinas Jazmín

SUSTENTANTE:

Sofia Alvarez Lorenzo

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó con financiamiento de UNAM-PAPIIT (Clave IA205421) y CONACyT (Clave 319300).

Agradezco a cada uno de los miembros del Laboratorio de Farmacología Molecular de la Facultad de Medicina por su orientación y apoyo durante la realización de este proyecto.

Agradezco especialmente a la Dra. Nohemí Salinas, por la dirección de la tesis y su apoyo académico. Gracias por su paciencia y por guiarme a lo largo de este tiempo, que ha impulsado mi formación profesional.

Se agradece al Dr. Jose Sullivan López González y al Dr. Francisco Hernández Luis por su apoyo con la revisión y el análisis crítico del trabajo: sus observaciones permitieron profundizar y mejorar los resultados que se presentan.

ABREVIATURAS

5-FU. 5-fluorouracilo

AF. Autofluorescencia

CapeOx. Combinación de capecitabina y oxaliplatino

CDC. Citotoxicidad celular dependiente del complemento

CD46. mCRP, proteína cofactor de membrana.

CD55. mCRP, factor acelerador de la descomposición

CD59. mCRP, protectina

CBCs. Células columnares de la base de la cripta

CRC. Cáncer colorrectal

CTT. Células troncales tumorales

dTTP. Deoxitimidina trifosfato

dUMP. Desoxiuridina monofosfato

dUTP. Desoxiuridina trifosfato

EGFR. Receptor del factor de crecimiento epidérmico

EMT. Transición epitelio-mesénquima

EpCAM. Molécula de adhesión celular epitelial

FdU. Floxuridina

FdUMP. Fluorodeoxiuridina monofosfato

FdUTP. Fluorodeoxiuridina trifosfato

dTMP. Timidina monofosfato

FUMP. 5-fluoridina monofosfato

FUTP. Fluorouridina trifosfato

FOLFIRI. Combinación de ácido folínico (leucovorin) "FOL", fluorouracilo (5-FU) "F", e irinotecan "IRI"

FOLFOX. Combinación de ácido folínico (leucovorin) "FOL", fluorouracilo (5-FU) "F", y oxaliplatino (eloxatin) "OX"

IC. Intracelular

IMF. Intensidad media de fluorescencia

ISO. Isotipo (control de isotipo)

mAbs. Anticuerpos monoclonales

MAC. Complejo de ataque a la membrana
MASP2. Serina proteasa 2 asociada a MBL
MBL. Lectinas de unión a manosa
mCRP. Proteínas de membrana reguladoras del complemento
MCSCs. Células troncales tumorales migratorias
MSI-H/dMMR: Microsatellite instability high/deficient mismatch repair
LGR5. Receptor 5 acoplado a proteína G que contiene repetición rica en leucina
RCA. Reguladores de activación del complemento
OPRT. Orotato fosforibosil transferasa
SCSCs. Células troncales tumorales estáticas
SNCA. Sinucleína alfa
Tam. Tamoxifeno
TK. Timidilato cinasa
TS. Timidilato sintasa
VEGF. Factor de crecimiento endotelial vascular

ÍNDICE

.....	1
ABREVIATURAS.....	4
INTRODUCCIÓN	8
ANTECEDENTES	8
1. Cáncer	8
1.1 Definición	8
1.2.1 Células troncales tumorales (CTT)	10
1.2.2 Origen de las CTT.....	10
1.2.3 Características de las CTT.....	12
2. Cáncer colorrectal (CRC)	15
2.1 Epidemiología	16
2.2 Origen y diagnóstico	17
2.3 Factores de riesgo	19
2.4 Tratamientos	20
3. Complemento.....	25
3.1 El sistema de complemento.....	25
3.1.1 CD46 o proteína cofactor de membrana.....	27
3.1.2 CD55 o factor de aceleración de la descomposición	28
3.1.3 CD59 o protectina	28
3.2 Las mCRP en cáncer.....	29
3.3 Papel de las mCRP en el CRC y su tratamiento.....	31
4. OBJETIVO GENERAL	33
4.1Objetivos particulares	33
5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	33
6. RESULTADOS.....	38

7. DISCUSION	51
8. CONCLUSIONES.....	56
9. REFERENCIAS.....	56
APÉNDICE	66

INTRODUCCIÓN

A pesar de los grandes avances en estrategias de tratamiento y herramientas de diagnóstico, el cáncer sigue siendo un gran problema de salud pública a nivel mundial. En 2020, se estimó que el cáncer colorrectal (CRC) fue responsable de 1.9 millones de casos de cáncer y 0.9 millones de muertes alrededor de todo el mundo. Su tratamiento involucra la combinación de agentes citotóxicos y dirigidos junto con la cirugía. En los últimos años, el uso de anticuerpos monoclonales (mAbs) ha aumentado la supervivencia de los pacientes con CRC; sin embargo, su eficacia puede estar limitada por la presencia de proteínas de membrana reguladoras del complemento (mCRP), que pueden inhibir la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y favorecer la progresión tumoral, o regular la autorrenovación y pluripotencia, como se ha observado en cáncer colorrectal, de mama, pulmón, entre otros. Además de este mecanismo de resistencia de las células tumorales, existe una subpoblación que se caracteriza por su capacidad de autorrenovarse, iniciar tumores, causar metástasis y tener una resistencia intrínseca a la terapia: las células troncales tumorales (CTT), y se les ha atribuido un papel importante en la prognosis y recaída de los pacientes con cáncer. El efecto de las mCRP (CD46, CD55 y CD59) sobre los mecanismos de acción de los mAbs ha sido bien estudiado, pero su relación con la terapia citotóxica y la población troncal no es tan conocido. Por tal motivo se decidió analizar el impacto de la quimioterapia en la expresión de dichas proteínas y en la población troncal, en una línea celular de CRC (SW-480). Los fármacos empleados fueron el 5-fluorouracilo (5FU), fármaco que ha sido usado para el tratamiento de CRC por más de 40 años, y tamoxifeno (Tam), cuya administración ha disminuido los niveles de CD55, una mCRP, en cáncer de mama incrementando la eficacia de los mAbs empleados para este tipo de cáncer.

ANTECEDENTES

1. Cáncer

1.1 Definición

El cáncer engloba un grupo numeroso de enfermedades que se caracterizan por células anormales, que se proliferan y se diseminan sin control, y que puede ocurrir en cualquier parte del cuerpo. (1) Esto provoca la formación de masas, denominadas “tumores”, que

en su expansión suelen destruir y sustituir a los tejidos normales. Dicho proceso involucra un cambio en la activación de diversos genes que proveen ventajas para la supervivencia y proliferación de las células tumorales. Los tumores pueden ser benignos o malignos. Los primeros suelen crecer a un ritmo lento, no se diseminan a los tejidos vecinos y no se consideran cancerosos; los tumores malignos son cancerosos y las células que los conforman invaden tejidos vecinos y se diseminan a otras partes del cuerpo. (1,2)

A pesar de los grandes avances para su diagnóstico y tratamiento, el cáncer lidera como una de las principales causas de muerte en todo el mundo y representa una gran barrera en la expectativa de vida. En 2020 fue causante de 10 millones de muertes y se detectaron 19.3 millones de casos nuevos a nivel mundial, y se estima que en el futuro, en países en desarrollo el número de pacientes de cáncer se incremente hasta en un 70% (2,3). En México, los tumores malignos se posicionaron como la cuarta causa de muerte a nivel nacional en 2021, únicamente por debajo de enfermedades del corazón, la COVID-19 y la diabetes mellitus. (4)

Las causas directas de la mayoría de los cánceres no son identificables, pero existe evidencia de que ciertos agentes químicos, la radiación y algunos agentes biológicos contribuyen a la incidencia del cáncer.

La carcinogénesis es un proceso, por el que las células normales se transforman progresivamente a células tumorales requiere la adquisición secuencial de mutaciones, que surgen como consecuencia del daño al material genético. Estos daños, resultan en distintos procesos endógenos como errores en la replicación del ADN. A pesar de que las células tienen mecanismos evolutivos para la reparación de estos daños, estos pueden fallar y es posible que cambios permanentes puedan ser introducidos en el genoma. (5) Es un proceso de varios pasos en el que ocurren las alteraciones celulares y moleculares que transforman a las células normales a células tumorales. Se divide en tres etapas generales: i) iniciación, ii) promoción y iii) progresión. (6)

La etapa de iniciación involucra la alteración y mutación de genes de manera espontánea o tras la exposición a un agente carcinogénico; estas alteraciones pueden resultar en la desregulación de vías de señalización asociadas a la proliferación celular, la supervivencia y la respuesta y función de los mecanismos de reparación del ADN. La etapa de promoción se considera de larga duración, y es un proceso reversible en donde

se acumulan células preneoplásicas que poseen una elevada tasa de replicación; en este periodo, el proceso puede verse afectado por agentes preventivos y cambios en las tasas de crecimiento de las células. Finalmente, está la etapa de la progresión, la última de la transformación neoplásica, donde las células pueden adquirir aún más mutaciones y adquirir el potencial de ser invasivas y formar metástasis. La progresión es una fase entre la formación de la lesión maligna y el desarrollo de un cáncer invasivo. (6)

A pesar de que existen distintos tipos de cáncer estos comparten características similares, las conocidas como *hallmarks* del cáncer, que son alteraciones a nivel metabólico, bioquímico y morfológico, que incluyen: 1) activación invasión y metástasis, 2) modulación inmune, 3) inducción de angiogénesis, 4) promoción de ambientes inflamatorios, 5) inestabilidad genómica, 6) resistencia a la muerte celular, 7) desregulación energética celular, 8) sostener una señal proliferativa, 9) evasión de supresores de crecimiento y 10) inmortalidad replicativa. Estas características les permiten a los tumores el poder progresar, y son lo que distinguen a las células tumorales de las células normales. (7)

1.2.1 Células troncales tumorales (CTT)

Las CTT, también conocidas como células iniciadoras de tumores, son una pequeña subpoblación de las células que conforman a los tumores. Exhiben tanto características de células tumorales como de células troncales, y expresan marcadores asociados a células troncales. Recientemente, el estudio de esta subpoblación ha tomado gran importancia, pues se le atribuyen diversas características que les proporcionan la capacidad de formar tumores *de novo* así como de mantenerlos *in vivo*, teniendo así una gran relevancia clínica por su papel dentro del inicio y la recaída del cáncer. (8,9)

1.2.2 Origen de las CTT

Existen dos teorías sobre el origen de las células tumorales y las CTT, respaldadas por la evidencia experimental; por un lado, está la hipótesis jerárquica, y por el otro lado, la hipótesis del origen estocástico.

El primer modelo establece que hay una jerarquía en la célula progenitora del cáncer, así como en el desarrollo de una célula troncal normal, y que las CTT entonces resultan

de la desregulación en la autorrenovación y diferenciación de una célula troncal normal, generando una célula con dichas capacidades de autorrenovación y diferenciación. Este modelo predice que los subtipos de cáncer derivan por jerarquía de una célula progenitora en específico. La evidencia de esta teoría se apoya también en las similitudes entre las células troncales normales y las CTT, sumado a que, las células troncales no tumorales son muy susceptibles a mutaciones y a transformaciones oncogénicas debido a sus largos tiempos de vida. (9,10)

La hipótesis estocástica sostiene que mutaciones aleatorias pueden originar a una célula tumoral a partir de cualquier célula del cuerpo, pudiendo ser que una célula tumoral normal entonces se convierta en tumoral. Esto implica que las CTT se desarrollan a partir de la transición epitelio-mesénquima (EMT), un proceso en donde las células epiteliales polarizadas son convertidas a células mesenquimales móviles; las células que han pasado por la EMT son susceptibles a la transformación y tienen características similares a las células troncales normales. (9,10)

Las CTT se derivan por cuatro mecanismos principales: fusión celular, inestabilidad genética, transferencia de genes y cambios en el microambiente tumoral. (11,12)

Se ha mostrado que células troncales circulantes pueden fusionarse con diversos tipos de células, y que esta fusión puede contribuir al desarrollo de cáncer o a su progresión, como consecuencia de la hibridación entre estos subtipos celulares, y que además esto puede promover una diversidad en el fenotipo y genotipo de tumores, estimulando la progresión del cáncer. (12)

La transferencia horizontal de genes funge como otro mecanismo para el desarrollo de CTT. Este mecanismo ocurre comúnmente en bacterias y hongos, y les ayuda a adaptarse y adquirir ventajas para sobrevivir al medio en el que se encuentran. Es un proceso que consta de tres etapas: 1) la donación del ADN de una célula donadora a una célula receptora; 2) la inserción de ciertas secuencias del material genético donado en el genoma del receptor; y 3) la expresión de los genes incorporados. En células eucariotas este proceso se refiere a la transferencia de ADN que proviene de células apoptóticas a células receptoras por fagocitosis o endocitosis. Células somáticas pueden adquirir mutaciones que conlleven la reprogramación de la célula y la formación de un nuevo fenotipo agresivo. (12)

Las alteraciones y la inestabilidad del genoma son parte de la base fundamental de la transformación celular que lleva a la iniciación del cáncer. Mutaciones y rearrreglos en los cromosomas en células troncales pueden generar la formación de CTT. Por otro lado, el microambiente tiene un papel crítico para su expansión clonal selectiva, diversos factores del microambiente regulan la diferenciación y transformación de células troncales. Un ambiente inflamatorio tiene una fuerte actividad estimuladora para la formación de tumores, a través de la producción de citocinas proinflamatorias. (12)

El concepto y la presencia de células troncales transformadas en los tumores provee un sólido contexto para dar una explicación a la resistencia a la terapia y el progreso de la enfermedad, pues se esperaría que las CTT resistentes intrínsecamente a la terapia escapen a estos tratamientos convencionales y desencadenen el desarrollo de la enfermedad. La evidencia actual en la literatura apoya la teoría de que el cáncer es provocado por las CTT, y que, por ende, para prevenir recaídas y conseguir una mayor eficacia en las terapias, es necesario erradicar a la población troncal. (13)

1.2.3 Características de las CTT

Las CTT poseen atributos fundamentales muy similares a los de las células troncales no tumorales adultas. Dependen de distintas vías de señalización para mantener su troncalidad y poder contribuir a la progresión de los tumores al establecer procesos fundamentales para el desarrollo del cáncer, como lo son la proliferación celular, invasión o metástasis. Las características funcionales de las CTT son reguladas por un gran número de factores de transcripción que controlan la troncalidad en células embrionarias y células adultas, incluyendo a OCT4, NANOG, SOX2, KLF4 y MYC. Principalmente, estas células se caracterizan por una capacidad de autorrenovación y un potencial de diferenciación hacia un rango diverso de tipos celulares especializados, pudiendo generar células con una amplia variedad de fenotipos dentro de los tumores. (8,9,13,14) Las CTT pueden generar nuevas células troncales por división asimétrica (se produce una célula troncal y una diferenciada a partir de una troncal), o división simétrica (se generan dos células troncales), lo que les concede la capacidad de autorrenovarse y producir células tumorales fenotípicamente diversas.

Dicha capacidad para autorrenovarse involucra diversas vías de señalización, dentro de ellas se encuentran las vías de Notch, Hedgehog y la vía de Wnt; por ejemplo, la vía Wnt/ β -catenina es indispensable para la proliferación, diferenciación y el mantenimiento de la troncalidad en CTT. Adicionalmente, las CTT están reguladas por otros factores de transcripción como lo son NF- κ B, c-Jun, o Dach1. (9,11)

Si bien era claro que las CTT pueden diferenciarse a células tumorales no troncales, no estaba del todo elucidado que células tumorales diferenciadas pudiesen revertirse a CTT. Recientemente se ha demostrado que existe una plasticidad dentro de estos dos tipos celulares, y que las señales del microambiente tumoral participan en esta dinámica de plasticidad. Ejemplo de ello es que se ha demostrado que IL-22 induce la troncalidad en líneas celulares de CRC, provocando un mayor potencial tumorigénico, un incremento en la formación de esferoides y mayor expresión de marcadores clásicos de las CTT. Asimismo, se ha visto que IL-6 induce la generación de CTT a partir de células tumorales no troncales en cáncer de mama. (9,15)

La población troncal es heterogénea y posee diversos mecanismos para evadir la apoptosis: uno de los más importantes es la autofagia y el ingreso de glucosa a las células. Además, las CTT expresan SOX2, que controla la expresión de la survivina, un gen inhibidor de la apoptosis; se ha demostrado que el silenciamiento de SOX2 disminuye la expresión de dicho gen. (11)

Las células troncales tumorales también poseen efectos inmunosupresores tal como las células troncales normales, característica que les otorga grandes ventajas para promover el desarrollo de tumores. Se ha reportado que la secreción de diversas citocinas por parte de las CTT tiene efectos inmunosupresores en células T, células presentadoras de antígeno y células NK. (11)

La hipótesis de las células troncales tumorales considera que ellas mismas son las responsables del inicio de los tumores, de su crecimiento y de la diseminación de los tumores, es decir, de la metástasis. Las células troncales presentan una motilidad e invasión incrementada, además de sobreexpresar genes conocidos por promover la metástasis. Resultados experimentales apuntan a que las CTT pueden adquirir propiedades de la EMT e interconvertirse entre ambos fenotipos, epiteliales o mesenquimales, para ejecutar y llevar a cabo procesos de metástasis; con ello adquieren

una alta capacidad para migrar, ser resistentes a la apoptosis, tener una elevada producción de enzimas degradadoras de matriz extracelular y, por ende, poder ser más invasivas. Estudios previos han demostrado que las CTT tienen el potencial de inducir angiogénesis y de generar células angiogénicas; mientras que las células diferenciadas, no troncales, no pueden hacerlo. La población troncal puede promover la progresión tumoral al inducir la angiogénesis al secretar niveles elevados del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). (9,13)

Por último, una característica que es de gran relevancia en la clínica es el hecho de que las CTT son resistentes a la quimioterapia y radioterapia, razón por la cual tienen un rol muy importante en la metástasis y la reaparición del cáncer, y por lo que en los últimos años se han vuelto un blanco de especial atención para el desarrollo de nuevos fármacos. (8)

El cáncer de mama es uno de los modelos de tumores sólidos en donde más se ha estudiado a las CTT. Se ha descrito que la administración de quimioterapia adyuvante a pacientes con cáncer de mamá incrementa a la población troncal y la formación de mamoesferas *in vivo*. El enriquecimiento de las CTT por la quimioterapia y radioterapia también se ha reportado en modelos *in vitro* y en ratones. Esto se ha asociado con alteraciones en las vías de señalización de autorrenovación y el destino celular como las vías de Notch, Wnt, Hedgehog y HER2. (9)

Debido a sus propiedades tumorigénicas y su elevada resistencia a la terapia, se sugiere que las CTT tienen una fuerte implicación en las recaídas de los pacientes con cáncer. Las células troncales que sobrevivieron a la presión selectiva ejercida por la quimioterapia podrían pasar la sensibilidad reducida que adquirieron a su progenie, aumentando la agresividad en los tumores con el tiempo junto con una resistencia a la terapia. Sin embargo, parece ser que la resistencia no es una característica universal: en líneas celulares de cáncer de mama triple negativo se ha observado que las CTT pueden ser erradicada con radioterapia, sugiriendo que la resistencia entonces no es un factor intrínseco y que depende más bien del fenotipo molecular del tumor. Por ello, conocer los mecanismos moleculares por los que las CTT pueden o no volverse resistentes a la terapia, puede ayudar a identificar nuevas estrategias terapéuticas que mejoren la prognosis de los pacientes. (9)

Para el caso de CRC se han identificado fármacos capaces de disminuir a la población troncal. Mitraticina A puede suprimir el crecimiento de la población troncal en el colon, y reduce el porcentaje de células CD44+/CD11+ tanto *in vitro* como *in vivo*. Por otro lado, el tratamiento con cetuximab incrementa la muerte por apoptosis de CTT en presencia de 5-FU. (14,15)

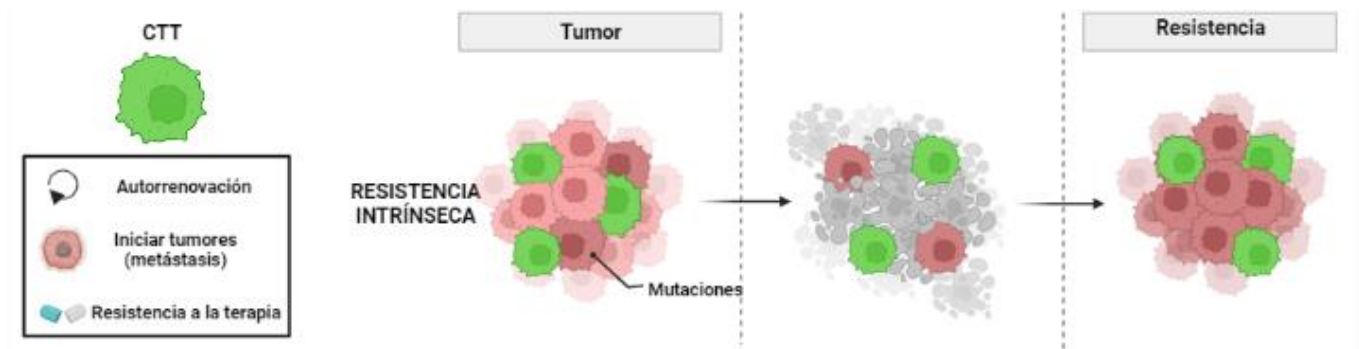


Figura 1. Representación de las características de las CTT y su relevancia en la recaída. En verde se muestra a la población troncal, capaz de resistir a la quimioterapia y radioterapia y autorrenovarse para repoblar tumores; en rosa a las células tumorales. Creada con Biorender.com

2. Cáncer colorrectal (CRC)

El CRC se define como el crecimiento de células transformadas en el interior del colon o del recto, que dan lugar a la formación de tumores benignos o pólipos (que pueden ser: adenomatosos, inflamatorios o hiperplásicos), y que con el paso del tiempo pueden evolucionar a tumores malignos (Figura 2). (16–18)

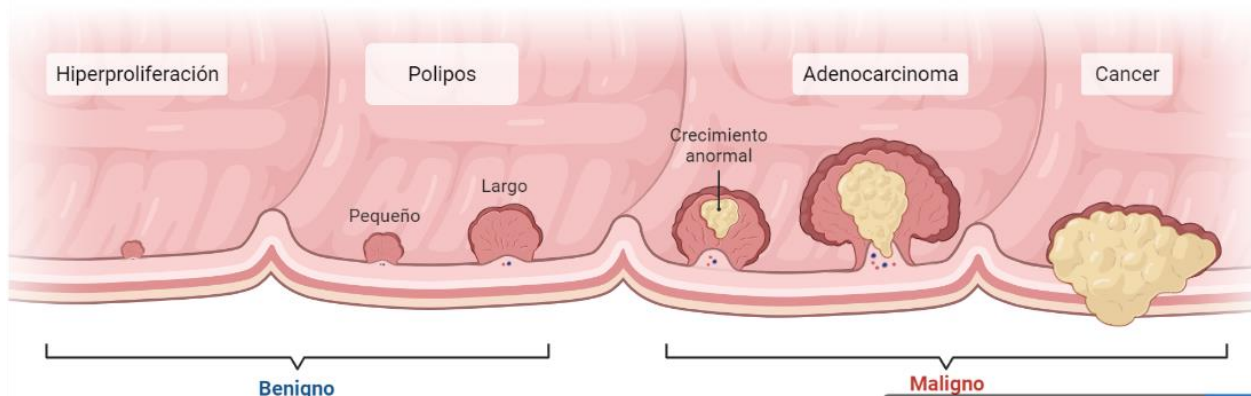


Figura 2. Desarrollo del cáncer colorrectal. La figura muestra el proceso de transformación a un tumor maligno dentro del colón o recto. Creada con Biorender.com

Existe un consorcio de consensos de subtipos moleculares (CSM), que clasifica en subtipos al CRC con base en la expresión de ciertos genes o vías de señalización implicadas en su progresión: i) CSM-1: inestabilidad de microsatélites inmune (hipermutado: dMMR, MSI, BRAF, MLH1-sil); ii) CSM-2: canónico (alto SNCA, activación de MYC y WNT); iii) CSM-3: metabólico, con una evidente desregulación metabólica (KRAS mutado, bajos SNCA y CIMP); y iv) CSM-4: mesenquimal (alto SNCA, infiltración estromal, angiogénesis, alta activación del factor de crecimiento β , y EMT). Esta clasificación permite relacionar diversos parámetros: la respuesta de los pacientes al tratamiento, recaídas, la supervivencia global y libre de progresión, y provee la mejor caracterización molecular del CRC hoy en día. Además, proporciona un marcador de pronóstico independiente para los pacientes con cáncer colorrectal metastásico que tuvieron un tratamiento de primera línea de quimioterapia en combinación con mAbs (bevacizumab o cetuximab). Por otro lado, los análisis de *single-cell* han permitido examinar la diversidad celular presente en un único tumor, que puede contener clonas de células con más de uno de los subtipos moleculares definidos hasta el momento. Esto demuestra la elevada heterogeneidad intratumoral, que probablemente sea la responsable de las grandes diferencias de la respuesta a terapia entre los pacientes y a la resistencia a la misma. (15,19)

2.1 Epidemiología

Cada año se relaciona el 10% de diagnósticos y muertes por cáncer a nivel mundial con el CRC. Además, es el tercero en incidencia y mortalidad en todo el mundo (Figura 3) (20); siendo la primera causa de muerte relacionada a cáncer gastrointestinal. (21)

En países en desarrollo, se estima que para el año 2035 la incidencia anual aumente hasta 2.5 millones de casos nuevos. (18) En México, el CRC el cuarto tipo de cáncer más frecuente según cifras del Instituto Nacional de Salud Pública. (22)

A pesar de los grandes avances en herramientas diagnósticas y de tratamiento, muchos pacientes con CRC siguen siendo diagnosticados hasta las etapas avanzadas de la enfermedad, e incluso después del tratamiento inicial es muy común que los pacientes presenten recaídas y tumores recurrentes. (23)

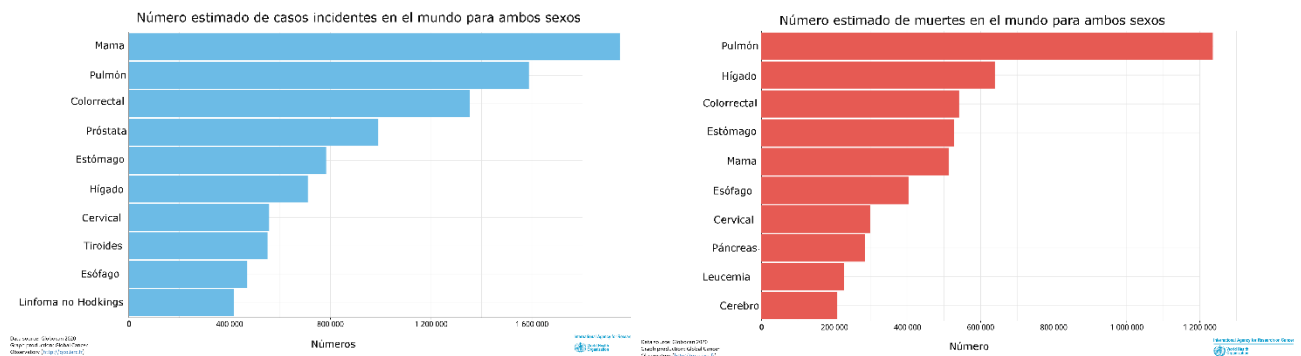


Figura 3. Incidencia y mortalidad de los distintos tipos de cáncer a nivel mundial para ambos sexos, reportadas por la Organización Mundial de Salud. Tomado de: (18)

2.2 Origen y diagnóstico

La superficie luminal del colon consiste en una única capa de células epiteliales acomodadas en protrusiones que forman una forma similar a un dedo dentro del lumen. Los espacios dentro de ellas se conocen como criptas de Lieberkühn, y son la unidad funcional del intestino. El epitelio del colon posee cuatro diferentes linajes de células: enterocitos, células goblet, células endocrinas y las células Paneth. Las células columnares de la base de la cripta (CBCs) son células no diferenciadas, y se piensa que son las células intestinales troncales que dan origen a los distintos linajes celulares. (24) El epitelio de un colon sano tiene una forma regular con criptas espaciadas y sin ramificaciones; por otro lado, las criptas en pacientes con CRC muestran ramificaciones y una forma irregular. Por ello, parecería lógico suponer que la tumorigenesis ocurre en el fondo de las criptas, ya sea por mutaciones en las CBCs o en células progenitoras durante el proceso de diferenciación; en efecto, las primeras investigaciones tenían como hipótesis que los tumores adenomatosos tenían su origen en lo profundo de las criptas, con el epitelio transformado moviéndose hacia la periferia para, eventualmente, reemplazar al epitelio normal. Sin embargo, la evidencia más reciente apunta hacia que

los tumores y pólipos poseen células activas y en división dentro de su periferia, desplazando la idea de que se movieran desde lo profundo de las criptas hacia la parte superficial del tejido intestinal. (24)

En los 90, Fearon y Vogelstein propusieron que el CRC se desarrollaba a partir de adenomas bien localizados como resultado de la acumulación de mutaciones genéticas sucesivas. Recientemente se ha cuestionado este paradigma lineal del origen del CRC, pues estudios han evidenciado el desarrollo no lineal en las mutaciones dentro de los tumores, que resultan por la acumulación simultánea de clonas genéticamente diversas que surgieron de una transformación inicial. Sorriba et al demostraron que posterior a esta primera transformación, los tumores de CRC se expanden, principalmente, como una única población con numerosas y diversas subclonas. Basado en esto, propusieron la teoría del progreso de CRC conocida como “*Big Bang*”, que postula que después de un evento oncogénico en común, la mayoría de las mutaciones responsables por el crecimiento del tumor ocurren en etapas tempranas y son las responsables de la diversidad clonal y la heterogeneidad intratumoral. Esta teoría apunta hacia la existencia de un ancestro en común durante el avance de la enfermedad. (15)

En CRC, se ha observado que las CTT tienen la capacidad de formar grandes colonias en el lumen del colon, conformadas por tres tipos distintos de células epiteliales diferenciadas. Al aislar una única CTT de estas colonias es posible reconstituir el lumen, y posteriormente estas células son capaces de formar tumores en ratones inmunodeficientes. Por ende, se afirma que una única célula troncal tumoral puede expandirse y diferenciarse a una larga masa de tumor. (13)

Las CTT del CRC suelen provenir de células intestinales diferenciadas o células troncales intestinales, que son transformadas por alteraciones genéticas, y comparten las características biológicas principales de las células troncales, mencionadas anteriormente. El grupo de Brabletz's y Oskarsson's clasificaron a las células troncales tumorales colorrectales en dos subgrupos: las células troncales tumorales estacionarias (SCTTs) y las células troncales tumorales migratorias (MCTTs). Las SCTTs existen en los tejidos epiteliales y principalmente contribuyen a la proliferación de la masa tumoral *in situ*, las células de este subgrupo permanecen en la área diferenciada durante la progresión del tumor y no pueden diseminarse. Las MCTTs son las responsables de la

rápida invasión y diseminación de las células tumorales, ya que migran a cortas distancias para dividirse asimétricamente y aumentar el tamaño del tumor primario. Tanto las SCTTs como otras células tumorales pueden transitar hacia las MCTTs, en tumores primarios como en metástasicos. (25)

Algunos marcadores de superficie de CTT son de específica relevancia para el CRC, y se incluyen a CD44, LGR5 y EpCAM, además de los marcadores universales como NANOG, SOX2, OCT4, entre otros. (24)

Tras la presencia de ciertos signos o síntomas clínicos que pueden ser: sangrado en heces, anemia o dolor abdominal, entre otros, los pacientes son derivados a la clínica para poder ser evaluados por un médico. Posteriormente se realiza una exploración médica y la toma de biopsias de lesiones en el colón o recto, se realizan colonoscopias (método de elección) o sigmoidoscopias para poder visualizar la presencia de tumores. Además, se incluyen estudios genéticos (para identificar biomarcadores epigenéticos y genéticos), la prueba de sangre oculta en heces, y estudios sanguíneos como la determinación de la concentración del antígeno carcinoembrionario (CEA). Los altos niveles del CEA son indicadores de un mal pronóstico o de elevado riesgo de recurrencia. Para identificar la invasión tumoral por fuera de la mucosa, o el avance de la enfermedad, se realizan colonografías por tomografía computada. (17,18)

2.3 Factores de riesgo

Se ha reportado que el mayor incremento en la incidencia y mortalidad del CRC ocurre en países con un estilo de vida “occidental”; aunado a esto, los países desarrollados tienen niveles más elevados de riesgo de cáncer colorrectal. (26)

Aunque no se sabe con gran certeza la causa o causas detrás de esto, la obesidad, el estilo de vida sedentario, y el consumo de carnes rojas y un historial de familiares con CRC, son considerados como los factores más importantes detrás del incremento de casos de CRC. (26)

La presencia de pólipos adenomatosos en pacientes o familiares de los pacientes también es un factor es de gran importancia, ya que estos pólipos poseen un alto potencial de volverse malignos: aproximadamente el 95% del CRC se desarrolla de un

pólipo de este tipo, a partir de las células productoras de moco que protegen el interior del colon y del recto, a este tipo de tumores se le conocen como adenomas. (26)

La edad es otro factor de riesgo que se debe tomar en cuenta, ya que se estima que el 90% de los casos nuevos de CRC ocurren en individuos mayores de 50 años. Es por ello que la vejez se considera como uno de los factores que influyen en el riesgo del desarrollo de la enfermedad. (26)

2.4 Tratamientos

Recientemente ha habido grandes avances en los tratamientos primarios y adyuvantes para tratar a los pacientes con CRC, a pesar de ello, el tiempo de supervivencia general en pacientes con CRC avanzado es de 3 años. Sin embargo, el pronóstico es malo porque los síntomas a menudo aparecen en la etapa avanzada., lo que contribuye a que la prognosis no sea favorable. (18,21)

En consecuencia a lo mencionado anteriormente, la supervivencia a 5 y 10 años para este tipo de cáncer es del 65% para el estadio II y 58% para el estadio III, mientras que para CRC metastásico (estadio IV) desciende al 12%, debido a las pocas opciones terapéuticas. (16,18)

La cirugía es la piedra angular del tratamiento local para los pacientes con CRC; mientras que la radioterapia y terapia sistémica son tratamientos adyuvantes, que disminuyen las recaídas y la progresión de los tumores. (18)

Dependiendo del estadio del tumor cambiará la estrategia de tratamiento (Tabla 1) y se basa en combinaciones de: i) quimioterapia (agentes únicos: 5- fluorouracilo, oxaliplatino, irinotecan, capecitabina y ácido folínico, o combinaciones: FOLFOX, FOLFIRI y CapeOx); ii) terapia dirigida (ramucirumab, bevacizumab, cetuximab y panitumumab); iii) inhibidores enzimáticos (regorafenib, TAS-102, binimetinib); o iv) inmunoterapia (pembrolizumab, nivolumab e ipilimumab). (21)

Cetuximab y panitumumab, son dos mAbs aprobados por la FDA para el CRC metastásico, y ambos poseen una gran afinidad y especificidad al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) [Tabla 1]. (21,27)

Estos anticuerpos monoclonales tienen diversos mecanismos de acción para eliminar a las células tumorales: i) inhiben la autofosforilación del receptor y reducen la señalización

del receptor; ii) internalizan al receptor; iii) inhiben la producción de IL-8 y del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF); e iv) inducen muerte celular por ADCC y CDC. (18,27,28)

Se han recopilado datos de diversos estudios clínicos recientes que demuestran que panitumumab es únicamente eficaz al administrarse en combinación con FOLFOX, mientras que cetuximab ha demostrado eficacia y seguridad con FOLFOX y FOLFIRI. Además, se ha concluido que es de gran importancia de analizar el isotipo y las respuestas activadas por cada anticuerpo antes de su prescripción a los pacientes. (18,27)

Tabla 1. Tratamientos empleados en cáncer colorrectal según estadios y características. Tomado de: (18)

Tipo de terapia	Características del tumor
Cirugía	Estadio 0: método de elección por el tamaño del tumor. Uso de colonoscopia o polipectomía. Estadio I: colonoscopia o cirugía mayor si hay crecimiento en los bordes. Estadio II: alternativa para extirpar el segmento del colon que contiene el tumor. Estadio III: alternativa para extirpar la zona el segmento del colon que contiene el tumor. Estadio IV: resección o ablación del tumor
Radioterapia	Estadios 0, I y II: no opcional Estadio III: opción en pacientes donde la cirugía no es opción. Estadio IV: sugerida.
Quimioterapia	Estadios 0 y I: no opcional Estadio II: puede prescribirse posterior a la cirugía. Estadio III: combinaciones como FOLFOX o CapeOx.

	Estadio IV: primera línea: agentes dirigidos se combinan con 5-fluorouracilo y oxaliplatino. segunda línea: FOLFOX o FOLFIRI en combinación con anticuerpos anti-EGFR (si se usó en primera línea cambiar a anticuerpo anti-VEGF) o anticuerpo anti-VEGF.
Terapia dirigida - Cetuximab - Panitumumab - Bevacizumab - Ramucirumab	Estadios 0, I, II y III: no sugerida Estadio IV: uso de anticuerpos anti-EGFR en tumores localizados en la zona izquierda. Uso de anticuerpos anti-VEGF.
Inmunoterapia - Pembrolizumab - Nivolumab - Ipilimumab	Tumores con alta inestabilidad de microsatélites: MSI-H/dMMR
Inhibidores enzimáticos - Regorafenib - TAS-102 - Binimetini	Tumores con metástasis refractaria de CRC que no han respondido a la terapia sistémica.

El 5-fluorouracilo (5-FU) es un fármaco usado para el tratamiento de distintos tipos de cáncer, incluyendo al cáncer colorrectal, el cáncer de mamá y cáncer de tracto digestivo, siendo en el CRC donde ha tenido un mayor impacto beneficioso para los pacientes. (23) En específico, el 5-FU es un fármaco de primera línea para el tratamiento del CRC; ha sido usado por más de 40 años y se ha mantenido como el agente principal para el tratamiento de la enfermedad tanto en etapas tempranas como en etapas avanzadas, y se incluye como parte del tratamiento en la mayoría de los regímenes. (23,29) Ha mejorado la supervivencia general y libre de enfermedad en pacientes con CRC en estadio III; los porcentajes de respuesta a quimioterapia única con 5-FU rondan el 15% y su administración conjunta oxaliplatino o irinotecan incrementa las respuestas en CRC avanzado hasta un 50%. Sin embargo, a pesar de que dichas combinaciones han

incrementado los rangos de respuesta a la quimioterapia, la resistencia a 5-FU se mantiene como una gran limitante para su uso clínico, por ello, resulta de gran relevancia generar nuevas estrategias terapéuticas y entender los mecanismos detrás de esta resistencia para poder incrementar su eficacia. (29)

El 5-FU es un análogo del uracilo que tiene un átomo de flúor en la posición C-5, en lugar de un hidrógeno. Entra rápidamente a las células empleando el mismo transporte facilitado que el uracilo para ser convertido a sus metabolitos activos. Se han propuesto tres mecanismos de acción para el 5-FU: incorporación al RNA, incorporación al ADN y la inhibición de la timidilato sintasa (TS) que conlleva a la disrupción de la síntesis del ADN (Figura 4). Muchos aspectos del mecanismo de incorporación al RNA no están elucidados, y a su vez, al ser un derivado del uracilo, el 5-FU no puede ser incorporado tan fácilmente al ADN, por lo que se le considera a la inhibición de síntesis del ADN como su mecanismo principal de acción (Figura 4). (23,29)

Una vez que ingresa a la célula, intracelularmente es convertido a 3 metabolitos activos: FdUMP (fluorodeoxiuridina monofosfato), FdUTP (fluorodeoxiuridina trifosfato) y FUTP (fluorouridina trifosfato).

El metabolito FdUMP es el responsable de la inhibición de la TS, enzima que participa en el ciclo de los folatos al reducir dUMP (desoxiuridina monofosfato) a dTMP (timidina monofosfato), y provee una fuente de timidilato, compuesto necesario para la replicación y reparación del ADN. Este metabolito se genera por vías metabólicas de nucleótidos para el dTMP, ya sea por la vía *de novo* o la vía de salvación. En la vía *de novo*, 5-FU se convierte a FUMP (5-fluoridina monofosfato) por la OPRT (orotato fosforibosil transferasa) y posteriormente a FdUMP por diversas enzimas de la vía OPRT-RR. En la vía de salvación el 5-FU se convierte primero a FdU (floxuridina) por la timidina fosforilasa (TP), y finalmente a FdUMP por la timidina cinasa (TK). (23,29)

El mecanismo de inhibición de la TS se debe a la incorporación de FdUMP en el sitio de unión a nucleótidos de la TS, formando un complejo ternario estable con la enzima y el CH₂THF (un folato reducido que actúa como el donador de metilos en la reacción), bloqueando entonces la síntesis del dTMP (Figura 4). A pesar de que los eventos río debajo de esta inhibición no son claros, se sabe que la depleción en los niveles de dTMP resulta en la consecuente disminución de dTTP (deoxitimidina trifosfato) que induce

perturbaciones en los niveles de los otros deoxinucleótidos (dATP, dGTP y dCTP). Dichos desbalances en los niveles de deoxinucleótidos pueden disrumpir en la síntesis y reparación del ADN, dando como resultado a un daño letal para el ADN. Adicionalmente, la inhibición de la TS provoca la acumulación de dUMP que a su vez puede incrementar los niveles de dUTP (desoxiuridina trifosfato): tanto el dUTP como el FdUTP pueden ser incorporados al ADN. La reparación de ADN por uracilo y 5-FU no puede llevarse a cabo en presencia de niveles altos de FdUTP/dTTP y provoca la incorporación errónea de nucleótidos alternativos al ADN. Estos ciclos de incorporación, escisión y reparación conllevan a la ruptura de cadenas de ADN y con ello, a la muerte celular.

Por otro lado, el metabolito FUTP se incorpora al RNA disrumpiendo su procesamiento y función normal, lo que puede resultar tóxico a distintos niveles, especialmente en la viabilidad celular. (29)

Durante las estrategias para aumentar la eficacia del 5-FU se han incluido las combinaciones con diversos fármacos: oxaliplatino, irinotecan, o ácido folínico.

El ácido folínico o leucovorina es empleada con el fin de aumentar los niveles intracelulares de CH₂THF, compuesto necesario para la unión del metabolito FdUMP a la timidilato sintasa. Su uso ha demostrado un incremento en la citotoxicidad del 5-FU en diversas líneas celulares de cáncer, tanto *in vitro* como *in vivo*. (29)

El oxaliplatino es un agente alquilante con mecanismo de acción similar al cisplatino: causa daño al ADN al formar aductos tras su unión a guaninas. Forma parte de la familia de ligandos con un anillo pesado de 1,2- diaminociclohexano (DACH) (30). Por otra parte, el mecanismo de acción del irinotecan se basa en el bloqueo a la topoisomerasa I, aunque se ha reportado que puede causar daño directo al ADN. (31)

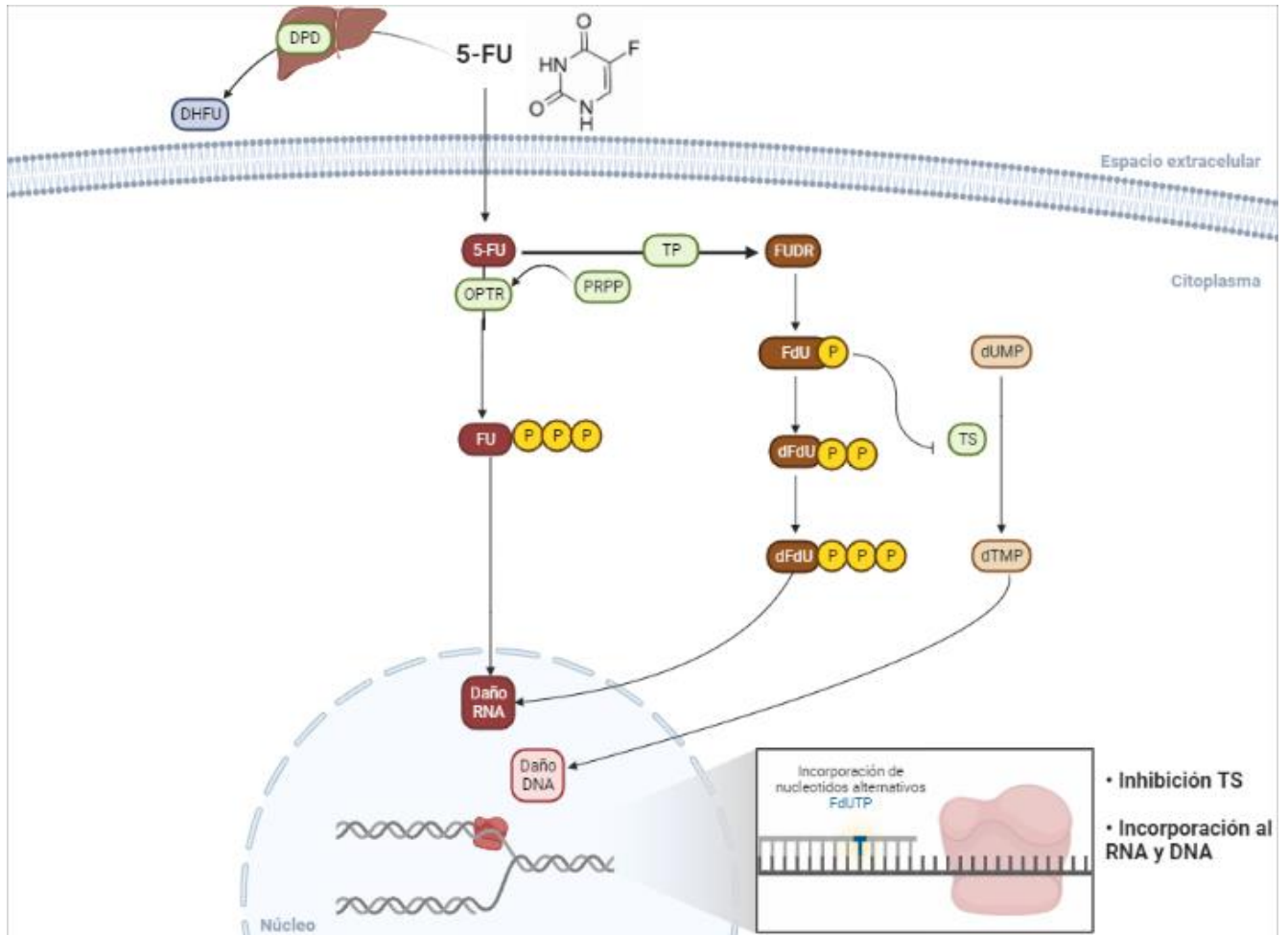


Figura 4. Metabolismo y mecanismos de acción del 5-FU. Se muestra la conversión del 5-FU a sus metabolitos activos y los consecuentes mecanismos de daño al RNA y ADN, así como la inhibición de la timidilato sintasa. Creada con Biorender.com

3. Complemento

3.1 El sistema de complemento

El sistema de complemento es un componente clave de la inmunidad innata. Tiene un papel esencial en el mantenimiento de la homeostasis en el organismo a través de mecanismos que regulan la coagulación, la angiogénesis y el metabolismo de lípidos; además, contribuye a la eliminación de células apoptóticas y evita la formación de tumores. Funciona en cascada a través de más de 30 proteínas que convergen en tres vías: la clásica, de lectinas y alternativa. Sus proteínas pueden encontrarse de manera soluble en el plasma o como precursores inactivados en la superficie de las células de

todo el cuerpo. Cuando el sistema es activado, conlleva a la opsonización y a la consecuente lisis de las células, además de inducir la liberación de mediadores inflamatorios y respuestas fagocíticas. (18,32,33)

La vía clásica, llamada así por haber sido la primera vía en ser descrita, se activa por la formación de complejos inmunes de antígenos y anticuerpos. El complejo C1 circula en el suero en un estado inactivo, y cuando se une a la región Fc de inmunoglobulinas IgM o IgG unidas a un antígeno, se provoca un cambio conformacional en C1 que activa a sus subunidades C1r y C1s, dos serina- proteasas. Esto conlleva al inicio de la cascada del complemento: C1s escinde a C4 en C4a y C4b; a C2 en C2a y C2b, creando el complejo C4bC2a, y formando el complejo de la C3 convertasa. (32)

En la vía de lectinas, las lectinas de unión a manosa (MBL) se unen a ligandos con naturaleza de carbohidratos que están presentes en la superficie de patógenos, como bacterias. Junto con la serin proteasa 2 asociada a MBL (MASP2), las MBL forman un complejo similar al C1 de la vía clásica, resultando también en la formación de la C3 convertasa: C2aC4b. (32)

Por último, la vía alternativa es estimulada por la hidrólisis espontánea de C3 o el reconocimiento de una superficie extraña. El factor B, y C3 hidrolizado en plasma [C3(H₂O)] se unen y junto con el factor D crean a [C3(H₂O)]Bb, que, a su vez, escindirá a C3, que se encuentra soluble en el plasma, dando como resultado a C3b. C3b se unirá a la superficie celular y a Bb, formando a C3Bb, que es la C3 convertasa de la vía alternativa. (32)

C3 es el punto donde convergen las tres vías del sistema de complemento, sin importar el mecanismo que lo haya activado. La ruptura de C3 resulta en C3a (una anafilatoxina) y C3b, una opsonina capaz de recubrir la superficie de los antígenos, volviéndolos susceptibles a la fagocitosis por los macrófagos que estén cercanos. Por otro lado, al unirse a las moléculas de C3b la C3 convertasa formará a la C5 convertasa, que romperá a C5 para formar a C5b; C5b se unirá a C6, C7, C8 y múltiples unidades de C9 para formar el complejo C5b-C9. A este complejo también se le conoce como el complejo de ataque a la membrana (MAC), que se deposita en la bicapa lipídica de las células para destruir la membrana celular y provocar la lisis celular. (32)

Puesto que el sistema de complemento se encuentra bajo una activación constante, y que con un pequeño estímulo puede ser amplificado hasta una gran y potencial respuesta de daño, el sistema debe ser regulado cuidadosamente para prevenir un daño excesivo a tejidos o células propias. La importancia de este control se refleja en que el sistema incluye diversas proteínas reguladoras que pueden estar ya sea de manera soluble o en la membrana de las células. (32–34)

Dentro de las proteínas que regulan al sistema de complemento se encuentran las mCRP, como CD46, CD55 y CD59, que se expresan en la membrana de todas las células del cuerpo, aunque sus niveles de expresión varían según el tipo de tejido. Son proteínas de superficie que inhiben las respuestas del complemento en distintos puntos de la cascada con el fin de detener su amplificación y evitar un daño a las células propias. (32)

3.1.1 CD46 o proteína cofactor de membrana

Se conoce también como MCP, es una glicoproteína de membrana expresada de forma ubicua en la mayoría de las células. El gen de la proteína se localiza en el cromosoma 1q32.2, y posee cuatro isoformas que surgen por *splicing* alternativo. La estructura de CD46 tiene cuatro módulos localizados en el extremo N-terminal denominados control del complemento (CCP) que interactúan con las proteínas del complemento, y un dominio O-glicosilado llamado STP (rico en serinas, treoninas y prolinas). Junto a este último dominio se encuentra un dominio transmembranal hidrofóbico que contiene una de dos colas citoplasmáticas con función quimiotáctica e inmunomoduladora: CYT1 o CYT2. La señalización de CD46 varía según la interacción con ligandos naturales o patogénicos y la asociación intracelular, y la respuesta inmune producida podría variar según la cola involucrada, por ejemplo: CYT-1 induce directamente la autofagia y activa a las células T mientras que CYT-2 provoca una regulación a la baja. Cada cola regula diversos procesos celulares en función del tipo de ligando y las proteínas adaptadoras intracelulares reclutadas, como la activación celular y la reprogramación metabólica, y cuentan una señalización distinta. Por otro lado, el cross-linking de CD46 activa diferentes tipos celulares. Su papel como mCRP recae en

ser un cofactor intrínseco en la proteólisis de C3b y C4b, mediada por el factor I. (18,32,35)

3.1.2 CD55 o factor de aceleración de la descomposición

Es una glicoproteína expresada en leucocitos, eritrocitos y plaquetas. CD55 se codifica en el cromosoma 1q32.2, y su estructura también consta de cuatro dominios CCP, con los que interactúa con las convertasas del sistema de complemento. Su dominio STP O-glicosilado, actúa como espaciador estructural entre CCP y la región de anclaje a glicosilfosfatidilinositol C-terminal (GPI) de la membrana celular. (18,36)

Su principal función se asocia a la protección intrínseca de las células a un ataque autólogo por complemento, al inhibir la ruptura de C3 y C5 y con ello, prevenir la formación y acelerar el decaimiento de las convertasas C3 y C5. Específicamente, CD55 reconoce los fragmentos C4b y C3b, interfiere con la formación de la convertasa C3 y acelera la degradación de las subunidades catalíticas de las convertasas C3 y C5. A través de estos mecanismos, CD55 puede proteger a las células de un ataque autólogo por complemento. (36,37)

Alteraciones en los niveles de expresión de CD55 se han asociado a cáncer (36–39) pero también a otras enfermedades, como malaria, vitíligo, esclerosis múltiple o artritis reumatoide. (36)

3.1.3 CD59 o protectina

Es una glicoproteína cuyo gen se localiza en el cromosoma Chr11p14-p13. Cuenta con un anclaje a GPI de membrana, pero también ha sido detectada de manera soluble (40,41). Su estructura consta de tres hojas β plegadas y una α hélice; se ha propuesto que las glicosilaciones que constituyen el core de la molécula pueden influir en su distribución membranal, que puede limitar la orientación del dominio extracelular para interactuar con las proteínas del complejo de ataque a la membrana (MAC) y en prevenir su digestión por proteasas. (18)

Es responsable de inhibir la formación del MAC en las membranas de las células: la α hélice de CD59 se une a la cadena β de C8 y al dominio β de C9 (29), evitando la oligomerización de C9 (que culmina con la formación del MAC). (30)

Puede formar complejos con proteínas de la familia de cinasas Src para transducir señales que se ha reportado pueden favorecer la progresión tumoral, y se ha descrito como un ligando alternativo para CD2 y con implicaciones en la activación de las células T. (40–43)

3.2 Las mCRP en cáncer

Fisiológicamente las funciones de las mCRP se basan en regular la activación del sistema de complemento, protegiendo al organismo de una sobreactivación que pudiese ser dañina; mientras que en el cáncer su sobreexpresión está relacionada con una defensa por parte de las células tumorales ante terapias inmunológicas. La sobreexpresión de las mCRP también se relaciona con una acción protumoral, debido a la inhibición de la CDC (Figura 5) y a la modulación del microambiente tumoral que favorece el desarrollo de metástasis y disminuye la eficacia de los mAbs, por ende, aumenta la resistencia farmacológica causando una menor supervivencia de los pacientes. (18,35,50,37,43–49)

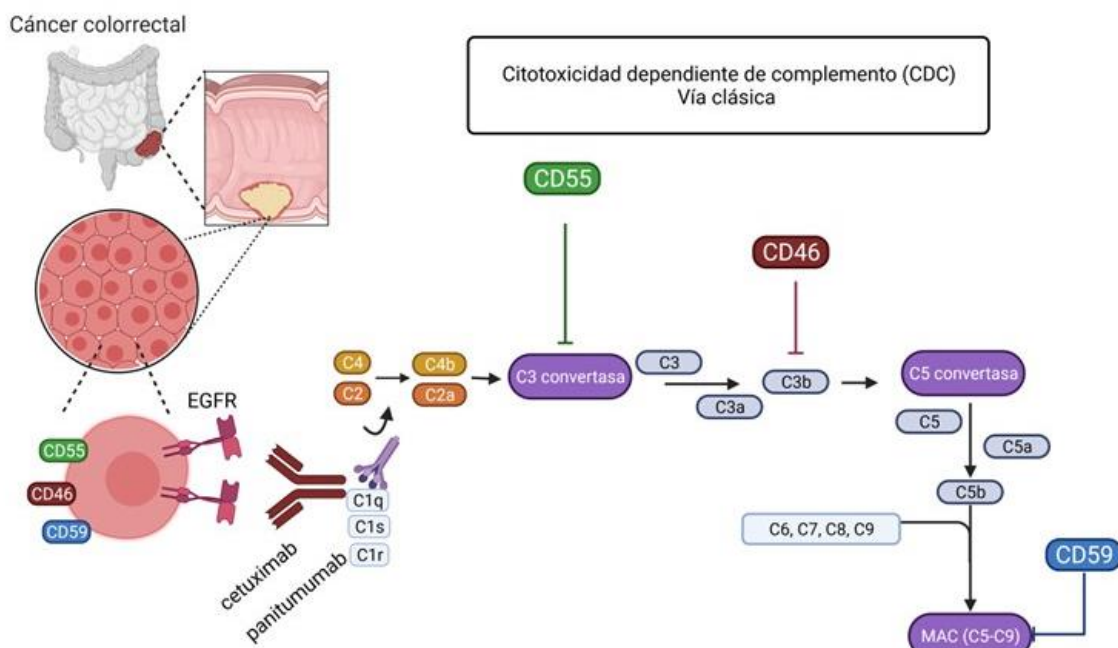


Figura 5. Cascada de la vía clásica del complemento en la CDC por anticuerpos en cáncer colorrectal. Se muestra el mecanismo de inhibición de la cascada de cada una de las mCRP. Tomado de: (18)

Adicionalmente, se ha reportado en diversas líneas celulares que cuando las mCRP se unen a sus respectivos ligandos, pueden activar distintas vías de señalización que regulan una variedad de procesos en las células tumorales, como la proliferación, autorrenovación, pluripotencia, reparación de daño en ADN y la evasión a la apoptosis. Por ello, recientemente se les ha atribuido responsabilidad en otros procesos relacionados con el cáncer, más allá de la disminución de la eficacia terapéutica por la inhibición del sistema del complemento. (51)

La sobreexpresión de CD59 otorga protección a las células tumorales de la formación del MAC; además, esta proteína puede regular la función y fenotipo de células inmunes en el microambiente tumoral, las cuales a su vez pueden modular la expresión de CD59 en las células tumorales. (40–42) Los pacientes con CRC que expresan CD59 tienen una menor supervivencia con respecto a aquellos con tumores negativos para CD59: por ello, se ha propuesto a CD59 como un marcador de pronóstico en CRC. (47)

En CRC, CD55 posee una correlación directa y significativa con la supervivencia libre de enfermedad en cáncer colorectal, y se le ha considerado como un marcador de agresividad tumoral. La sobreexpresión de esta molécula conduce a una menor supervivencia a 7 años. (46) Como ocurre con todas las mCRP, la sobreexpresión de CD55 disminuye la CDC, la eficacia de los mAb y promueve la progresión tumoral. (52) Mientras que en cáncer de mama se ha sugerido que la invasividad de las células tumorales es dependiente de la unión de CD55 con su ligando CD97, al activar una cascada de señalización mediada por glicosilfosfatidilinositol. Esta cascada resulta en la activación de la vía MAPK/ERK, que concluye con la transcripción de genes involucrados en la reparación del ADN. A su vez, ERK activa a NFκB, lo que favorece la expresión de las mCRP y la proliferación tumoral. Por otro lado, la cascada también regula al alza la expresión de oncogenes de firma característica en CTT, y que son responsables de su autorrenovación y pluripotencia, como SOX2 y OCT4. Respuestas similares se han reportado tras la activación de CD59 tras interactuar con glicosilfosfatidilinositol y DGI. (51)

También en cáncer de mama, se ha reportado que CD46 es capaz de activar señalizaciones intracelulares a través de sus colas citoplasmáticas CYT1 y CYT2, que

conducen a cascadas de fosforilación al interactuar con diversas cinasas. Dichas cascadas inducen la expresión de factores de transcripción que favorecen la proliferación y la adquisición del fenotipo troncal, y que, a su vez, favorece la expresión de CD46 en células tumorales (51). (35) En los últimos años, se ha identificado el importante rol que tiene en la transformación maligna de células, y las posibles aplicaciones en la inmunoterapia contra el cáncer. Su sobreexpresión en cáncer se correlaciona con un peor pronóstico por un mecanismo de evasión contra los anticuerpos terapéuticos. (53–55)

También existen algunos reportes que demuestran cambios en los niveles de expresión de las mCRP tras la administración de fármacos, tal es el caso de Tamoxifeno. Tamoxifeno (Tam) es un modulador selectivo no esteroideo del receptor de estrógeno (MSRE). Se ha reportado que puede disminuir los niveles de expresión de las mCRP (CD55) en cáncer de mama, elevando la CDC al combinarse con mAbs usados en la clínica. Además, se ha reportado que inhibe las metástasis a hígado en CRC, pudiendo tener un efecto positivo para pacientes con CRC en la clínica. (56)

Aunque en general se ha pensado que la base del efecto antiproliferativo de Tam resulta de la inhibición de la unión de los estrógenos a sus receptores, se ha demostrado que tiene efectos independientes a esta actividad. Por ejemplo, es capaz de inhibir a la PKC, una enzima clave en la regulación del crecimiento celular, y esta inhibición contribuye al efecto antitumoral de Tam; esto se ha documentado *in vivo* a concentraciones terapéuticas. También se ha reportado la inhibición de la DNA polimerasa como parte de la actividad de Tam. (57)

3.3 Papel de las mCRP en el CRC y su tratamiento

Como se mencionó previamente, los mAbs para tratar el CRC cuentan con múltiples mecanismos de acción, sin embargo, se ha demostrado que el efecto inhibitorio de las mCRP en la actividad de los mAbs es de tal magnitud que tiene un potente impacto en la eficacia terapéutica. (35,45,49,58) Adicionalmente, se ha demostrado que inhibir o disminuir la expresión de las mCRPs potencia la eficacia de los tratamientos. (35,49,59)

Gelderman et al. identificaron una alta tasa de recurrencia en pacientes con CRC, la cual asociaron a la inhibición de la activación del complemento por las mCRP. (18,60)

Se ha propuesto que CD46 tiene el papel más importante entre las mCRP en el CRC (61) pues, al parecer, su actividad funcional no está restringida a las membranas de las células tumorales sino que además puede ser liberada en vesículas y actuar en la proximidad del tumor para regular diversos procesos que contribuyen a la progresión tumoral, al modular el microambiente tumoral, facilitar la migración celular y la formación de metástasis e inhibir la activación complemento. (18)

Por otro lado, ha sido reportado que aquellos pacientes con CRC que presentan sobreexpresión de CD55 en células tumorales tienen un peor pronóstico de supervivencia y recurrencia en comparación con los que tienen una subexpresión de la molécula. Aunado a esto, se visualizó que al incrementar la expresión de CD55 la prognosis se deterioraba progresivamente. (38)

Diversos ensayos que tienen como objetivo inhibir la actividad de CD55 en células tumorales han arrojado resultados positivos. Tras realizar un bloqueo de CD55 mediante un mAb biespecífico (anti-17-1A/Ep-CAM-anti-CD55) se potenció 13 veces la CDC inducida por edrecolomab (anti 17-1A) (49). En otro estudio se demostró que la inhibición con un mAb anti- CD55 en células de CRC, se incrementó la activación del complemento, redujo la viabilidad y migración celular, además de generar un efecto sinérgico de la terapia combinada del mAb con 5-FU. (18,48)

La sobreexpresión de CD59 en pacientes con CRC tiene una correlación directa con el estadio de la enfermedad y una menor supervivencia. (41,47).

Sivasankar et al. expusieron *ex vivo* a células T CD4+, de pacientes con CRC, a los antígenos tumorales CEA y 5T4, y tras bloquear la actividad de CD59, hubo un incremento en la respuesta de las células T CD4+ (62). También se ha demostrado que el silenciamiento de CD59 en líneas celulares de CRC, inhibe la proliferación al sensibilizar a las células a la quimioterapia; la IC50 disminuyó considerablemente tras silenciar a la molécula. (18,41,63)

La revisión bibliográfica nos permitió identificar que el efecto de las mCRP en la eficacia de los mAbs ha sido bien estudiado, pero su relación con la terapia citotóxica y la población troncal no es tan conocido, aunque se ha reportado que algunos fármacos

pueden modificar la expresión de las mCRP y que esto puede conferir resistencia, como se describió para el caso de tamoxifeno y CD55. Por tal motivo, se decidió analizar el impacto de la terapia en la expresión de las mCRP y en las CTT en una línea celular de CRC; empleando al 5-FU, fármaco que ha sido usado en CRC por más de 40 años, y a tamoxifeno, cuya administración ha disminuido los niveles de CD55 en cáncer de mama.

4. OBJETIVO GENERAL

Analizar el impacto de la exposición a 5-fluorouracilo y tamoxifeno en la expresión de las mCRP y en la población troncal tumoral en un modelo de CRC *in vitro*.

4.1 Objetivos particulares

- 1) Analizar la expresión basal de las mCRP en las células SW-480.
- 2) Evaluar la sensibilidad de la línea celular SW-480 a 5-FU y a tamoxifeno.
- 3) Determinar si la exposición a los fármacos modifica la expresión de mCRPs.
- 4) Evaluar el efecto de los fármacos y sus combinaciones sobre la población troncal presente en las células SW-480.

5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

A) Material biológico

Como modelo de estudio se empleó una línea celular de cáncer de colon (SW-480): estas células fueron aisladas de un paciente hombre con un adenocarcinoma en el intestino grueso (ATCC CCL-228).

Las células fueron cultivadas en medio L-15 suplementado (Gibco) con 10% de suero fetal bovino (Gibco) en cajas de cultivo de 25 y 75 cm², y se incubaron a 37°C en atmósfera libre de CO₂, tal y como recomienda la ATTC. Para los ensayos posteriores, se cosecharon las células una vez que estas presentaran alta confluencia (90-100%), utilizando Tripsina/EDTA (Gibco), y contándolas en una cámara de Neubauer empleando azul tripán.

La línea celular empleada está transducida con un sistema reportero lentiviral de 6 repeticiones en tándem del elemento de respuesta a OCT4/SOX2, que induce la expresión de una proteína reportera fluorescente (GFP), permitiendo identificar a las CTT

del resto de la población presente en la línea celular, así como monitorear sus propiedades y respuestas a fármacos (Donada por el Dr. L.M. Wakefield (National Cancer Institute, Bethesda, MD USA)). (64)

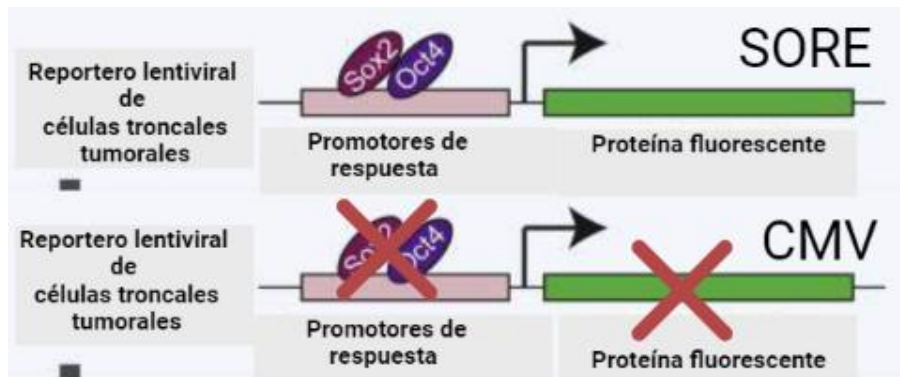


Figura 6. Sistema reportero lentiviral para identificación de CTT. Se ilustra a las células SORE, que tienen como elementos de respuesta a los factores de transcripción SOX2 y OCT4, activando la expresión de la GFP. Las células CMV, que actúan como control negativo, no poseen los elementos de respuesta a SOX2 y OCT4, y por ende, no expresan a GFP.

OCT4, SOX2 y NANOG conforman la triada de factores de transcripción de regulación del fenotipo troncal, tal y como se describió en los antecedentes. Al unirse a sus regiones promotoras, estos factores de transcripción son capaces de autoregular su expresión, y promover la troncalidad al regular genes involucrados en la pluripotencia y la autorrenovación, y al suprimir genes involucrados en la diferenciación en células tumorales. (24,64)

B) Fármacos y determinación de la CI50.

Dentro de los fármacos a evaluar se encuentran el 5-fluorouracilo (Sellekchem S1209) y tamoxifeno (SIGMA T5648), y se empleó DMSO (SIGMA D4540) como el vehículo. Para determinar la IC50 de cada uno de los fármacos se crearon curvas concentración-respuesta de cada uno de ellos (5-FU: 800-0.1 μ M; Tam: 50-0.5 μ M), evaluando la viabilidad celular en SW-480 por un ensayo colorimétrico de MTT. Una vez obtenidas

dichas curvas, se evaluó el efecto en la viabilidad celular de la combinación de las IC50 de Tam con 5-FU, los cuales se colocaron de manera simultánea.

Para evaluar el efecto de los fármacos citotóxicos en la viabilidad celular, se utilizó el ensayo colorimétrico de bromuro de 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5 difenil tetrazolio (MTT) (M5655, SIGMA). En placas de 96 pozos (701001, NEST) se sembraron 25,000 células por pozo en 100 μ L de medio L-15, por triplicado para cada condición, y se incubaron durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente, se expusieron las células a los fármacos a diferentes concentraciones y se incubaron durante 72 h.

Como vehículo, se utilizó el disolvente correspondiente para cada fármaco (DMSO). Transcurrido el tiempo, se añadió 20 μ L del reactivo de MTT (5mg/mL) y se incubó durante 3 h a 37°C. Posteriormente, se retiró el medio y se añadieron 100 μ L de DMSO, colocando la placa en agitación (150 rpm/5 min/TA) y protegida de la luz. Finalmente, se determinó la absorbancia a 570 nm en el espectrofotómetro Epoch (BioTeK) con el Software Gen 5.

Para el análisis de datos, las lecturas de absorbancia obtenidas se normalizaron con respecto al blanco. Se calculó la CI50, utilizando una regresión no lineal con un modelo de dosis-respuesta de inhibición (log vs respuesta de 4 parámetros) con el programa GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software). El análisis estadístico se determinó mediante un F test, comparando el logIC50 de la curva de 5-FU y 5-FU + Tam.

C) Tinción de marcadores de membrana e intracelulares: expresión de las mCRP en células SW-480

Para determinar los niveles basales de expresión de las proteínas reguladoras del complemento en la línea celular, se cuantificó su expresión por citometría de flujo empleando anticuerpos acoplados al fluorocromo APC para cada una de las proteínas (CD46, CD55 y CD59), ver tabla 2.

Las células fueron cosechadas con Tripsina/EDTA por 5 minutos, posteriormente los anticuerpos (diluidos previamente en buffer de tinción: PBS + 5 % SFB) se añadieron a la suspensión celular y ésta se incubó en frío y se mantuvo en agitación por 30 minutos. Tras la incubación las células se lavaron con buffer de lavado y se resuspendieron en 300 μ L de PBS, para su adquisición (Citómetro Attune NxT) Como controles se incluyeron

a las células sin teñir para determinar la autofluorescencia, y a un control de isotipo de los anticuerpos (tabla 2).

Adicionalmente, se cuantificó la expresión intracelular de CD55 y CD59 empleando un kit de permeabilización celular (BD Cytotfix/Cytoperm 554717). Primero, se deben fijar y permeabilizar a las células, resuspendiéndolas con 100 μ L de la solución Cytotfix/Cytoperm e incubando por 20 minutos a 4°C. Posteriormente, se deben realizar dos lavados con el buffer BD Perm/Wash. Por último, para teñir a las mCRP intracelulares se deben añadir los anticuerpos al buffer BD Perm/Wash, y se resuspende a las células en esta solución previamente preparada; se incuba por 30 minutos más a 4°C y posterior a la incubación se realizan dos lavados. El proceso de fijado únicamente se realizó para obtener la expresión intracelular de las proteínas, las tinciones de membrana del resto de experimento fueron en fresco (ver apéndice).

Hecho esto, las células fueron analizadas por citometría de flujo.

Anticuerpo	Fluorocromo	Isotipo	Marca/Catalogo
Anti- CD46 humano	APC	IgG1	Miltenyi/130 104 558
Anti- CD55 humano	APC	IgG1	Miltenyi/130 101 802
Anti- CD59 humano	APC	IgG1	Invitrogen/62 05996 42
Control de isotipo	APC	IgG1	Miltenyi/130 092 214

Tabla 2. Especificaciones de los anticuerpos empleados para la detección de las mCRP.

Finalmente, con los resultados obtenidos por citometría de flujo se generó una estrategia de análisis para las poblaciones de interés mediante el Software FlowJo vX.0.7 (Figura 7), y dicha estrategia fue empleada para analizar todos los resultados obtenidos mediante esta técnica. Primero se hizo selección de los singuletes y a partir de ahí la estrategia se dividió en dos:

- i) A partir de un *dotplot* de células únicas o singuletes (a), se realizó un segundo *gate* de un *dotplot* de granularidad vs tamaño (b), éste se seleccionó para identificar el porcentaje de células GFP+, tal y como lo reportan los autores

que generaron el sistema reportero SORE6: seleccionando a las células homogéneas de la población. Para seleccionar y delimitar las regiones correspondientes a las células GFP+ vs GFP- se utilizó el control de células CMV, nuevamente, como reportan los autores (ajustando a 0.01% de células GFP+, en control CMV) (c). Posteriormente, tras seleccionar a la población GFP+ y GFP-, se analizó mediante un histograma la IMF de GFP (d) o el nivel de expresión de las mCRP (CD46, CD55 y CD59; e).

- ii) De la población seleccionada del *gate* de singuletes, seleccionar a las células viables y no viables, es decir, 7-AAD- y 7-AAD+ respectivamente (f). A cada una de estas poblaciones se les analizó el nivel de expresión de las mCRP (g).

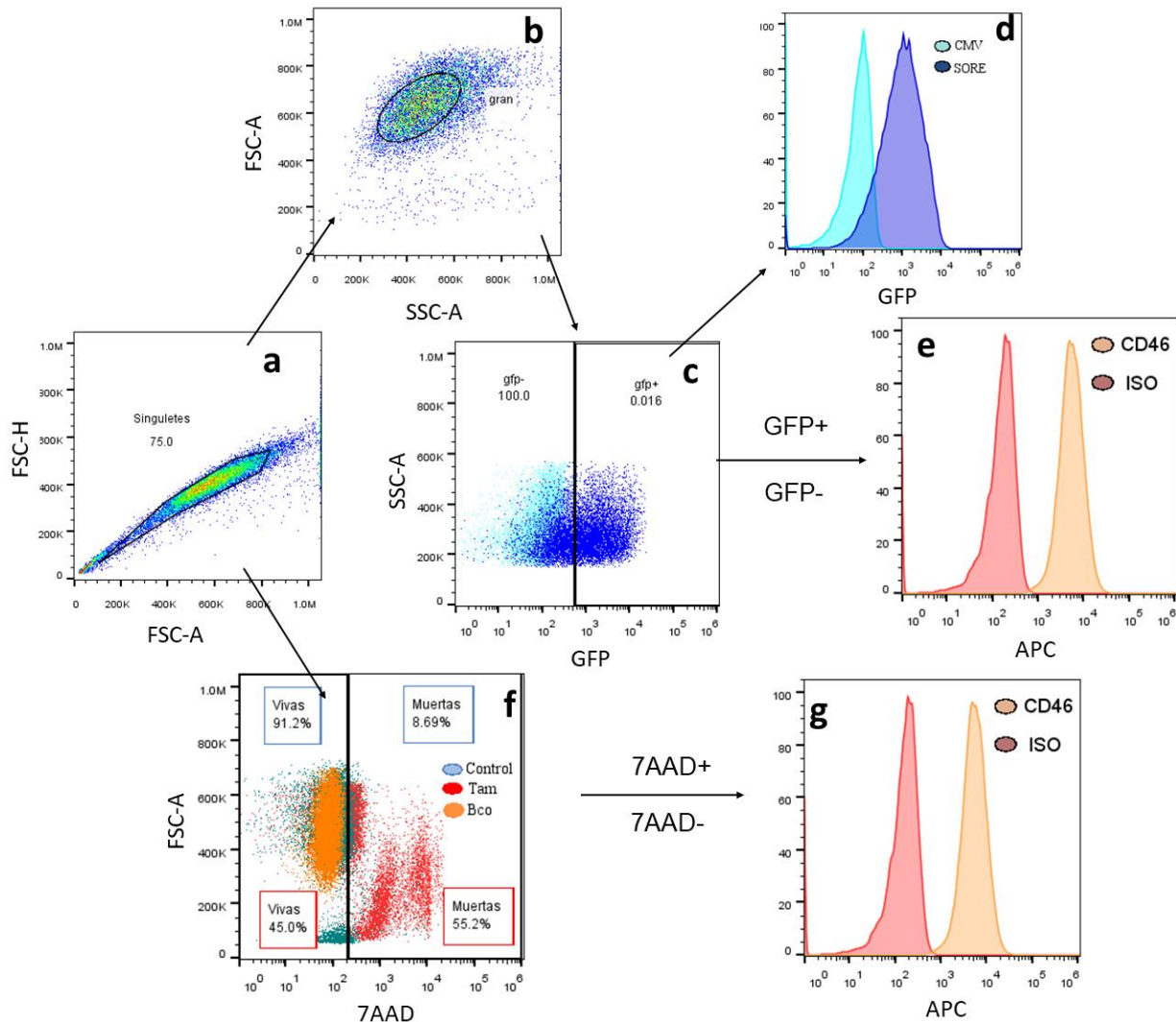


Figura 7. Estrategia de análisis de las poblaciones y moléculas de interés. Se muestran los *dotplots*, *gatings* e histogramas representativos de cada población de una muestra control y con tratamiento (Tamoxifeno). Para la evaluación de la expresión de: GFP, CD46 (una mCRP) en la población GFP+ y GFP-, CD46 en la población 7-AAD- y 7-AAD+. Número de eventos: 20,000.

D) Evaluación de la viabilidad celular con 7-AAD en células expuestas a 5-FU y

Tam

Las células (60,000) se sembraron en placas de 24 pozos y a la mañana siguiente se expusieron a las IC50 de 5-FU, Tam y la combinación de ambos de manera simultánea; es decir, ambos fármacos se colocaron al mismo tiempo y a las 72h se determinó el efecto en la viabilidad. Se incubaron a 37°C según los tiempos correspondientes (24 horas o 72 horas); transcurrido el tiempo de incubación, las células fueron cosechadas como se menciona previamente y teñidas en fresco para evaluar por citometría de flujo el impacto en la expresión de las mCRP en membrana; también se analizó la expresión de GFP para identificar el efecto de los tratamientos sobre las CTT. Adicionalmente, para analizar la viabilidad celular se realizó una tinción con 7-AAD 10 µg/mL incubando a 4°C por 15 minutos. El 7-AAD es un agente fluorescente intercalante del ADN, por lo que únicamente aquellas células muertas o con la membrana celular dañada serán teñidas, permitiendo así identificar a las células no viables de las células viables. Tras la adquisición los resultados fueron analizados tal y como se muestra en la figura 7.

E) Análisis estadístico

Con el objetivo de determinar si las diferencias entre los tratamientos y el control era significativo, se empleó el programa de GraphPad Prism versión 7. Se realizaron pruebas de ANOVA de una vía para la comparación entre tratamientos, y Tukey como prueba posthoc; en dicho programa también se realizaron las gráficas de los resultados experimentales.

6. RESULTADOS

Expresión basal de CD46, CD55 y CD59 en la línea SW-480

Previamente se ha reportado la presencia de las mCRP en cáncer colorrectal, y no es diferente el caso para la línea celular SW-480, en la que se ha demostrado la expresión de las tres proteínas: CD46, CD55 y CD59. En cuanto a sus niveles de expresión, CD46 es la proteína que más se expresa en la línea celular, específicamente en la membrana, por eso solo se realizó tinción de membrana (IMF= 31,700). En expresión le sigue CD55 que puede expresarse en membrana o de manera soluble al igual que CD59, y de esta última se reporta ser la proteína con menor expresión tanto en membrana y en citoplasma, lo que concuerda con los datos obtenidos. CD59 no se expresa ni en membrana ni en citoplasma, mientras que CD55 sí (Figura 8, tabla 3 y apéndice). Las células sin teñir y aquellas teñidas con el control de isotipo presentan una distribución similar, siendo lo esperado para estos controles, en donde no se debería ver una señal (Figura 8).

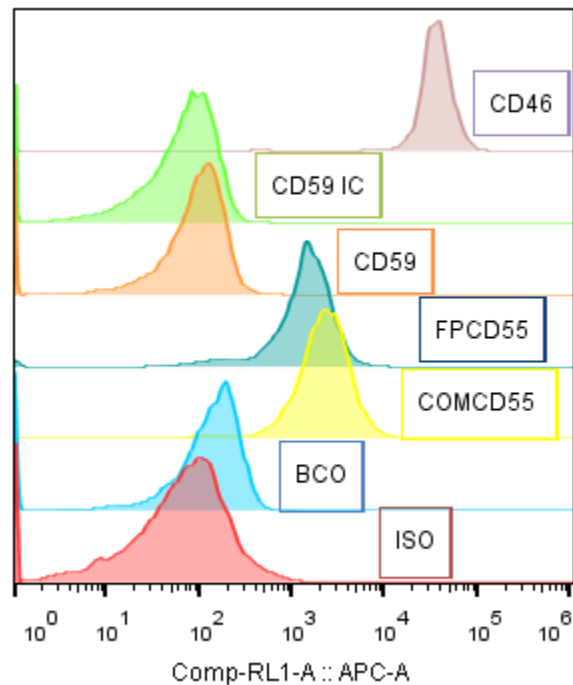


Figura 8. Expresión basal de mCRP en células SW-480. Niveles de expresión basal de cada una de las proteínas. (IC: intracelular, ISO: isotipo, BCO: autofluorescencia (células sin teñir), FP: fijado y permeabilizado; COM: tinción completa {intracelular y de

membrana)). Histogramas representativos obtenidos por citometría de flujo mediante una tinción directa. Número de eventos: 13000 (Ver apéndice)

Condición experimental	IMF
FPCD55	1383
COMCD55	1899
CD55 intracelular*	516

Tabla 3. Niveles de expresión de CD55 en SW480.* Para obtener la expresión de CD55 intracelular, se resta la IMF de FPCD55 (tinción en membrana tras fijar y permeabilizar) a COMCD55 (tinción antes y después de fijar y permeabilizar); ver apéndice.

Efecto citotóxico de 5-FU y tamoxifeno.

Se elaboraron curvas concentración-respuesta para cada uno de los fármacos y su combinación, y se determinó que 5-FU y Tam tienen un efecto citotóxico sobre las células SW-480, siendo Tam más potente que 5-FU: pues Tam posee una IC50 de 9.51 μM , mientras que la IC50 de 5-FU es de 75.6 μM (Figura 9 A y B). Además, la combinación de la IC50 de Tam con 5-FU de forma simultánea aumenta el efecto citotóxico individual de 5-FU sobre la viabilidad celular, que disminuye considerablemente la IC50 de 5-FU hasta 17.50 μM (Figura 9C).

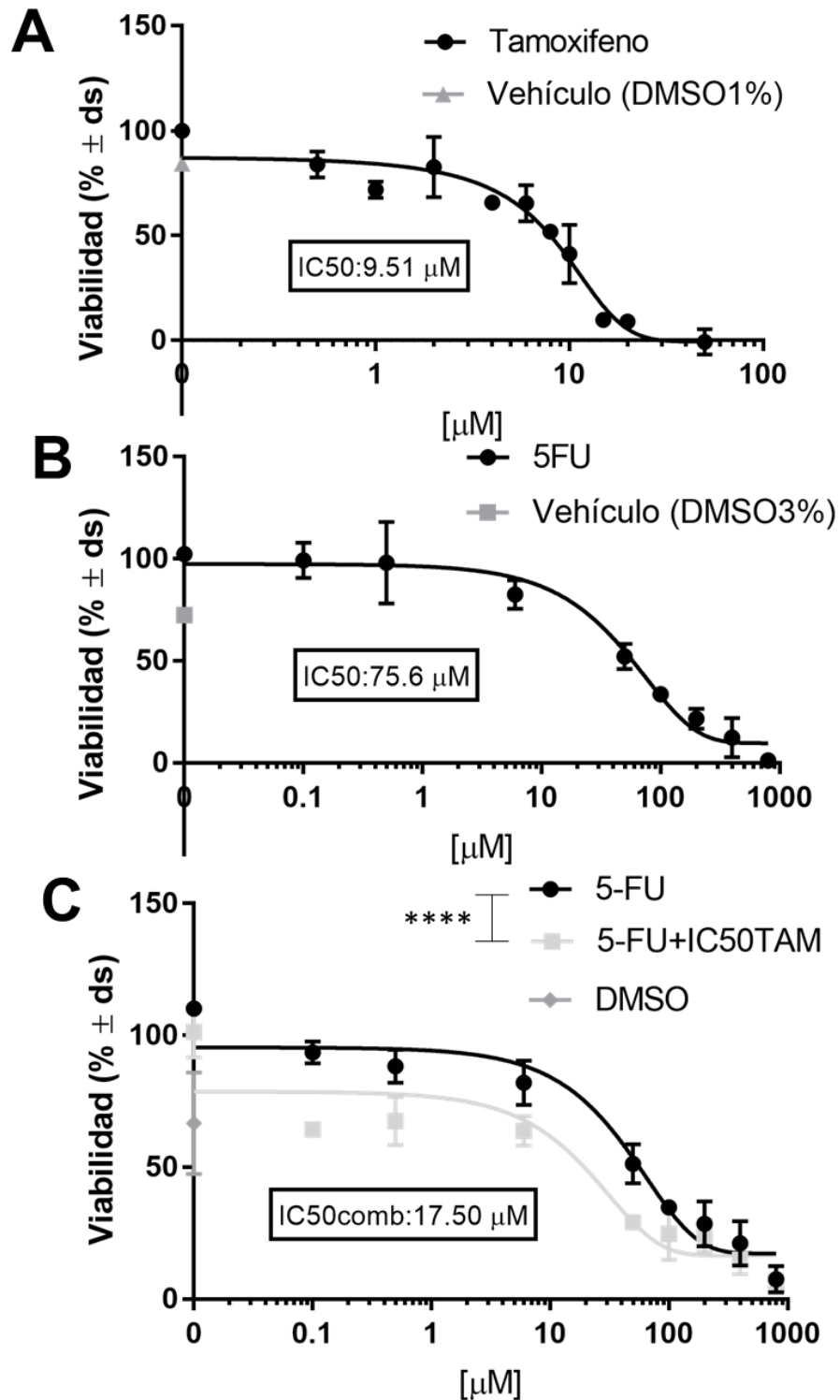


Figura 9. Curvas concentración-respuesta de 5-FU, Tam y 5-FU + Tam en la línea celular SW-480. A) Promedio de las curvas de Tam (n= 4 experimentos independientes realizados por triplicado); B) Promedio de las curvas de 5-FU (n= 5 experimentos

independientes de triplicados); C) Promedio de las curvas de la combinación de la IC50 de Tam con 5-FU simultánea (n= 3 experimentos independientes de triplicados). Las barras muestran la desviación estándar de los promedios. ****= $p < 0.0001$

Efecto de los fármacos sobre la población troncal

Tras 24 horas de exposición a los fármacos, se observa una ligera disminución en la población troncal con Tam y la combinación de 5FU + Tam; con diferencia estadística en el porcentaje de GFP entre Tam con el resto de las condiciones experimentales. En el caso de 5-FU no se observan cambios con respecto al control (Figura 10 y Tabla 4). Sin embargo, a exposición por 72h horas los fármacos tienen un efecto más claro sobre las CTT: el tratamiento con 5-FU disminuye a la población troncal con diferencia significativa, mientras que Tam enriquece a dicha población; y la combinación de ambos fármacos tiene un efecto compensatorio, aunque la población troncal tiende a la baja con respecto al control (Figura 10 y Tabla 4).

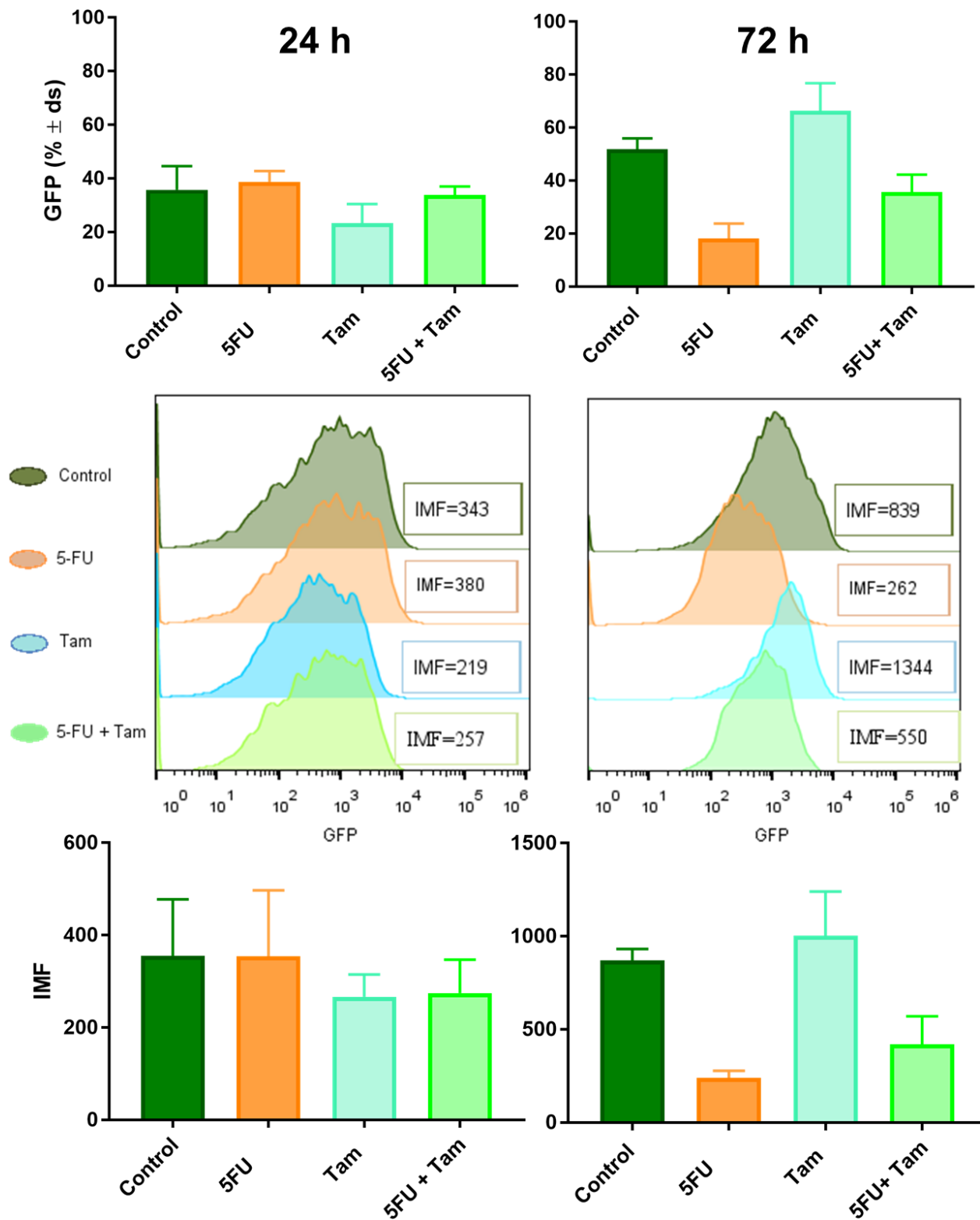


Figura 10. Efecto de los fármacos en la población troncal a 24 y 72 horas de exposición. Las barras muestran los promedios de la IMF ± ds o el porcentaje de GFP

± ds de cada uno de los tratamientos (n=6, para cada tratamiento a 24 horas) junto con los histogramas representativos obtenidos por citometría de flujo mediante una tinción directa. (a 72 horas para control y 5-FU n=18; para Tam y 5-FU + Tam n=16, de experimentos independientes con duplicados). IMF: Intensidad media de fluorescencia; ds: desviación estándar.

	Control vs. 5-FU	Control vs. Tam	Control vs. 5-FU + Tam	5FU vs. Tam	5FU vs. 5-FU + Tam	Tam vs. 5-FU + Tam
24 horas						
GFP (%)	ns	ns	ns	Ns	ns	ns
IMF GFP	ns	ns	ns	Ns	ns	ns
72 horas						
GFP (%)	****	****	****	****	****	****
IMF GFP	****	*	****	****	**	****

Tabla 4. Resumen de resultados estadísticos del efecto de los fármacos en la expresión de GFP e IMF a 24 y 72 horas de exposición. Los resultados se obtuvieron tras realizar una ANOVA de una vía seguido de una prueba post-hoc de Tukey. *= p<0.05; **= p<0.01; ***=<0.001, ****= p<0.0001; ns= no significativo

Efecto de los fármacos sobre la expresión de las mCRP

A modo de explorar el efecto de los fármacos sobre las mCRP se decidió realizar un análisis en dos tiempos distintos de exposición: 24 y 72 horas. Dado que a 24 horas no se observaron efectos claros sobre los niveles de expresión de las mCRP se decidió proseguir con repeticiones del análisis a 72 horas; es por ello, que a 24 horas únicamente se muestra un experimento representativo realizado por duplicado (Figura 11).

Asimismo, una pregunta que surgió tras el planteamiento del proyecto fue si las células podrían sobreexpresar a las proteínas para protegerse de los estímulos citotóxicos de

los fármacos, es por ello que se decidió incluir una tinción con 7-AAD para poder realizar un análisis discriminando entre células viables y células no viables, e identificar si existen diferencias entre los niveles de expresión de las mCRP entre estas dos poblaciones.

En la expresión de las mCRP, tras 24 horas de exposición hay una inducción de la expresión de CD59 tanto en células viables (7-AAD-) como en células no viables (7-AAD+), siendo de mayor expresión en células no viables (Figura 11A). En células viables, el tratamiento con 5-FU + Tam incrementa los niveles de CD59 con respecto al control. Esto mismo se mantiene en las células no viables, donde, además, las células tratadas con Tam muestran una tendencia a sobreexpresar CD59.

En el caso de CD46 los niveles de proteína se mantienen similares entre células viables y células no viables. Pero las células que tras ser expuestas a tratamientos resultaron no viables (7-AAD+), parecen tener una menor expresión de la proteína con respecto al control; mientras que en las células viables (7-AAD-) aquellas tratadas con 5-FU y Tam tienen mayor expresión de CD46 y, por el contrario, su combinación provoca una tendencia a la baja en la expresión.

Por último, CD55 también se expresa en niveles similares en células viables y en aquellas no viables. En ambos casos se observa que en las células expuestas a la combinación de fármacos hay una ligera tendencia al alza en la expresión de la proteína, sin mayores cambios para los fármacos por separado.

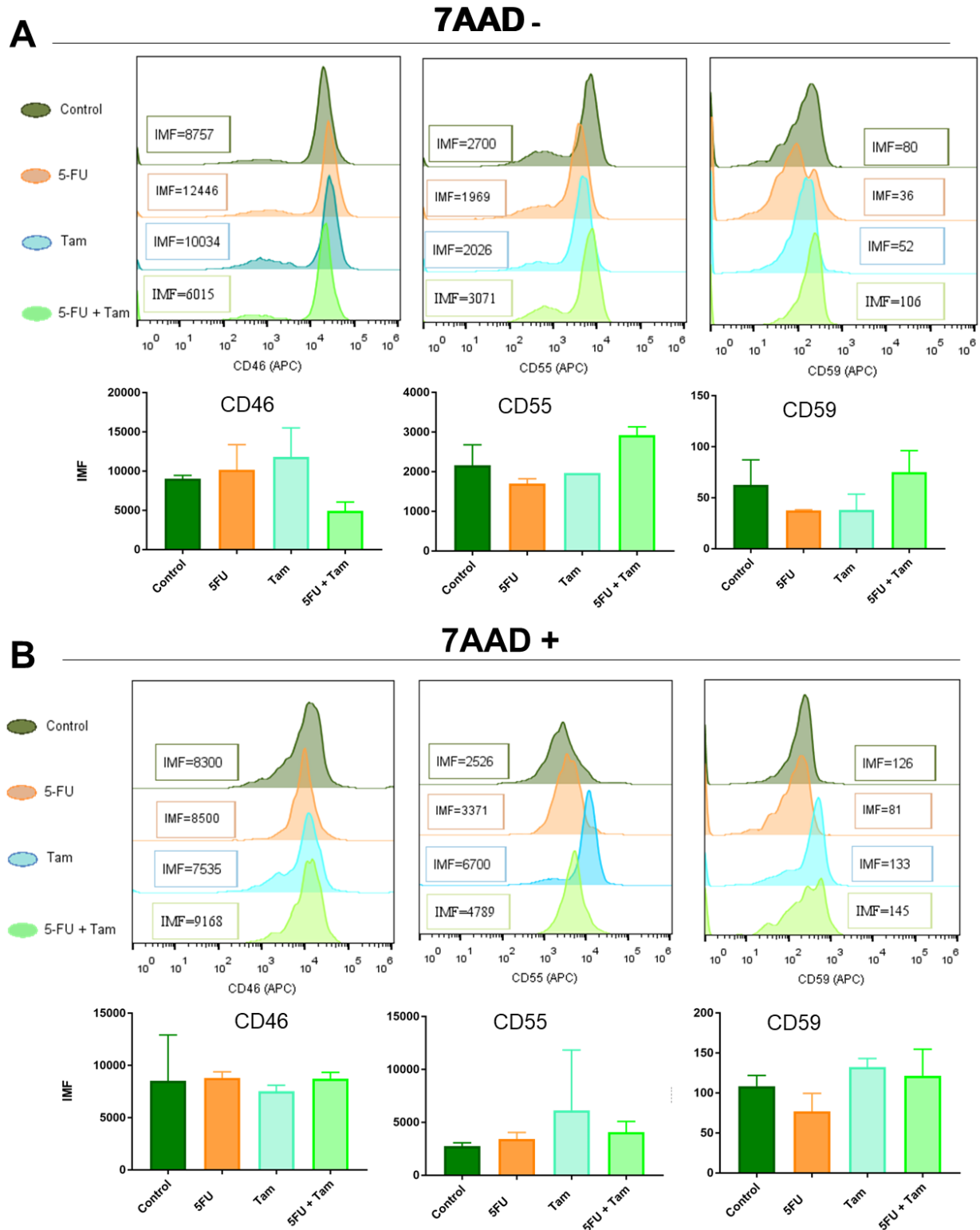


Figura 11. Efecto de los fármacos en los niveles de expresión de las mCRP tras 24 horas de exposición. A) Efecto en las mCRP en células viables (7-AAD-); B) Efecto en

las mCRP en células no viables (7-AAD+). Las barras muestran los promedios +/- ds. IMF: Intensidad media de fluorescencia n=2. Histogramas representativos de un experimento independiente realizado por duplicado.

Tras 72 horas de exposición a los fármacos, hay cambios significativos en la expresión de las mCRP (Figura 12 y tabla 5). En células viables no se modificó la expresión de CD46 en ninguna de las condiciones experimentales; sin embargo, en el caso de las células no viables se observa que las expuestas a tratamiento tienen una expresión mucho menor con respecto a las células no viables del control, con una diferencia significativa para las tres condiciones de tratamiento (Tabla 5).

Con respecto a CD55, observamos que la exposición a las IC50 de 5-FU y Tam inducen su expresión en células viables, únicamente con diferencia significativa para 5-FU cuando comparamos con el control (medio). En células SW-480 no viables no se ven diferencias relevantes de la expresión de la proteína, sin embargo, pareciera que las células expuestas a la combinación de tratamientos tienen una expresión a la baja con respecto al control, sin embargo, esto no fue significativo (Tabla 5).

A pesar de que CD59 no se expresa de manera basal en las células SW-480, su expresión también se induce tras las 72 horas de exposición a los fármacos, siendo más claro dicho efecto con la combinación de las IC50 de 5-FU y Tam. Esto ocurre tanto en células viables como no viables, teniendo niveles similares de expresión en ambos casos.

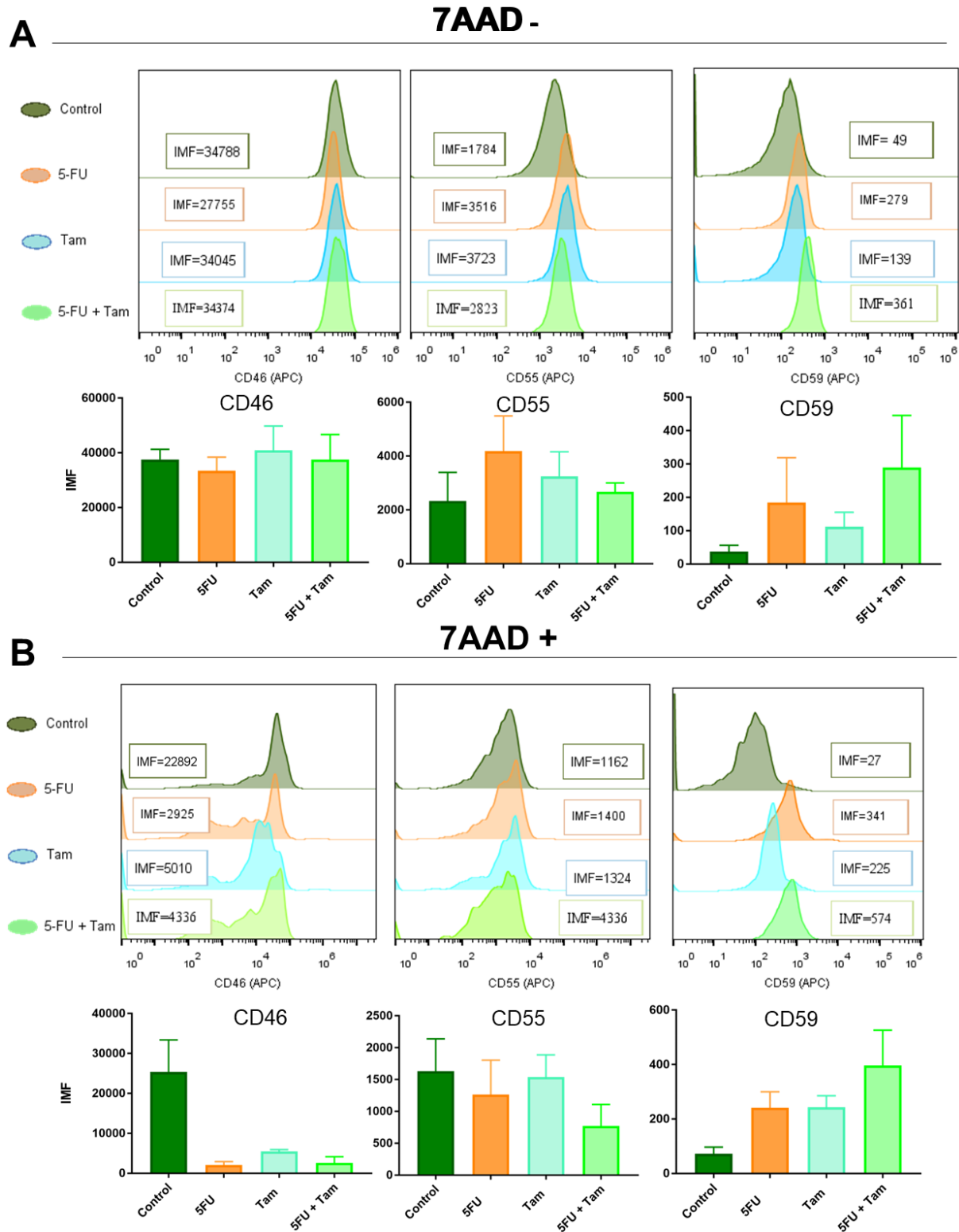


Figura 12. Efecto de los fármacos en los niveles de expresión de las mCRP tras 72

horas de exposición. A) Efecto en las mCRP en células viables (7-AAD-); B) Efecto en las mCRP en células no viables (7-AAD+) junto con los histogramas representativos obtenidos por citometría de flujo mediante tinción directa. Las barras muestran los promedios de la IMF+/- ds. IMF: Intensidad media de fluorescencia. Para control y 5-FU n=7; para Tam y 5-FU+ Tam n=5, de experimentos independientes.

mCRP	Control vs. 5-FU	Control vs. Tam	Control vs. 5-FU + Tam	5FU vs. Tam	5FU vs. 5-FU + Tam	Tam vs. 5-FU + Tam
Células viables						
CD46	ns	ns	ns	ns	ns	Ns
CD55	*	ns	ns	ns	ns	ns
CD59	*	ns	**	ns	ns	*
Células no viables						
CD46	****	***	****	ns	ns	ns
CD55	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CD59	**	**	***	ns	*	*

Tabla 5. Resumen de resultados estadísticos del efecto de los fármacos en las mCRP a 72 horas de exposición. Los resultados se obtuvieron tras realizar una ANOVA de una vía seguido de una prueba post-hoc de Tukey. *= p<0.05; **= p<0.01; ***=<0.001, ****= p<0.0001; ns= no significativo.

Después de identificar que 5-FU y Tam modificaban la expresión de CD55 y CD59 a 72h, decidimos evaluar si además había diferencias en la expresión de las mCRP entre la población troncal (GFP+) o no troncal (GFP-).

El análisis muestra que en ambas poblaciones los tratamientos tienen el mismo efecto sobre la expresión de las mCRP. Para CD46 observamos un ligero aumento que no es significativo al comparar con el control, pero en las múltiples combinaciones no observamos cambios. (Tabla 6; Figura 13)

Para el caso de CD55, tras la exposición con 5-FU se induce su expresión, sin ser significativo dicho cambio (Tabla 6; Figura 13). Por último, para CD59 nuevamente se

observa que los tratamientos inducen la expresión de la proteína; teniendo mayores niveles de expresión en la población GFP- (no troncal). (Figura 13)

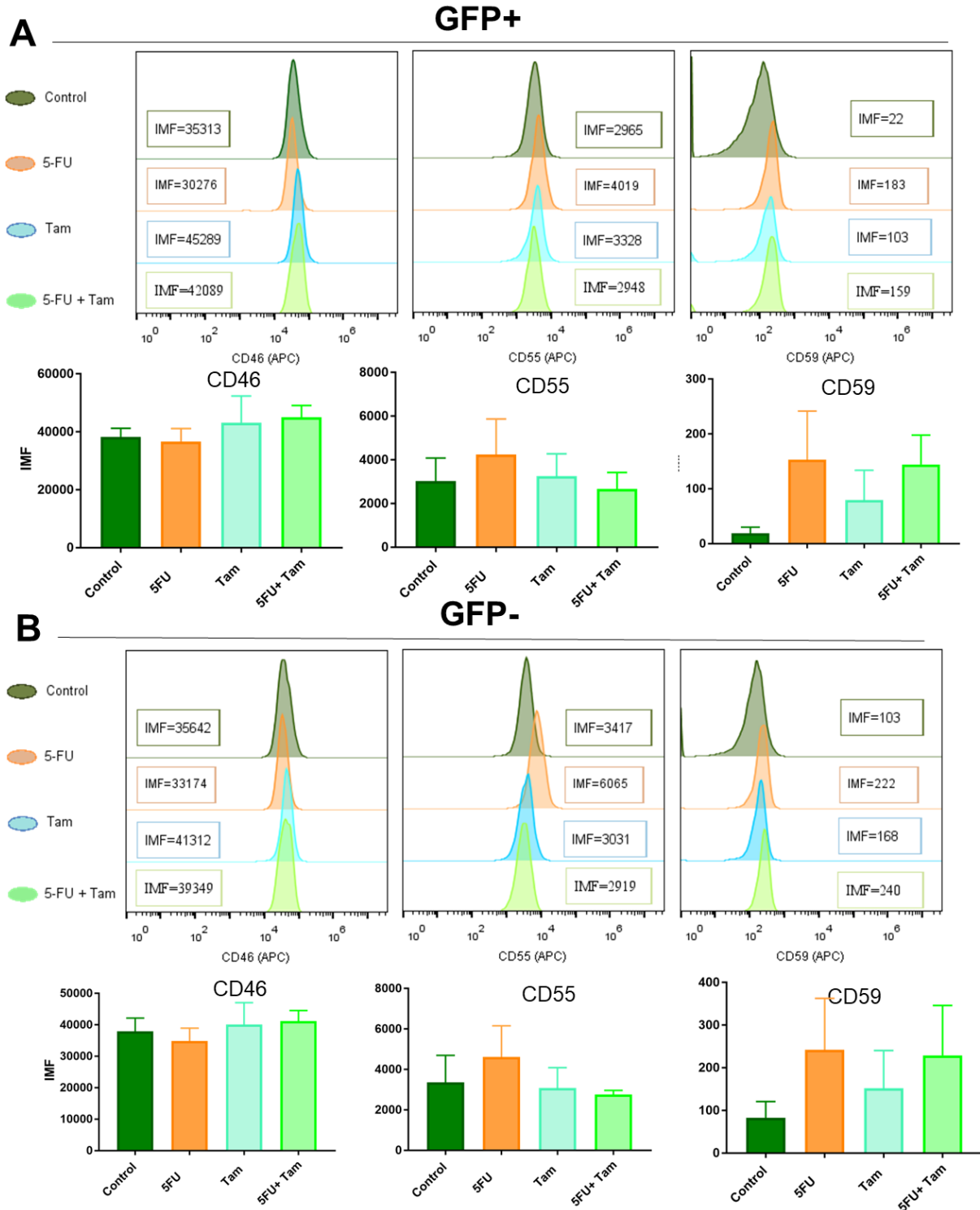


Figura 13. Efecto de los fármacos en los niveles de expresión de las mCRP tras 72 horas de exposición en células GFP+. A) Efecto en células GFP+; B) Efecto en células GFP-, junto con los histogramas representativos obtenidos por citometría de flujo mediante tinción directa. Las barras muestran los promedios de la IMF+/- ds. IMF: Intensidad media de fluorescencia. Para control y 5-FU n=7; para Tam y 5-FU+ Tam n=5, de experimentos independientes.

mCRP	Control vs. 5-FU	Control vs. Tam	Control vs. 5-FU + Tam	5FU vs. Tam	5FU vs. 5-FU + Tam	Tam vs. 5-FU + Tam
Células GFP+						
CD46	ns	ns	ns	Ns	ns	ns
CD55	ns	ns	ns	Ns	ns	ns
CD59	**	ns	*	Ns	ns	ns
Células GFP-						
CD46	ns	ns	ns	Ns	ns	ns
CD55	ns	ns	ns	Ns	ns	ns
CD59	*	ns	ns	Ns	ns	ns

Tabla 6. Resumen de resultados estadísticos del efecto de los fármacos en las mCRP de células GFP+ y GFP- a 72 horas de exposición. Los resultados se obtuvieron tras realizar una ANOVA de una vía seguido de una prueba post-hoc de Tukey. * = p<0.05; ** = p<0.01; *** = <0.001, **** = p<0.0001; ns = no significativo.

7. DISCUSION

Los resultados obtenidos con respecto a los niveles basales de las mCRP en SW-480 concuerdan con lo reportado, teniendo un orden de expresión creciente entre CD59, CD55 y CD46 (Figura 8). La expresión de CD46 es exclusiva de la membrana celular, mientras que para CD55 se encontró expresada en membrana y en citoplasma, tal y como se reporta en la literatura. Además, en la literatura se reporta que CD46 podría ser la mCRP de mayor importancia CDC en CRC en la membrana, ello podría explicar los elevados niveles de CD46 en SW-480. (65,66)

La nula expresión de CD59 (Figura 8) no correlaciona con lo reportado en la literatura; sin embargo, los autores de dichos reportes mantienen a la línea SW-480 en 5% de CO₂, lo que bien podría afectar la expresión de la proteína, a diferencia de nuestros cultivos, en donde cultivamos la línea celular en una atmosfera libre de CO₂, de acuerdo con las indicaciones del proveedor (ATCC).

Las IC₅₀ reportadas para 5-FU a 72h por ensayos de viabilidad con MTT varían en los rangos de 9-28 µM. Con nuestros ensayos se obtuvo una IC₅₀, aproximadamente 2.5 veces mayor que el valor máximo reportado, esta diferencia podría deberse a múltiples factores tales como el manejo y almacenamiento de la línea celular y las condiciones de ejecución del ensayo de viabilidad con MTT (porcentaje de suero fetal bovino, condiciones de incubación, tiempo de incubación del MTT, etc.) (67–69). También hay reportes en donde la IC₅₀ para 5FU a 24h evaluada por MTT es de 897.5 µM. (70)

Como se mencionó, en los antecedentes, tamoxifeno es un fármaco antineoplásico que se une al receptor a estrógenos (ER) y es utilizado para el tratamiento de cáncer de mama. En la literatura se reporta la expresión del ER2 para la línea celular SW-480; con respecto al receptor ER1 existen reportes contradictorios, Shu-Biao Ye et al nombran a la línea SW480 como una línea celular con elevada expresión de SR1, dónde ellos mismos determinaron experimentalmente su expresión. Sin embargo, Arai N et al reportaron que SW480 carece de expresión del mRNA de ER1. Futuros ensayos para esclarecer la presencia de ESR1 en SW-480 serían de utilidad, en cualquier caso, Tam podría ejercer su mecanismo de acción mediante dichos receptores a estrógenos. Adicionalmente, como se mencionó es sabido que tamoxifeno puede tener efectos antiproliferativos independientes de su actividad antiestrogénica, por lo que en esta línea celular también podría estar ejerciendo algún efecto independiente de los estrógenos. (71,72)

No existen reportes de que Tam inhiba la viabilidad de la línea celular SW480, pero existen reportes de su actividad antiproliferativa en otras líneas de cáncer de colon (SW620, HT-29, COLO-205, SW-837), con rangos similares de actividad y concentración (0.005 µM, 0.05 µM, 0.5 µM, 5 µM, and 50 µM). (73)

Nuestros resultados muestran que Tam (CI50= 9.51; figura 9) tiene un efecto más potente sobre la viabilidad de las células SW480 que el 5-FU (CI50=75.60); con la combinación 5-FU + IC50 Tam observamos un efecto mucho mayor (CI50=17.50) que hace a las células 4.32 veces más sensibles a 5-FU. Sugiriendo que la terapia adyuvante con Tam, podría tener un impacto positivo en los pacientes.

Con respecto a la combinación de Tam con agentes quimioterapéuticos en cáncer colorrectal, existe evidencia previa de que el uso de tamoxifeno en combinación con 5-FU disminuye la resistencia hacia dicho fármaco, haciendo a las células más sensibles y por ende requiriendo concentraciones menores para ejercer un efecto citotóxico tal y como muestran los resultados obtenidos en una línea celular de cáncer de colon (Figura 9). (74) Shu-Biao Ye et al también demostraron que el silenciamiento del ER1, receptor mediante el cual tamoxifeno ejerce efectos antiestrogénicos, sensibiliza a distintas líneas celulares de cáncer de colon (HCT116, KM12, DLD1, y SW480) al tratamiento con 5-FU. La activación de la vía NF- κ B a través del receptor ER1 parece promover la resistencia a 5-FU. (71)

Se ha sugerido que las CTT son un factor importante en la resistencia a la terapia citotóxica (9). Diversos reportes de la literatura indican que 5-FU es capaz de disminuir los niveles de factores de transcripción asociados a troncalidad; SOX2, OCT4 y Nanog, esto se ha observado tanto en líneas celulares de colon como de páncreas, lo cual explicaría porque la exposición a 5-FU disminuyó el porcentaje de células GFP+ (Figura 9).

En CTT de colon (S707) se evaluaron los efectos provocados por la exposición a 5-FU y melatonina, así como su tratamiento conjunto. La administración individual de 5-FU elevó los niveles de proteínas pro-apoptóticas como BAX, la caspasa-3 o PARP-1; y se observó un aumento en la apoptosis de CTT tras el tratamiento. Aunado a esto, la expresión de SOX2, OCT4 y NANOG disminuyó de manera significativa en respuesta al tratamiento con 5-FU en comparación con el control, esto fue respaldado por ensayos de western blot así como en citometría de flujo. (75) Por otro lado, efectos similares se encontraron al exponer células PANC-1 a 5-FU: el tratamiento disminuyó la viabilidad celular, incremento la apoptosis y tuvo efectos supresores en el mantenimiento de la troncalidad

en las CTT de dicha línea celular, en todas las concentraciones evaluadas del fármaco (0.5 IC50, 1.0 IC50, y 2.0 IC50). Las células expuestas a 5-FU tuvieron una menor capacidad de formar esferoides, y los niveles de biomarcadores de troncalidad evaluados, CD44+CD133+, OCT4 y SOX2, disminuyeron significativamente en contraste con el control. (76) Esto indica que 5-FU puede suprimir y disminuir a la población troncal al atenuar la expresión de los factores de transcripción implicados en su regulación, tal y como se observa en los resultados obtenidos (Figura 10) dónde tras la exposición a 5-FU se observa una disminución en la población GFP+.

Los resultados de la exposición a Tam por 72 horas muestran un enriquecimiento de la población troncal (figura 10), en líneas celulares de cáncer de mamá se ha demostrado que Tam es capaz de promover la troncalidad a través del receptor ESR1, promoviendo la activación de diversos factores transcripcionales como la de ALDH1A1. Por tanto, Tam también podría estar activando vías de señalización que promuevan la troncalidad en células SW-480. (77) A pesar de que dicho receptor parece no expresarse en las células SW-480, el receptor presente en ellas (ESR2) bien podría activar a factores de transcripción para activar vías de señalización tal y como el ESR1. Dichos efectos pueden atribuírsele a su cascada río abajo, así como aquellos relacionados con los cambios morfológicos observados en las células; pues, tras 72 horas de exposición a las células SW-480 con tamoxifeno observamos cambios morfológicos, similares a aquellos cuando se encuentran realizando procesos de invasividad o migración. Dichos cambios bien podrían deberse a cambios en el citoesqueleto ejercidos por la acción del fármaco en las células o al cambio en la expresión en proteínas asociadas a procesos de invasividad o migración. Dicho fenómeno podría evaluarse al realizar una tinción con faloidina, compuesto que tiñe a la actina F, para determinar si la exposición a tamoxifeno tiene un papel en ello. La literatura menciona que Tam modifica la morfología de las células y el arreglo del citoesqueleto, reorganizando los filamentos intermedios y de actina. (57)

Resulta relevante el hecho de que los cambios en las mCRP y el porcentaje de células GFP+ positivas se vean alterados posterior a 72h de exposición con los fármacos y no a 24h. Esto podría deberse a que la IC50 fue determinada justamente a las 72h, y entonces para ver efectos similares a 24h se necesitaría realizar una curva concentración-

respuesta. El no tener alteraciones en los niveles de proteína a tiempos cortos, podría ser indicativo que la expresión no es producto de la recaptura o liberación de la proteína desde vesículas, sino de la alteración en cascadas de señalización. Es decir, podría deberse a cambios en la transcripción provocados por los fármacos que toman más tiempo en ser reflejados, por la activación de cascadas de señalización en respuesta a la citotoxicidad que inducen. Esto tomaría más tiempo ya que primero se necesitaría inducir la transcripción del gen, posteriormente traducir a proteína y realizar las modificaciones postraduccionales necesarias, y podría involucrar a más de una cascada de señalización.

Como se mencionó previamente, se ha reportado que CD55 tiene un papel en la autorrenovación y el control de genes asociados a pluripotencia en CTT en líneas celulares de cáncer de endometrio (78), por lo que la sobreexpresión de CD55 tras el efecto de 5-FU sobre las CTT en este modelo de cáncer colorrectal podría ser una respuesta de dicha población para sobrevivir, ya que observamos un aumento en la expresión de CD55 en la población 7-AAD- (Figura 12). Para ello deberían hacerse experimentos a tiempos más largos, en donde se evalúe si la sobreexpresión de CD55 inducida por 5-FU regula a la población troncal, mediante un ensayo de esferoides. Asimismo, para demostrar que CD46 puede tener un efecto protector sobre la viabilidad celular, puesto que su expresión en células no viables disminuye drásticamente (Figura 13), para ello se podría silenciar la expresión de dicha molécula en células viables y determinar si se vuelven más sensibles al tratamiento.

Recientemente se ha reportado a CD59 como un candidato de resistencia a la terapia con tamoxifeno en cáncer de mama. Dicha proteína se encuentra sobreexpresada en líneas celulares de cáncer de mama resistentes a tamoxifeno, y su atenuación usando un RNAi disminuye la resistencia a tamoxifeno al suprimir la proliferación celular. Esta modulación de CD59 sobre la sensibilidad a Tam está mediada por el gen anti apoptótico Bcl2. (79)

Adicionalmente, se ha reportado que el silenciamiento de CD59 en una línea celular de cáncer de colon (HT-29) incrementa su sensibilidad al tratamiento con 5-FU y

oxaliplatino, reduciendo significativamente su IC50. (80) La sobreexpresión de CD59 (Figura 11) tras la exposición al tratamiento por 72 horas podría ser un mecanismo de resistencia de las células cancerosas para evitar la muerte inducida por los tratamientos. Para ello, también sería importante evaluar los cambios en la expresión de la molécula tras exposiciones continuas al tratamiento, y si esta sobreexpresión provoca cambios en las IC50 de los fármacos, lo cual, podría asociarse con el desarrollo de resistencia hacia los mismos.

Adicionalmente, la sobreexpresión de CD55 y CD59 por 5-FU (Figura 12) pudiera ser resultado del daño que puede provocar el fármaco por la incorporación de nucleótidos alternativos al ADN, pues se ha reportado que CD55 y CD59 pueden activar vías de señalización que conducen a la reparación del daño al ADN (51).

8. CONCLUSIONES

Nuestros resultados mostraron que tamoxifeno tiene un efecto citotóxico importante en la línea SW-480; siendo más potente que el tratamiento estándar para el CRC: 5-FU. Este hallazgo sugiere que tamoxifeno podría ser utilizado en la clínica, previa a su evaluación en modelos animales y a estudios complementarios que esclarezcan el efecto que se desencadena tras la inducción de la expresión de CD55 y CD59, y la inducción de la troncalidad. Ya que nuestros resultados mostraron que aun cuando las células SW-480 expresan CD46, CD55 y en menor proporción CD59, el tratamiento con Tam y 5-FU sólo induce la expresión de CD55 y CD59.

Además, reproducimos lo reportado en la literatura para 5-FU sobre la disminución de la población troncal. La expresión de las mCRP (CD55 y CD59) al alza, tras la exposición a 5-FU, puede impactar en la eficacia de la CDC de los mAbs, por lo que experimentos futuros permitirían identificar si esta combinación terapéutica, usada con frecuencia en la clínica, es en realidad óptima.

9. REFERENCIAS

1. ¿Qué es el cáncer y cómo se desarrolla? - SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica © 2019 [Internet]. [cited 2022 May 17].

2. Rashid S. Cancer and chemoprevention: An overview. Springer Singapore; 2017. 1–173 p. Available from: 10.1007/978-981-10-2579-2
3. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2022 May 17];71(3):209–49. Available from: 10.3322/CAAC.21660
4. ESTADÍSTICAS DE DEFUNCIONES REGISTRADAS 2021 1 (PRELIMINAR).
5. Bertram JS. The molecular biology of cancer. *Mol Aspects Med* [Internet]. 2000 Dec 1 [cited 2022 May 17];21(6):167–223. Available from: 10.1016/S0098-2997(00)00007-8
6. Siddiqui IA, Sanna V, Ahmad N, Sechi M, Mukhtar H. Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2015 [cited 2022 Sep 2];1348(1):20–31. Available from: 10.1111/NYAS.12811
7. Fouad YA, Aanei C. Revisiting the hallmarks of cancer. *Am J Cancer Res* [Internet]. 2017 [cited 2022 Sep 2];7(5):1016.
8. Yu Z, Pestell TG, Lisanti MP, Pestell RG. Cancer Stem Cells. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2012 [cited 2022 May 12];44(12):2144. Available from: 10.1016/J.BIOCEL.2012.08.022
9. Velasco-Velázquez MA, Homsí N, De La Fuente M, Pestell RG. Breast Cancer Stem Cells. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2012 [cited 2022 Aug 30];44(4):573. Available from: 10.1016/J.BIOCEL.2011.12.020
10. Tu SM, Zhang M, Wood CG, Pistors LL. Stem Cell Theory of Cancer: Origin of Tumor Heterogeneity and Plasticity. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2021 Aug 2 [cited 2022 Aug 18];13(16). Available from: 10.3390/CANCERS13164006
11. Atashzar MR, Baharlou R, Karami J, Abdollahi H, Rezaei R, Pourramezan F, et al. Cancer stem cells: A review from origin to therapeutic implications. *J Cell Physiol* [Internet]. 2020 Feb 1 [cited 2022 Aug 18];235(2):790–803. Available from: 10.1002/JCP.29044
12. Bu Y, Cao D. The origin of cancer stem cells. *Front Biosci - Sch* [Internet]. 2012 Jan 1 [cited 2022 Aug 18];4 S(3):819–30. Available from: 10.2741/S302/PDF
13. Islam F, Gopalan V, Lam AKY. Cancer Stem Cells: Role in Tumor Progression

- and Treatment Resistance. *Oncogenomics*, Academic Press; 2019. p. 77–87.
Available from: 10.1016/B978-0-12-811785-9.00006-5
14. Hervieu C, Christou N, Battu S, Mathonnet M. The Role of Cancer Stem Cells in Colorectal Cancer: From the Basics to Novel Clinical Trials. *Cancers* 2021, Vol 13, Page 1092 [Internet]. 2021 Mar 4 [cited 2022 Oct 27];13(5):1092. Available from: 10.3390/CANCERS13051092
 15. Frank MH, Wilson BJ, Gold JS, Frank NY. Clinical Implications of Colorectal Cancer Stem Cells in the Age of Single-Cell Omics and Targeted Therapies. *Gastroenterology* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2022 Sep 5];160(6):1947–60. Available from: 10.1053/J.GASTRO.2020.12.080
 16. Granados-Romero JJ, Valderrama-Treviño AI, Contreras-Flores EH, Barrera-Mera B, Herrera Enríquez M, Uriarte-Ruiz K, et al. Colorectal cancer: a review. *Int J Res Med Sci* [Internet]. 2017 Oct 27 [cited 2021 Jun 28];5(11):4667. Available from: 10.18203/2320-6012.ijrms20174914
 17. Kashida H, Takeuchi T, Kurahashi T, Fukami N, Yamamura F, Ohtsuka K, et al. Diagnosis and Treatment of T1 Colorectal Cancer. *Gastrointest Endosc* [Internet]. 2004 Apr 1 [cited 2022 Aug 16];59(5):P276. Available from: 10.1016/S0016-5107(04)01220-9
 18. Alvarez Lorenzo S, Salinas Jazmín N. Relación entre la expresión proteínas inhibidoras de complemento y la eficacia de anticuerpos terapéuticos en cáncer colorrectal. *Farmacología* [Internet]. 2022 [cited 2022 Nov 23];4–21.
 19. Müller MF, Ibrahim AEK, Arends MJ. Molecular pathological classification of colorectal cancer [Internet]. Vol. 469, *Virchows Archiv*. Springer Verlag; 2016 [cited 2021 Jun 28]. p. 125–34. Available from: 10.1007/s00428-016-1956-3
 20. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018 Nov;68(6):394–424.
 21. Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, Kasi PM, Wallace MB. Colorectal cancer. Vol. 394, *The Lancet*. Lancet Publishing Group; 2019. p. 1467–80. Available from: 10.1016/S0140-6736(19)32319-0
 22. Pública IN de S. Cáncer de colon y recto [Internet]. [cited 2022 Sep 4].

23. Suetsugu T, Mori R, Futamura M, Fukada M, Tanaka H, Yasufuku I, et al. Mechanism of acquired 5FU resistance and strategy for overcoming 5FU resistance focusing on 5FU metabolism in colon cancer cell lines. *Oncol Rep* [Internet]. 2021 Apr 1 [cited 2022 Aug 25];45(4):1–8. Available from: 10.3892/OR.2021.7978/HTML
24. Munro MJ, Wickremesekera SK, Peng L, Tan ST, Itinteang T. Cancer stem cells in colorectal cancer: a review. *J Clin Pathol* [Internet]. 2018 Feb 1 [cited 2022 Sep 5];71(2):110–6. Available from: 10.1136/JCLINPATH-2017-204739
25. Zhou Y, Xia L, Wang H, Oyang L, Su M, Liu Q, et al. Cancer stem cells in progression of colorectal cancer. *Oncotarget* [Internet]. 2018 Sep 9 [cited 2022 Sep 5];9(70):33403. Available from: 10.18632/ONCOTARGET.23607
26. Sawicki T, Ruskowska M, Danielewicz A, Niedźwiedzka E, Arłukowicz T, Przybyłowicz KE. A Review of Colorectal Cancer in Terms of Epidemiology, Risk Factors, Development, Symptoms and Diagnosis. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2021 Sep 20];13(9). Available from: 10.3390/CANCERS13092025
27. García-Foncillas J, Sunakawa Y, Aderka D, Wainberg Z, Ronga P, Witzler P, et al. Distinguishing Features of Cetuximab and Panitumumab in Colorectal Cancer and Other Solid Tumors. Vol. 9, *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A.; 2019. Available from: 10.3389/fonc.2019.00849
28. Xie YH, Chen YX, Fang JY. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer [Internet]. Vol. 5, *Signal Transduction and Targeted Therapy*. Springer Nature; 2020 [cited 2021 Jun 28]. p. 1–30. Available from: 10.1038/s41392-020-0116-z
29. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 2003 35 [Internet]. 2003 May [cited 2022 Feb 5];3(5):330–8. Available from: 10.1038/nrc1074
30. Seetharam RN, Sood A, Goel S. Oxaliplatin: pre-clinical perspectives on the mechanisms of action, response and resistance. *Ecancermedalscience* [Internet]. 2009 Sep 24 [cited 2022 Aug 26];3(1). Available from: 10.3332/ECANCER.2009.153

31. Bao X, Wu J, Kim S, LoRusso P, Li J. Pharmacometabolomics Reveals Irinotecan Mechanism of Action in Cancer Patients. *J Clin Pharmacol* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2022 Aug 26];59(1):20. Available from: 10.1002/JCPH.1275
32. Geller A, Yan J. The role of membrane bound complement regulatory proteins in tumor development and cancer immunotherapy. *Front Immunol*. 2019;10(MAY):1–13. Available from: 10.3389/fimmu.2019.01074
33. Reis ES, Mastellos DC, Ricklin D, Mantovani A, Lambris JD. Complement in cancer: untangling an intricate relationship. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2022 Aug 31];18(1):5. Available from: 10.1038/NRI.2017.97
34. Morgan BP, Harris CL. Complement regulatory proteins. Academic Press; 1999. 382 p. Available from: 10.1016/B978-012506965-6/50000-3
35. Elvington M, Liszewski MK, Atkinson JP. CD46 and Oncologic Interactions: Friendly Fire against Cancer. *Antibodies* [Internet]. 2020 Nov 2 [cited 2021 May 24];9(4):59. Available from: 10.3390/antib9040059
36. Christy JM, Toomey CB, Cauvi DM, Pollard KM. Decay-Accelerating Factor. In: *The Complement FactsBook: Second Edition*. Elsevier; 2018. p. 261–70. Available from: 10.1016/B978-0-12-810420-0.00025-0
37. Dho SH, Lim JC, Kim LK. Beyond the role of CD55 as a complement component [Internet]. Vol. 18, *Immune Network*. Korean Association of Immunologists; 2018 [cited 2021 Jun 28]. Available from: 10.4110/in.2018.18.e11
38. Durrant LG, Chapman MA, Buckley DJ, Spendlove I, Robins RA, Armitage NC. Enhanced expression of the complement regulatory protein CD55 predicts a poor prognosis in colorectal cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2003 5210 [Internet]. 2003 Jun 14 [cited 2021 Aug 16];52(10):638–42. Available from: 10.1007/S00262-003-0402-Y
39. Thorsteinsson L, O'Dowd GM, Harrington PM, Johnson PM. The complement regulatory proteins CD46 and CD59, but not CD55, are highly expressed by glandular epithelium of human breast and colorectal tumour tissues. *APMIS* [Internet]. 1998 Jul 1 [cited 2021 Jun 28];106(9):869–78. Available from: 10.1111/j.1699-0463.1998.tb00233.x
40. Morgan P. CD59. In: *The Complement FactsBook: Second Edition*. Elsevier;

2018. p. 361–7. Available from: 10.1016/B978-0-12-810420-0.00034-1
41. Zhang R, Liu Q, Liao Q, Zhao Y. CD59: a promising target for tumor immunotherapy. <https://doi.org/10.2217/fon-2017-0498> [Internet]. 2018 Mar 9 [cited 2021 Aug 30];14(8):781–91. Available from: 10.2217/FON-2017-0498
 42. Ouyang Q, Zhang L, Jiang Y, Ni X, Chen S, Ye F, et al. The membrane complement regulatory protein CD59 promotes tumor growth and predicts poor prognosis in breast cancer. *Int J Oncol* [Internet]. 2016 May 1 [cited 2021 Aug 30];48(5):2015–24. Available from: 10.3892/IJO.2016.3408
 43. Zhou Y, Chu L, Wang Q, Dai W, Zhang X, Chen J, et al. CD59 is a potential biomarker of esophageal squamous cell carcinoma radioresistance by affecting DNA repair. *Cell Death Dis*. 2018 Sep 1;9(9). Available from: 10.1038/s41419-018-0895-0
 44. Liszewski MK, Atkinson JP. Membrane Cofactor Protein. In: *The Complement FactsBook: Second Edition*. Elsevier; 2018. p. 271–81. Available from: 10.1016/B978-0-12-810420-0.00026-2
 45. Wilczek E, Wasitynski A, Wilczynski GM, Sladowski D, Gornicka B. The expression of membranous complement inhibitors CD46, CD55 and CD59 in the primary and metastatic colon cancer cell lines derived from the same patient. *Cent J Immunol*. 2013;38(4):549–55. Available from: 10.5114/ceji.2013.39774
 46. Bao D, Zhang C, Li L, Wang H, Li Q, Ni L, et al. Integrative Analysis of Complement System to Prognosis and Immune Infiltrating in Colon Cancer and Gastric Cancer. *Front Oncol* [Internet]. 2021 Feb 3 [cited 2021 Jun 28];10:3244. Available from: 10.3389/fonc.2020.553297
 47. Watson NFS, Durrant LG, Madjd Z, Ellis IO, Scholefield JH, Spendlove I. Expression of the membrane complement regulatory protein CD59 (protectin) is associated with reduced survival in colorectal cancer patients. In: *Cancer Immunology, Immunotherapy* [Internet]. *Cancer Immunol Immunother*; 2006 [cited 2021 Jun 28]. p. 973–80. Available from: 10.1007/s00262-005-0055-0
 48. Dho SH, Cho EH, Lee JY, Lee SY, Jung SH, Kim LK, et al. A novel therapeutic anti-CD55 monoclonal antibody inhibits the proliferation and metastasis of colorectal cancer cells. *Oncol Rep* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2021 Jun

- 28];42(6):2686–93. Available from: 10.3892/or.2019.7337
49. Gelderman KA, Kuppen PJK, Bruin W, Fleuren GJ, Gorter A. Enhancement of the complement activating capacity of 17-1A mAb to overcome the effect of membrane-bound complement regulatory proteins on colorectal carcinoma. *Eur J Immunol.* 2002;32(1):128-135. Available from:10.1002/1521-4141(200201)32:1<128::AID-IMMU128>3.0.CO;2-P
 50. Li L, Spendlove I, Morgan J, Durrant LG. CD55 is over-expressed in the tumour environment. *Br J Cancer [Internet].* 2001 Jan 1 [cited 2021 Jun 28];84(1):80–6. Available from: 10.1054/bjoc.2000.1570
 51. Montalvo-Castro RE, Salinas-Jazmín N. Relationship between the expression of complement inhibitory proteins and therapeutic efficacy of antibodies in breast cancer. *Gac Mex [Internet].* 2022 Jul 27 [cited 2022 Aug 28];158(3). Available from: 10.24875/GMM.M22000657
 52. Mikesch JH, Schier K, Roetger A, Simon R, Buerger H, Brandt B. The expression and action of decay-accelerating factor (CD55) in human malignancies and cancer therapy. *Cell Oncol [Internet].* 2006 [cited 2021 Sep 13];28:223–32. Available from: 10.1155/2006/814816
 53. Maclejczyk A, Szlachowska J, Szynglarewicz B, Szulc R, Szulc A, Wysocka T, et al. CD46 expression is an unfavorable prognostic factor in breast cancer cases. *Appl Immunohistochem Mol Morphol [Internet].* 2011 Dec [cited 2021 Aug 16];19(6):540–6. Available from: 10.1097/PAI.0B013E31821A0BE9
 54. Modest DP, Pant S, Sartore-Bianchi A. Treatment sequencing in metastatic colorectal cancer [Internet]. Vol. 109, *European Journal of Cancer.* Elsevier Ltd; 2019 [cited 2021 Jun 28]. p. 70–83. Available from: 10.1016/j.ejca.2018.12.019
 55. Lu Z, Zhang C, Cui J, Song Q, Wang L, Kang J, et al. Bioinformatic analysis of the membrane cofactor protein CD46 and microRNA expression in hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep [Internet].* 2014 Feb [cited 2021 Aug 16];31(2):557. Available from: 10.3892/OR.2013.2877
 56. Kuruppu D, Christophi C, Bertram JF, O'Brien PE. Tamoxifen inhibits colorectal cancer metastases in the liver: a study in a murine model. *J Gastroenterol Hepatol [Internet].* 1998 [cited 2022 May 13];13(5):521–7. Available from:

10.1111/J.1440-1746.1998.TB00680.X

57. Kellen JA, editor. Tamoxifen. 1996 [cited 2022 Oct 7]; Available from: 10.1007/978-1-4612-4092-1
58. Golay J, Taylor RP. The Role of Complement in the Mechanism of Action of Therapeutic Anti-Cancer mAbs. *Antibodies* [Internet]. 2020 Oct 28 [cited 2021 Jun 28];9(4):58. Available from: 10.3390/antib9040058
59. Gelderman KA, Tomlinson S, Ross GD, Gorter A. Complement function in mAb-mediated cancer immunotherapy. Vol. 25, *Trends in Immunology*. Elsevier Ltd; 2004. p. 158–64. Available from: 10.1016/j.it.2004.01.008
60. Gelderman KA, Kuppen PJK, Bruin W, Fleuren GJ, Gorter A. Enhancement of the complement activating capacity of 17-1A mAb to overcome the effect of membrane-bound complement regulatory proteins on colorectal carcinoma. *Eur J Immunol* [Internet]. 2002 [cited 2021 Jun 28];32(1):128–35. Available from: 10.1002/1521-4141
61. Wilczek E, Wasiutynski A, Wilczynski GM, Sladowski D, Gornicka B. Comparison of the expression of complement regulatory proteins CD46, CD55 and CD59 in primary colon cancer and synchronous/ metachronous liver metastases. *Cent J Immunol*. 2013;38(4):543–8. Available from: 10.5114/ceji.2013.39773
62. Sivasankar B, Longhi MP, Gallagher KME, Betts GJ, Morgan BP, Godkin AJ, et al. CD59 Blockade Enhances Antigen-Specific CD4 + T Cell Responses in Humans: A New Target for Cancer Immunotherapy? . *J Immunol* [Internet]. 2009 May 1 [cited 2021 Jun 28];182(9):5203–7. Available from: 10.4049/jimmunol.0804243
63. H Y, C L, S W, Q G, X R, G J. Silencing of CD59 enhanced the sensitivity of HT29 cells to 5-Fluorouracil and Oxaliplatin. *J Infect Chemother* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2021 Aug 16];21(1):8–15. Available from: 10.1016/J.JIAC.2014.08.020
64. Tang B, Raviv A, Esposito D, Flanders KC, Daniel C, Nghiem BT, et al. A Flexible Reporter System for Direct Observation and Isolation of Cancer Stem Cells. *Stem Cell Reports* [Internet]. 2015 Jan 13 [cited 2022 May 12];4(1):155. Available from: 10.1016/J.STEMCR.2014.11.002
65. Chenyin Yang, Jones JL, Barnum SR. Expression of decay-accelerating factor

- (CD55), membrane cofactor protein (CD46) and CD59 in the human astrogloma cell line, D54-MG, and primary rat astrocytes. *J Neuroimmunol* [Internet]. 1993 Sep 1 [cited 2022 Sep 29];47(2):123–32. Available from: 10.1016/0165-5728(93)90022-Q
66. Wilczek E, Wasiutynski A, Wilczynski GM, Sladowski D, Gornicka B. The expression of membranous complement inhibitors CD46, CD55 and CD59 in the primary and metastatic colon cancer cell lines derived from the same patient. *undefined*. 2013;38(4):549–55.
 67. Shakery A, Pourvali K, Ghorbani A, Fereidani SS, Zand H. Beta-Hydroxybutyrate Promotes Proliferation, Migration and Stemness in a Subpopulation of 5FU Treated SW480 Cells: Evidence for Metabolic Plasticity in Colon Cancer. *Asian Pacific J Cancer Prev* [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2022 Oct 6];19(11):3287–94. Available from: 10.31557/APJCP.2018.19.11.3287
 68. Zhu Y, Li K, Zhang J, Wang L, Sheng L, Yan L. Inhibition of CDK1 Reverses the Resistance of 5-Fu in Colorectal Cancer. *Cancer Manag Res* [Internet]. 2020 [cited 2022 Oct 6];12:11271. Available from: 10.2147/CMAR.S255895
 69. Fluorouracil (5-Fluorouracil, 5-FU) | ≥99%(HPLC) | Selleck | DNA/RNA Synthesis inhibitor [Internet]. [cited 2022 Oct 6].
 70. Egusquiza-Alvarez CA, Castañeda-Patlán MC, Albarran-Gutierrez S, Gonzalez-Aguilar H, Moreno-Londoño AP, Maldonado V, et al. Overexpression of Multifunctional Protein p32 Promotes a Malignant Phenotype in Colorectal Cancer Cells. *Front Oncol* [Internet]. 2021 May 31 [cited 2022 Nov 23];11. Available from: 10.3389/FONC.2021.642940/FULL
 71. Ye SB, Cheng YK, Deng R, Deng Y, Li P, Zhang L, et al. The Predictive Value of Estrogen Receptor 1 on Adjuvant Chemotherapy in Locally Advanced Colorectal Cancer: A Retrospective Analysis With Independent Validation and Its Potential Mechanism. *Front Oncol*. 2020 Mar 20;10:214. Available from: 10.3389/fonc.2020.00214
 72. Arai N, Ström A, Rafter JJ, Gustafsson JÅ. Estrogen receptor beta mRNA in colon cancer cells: growth effects of estrogen and genistein. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2000 Apr 13 [cited 2022 Oct 7];270(2):425–31. Available

from: 10.1006/BBRC.2000.2444

73. Y Ziv 1, M K Gupta, J W Milsom, A Vladislavljevic, K Kitago VWF. The effect of tamoxifen on established human colorectal cancer cell lines in vitro - PubMed. *Antican* [Internet]. 1996 [cited 2022 Oct 6];6B.
74. Congyao L. The effects of tamoxifen combining with chemotherapy in human colorectal carcinoma cell line SW480, HT29. undefined. 2003;
75. Lee JH, Yun CW, Han YS, Kim SM, Jeong D, Kwon HY, et al. Melatonin and 5-fluorouracil co-suppress colon cancer stem cells by regulating cellular prion protein-Oct4 axis. *J Pineal Res* [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2022 May 18];65(4). Available from: 10.1111/JPI.12519
76. Zhao J, Shi X, Dong C, Liu R, Su L, Cao C. 5-fluorouracil suppresses stem cell-like properties by inhibiting p38 in pancreatic cancer cell line PANC-1. *Folia Histochem Cytobiol* [Internet]. 2022 Mar 16 [cited 2022 May 18];60(1):55–65. Available from: 10.5603/FHC.A2022.0004
77. Kalyanaraman A, Gnanasampanthapandian D, Shanmughan P, Kishore P, Ramalingam S, Arunachalam R, et al. Tamoxifen induces stem-like phenotypes and multidrug resistance by altering epigenetic regulators in ER α + breast cancer cells. *Stem Cell Investig* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2022 Sep 29];7. Available from: 10.21037/SCI-2020-020
78. Saygin C, Wiechert A, Rao, Alluri R, Connor E, Thiagarajan PS, et al. CD55 regulates self-renewal and cisplatin resistance in endometrioid tumors. *J Exp Med* [Internet]. 2017 [cited 2021 Aug 14];214(9):2715–32. Available from: 10.1084/JEM.20170438
79. Xiong H, Jin X, You C. Expression of the CD59 Glycoprotein Precursor is Upregulated in an Estrogen Receptor-alpha (ER- α)-Negative and a Tamoxifen-Resistant Breast Cancer Cell Line In Vitro. *Med Sci Monit* [Internet]. 2018 Nov 4 [cited 2022 Sep 29];24:7883. Available from: 10.12659/MSM.910647
80. Yin H, Li C, Wang S, Guo Q, Ren X, Jiang G. Silencing of CD59 enhanced the sensitivity of HT29 cells to 5-Fluorouracil and Oxaliplatin. *J Infect Chemother*. 2015 Jan 1;21(1):8–15. Available from: 10.1016/J.JIAC.2014.08.020

APÉNDICE

El presente apéndice se incluye para dar una explicación más profunda a la determinación del nivel de expresión de CD55 en membrana e intracelular. (Figura 14)

En un inicio se pensó que tras el proceso de fijado y permeabilización se perdía la unión del anticuerpo a las proteínas localizadas en membrana, pues en el inserto del anticuerpo, proporcionado por el proveedor se recomienda teñir antes de fijar

(<https://www.miltenyibiotec.com/US-en/products/cd55-daf-antibody-anti-human-reafinity-rea1231.html#pe:100-tests-in-200-ul>) y es un hecho reportado para diversas

proteínas de membrana que fijar puede afectar la unión con el anticuerpo. Por ello, para

obtener la señal intracelular únicamente se añadía el anticuerpo al final del proceso de

fijado y permeabilización (Tabla 7). Sin embargo, pesar de que la IMF en fresco

(SFCD55) es mayor a la del anticuerpo tras fijar (FCD55), y aún mucho mayor tras fijar y

permeabilizar (FPCD55), la IMF sigue siendo alta y lejana al 0. Es decir, la unión del

anticuerpo a CD55 no se pierde por completo tras fijar y permeabilizar, por ello, para

obtener los niveles de CD55 intracelulares fue necesario seguir otra serie de pasos, lo

cual se describe a continuación.

Para cuantificar los niveles de CD55 intracelular y de membrana se siguieron diferentes

condiciones experimentales. Primero realizamos una tinción en fresco (tabla 7; SFCD55)

y realizamos nuestra adquisición en el citómetro (Figura 14; histograma verde claro).

Posteriormente para identificar si la señal se modificaba tras fijar, se colocó el anticuerpo

y después fijamos las células (Figura 14; histograma verde fuerte. Tabla 7; FCD55). Es

notorio que la señal sí se reduce. Además, la señal se reduce aún más cuando se agrega

el anticuerpo, se fija, y después se permeabiliza (Figura 14; histograma azul oscuro.

Tabla 7; FPCD55).

Decidimos comparar la señal para CD55 en células a las cuales se les agregó el anticuerpo después de fijar y permeabilizar, y a las que se les agrega antes y después.

Con esta serie de combinaciones para cuantificar la señal de la tinción en membrana,

demostramos que la señal tiende a disminuir con el proceso de fijado. Por esta razón las

determinaciones en membrana siempre se realizaron en fresco, y por ello además se

decidió que para obtener los niveles intracelulares de CD55, sería necesario restar

COMCD55 de FPCD55 (ver tabla 7), puesto que la señal de CD55 IC estaría representando la unión al anticuerpo de proteínas intracelulares, pero también de la proteína en membrana.

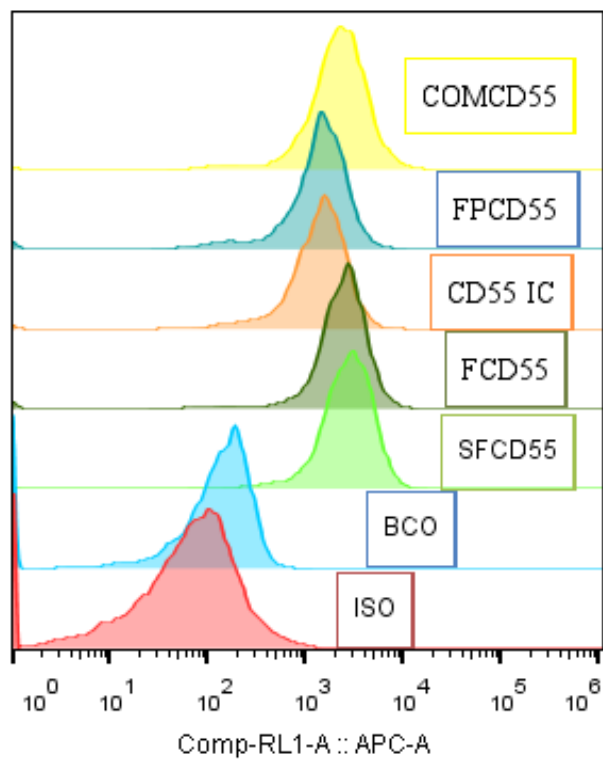


Figura 14. Comparación entre condiciones de tinción. Se comparan los niveles de expresión de la molécula CD55 en membrana e intracelular en distintas condiciones.

Condición	Anticuerpo	Fijado	Permeabilización	Anticuerpo	IMF
COMCD55	✓	✓	✓	✓	1899
FPCD55	✓	✓	✓	-	1180
CD55 IC	-	✓	✓	✓	1248
FCD55	✓	✓	-	-	2081
SFCD55	✓	-	-	-	2488
BCO	-	-	-	-	81
ISO	✓	-	-	-	6

Tabla 7. Diferentes condiciones experimentales para CD55 y su valor de IMF.

COMCD55 (tinción completa); FPCD55 (fijado y permeabilizado); CD55 IC (intracelular); FCD55 (fijado); SFCD55 (sin fijar); BCO (blanco); ISO (isotipo)