



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**Productos excretados/secretados de *Taenia crassiceps* como adyuvante al 5-Fluorouracilo, y su efecto regulador sobre la expresión de P53 y P21 en el tratamiento de Cáncer de colon asociado a colitis.**

TESIS

Para obtener el grado de

**LICENCIADA EN BIOLOGÍA**

Que presenta

**DANIELA MEDINA REYES**

**TUTORA DE TESIS:**

**DRA. MONICA GRACIELA MENDOZA RODRIGUEZ**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM.

**ASESORES DE TESIS:**

**DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDÉS**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM.

**DR. JOSE LUIS REYES HERNÁNDEZ**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM.

**DRA. VERONICA GARCIA CASTILLO**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM.

**DR. ELOY ANDRÉS PEREZ YEPEZ**  
Instituto Nacional de Cancerología



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.

## **Agradecimientos Institucionales**

Agradecimiento al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), por la beca brindada a la alumna Daniela Medina Reyes con Número de CVU 1190452 para la realización del trabajo de tesis.

El trabajo de esta tesis fue apoyado y financiado por los siguientes proyectos:

Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos de Personal Académico (IA206421), Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (FICDTEM- 2021-01-088). Programa de Apoyo a Profesores de Carrera (PAPCA), (FESI-DIP-PAPCA-2022-38) y Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CF-2023-I- 563).

## **Agradecimientos**

Primeramente, quiero agradecer a mi familia por el apoyo incondicional.

A mi madre Ana por siempre ser un ejemplo a seguir y por las aspiraciones que tengo en la vida gracias a ella.

A mi padre Daniel por enseñarme que siendo constante y perseverante puedo lograr todo lo que me proponga.

A mi hermana Hanna que siempre fue mi pilar y mi fuerza para seguir adelante.

A mi novio David por siempre creer en mí, aconsejarme y nunca dejar que me rinda.

A mi mejor amigo Jorge por ser tan incondicional.

Al Dr. Terrazas por apoyarme en la realización de este proyecto.

A la Dra. Mónica por guiarme durante todo este proceso, así como compartirme todo su conocimiento y enseñarme todo lo que se.

A mis compañeros y amigos de laboratorio Ángel, Vane y Damián por los buenos ratos que pasamos y hacerme el trabajo en el laboratorio más ameno, así como por su ayuda intelectual.

Al Dr. José Luis y los integrantes de su laboratorio siempre tener las puertas abiertas para mí, por sus buenas charlas y su buena vibra siempre.

A la Dra. Yadira por su atención y ayuda siempre que lo necesite.

Y finalmente a toda mi familia y amigos que si los nombro no terminaría, pero que saben que estuvieron ahí siempre apoyándome y que tienen un gran lugar en mi corazón.

|

|

---

## ÍNDICE

Índice de Figuras.....	6
Índice de tablas.....	7
1. RESUMEN.....	9
2. Introducción.....	11
2.1. Epidemiología del cáncer colorrectal.....	11
2.2. Factores de riesgo.....	12
2.3. Patogénesis del CCR.....	13
2.4. Cáncer de colon asociado a colitis.....	14
2.5. Tratamiento en el cáncer colorrectal.....	18
2.5.1. 5-Fluorouracilo.....	19
2.5.2. Mecanismo de acción.....	20
2.5.3. Quimio resistencia.....	21
2.6. Ciclo celular y cáncer.....	22
2.6.1. P21.....	23
2.6.2. P53.....	24
2.7. Nuevas terapias en el tratamiento del CCR.....	25
2.7.1. Taenia crassiceps y CAC.....	26
2.8. Uso de moléculas excretadas/secretadas por helmintos .....	27
3. JUSTIFICACION.....	29
4. HIPOTESIS.....	30
5. OBJETIVOS.....	31
5.1. Objetivo general.....	31
5.2. Objetivos particulares.....	31
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32

5.3.	Ratones.....	32
5.4.	Obtención de TcES.....	32
5.5.	Inducción de CAC.....	33
5.6.	Análisis histológico y Procesamiento de tejido.....	34
5.7.	Tinción Hematoxilina/Eosina.....	34
5.8.	Inmunohistoquímica.....	35
5.9.	Western blot.....	35
5.10.	Extracción de RNA y RT-PCR.....	36
5.11.	Análisis estadísticos.....	38
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>
<b>7.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>49</b>
<b>8.</b>	<b>CONCLUSIÓN.....</b>	<b>54</b>
<b>9.</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>55</b>
<b>10.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>56</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tasas de incidencia estandarizadas

Figura 2. Esquema de los principales factores de riesgo del cáncer colorrectal.

Figura 3. Etapas y desarrollo del cáncer colorrectal (CCR).

Figura 4. Disbiosis microbiana intestinal

Figura 5. Estadios del cáncer colorrectal.

Figura 6. Colectomía parcial de colon.

Figura 7. Metabolismo y mecanismo de acción del 5-FU.

Figura 8. Inducción de CAC en modelo murino, uso de AOM/DSS.

Figura 9. Imágenes representativas del sangrado rectal en ratones inducidos a CAC.

Figura 10. Colón obtenido de ratones inducidos a CAC con diferentes tratamientos y grupo control libre de CAC

Figura 11. Imágenes de tejidos de colon teñidos con Hematoxilina & Eosina.

Figura 12. Expresión relativa de los genes *Il-10*, *Tgf-β*, *Tnf-α* e *IL-17a*.

Figura 13. Evaluación de los niveles de expresión de la proteína P53 en extracto de proteína total obtenidos de los de los diferentes grupos de tratamientos.

Figura 14. Tinción de inmunohistoquímica para las proteínas P 53, P21 y MDM2 en tejidos de colon obtenidos de grupo de animales Control, CAC, 5FU, TcES y TcES+5-FU.

Figura 15. Graficas representativas del porcentaje de expresión de P53,P21 y MDM2 en tejidos de los diferentes grupos de animales inducidos a CAC, con y sin tratamiento y grupo control.

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Lista de anticuerpos utilizados.

**Tabla 2.** Secuencia de oligonucleótidos utilizados para identificación de los genes *Tgf $\beta$* , *Tnfa*, *Il17a* e *Il10* mediante PCR en tiempo real.



## 1. Resumen

El cáncer colorrectal (CCR) es una de las neoplasias más letales en todo el mundo. La resistencia al 5-Fluorouracilo (5-FU), principal quimioterapéutico, es una de las causas de los altos índices de mortalidad. Los mecanismos de resistencia involucran la alteración de diferentes genes, dentro de los que se encuentran el gen *TP53* que codifica para la proteína P53, proteína clave en la regulación de diversos procesos fundamentales en las células, como apoptosis y regulación del ciclo celular, esto a través de la regulación de proteínas como P21, entre otros. Alteraciones en los niveles de expresión de P53 y mutaciones, son eventos frecuentes en el CCR. Compuestos que favorezcan la regulación positiva de esta proteína, podrían ser una alternativa viable en el tratamiento en este tipo de neoplasia. Recientemente nosotros demostramos que moléculas derivadas del parásito *Taenia crassiceps* (TcES), tienen capacidad antiinflamatoria y antitumoral, cuando son utilizados como terapia profiláctica. En este trabajo, ahora nosotros evaluamos un posible efecto adyuvante de los TcES al 5-FU en tumores ya establecidos en un modelo de cáncer de colon asociado a colitis (CAC). Los resultados obtenidos indican que el uso de los TcES potencian el efecto del 5-FU en tumores de colon, al regular negativamente la expresión de citocinas inmunorreguladoras, como Il-10 y Tgf- $\beta$ , y de citocinas proinflamatorias, como Tnf- $\alpha$  e Il-17a. -Adicionalmente se observó un incremento en la muerte de las células tumorales en los tejidos del grupo de animales tratados con la terapia combinada de TcES+5-FU, lo cual se asocia con la regulación positiva en la expresión de las proteínas P53 y P21 y una marcada

disminución en los niveles de expresión de la proteína MDM2, principal regulador negativo de P53.

Nuestros hallazgos demuestran, por primera vez, que los productos excretados/secretados por *T.crapssiceps* pueden potenciar el efecto del 5-FU en los tumores de colon establecidos.

|

## 2. Introducción

### 2.1. Cáncer Colorrectal Epidemiología

El CCR es una de las neoplasias con mayor incidencia y letalidad en el mundo, representa un problema de salud pública a nivel mundial. Aproximadamente se diagnostican 134, 490 casos nuevos por año [1]. En México este panorama no es muy diferente, representa uno de los principales tipos de cáncer tanto en mortalidad como incidencia. En hombres es la segunda causa de muerte por cáncer, tan solo por debajo de los datos reportados para cáncer de próstata y en mujeres se encuentra como el cuarto tipo de cáncer más letal (Figura 1A y 1B).

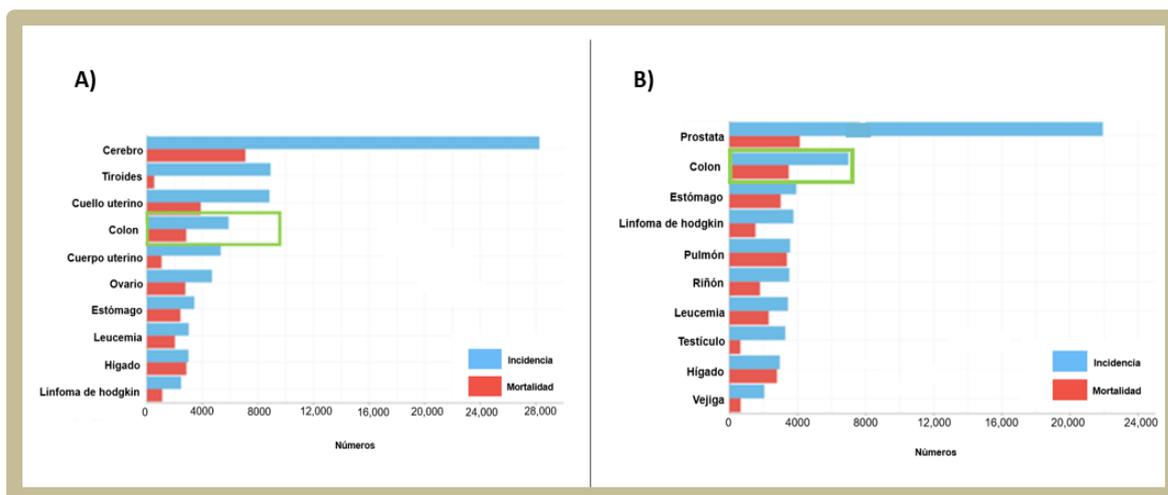


Figura 1. Número estimado de incidencia y mortalidad en diferentes neoplasias en México. (A) Datos correspondientes a la población femenina. (B) Datos correspondientes a población masculina. Barras en color azul representan incidencia, barras en color rojo los datos obtenidos para mortalidad. Cuadro en color verde indica los datos reportados en incidencia y mortalidad para el CCR en México [1].

## 2.2. Factores de riesgo

El cáncer colorrectal es una enfermedad multifactorial. Los factores de riesgo asociados al desarrollo de esta neoplasia se pueden clasificar en factores modificables y no modificables. Dentro de los factores de tipo modificables se encuentran el consumo de alimentos altos en grasas, baja ingesta en fibra, sedentarismo, consumo de tabaco, alcohol y obesidad (Figura 2). Los factores de riesgo de tipo no modificables incluyen antecedentes familiares de cáncer de colon, síndrome de poliposis adenomatosa familiar (PAF), síndrome de Lynch, conocido como cáncer colorrectal hereditario no polipósico y antecedente de enfermedades inflamatorias intestinales (EII) como la colitis ulcerativa y enfermedad de Crohn [2]. La colitis ulcerativa es una enfermedad que se caracteriza por un estado inflamatorio en el colon y el recto, cuando la inflamación se vuelve crónica, se incrementa el riesgo al desarrollo de cáncer de colon asociado a colitis (CAC), que es un tipo de cáncer colorrectal [3]. En esta enfermedad se genera un ambiente que supera los mecanismos de vigilancia inmunológica y crea un microambiente que favorece la inhibición de las respuestas inmunitarias antitumorales, generando diversas alteraciones a nivel celular y molecular que llevan al establecimiento y crecimiento de las células cancerosas [4].

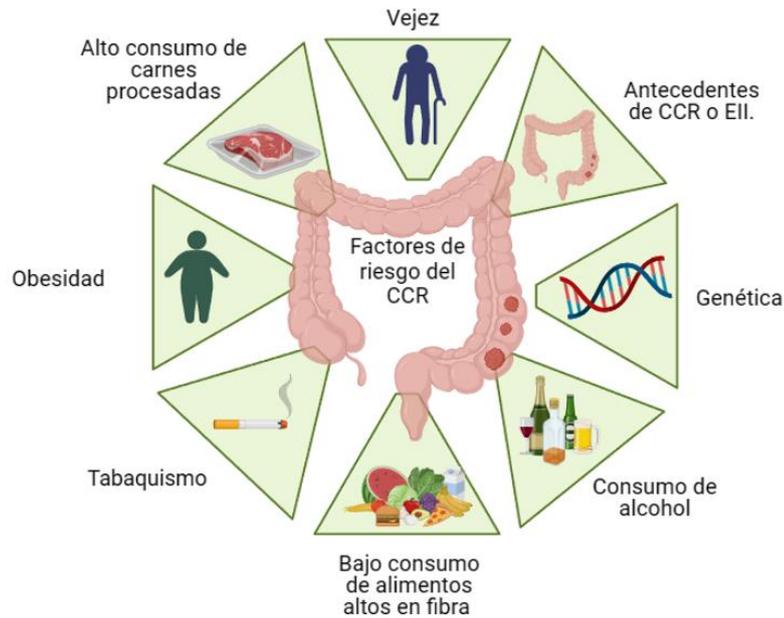


Figura 2. Esquema de los principales factores de riesgo modificables y no modificables del cáncer colorrectal.

### 2.3. Patogénesis del CCR

El desarrollo del cáncer colorrectal comienza en el momento en que las células epiteliales presentan cambios genéticos o epigenéticos, que se establecen y que finalmente desencadenan en la alteración de procesos celulares fundamentales en la homeostasis celular como es la proliferación, que se incrementa [5]. En el desarrollo del CCR, estas células de rápido crecimiento, con el paso del tiempo, pueden formar adenomas benignos y progresar a cáncer. Cuando el cáncer no es detectado a tiempo, finalmente esto puede llevar a la metástasis través de diferentes vías [6]. En CCR de tipo esporádico se sabe que la primera mutación principalmente se da en el gen APC, posteriormente en los genes de KRAS y BRAF, las alteraciones

en estas moléculas llevan a modificación en las funciones de las proteínas CDC4, SMAD4, TGFBR2 y finalmente en TP53 y BAX (Figura 3).

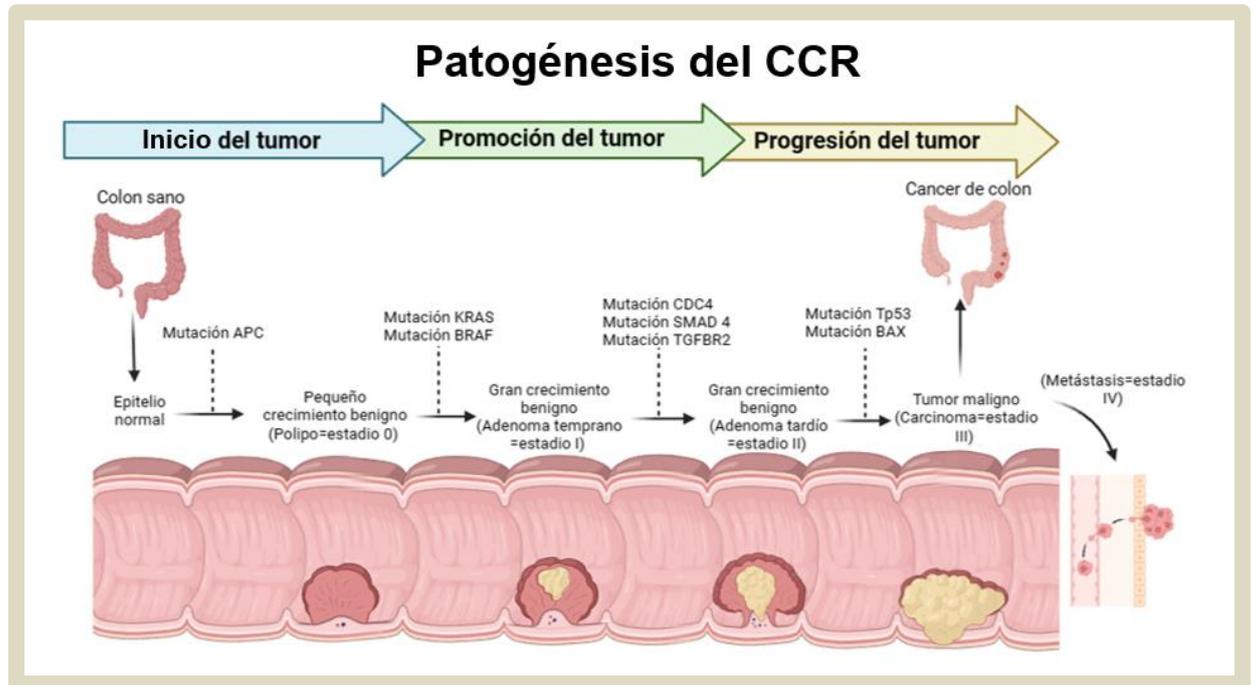


Figura 3. Etapas y desarrollo del cáncer colorrectal (CCR). Hay cuatro etapas en el desarrollo de la carcinogénesis del CCR: inicio, promoción, progresión y metástasis.

## 2.4. Cáncer de colon asociado a colitis

El cáncer de colon asociado a colitis es una neoplasia que se desencadena a partir de la inflamación constante del intestino [7]. Pacientes con enfermedades inflamatorias intestinales como la enfermedad de Crohn (CD) y la colitis ulcerativa (CU) tienen entre un 10 a 20% de mayor probabilidad de desarrollar CCR. Estas enfermedades se caracterizan por una inflamación crónica recurrente con episodios de remisión y reincidencia. Estudios epidemiológicos muestran que la CU incrementa hasta un 20% la probabilidad

de desarrollar CCR debido a diferentes mediadores inflamatorios presentes como el factor de transcripción  $\text{NFK}\beta$  y citocinas inflamatorias como IL-17a, IL-6,  $\text{TNF-}\alpha$  (Figura4) [8,9]. La disbiosis de la microbiota intestinal es uno de los ejemplos de los procesos que pueden generar una inflamación crónica en el intestino. Como se observa en la figura 4, la alteración en las bacterias residentes en colon por bacterias patógenas conlleva a la liberación de moléculas genotóxicas que producen especies reactivas de oxígeno (ROS), que dañan el material genético del hospedero. La translocación de las bacterias de la barrera epitelial desencadena una respuesta inmune de tipo inflamatoria, produciendo la liberación de moléculas como iNOS, Arginasa 1,  $\text{TGF}\beta$ , IL-6, por las células del sistema inmune presentes. Este proceso de disbiosis finalmente desencadena el encendido de vías involucradas en el incremento de la proliferación celular como  $\text{Nfk}\beta$ , ERK, PI3K y AKT y activación de células del sistema inmune que favorecen la liberación de citocinas proinflamatorias como IL-17 (Figura 4).

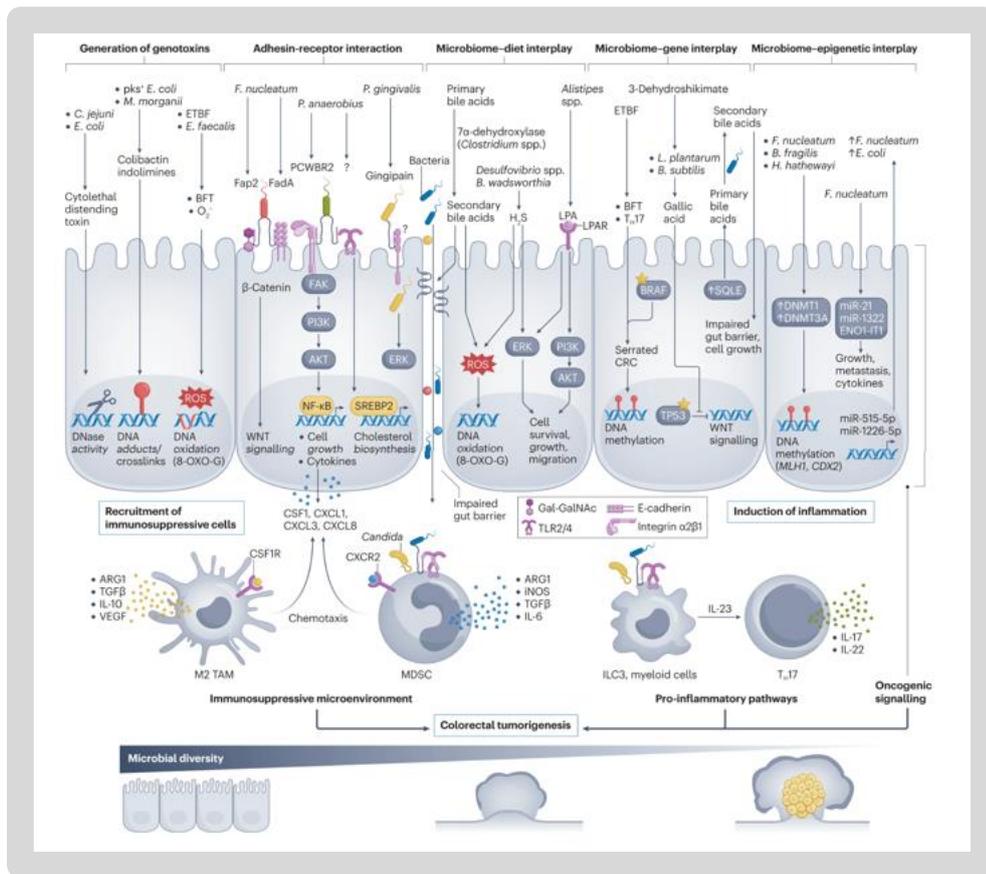


Figura 4. La disbiosis microbiana intestinal contribuye al desarrollo del CCR a través de una amplia gama de mecanismos moleculares.

## -Estadios del CCR

Los estadios del CCR permite estratificar el grado de crecimiento del tumor así como localización e invasión a otros órganos en el cuerpo. Estos estadios se enumeran del 0 al 4 de acuerdo con American Society of Clinical Oncology [ASCO], 2021 (Figura 5).

Estadio	Tumor (penetración máxima)	Metástasis en ganglios linfáticos regionales	Metástasis a distancia
0	Tis	N0	M0
I	T1 o T2	N0	M0
II	T3	N0	M0
III	Cualquier T o	Cualquier N	M0
	T4	N0	M0
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

\*Clasificación TNM:

- Tis = carcinoma in situ; T1 = submucosa; T2 = muscular propia; T3 = atraviesa todas las capas (en el cáncer rectal, incluye el tejido perirrectal); T4 = órganos adyacentes o peritoneo.
- N0 = ninguna; N1 = 1-3 ganglios regionales; N2 = ≥ 4 ganglios regionales; N3 = ganglios apicales o de troncos vasculares.
- M0 = ninguna; M1 = presente.

Figura 5. Estadios del cáncer colorrectal.

- Etapa 0 (Tis)

El cáncer se encuentra en su etapa más temprana. Esta etapa también se conoce como carcinoma intramucoso (Tis). No ha crecido más allá de la capa interna (mucosa) del colon o del recto.

- Etapa I (T1 o T2)

El cáncer ha crecido a través de la capa muscular de la mucosa hasta la submucosa (T1), y también es posible que haya crecido hasta la muscular propia (T2). No se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (N0), ni a sitios distantes (M0).

- Etapa II (T3)

El cáncer ha crecido hacia las capas más externas del colon o del recto, pero no ha atravesado estas capas (T3). No ha alcanzado órganos adyacentes. No se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (N0), ni a sitios distantes (M0).

- Etapa III (cualquier T o N)

El cáncer pudo o no haber crecido a través de la pared del colon o del recto (Cualquier T). Podría o no haberse propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (Cualquier N). Pero no se propago a sitios distantes (M0)

- Etapa III (T4)

El cáncer ha crecido a través de la pared del colon o del recto y está unido o crece hacia otros tejidos u órganos adyacentes (T4). El cáncer aún no se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (N0) ni a sitios distantes (M0).

- Etapa IV (cualquier T/N)

El cáncer pudo o no haber crecido a través de la pared del colon o del recto (Cualquier T). Podría o no haberse propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (Cualquier N). Se ha propagado a partes distantes del peritoneo y puede o no haberse propagado a órganos o a ganglios linfáticos distantes.

## **2.5. Tratamiento en el cáncer colorrectal**

El tratamiento del cáncer colorrectal depende principalmente de la etapa clínica en la que es diagnosticado. La cirugía suele ser el tratamiento primario para pacientes que presentan este tipo de neoplasia que no se ha propagado a otras partes [10].

La cirugía consiste en extirpar la sección del colon que contiene el cáncer (colectomía parcial) (Figura 6) junto con los ganglios linfáticos cercanos, seguida de un tratamiento con quimioterapia adyuvante.

Este tipo de terapia se puede utilizar a partir de un estadio II, pero solamente en algunos casos donde pueda existir riesgo de que el cáncer regrese.

La quimioterapia para los estadios III, es utilizada de manera estándar como adyuvante a la cirugía y en estadios IV, es la principal herramienta utilizada para el tratamiento de los pacientes cuando la cirugía no es posible, así como paliativo para aliviar ciertas molestias y mejorar la calidad de vida. Las principales combinaciones farmacéuticas que se utilizan en conjunto con el 5-FU para incrementar su efectividad, son leucovorina, y oxaliplatino (FOLFOX ) o el régimen capecitabina y oxaliplatino (CAPEOX ) [11].

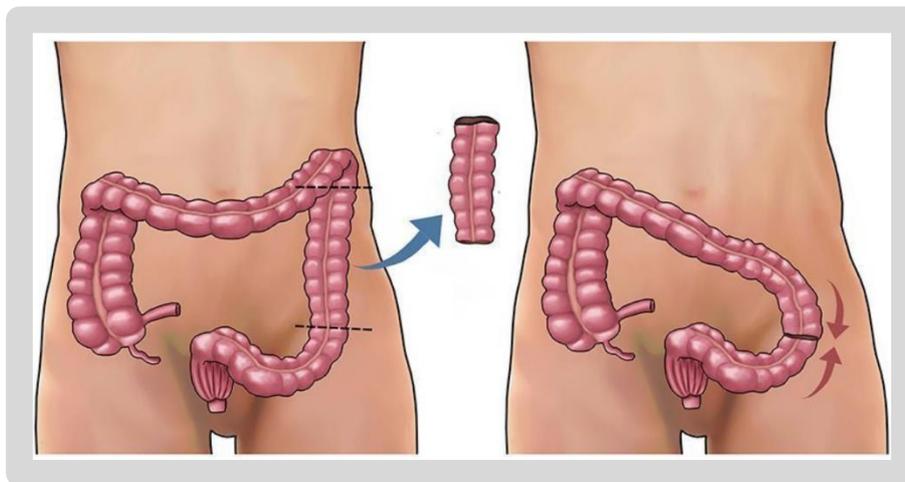


Figura 6. Colectomía parcial de colon.

### 2.5.1. 5-Fluorouracilo

El 5-Fluorouracilo es el estándar de oro en el tratamiento de CCR, es un medicamento que es utilizado en el tratamiento de diferentes neoplasias, cánceres de mama, colon, recto, estómago y páncreas [12]. Es un fármaco anticancerígeno del tipo de las antimetabolitos y perteneciente al grupo de los

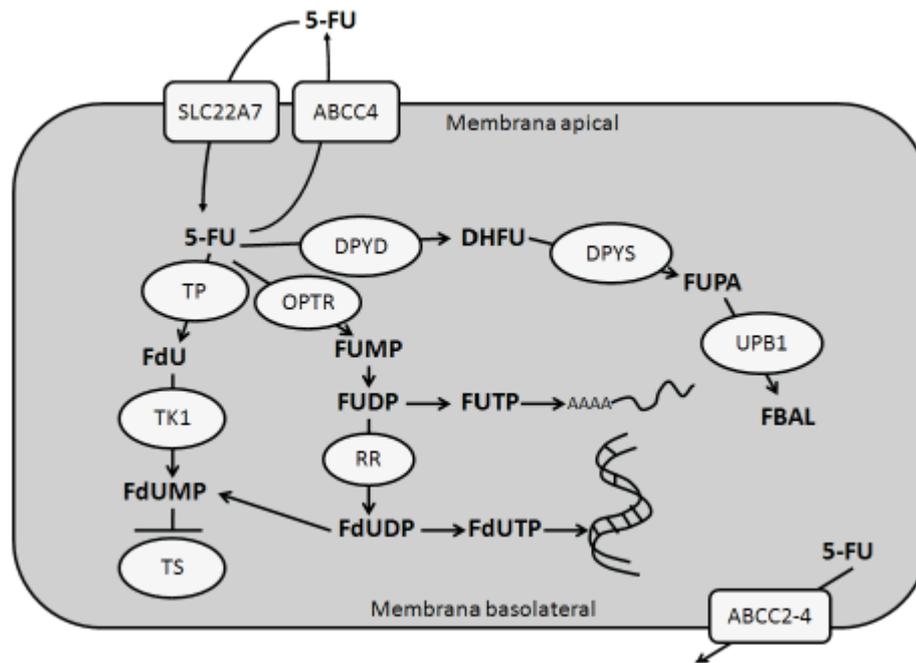
análogos de pirimidina. El 5-fluoracilo inhibe la síntesis del DNA promoviendo un desequilibrio metabólico resultando la muerte celular [13]

### **2.5.2. Mecanismo de acción**

El efecto antitumoral del 5-FU se ha relacionado a tres de sus metabolitos:

1) La 5-fluorouridina-2'-deoxiuridina-5'-trifosfato (FdUTP), causante de la inestabilización del ADN; 2). La 5-fluorouridina-5'-trifosfato (FUTP), que se incorpora al ARN y causa la terminación temprana de la transcripción 3) La 5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-monofosfato (FdUMP), este último se cree que es el principal responsable del efecto antitumoral, gracias a su participación en la inhibición de la enzima timidilato sintasa (TS), necesaria para la síntesis de dTMP.

Una vez que ingresa a la circulación, más del 80% del fármaco administrado es metabolizado rápidamente en el hígado, por la enzima dihidropirimidina deshidrogenasa (DPYD) y convertido al metabolito farmacológicamente inactivo 5-fluorodihidrouracilo (DHFU), siendo éste el paso limitante del metabolismo de detoxificación del 5-FU (Figura 6). Otros procesos más adelante se encargan de la transformación de este metabolito en fluoro- b- alanina (FBAL), el producto final de todo el proceso de biotransformación del fármaco [14].



**Figura 7.** Metabolismo y mecanismo de acción del 5-FU en la célula tumoral. SLC22A, ABCC4, ABCC2-4 =Transportadores de membrana. TP= timidina fosforilasa, TK1= timidina cinasa. TS= timidilato sintasa. DPYD=dihidropirimidina deshidrogenasa. DPYS= dihidropirimidinas. UPB1= $\beta$ -ureidopropionasa. OPTR=orotatofosforribosil transferasa. RR= ribonucleótido reductasa. La flecha truncada indica inhibición.

### 2.5.3. Quimio-resistencia

Se denomina quimio resistencia al proceso mediante el cual cualquier organismo puede desarrollar resistencia a determinados fármacos o compuestos. En la quimioterapia, tras la administración de un determinado fármaco, un gran número de células tumorales del paciente se vuelven resistentes al fármaco. Generalmente los pacientes con tumores que responden inicialmente a la quimioterapia presentan recaídas a medida que va evolucionando la enfermedad, debido a alteraciones a nivel molecular y celular [15]. Diversos estudios han evaluado el efecto de la quimio-resistencia en la supervivencia de los pacientes, tratando de entender los mecanismos involucrados

[16]. La quimio-resistencia se puede clasificar en dos principales mecanismos, resistencia intrínseca, en la cual las células tumorales tienen alteraciones génicas que per se, favorecen la eliminación, metabolismo o mecanismos de resistencia a diversos fármacos por incremento de sistemas de transporte o mecanismos de reparación del daño al DNA [15]. La resistencia adquirida incluye factores extracelulares como la falta de acceso al tumor debido a la vasculatura o el microambiente tumoral [17].

## **2.6. Ciclo celular y cáncer**

El ciclo celular es el proceso que permite a una célula eucariota duplicar su contenido genético y posteriormente dividirse en dos células genéticamente idénticas. El DNA se replica y los cromosomas se segregan a las dos células hijas. Por tanto, el ciclo celular es un conjunto complejo de procesos citoplasmáticos y nucleares coordinados. Durante la progresión del ciclo de división de una célula, se encuentran 4 fases y en su conjunto el proceso la mayor parte del tiempo dura aproximadamente 24 horas, dentro de estas fases se encuentra: a) Fase S cuando los cromosomas han sido replicados, b) Fase G2 donde la célula comprueba que la duplicación de su contenido en DNA ha sido correcta, c) Fase M que comprende la división nuclear (mitosis) y citoplasmática (citoquinesis). A partir de este punto las células hijas entran en la interfase de un nuevo ciclo, d) La interfase comienza con la fase G1. Las fases G1 y G2 son dos fases de comunicación entre la síntesis de DNA y la mitosis [18].

El cáncer es la proliferación descontrolada de cierto tipo de células. Durante este proceso muchos genes que están relacionados con el

control celular son afectados y promueven a que esta enfermedad sea invasiva y letal. La capacidad de las células normales para detener el ciclo celular posterior a un daño en el ADN es esencial para mantener la integridad del genoma [19]. Por lo que en la actualidad se busca encontrar terapias con la capacidad de modular moléculas relacionadas con el ciclo celular como P21 que es una de las proteínas mayormente involucradas en este proceso [20]

### **2.6.1. P21**

P21 actúa como un gen río abajo de p53 para bloquear la progresión celular; Debido a ello se ha utilizado como diana terapéutica para el cáncer. Trabajos anteriores han demostrado que la terapia antitumoral dirigida al ciclo celular como palbociclib [21], el cual es un fármaco oral dirigido que actúa directamente sobre CDK4/6 inhibiendo su función, así como la proliferación de las células tumorales y regulando el control del ciclo celular. Por lo que se ha clasificado a p21 como una proteína supresora de tumores [20]. Adicionalmente, se le ha reconocido por su función como cofactor transcripcional regulando la actividad de proteínas que se unen al ADN, como NF- $\kappa$ B, Myc, E2F, STAT3 y el receptor de estrógenos [22]. Recientemente, se ha demostrado que tiene un papel represor en la transcripción de Wnt4 [23], Myc, Cdc25A [20] y en genes mitóticos, previniendo la segregación cromosómica incorrecta después de ocurrir un daño en el ADN [24].

No solo P21 regula el ciclo celular, también también juega un papel en varios procesos biológicos, como la senescencia, diferenciación, apoptosis,

citoquinesis, adhesión celular, crecimiento celular y endo-replicación [24]. Estos procesos pueden depender o no de la presencia de P53.

### **2.6.2. P53**

El gen que codifica para la proteína p53 ha sido implicado en muchos tipos de cáncer humano tanto heredado como esporádico. Cuando surge una pérdida de la función de p53 por mutaciones, esto conlleva a inestabilidad genómica, inhibición de la apoptosis y descontrol del ciclo celular. La alteración de esta proteína es la mutación más común en el cáncer humano.

Al principio se clasificó como un oncogén debido a que en sus primeras experimentaciones se utilizó cDNA mutado tras purificar mRNA de una célula tumoral. Bert Vogelstein quien lo categorizo como gen supresor tumoral lo describe como un importante regulador del ciclo celular que codifica la síntesis de una fosfoproteína (p53) formada por 393 aminoácidos, con peso molecular de 53kD, que se expresa en muchos tipos celulares como factor transcripcional inactivo, latente, que se activa solo cuando las células están sujetas a uno o varios factores [25].

Existen dos grupos de factores capaces de activar p53, en primer lugar, el daño al ADN, así como factores pro-oncogénicos. La activación de p53 manda una señal transcripcional que, dependiendo del tipo celular, detiene la proliferación celular o bien induce a apoptosis.

La mutación en P53 es una de las alteraciones genéticas más conocidas y aceptadas en el modelo de progresión del CCR favoreciendo la transformación maligna celular. En estudios preclínicos se ha observado que los fármacos

utilizados generalmente para tratar esta neoplasia se basan en la inducción de apoptosis y muerte celular mediada por la activación de la proteína p53 normal. En varios estudios se afirma que dicha respuesta es menor en pacientes con tumores portadores de mutación en el gen *p53*.

Este gen supresor de tumores en su forma natural regula de forma negativa el crecimiento celular, controlando la entrada de la célula en la fase S, bloqueando la fase de transición G1-S del ciclo celular. La proteína p53 es fosforilada por una cdc-2 quinasa a lo largo del ciclo celular. Su localización subcelular varía también a lo largo del ciclo celular. En la fase G1, la proteína se localiza en citoplasma, emigrando al núcleo al principio de fase S.

La función de p53 en su forma natural es controlar el ciclo celular regulando la transcripción o la replicación del DNA. Por ello se le denomina el guardián del genoma. Tiene la capacidad de unirse a lugares específicos del ADN regulando la expresión de otros genes tales como p21, que controlan funciones celulares esenciales. Es la conexión entre p53 con procesos como la carcinogénesis, el ciclo celular, activación de apoptosis, angiogénesis, etc. La alteración y ausencia de funcionalidad de p53 es un defecto usual en más del 50% de los cánceres, incluso los más frecuentes (mama, pulmón, colon y esófago). Por ello, es de gran interés explorar la relación entre la mutación de p53 y respuesta a la quimioterapia adyuvante.

## **2.7. Nuevas Terapias contra el CCR**

La búsqueda de nuevas moléculas que puedan ser útiles como tratamiento adyuvante a terapias convencionales, potenciando el efecto de

quimioterapéuticos como el 5-FU sobre las células tumorales, podrían ser una buena opción para el tratamiento de esta neoplasia.

En los últimos años se ha optado por la búsqueda de moléculas de origen natural, ya que se ha observado la capacidad de algunos compuestos de sensibilizar a las células tumorales a la quimioterapia así como potenciar el efecto de los fármacos y hacerlos más específicos al actuar solamente sobre las células cancerosas. Los compuestos naturales suelen ser multi blanco, por lo que pueden interferir con diferentes vías de señalización y de esta manera evitar la aparición de quimio-resistencia [26].

Un claro ejemplo es uso de la curcumina, compuesto de origen natural proveniente de la planta *Cúrcuma longa* el cual, diversos estudios han demostrado favorece la disminución de la activación de NF-kB, la expresión de COX-2, así como citocinas proinflamatorias como IL-1 e IL-6 y la producción de TNF- $\alpha$  inhibiendo la formación de tumores y favoreciendo de esta manera la eliminación de las células cancerosas sin dañar a las células normales.

## **2.8. Uso de moléculas excretadas/secretadas por helmintos**

### **2.8.1 *Taenia crassiceps* y CAC**

*Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) es un cestodo cosmopolita endémico del hemisferio norte. Su fase adulta presenta una longitud aproximada de 14 cm y 82 proglótides, su escólex está conformado por cuatro ventosas ovales y un rostelo con 30 ganchos aproximadamente. Sus larvas miden de aproximadamente 5 mm y cuentan con un escólex de 17 ganchos y cuatro

ventosas [27]. En su fase adulta puede ser encontrado en el intestino delgado de cánidos, mientras que su estado larval se encuentra en la musculatura, cavidad pleural o peritoneal de roedores.

Debido a su similitud con *Taenia solium* (Linnaeus, 1758) y a su capacidad de reproducirse asexualmente por gemación en su fase larval, *T. crassiceps* se ha convertido en uno de los mejores modelos experimentales para el estudio de infecciones parasitarias, además se considera inocuo para el ser humano, a excepción de algunos casos en donde pacientes inmunocomprometidos con cáncer, virus de inmunodeficiencia humana y de la hepatitis C, han sido infectados por este parásito [28].

Reportes previos en nuestro grupo de trabajo, han demostrado que el uso de productos excretados/secretados por el parásito helminto *Taenia crassiceps* (TcEs), tienen la capacidad de regular procesos inflamatorios, que favorecen la reducción de formación de tumores en el colon, cuando estos compuestos son utilizados como un profiláctico y en etapas tempranas de la enfermedad (19). Siendo uno de los mecanismos comprobados, la regulación negativa en la expresión del factor de transcripción STAT3 y NF- $\kappa$ B, los cuales se han asociado ampliamente con malignidad de las células tumorales, inhibición de la apoptosis y regulación de la angiogénesis tumoral e invasividad en diversos tipos de cáncer (6,7).

A la fecha se desconoce si estos productos tienen el mismo efecto antitumoral en etapas avanzadas de la enfermedad y si su efecto antiinflamatorio podría favorecer la respuesta al tratamiento con 5-FU regulando moléculas clave como P53 y la expresión de P21. Motivo por el cual extendemos nuestro estudio a etapas avanzadas de la enfermedad, utilizando a los TcES como un posible

adyuvante al 5-FU en el tratamiento de cáncer colorrectal y como un posible regulador de la expresión de P53 y P21.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El CCR es una de las neoplasias más letales y con altas tasa de incidencia en todo el mundo. Alteraciones en la expresión de las proteínas P53 y P21, son de las alteraciones más frecuentes en esta neoplasia, las cuales se han asociado con fallas en la respuesta las terapias.

El eje principal de los tratamientos en el CCR es el 5-FU, aun cuando en terapia individual su eficacia es del 10 y 15%, incrementando hasta en un 50% con terapias adyuvantes, como el Oxaliplatino o Irinotecan. Desafortunadamente, más del 90% de los pacientes en etapas avanzadas genera resistencia a estos quimioterapéuticos. Por lo que la búsqueda de nuevas terapias que puedan potenciar y reducir la resistencia a los fármacos convencionales, son una alternativa viable.

Recientemente, nosotros evaluamos en un modelo de murino de CAC, el efecto de productos excretados/secretados del parásito de *T. crassiceps* (TcES), encontrando que estas moléculas tienen la capacidad de inhibir la formación tumores en el colon cuando son administradas como terapia profiláctica. A la fecha se desconocen los efectos de los TcES en tumores ya establecidos y mecanismos asociados que puedan favorecer la respuesta al 5-FU, como regulación en la expresión de P53 y P21, proteínas claves en la sensibilidad a este quimioterapéutico.

## 4. HIPÓTESIS

El uso de terapias adyuvantes con productos Excretado/secretado por *T. crassiceps* favorecerá la sensibilidad al 5-FU mediante la regulación positiva de P53 y P21, en un modelo murino de cáncer de CAC.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. OBJETIVO GENERAL**

- Evaluar los niveles de expresión y regulación de P53 y P21 en el tratamiento del CAC con el uso de terapias adyuvantes con TcES

### **5.2. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Evaluar el efecto de los TcES como posible adyuvante al 5-Fluorouracilo en el tratamiento de cáncer de colon asociado a colitis.
- Determinar el efecto de los TcES, sobre el tamaño y número de tumores en el modelo murino de CAC tratados con TcES.
- Evaluar los niveles de expresión de las proteínas P53 y P21 en muestras de tejidos de CAC con y sin tratamiento de TcES.
- Evaluar el efecto de la terapia combinada de TcES+5FU en la expresión de P53 y P21.
- Determinar el o los potenciales mecanismos asociados a la regulación de P53 y P21 en CAC, por el tratamiento con TcES.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Ratones

Se utilizaron ratones hembra BALB/c de ocho a diez semanas de edad de donados por el UPEAL-CINVESTAV-IPN (México). Los cuales se mantuvieron en un ambiente libre de patógenos en las instalaciones de animales de la Facultad de Estudios Superiores-Iztacala (FESI), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Los animales se alimentaron con Purina Diet 5015 (Purina) y agua ad libitum. Todos los procedimientos experimentales se ajustaron estrictamente a las recomendaciones de la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio de los Institutos Nacionales de la Salud (EE.UU.) Y fueron aprobados por el Comité de Ética de los Experimentos con Animales de la FES-Iztacala (UNAM).

### 6.2. Obtención de TcES

Los metas cestodos de *T. crassiceps* (cepa ORF) se recolectaron en condiciones estériles de la cavidad peritoneal de ratones hembra BALB/c después de 8- 10 semanas de infección. Los cisticercos obtenidos de la infección se cultivaron en solución salina fisiológica a 37° C durante 24 h. Los TcES se recuperaron del sobrenadante y se centrifugaron durante 10 min a 3500 rpm. Posteriormente, las proteínas de peso molecular superior a 50 kDa se concentraron utilizando una membrana de corte de 50 kDa Ultrafiltro Amicon (Millipore, Billerica, MA, EE. UU.). Se recolectaron las moléculas de alto peso molecular y se agregaron inhibidores de proteasas. La concentración de proteína se determinó utilizando el ensayo de Bradford y el TcES se almacenó a -70° C

hasta su uso posterior. Se evaluaron los niveles de endotoxinas que no fueron detectables de los productos excretados/secretados por *T. crassiceps* (<0.4 EU / mg) utilizando el kit de E-Toxate (Sigma, EE. UU.)

### **6.3. Desarrollo de CAC**

Para el desarrollo de CAC se utilizó el modelo AOM/DSS. Ratones WT recibieron una sola dosis de AOM 12.5 mg/kg (Sigma-Aldrich, EE. UU) mediante inyección intraperitoneal. Cinco días después, los ratones se sometieron a tres ciclos de DSS. Cada ciclo consistió en la administración de DSS 2% en agua ad libitum (MW: 40 000, Alfa, Canadá) durante siete días y un periodo de descanso con agua regular ad libitum durante 14 días. En el día 54 posterior a la inducción del CAC, a un grupo de ratones se les administró 200ug de TcES por ratón 3 veces a la semana vía intraperitoneal hasta el día de su sacrificio al día 90. A otro grupo de ratones, en el día 60 se les administró 30 mg/kg de 5-FU vía intraperitoneal, 3 veces por semana hasta finalizar el experimento. Los ratones se monitorearon y se pesaron una vez por semana. Al día 90 los ratones se sacrificaron en cámara de CO<sub>2</sub> y se realizó la disección del colon (Figura 8).

## 1) MODELO AOM/DSS

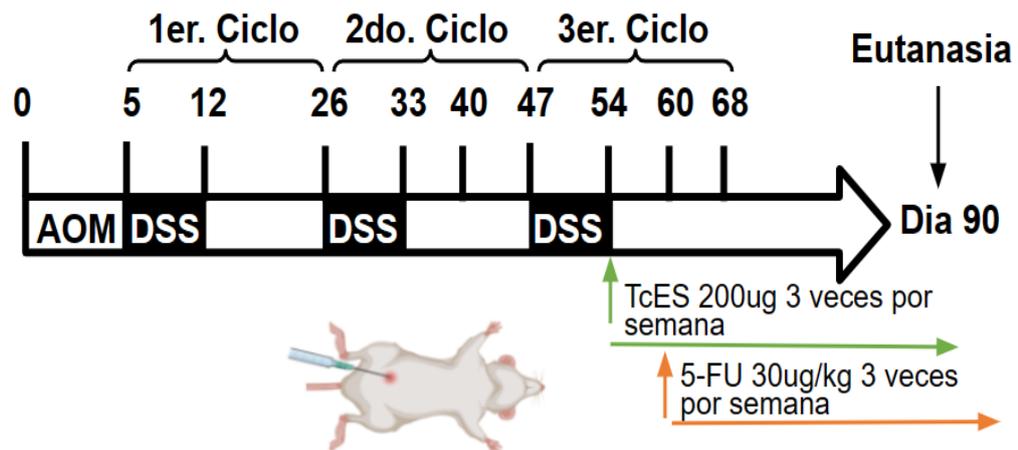


Figura 8. Esquema representativo de la administración del AOM/DSS en ratones Balb/c. Los ciclos consisten en una semana con DSS en agua para beber, seguido de dos semanas con agua regular estéril.

### 6.4. Análisis histológico y Procesamiento del tejido

Secciones longitudinales del colon se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 24h. Los tejidos se deshidrataron en etanol-xilol absoluto y se incluyeron en parafina (Leica Geosystems, Switzerland). Posteriormente, se obtuvieron secciones de 4 $\mu$ m de espesor y se montaron en portaobjetos previamente tratados con Poli-L-lisina (1:10) (Sigma-Aldrich, EE. UU). Finalmente, se eliminó la parafina a 58°C.

### 6.5. Tinción Hematoxilina & Eosina

Para el análisis histológico, las secciones longitudinales del intestino grueso de los ratones se fijaron inmediatamente mediante inmersión en paraformaldehído al 4%, después de un día el tejido se deshidrató en gradiente de concentración de alcohol para la posterior inclusión de parafina y el análisis

histológico. Se examinaron los tejidos de colon utilizando 4µm de espesor y se tiñeron con hematoxilina y eosina para visualizar la morfología.

## **6.6. Inmunohistoquímica**

Para inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, las secciones de colon se incubaron toda la noche a 4° C con anticuerpo primario para: P21 (anti-mouse 1:200), P53 (anti-mouse 1:200) y MDM2 (anti-rabbit 1:200) (Abcam, USA), con su respectivo anticuerpo secundario durante 1 h. Los análisis confocales se realizaron utilizando un sistema de microscopía confocal Leica TCS SP8 (Leica).

## **6.7. Western Blot**

Las muestras tisulares de colon se lisaron en buffer con: Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 137 mM, glicerol al 10%, NP-40 al 1%, NaF 50 mM, fosfato de β-glicerol 10 mM, sodio 2 mM Ortovanadato, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM y 10 µg/ml de aprotinina.

La proteína total se extrajo de muestras de tejido de colon utilizando un kit de purificación de ARN/proteína (Norgen Biotek Corp, Thorold, ON, Canadá). Las concentraciones de proteínas de muestras de tejido de colon se determinarán mediante el ensayo de Bradford y se separarán mediante SDS-PAGE (se cargaron 30 µg de proteína en cada pozo) utilizando geles de acrilamida al 10%, seguido de transferencia a membranas de nitrocelulosa (Immobilon-P, Millipore, EE. UU.). Las membranas se bloquearon con leche sin grasa al 5% en PBS durante 2 h, los anticuerpos primarios de; β-actina, p53, p21, MDM2 y Ciclina D1(Cell Signaling Technology, USA) (Biolegend, USA) se incubaron en leche al 5% en PBS durante toda la noche. La etapa de detección se realizó con IgG anti-

rabbit y anti-mouse (dependiendo del anticuerpo primario) acoplado a peroxidasa o IgG1 antimicrobiana (BioLegend, 1: 5000) durante 1 h. Los blots fueron revelados utilizando un sistema de detección de IgG (Thermo Scientific™ SuperSignal™ West Pico Complete Mouse IgG Detection Kit) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Amersham, EE. UU.).

Nombre	Dilución	Peso
p53	1:2000	53 KDa
p21	1:2000	21 KDa
MDM2	1:2000	90 KDa
Actina	1:2000	47 KDa

Tabla 1. Anticuerpos seleccionados para la evaluación de nuestro modelo murino de CAC.

## 6.8. Extracción de RNA y qPCR

El ARN total del tejido del colon se extrajo utilizando un kit de purificación de ARN/proteína (Norgen Biotek Corp, Canadá). Para la amplificación de los genes *Tgfβ*, *Tnfa*, *IL-17α* e *Il-10* se utilizó RT-PCR partiendo de RNA total de las células. Para la transcripción inversa, se utilizaron 11 µl de RNA total disuelto en una mezcla que contenía 50 mM Tris-HCl pH 8.3, 40 mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM DTT, 10 mM de una mezcla de dNTPs, 2,5 µM de hexámeros al azar, 20 unidades/ µL de

inhibidor recombinante de la Rnasa Out<sup>TM</sup> y 100 unidades de la enzima transcriptasa reversa de RevertAid H Minus. Esta reacción se incubó a 42° C 50 min y luego 5 min a 95° C para inactivar a la enzima. Una vez obtenido el cDNA se realizaron las reacciones de PCR utilizando los oligonucleótidos específicos, los cuales se especifican en la tabla 2 para cada gen utilizando la mezcla de reacción de IQTM SYBR Green Supermix (Bio-Rad), que contiene SYBR Green para la detección (fluoróforo que se une al DNA de doble hebra), dNTPs con UTP, tampón de reacción y la iTaq DNA polimerasa. La enzima se activa cuando se somete a elevadas temperaturas de 95° C durante al menos 3 min, evitando de este modo la hibridación inespecífica de los cebadores. La amplificación se llevó cabo en un termociclador CFX96 Time PCR Detection System “(BioRad). Las condiciones de la PCR fueron: 95°C/ 15 min, (95°C/30 s; 58°C, 59°C o 60°C (dependiendo del gen)/45 s; 72°C/45s) 40 ciclos y 72°C/ 5 min.

El análisis de la expresión génica por RT-qPCR se realizó con el sistema CFX Maestro Software for CFX Real-Time PCR Instruments.

Gen amplificado	Cebadores utilizados	Tamaño del amplicón	TM
<i>Tgfβ</i>	Fw 5'-CTTCAATACGTCAGACATTCGGG-3' Rv 5'-GTAACGCCAGGAATTGTTGCTA-3'	142 pb	59
<i>Tnfa</i>	Fw 5'-CAGGCGGTGCCTATGTCTC-3' Rv 5'-CGATCACCCCGAAGTTCAGTAG-3'	89 pb	60
<i>Il-17a</i>	Fw 5'-ATCCCTCAAAGCTCAGCGTGTC-3' Rv 5'-GGGTCTTCATTGCGGTGGAGAG-3'	170 pb	63

<i>Il-10</i>	Fw 5'-AGCCCTATCGGAAATGATCCAGT-3' Rv 5'-GGCCTTGTAGACACCTTGGT-3'	229 pb	60
--------------	---	--------	----

Tabla 2. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para identificación de los genes *Tgfβ*, *Tnfa*, *Il17a* e *Il10*.

### 6.9.1 Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) unidireccional, seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Sidak mediante el software Graphpad Prism. Los datos se expresaron como la media  $\pm$  Devest., con un intervalo de confianza del 95%. Un valor estadísticamente significativo se consideró aquel con un valor  $p < 0.05$ .

## 11.RESULTADOS

### 11.1. Efecto de los TcES como posible adyuvante al 5-Fluorouracilo en el tratamiento de cáncer de colon asociado a colitis.

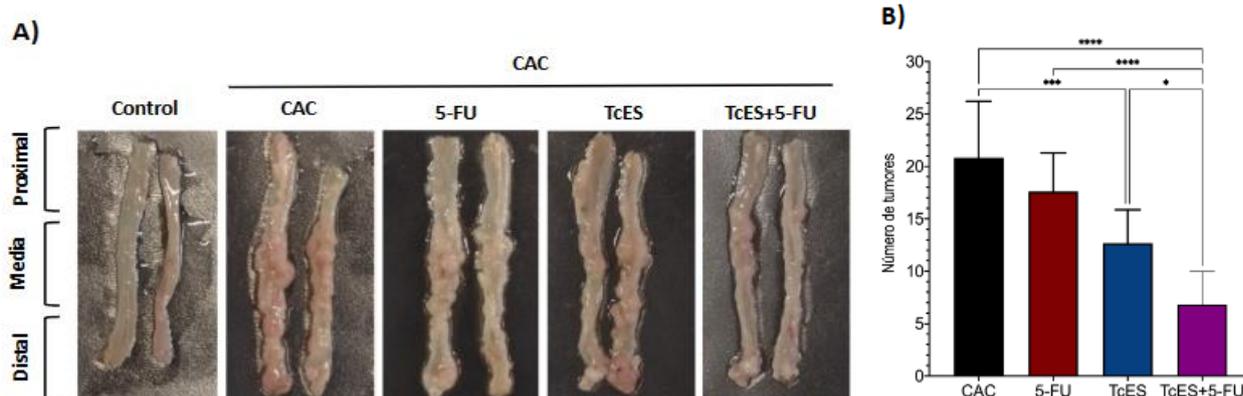
Los ratones fueron evaluados en peso y DAI (Disease Activity Index) el cual es un índice que nos ayuda a evaluar la actividad de la enfermedad, esto se evaluó cada semana durante ocho semanas. En la (figura 9) se muestran imágenes representativas de los animales a las 12 semanas de ser infectados, observando sangrado evidente, así como prolapso rectal en el grupo de animales CAC sin ningún tratamiento, por otro lado los animales que recibieron la terapia combinada de TcES en conjunto con el 5-FU se observó una similitud con el grupo control, en comparación con las terapias administradas de manera individual en los cuales no se observa diferencia significativa.



Figura 9. Imágenes representativas de sangrado colorrectal en los ratones al día 90 posterior a la inducción de CAC, con los diferentes tratamientos de 5-FU, TcES, TcES+5-FU, comparados con ratones sanos (Control) y ratones CAC sin tratamiento.

11.2. *La terapia adyuvante del TcES disminuye el tamaño y número de tumores en un modelo murino de CAC.*

Al día 90, como se indicó en el esquema de trabajo de la (Figura 11), los animales de todos los grupos recibieron eutanasia y el colon fue extraído. La figura 12 muestra las imágenes representativas de los colon obtenidos de los diferentes grupos con y sin tratamiento: Control, CAC, 5-FU, TcES y TcES+5-FU obtenido de los grupos de animales al final del experimento. Se observó de manera evidente que los animales que fueron inducidos a CAC, pero que no recibieron ningún tratamiento, tuvieron mayor formación de tumores en comparación con los animales que recibieron el tratamiento individual y en conjunto de TcES más 5-FU. Así también se observó que en el tratamiento en terapia única con el TcES hubo diferencia significativa con respecto a CAC indicando una disminución en el número de tumores, en el grupo de animales que recibieron la terapia combinada (TcES+5-FU), a diferencia de lo que se observó en el grupo de animales con CAC que únicamente recibieron el 5-FU de manera individual (5-FU) (Figura 12A). Por otra parte, en la terapia combinada de los TcES en conjunto con el 5-FU (TcES+5-FU) se observó una marcada disminución en el número de tumores desarrollados en comparación con el grupo de CAC libre de tratamiento, cercana a un 70% menos (Figura 12B).



**Figura 12. (A)** Imágenes representativas del colon obtenido de los ratones inducidos a CAC con diferentes tratamientos y grupo control libre de CAC: CAC libre de tratamientos (CAC); tratados con 5-Fluorouracilo (5-FU), tratados con los TcES (TcES), animales con terapia combinada TcES+5-Fluorouracilo (TcES+5-FU) y colon de grupo control sin inducción de CAC (Control). Los tratamientos se administraron hasta el día 90. **B)** Gráfica de número de tumores en ratones con los diferentes tratamientos. Los datos se presentan como la media de la desviación estándar SD de 4 animales por grupo de tres experimentos independientes.  $P$  inferior a 0.0001 (\*\*\*\*),  $P = 0.001$  (\*\*\*) y  $P = 0.05$  (\*).

### 10.2.1. La terapia adyuvante del TcES disminuye la transformación epitelial en CAC.

Se realizó tinción hematoxilina-eosina en tejidos de colon obtenidos de los animales control e inducidos a CAC con y sin tratamientos (5-FU, TcES y TcES+5FU), para visualizar los cambios morfológicos del epitelio. En la (Figura 13) se observa que en la terapia combinada de TcES+5-FU, se observó una diferencia en cuanto al daño en el epitelio, ya que estos tuvieron una menor transformación y mantuvieron una morfología más organizada en las criptas de Lieberkühn y vellosidades; esta estructura se asemeja con la del grupo control.

En las tinciones de los tejidos de los animales en los cuales se administraron terapias individuales de 5-FU, la morfología epitelial fue muy semejante a la obtenida en el epitelio del CAC, mostrando células displásicas, desorganización de las criptas, con incremento de los infiltrados celulares y una estructura más desorganizada. En la terapia con TcES, únicamente se observó una ligera disminución en la desorganización de la arquitectura epitelial y transformación de las células epiteliales (Figura 13).

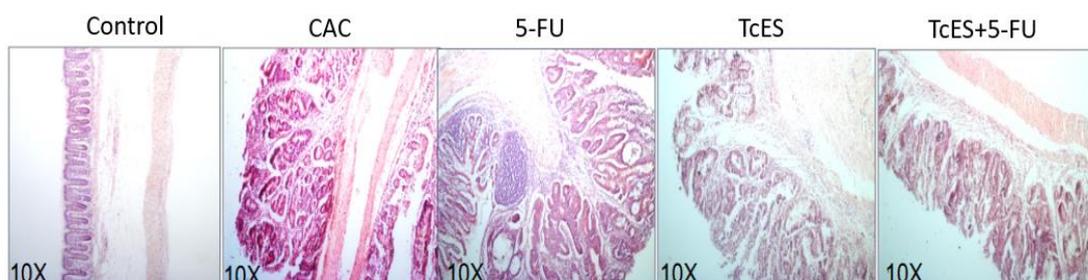
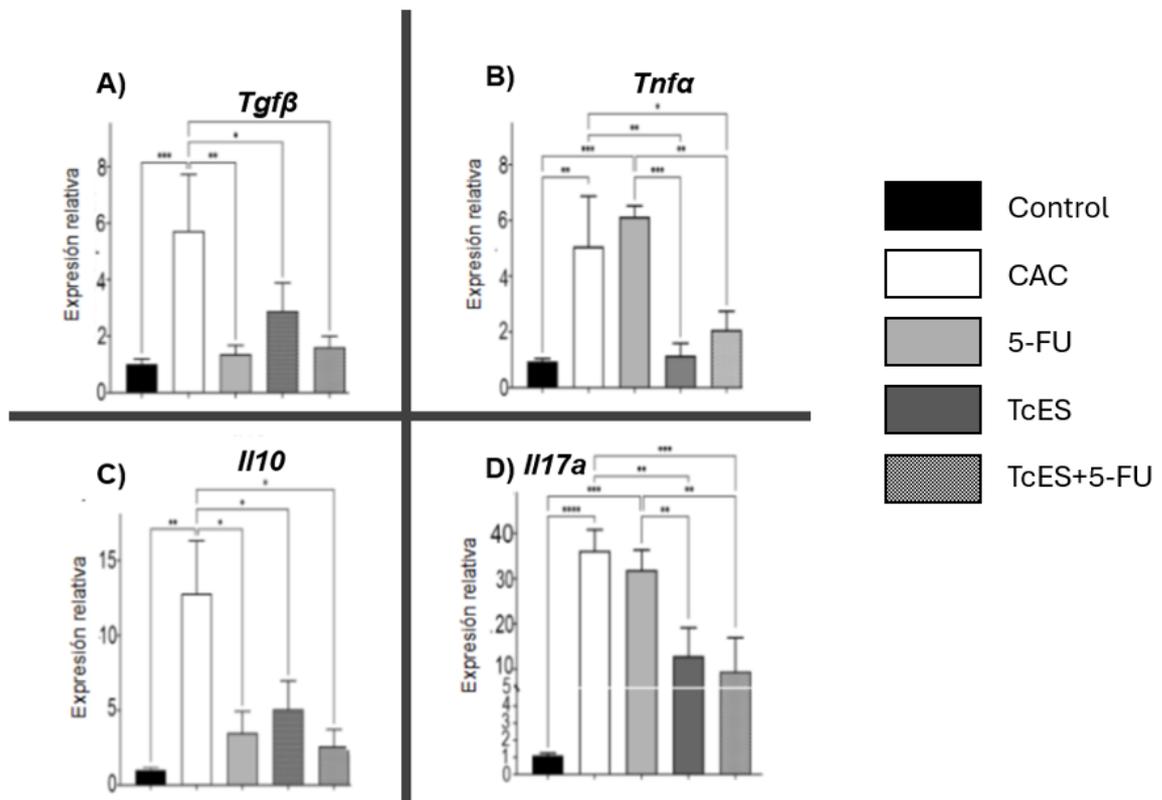


Figura 13. Análisis histológico. Imágenes representativas de tejidos de colon tenidos con Hematoxilina-Eosina en epitelio del colon de los ratones inducidos a CAC, con terapias individuales de 5-FU y TcES, así como terapia combinada. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio Zeiss en objetivo 10X.

#### *10.2.2. La terapia adyuvante del TcES disminuye la expresión de citocinas proinflamatorias e inmuno-reguladoras*

La disminución en el número de los tumores en el colón y aparente protección del epitelio por el uso de la terapia combinada de 5-FU con TcES, indicaba que el uso de estas moléculas podría estar regulando procesos que favorecen estos eventos. Como se ha reportado anteriormente la inflamación es un factor importante que lleva a la transformación epitelial. Motivo por el cual se decidió evaluar los niveles de expresión de los mensajeros de citocinas proinflamatorias e inmuno-reguladoras que se sabe participan en el proceso de la carcinogénesis, así como en mecanismos de respuesta a la terapia con 5-FU (Tgf $\beta$ , IL10,

Tnf $\alpha$  e IL-17a). En la imagen XX A-B se observa un aumento significativo (13, 5.8, 5 y 37 veces más, respectivamente) en los niveles de todas las citoquinas mencionadas en los tejidos del colon de ratones CAC (CAC) no tratados en comparación con el control sano (Figura 14). El grupo de ratones CAC que recibieron TcES como terapia única mostraron una reducción significativa en los niveles de Il-10 y Tgf- $\beta$  (2 veces menos) y en los niveles de mRNA de las citocinas proinflamatorias Tnf- $\alpha$  e Il-17a, en comparación con los datos obtenidos del grupo CAC no tratado (Figura 14). Por otra parte, los ratones CAC tratados con 5FU exhibieron una expresión negativamente de Il-10 y Tgf- $\beta$  (Figura 14), no así para los datos obtenidos de las citocinas inflamatorias Tnf- $\alpha$  e Il-17<sup>a</sup>, en los cuales no se observó modificación en su expresión en este grupo en comparación con el grupo CAC (Figura 14). La terapia combinada de TcES+5FU disminuyó significativamente los niveles de todos estos factores. Adicionalmente, los niveles de mRNA de las citoquinas inflamatorias Tnf- $\alpha$  e Il-17a se redujeron significativamente (3,5 veces y 23 veces, respectivamente, (Figura 14).



**Figura 14.** El efecto adyuvante de TcES disminuye las citocinas inflamatorias en la colitis asociada al cáncer de colon. Expresión relativa de los genes *Tgf-β* (A), *Tnfα* (B), *Il-10* (C), e *Il-17a* (D) determinada por qPCR a partir de ARNm de Control (barras negras), CAC sin tratamiento (barras blancas), 5FU (gris continuo), TcES (barras cuadriculadas) y TcES+ 5FU (barra con líneas). Los datos se presentan como valores individuales con una mediana y un rango de tres experimentos independientes realizados por triplicado. valor de p inferior a 0,001 (\*\*\*) ; p = 0,01 (\*\*) y p = 0,05

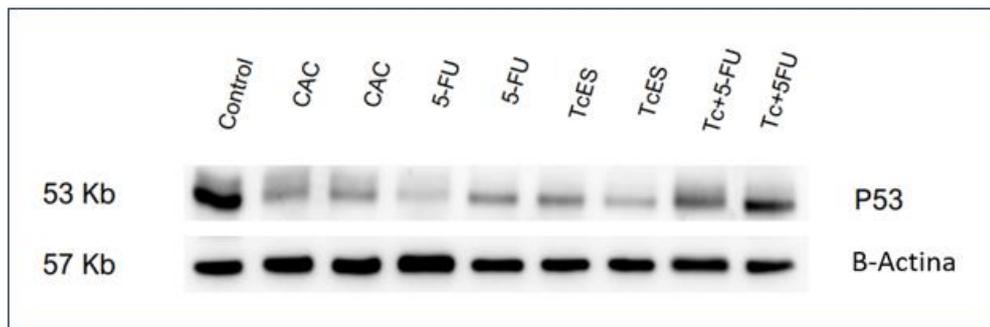
### 11.3. El uso de TcES regula la proliferación celular a través de la señalización P53 en células de cáncer de colon humano.

Con el fin de determinar una de las posibles rutas mediante las cuales el TcES pueda ejercer su efecto como adyuvante a la terapia con el 5-FU, favoreciendo de esta manera la reducción del número de tumores en el colon y

con base en trabajos anteriores acerca de señalización, se probó si el efecto del antígeno de *T. Crapssiceps* podía regular proteínas encargadas de regular procesos de Proliferación y muerte celular.

Se realizó extracción proteínas y western blot, de los tejidos de los diferentes grupos. Como primer punto se evaluó los niveles de expresión de la proteína P53.

Como se observa en la (Figura 15), la expresión de la P53 se ve disminuida en el grupo CAC, así como en las terapias individuales en comparación con el grupo control y la terapia combinada, presentando una mayor expresión en P53. Esto sugiere que el TcES podría ser un regulador de la expresión de P53, el cual estaría regulando directamente los niveles de expresión de P21 como se muestra en la figura (15)



**Figura 15.** Evaluación de la expresión de P53 y B-Actina con los grupos sin tratamiento (Control y CAC), en terapia única (5- FU y TcES) y en terapia combinada (TcES+5-FU)

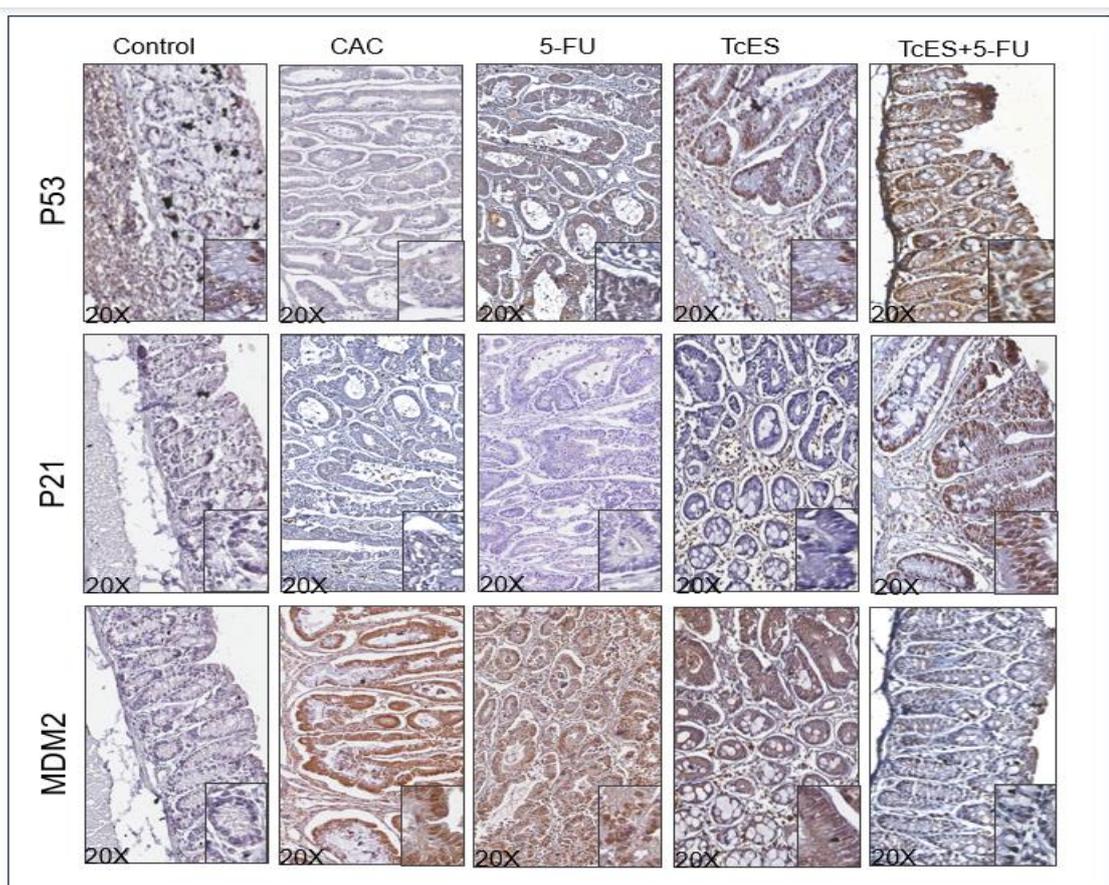
11.4. *El efecto de la terapia combinada de TcES+5FU regula la expresión de P21, P53 y MDM2 en tejidos de colon.*

Uno de los principales mecanismos asociados a la regulación de la proliferación por medio de P53 es a través de P21, motivo por el cual se

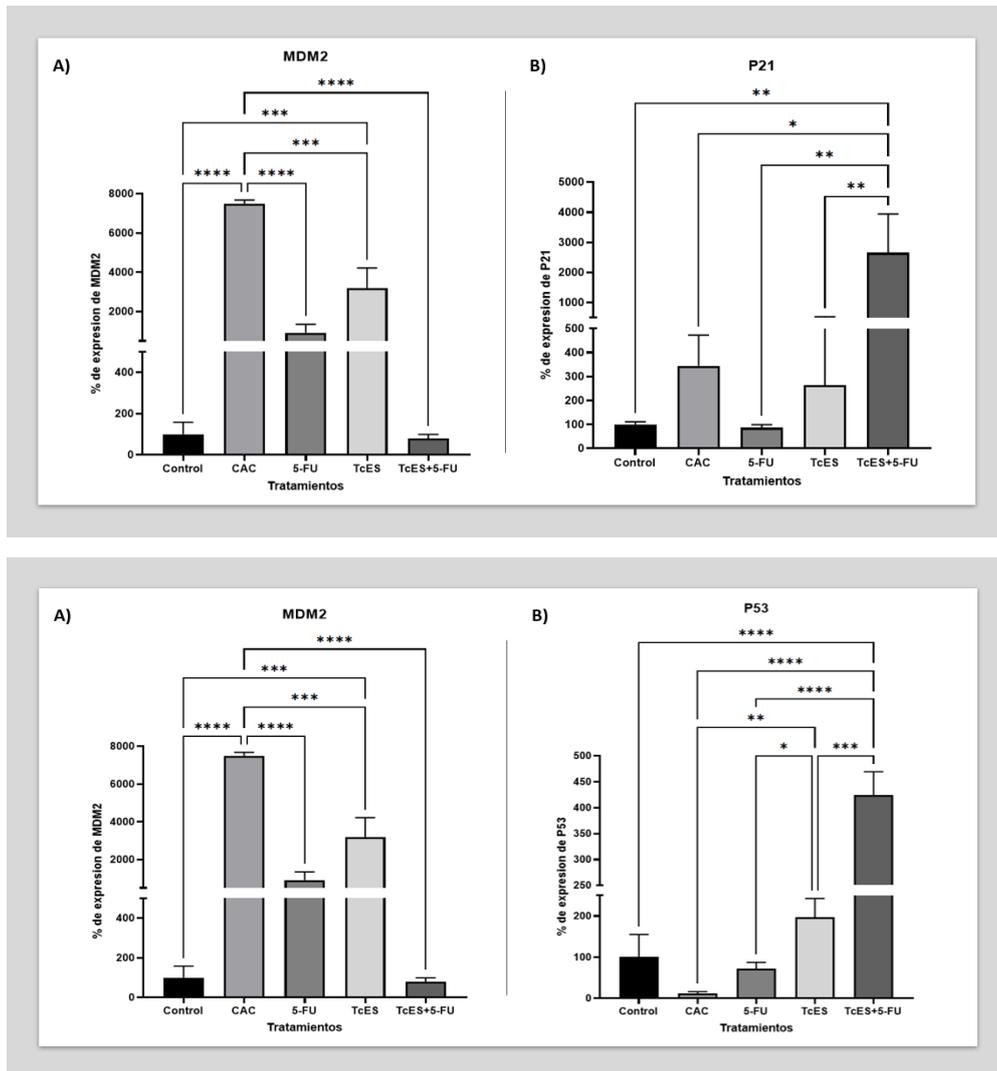
decidió evaluar la expresión de esta proteína en los tejidos de colon obtenidos y de esta manera determinar si la regulación de P53 por las TcES afectaría moléculas reguladas por esta proteína. En la (Figura 16) se muestra las imágenes representativas de la tinción por inmunohistoquímica obtenidas de los diferentes tejidos para la expresión de las proteínas P53 y P21. Como se observa en el panel superior de la (Figura 16) corresponde a la tinción de P53 donde se observó una marcada expresión en el tejido control (tejido sano sin inducción de CAC) y con una marcada disminución en el tejido de CAC sin tratamiento. Por otra parte, la terapia combinada de TcES+5FU tuvo una sobreexpresión del 48% de P53. Así mismo se pudo observar una regulación positiva significativa en la expresión de P21 en la terapia combinada de TcES+5FU incrementando un 35% en comparación con los grupos control y la terapia de manera individual.

Finalmente, con el objetivo de poder determinar la manera a través de cuál es el mecanismo por el cual los TcES podrían estar favoreciendo la expresión de P53 en la terapia combina con el 5-FU. Se determino la expresión de una de las moléculas reguladoras de P53, la expresión de la proteína MDM2, la cual se sabe participa en la regulación de P53 a través de la interacción con determinados aminoácidos del dominio de transactivación conduciendo a su degradación. En la (Figura 16) en la sección final de los tejidos se pudo observar una sobreexpresión significativa de MDM2 del 47% en el grupo de CAC, sin ningún tratamiento en comparación con el grupo control al igual que en los grupos con

terapias individuales con un 17% en TcES y un 9% en 5-FU. En el grupo de la terapia combinada se observó una marcada disminución de la expresión de esta proteína con respecto al grupo de CAC, hasta niveles muy similares a los observados en el grupo control, lo cual correlaciona con el incremento de la expresión de la proteína P53 en los tejidos del mismo grupo.



**Figura 16.** Imágenes representativas de tinción de inmunohistoquímica para detección de la proteína P53, P21 y MDM2 en tejidos de colon sano (Control), CAC sin tratamiento (CAC) y tejidos de ratones inducidos a CAC con tratamientos de manera individual de 5-FU (5-FU), TcES (TcES) y terapia combinada de TcES+5-FU (TcES+5FU). Las imágenes fueron tomadas en Aperio SC2 20x.



**Figura 17.** Densitométricos de expresión de P53, P21 y MDM2 en tejidos de colon sano (Control), CAC sin tratamiento (CAC) y tejidos de ratones inducidos a CAC con tratamientos de manera individual de 5-FU (5-FU), TcES (TcES) y terapia combinada de TcES+5-FU (TcES+5FU).

## 12. Discusión

El CCR es una de las neoplasias con mayor índice de casos nuevos y de mortalidad a nivel global. Aproximadamente la mitad de los pacientes con CCR tienen riesgo de desarrollar metástasis, y un gran número son diagnosticados en esta etapa avanzada (21%), lo que complica más la efectividad de los tratamientos en los pacientes [29].

En el microambiente tumoral, diversos genes juegan un papel importante en la supervivencia, proliferación y metástasis de las células cancerosas, al proveer vías de señalización críticas [30]. El potencial de la terapia contra el cáncer se ve afectado por las dificultades para predecir tanto la respuesta tumoral como los eventos adversos. El 5-FU es uno de los principales fármacos utilizados en el tratamiento de esta neoplasia. Desafortunadamente su baja eficacia en terapia individual y los efectos adversos que se generan con el uso de otros quimioterapéuticos como el oxaliplatino e irinotecan, limitan el uso de estos fármacos en los pacientes. Motivo por el cual, la búsqueda de nuevas terapias alternativas adyuvantes se ha vuelto una necesidad para mejorar la eficacia de los medicamentos ya establecidos.

El uso de terapias alternativas basadas en parásitos y sus derivados, a la fecha continúan siendo controversiales, estudios previos han demostrado un efecto beneficioso de las infecciones por helmintos en la regulación de diferentes enfermedades inflamatorias y tipos de cáncer, incluido el CCR [31,32]. Estudios realizados con el *helminto Echinococcus granulosus*, indican que la prevalencia de ciertos tipos de cáncer, como el cáncer de hígado y los carcinomas gástricos, es menor en los pacientes infectados con este parásito a diferencia de los pacientes no infectados [33]. Acorde con estos resultados, trabajos previos de

nuestro grupo, utilizando un modelo de cáncer de colon asociado a colitis, determinaron el potencial efecto profiláctico de la infección y el uso de moléculas liberadas por *Taenia crassiceps* (TcES), demostrando un fuerte componente antiinflamatorio capaz de disminuir la expresión de citoquinas inflamatorias asociadas con el desarrollo y malignidad en cáncer de colon (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-33 e IL-17, así como disminución en la actividad del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) y del factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), dando como consecuencia una marcada disminución de la formación de tumores en el colon [30].

Desafortunadamente y debido a que uno de los principales problemas que se asocia con las altas tasas de mortalidad en CCR es la respuesta inadecuada a los quimioterapéuticos y resistencia que se llega a generar en los pacientes en etapas avanzadas de la enfermedad, motivo por el cual en este trabajo se evaluó el uso de los TcES como una terapia adyuvante con 5-FU en el cáncer de colon ya establecido, en el modelo de ratón CAC. Aquí nosotros demostramos que el uso de estas moléculas, como adyuvante para 5-FU, inducen una reducción significativa en el número y tamaño de los tumores de colon a través de diferentes mecanismos. Esta combinación terapéutica llevó a la regulación en la expresión de citocinas como Tgf- $\beta$ , Il-10, Tnf- $\alpha$  e Il-17a, las cuales como se mencionó anteriormente se involucran en el desarrollo de tumores y la resistencia a múltiples quimioterapéuticos, [34–36]. Cabe señalar que los tratamientos individuales de TcES y 5-FU y en conjunto (TcES+5FU) regularon negativamente la expresión de Il-10 y Tgf- $\beta$  en niveles similares, lo que indica que TcES y 5-FU no ejercieron efectos sinérgicos en esta situación.

Por otra parte debido a la alta tasa de mortalidad y la escasa eficacia de los tratamientos, en los últimos años, ha habido avances en las terapias dirigidas a los reguladores del ciclo celular.

Se sabe que el 5-FU, induce apoptosis por vías dependientes o independientes de P53, y en distintos casos la proteína P21 protege a las células de esta apoptosis [37]. Esta conclusión se ha derivado de estudios que muestran que la eliminación de P21 aumenta la sensibilidad de las células tumorales a la apoptosis inducida por diversos agentes quimioterapéuticos. En este modelo, se ha observado que P21 juega un papel anti-apoptótico en respuesta a diferentes fármacos genotóxicos que causan daño al ADN, como es el caso del 5-FU. Así mismo, diversos estudios han reportado que el incremento en la expresión de P21 es un elemento clave en la respuesta a tratamiento con 5-FU, tal como lo que se indica en el trabajo realizado por Zhang y Cols (2014), en el cual se observó en un modelo in vivo de xenoinjerto en ratón con células de cáncer de colon que sobre expresaban el micro RNA miRNA520g, se asociaba con pérdida en expresión de la proteína P21 y la inhibición de este microRNA favorecía la expresión de P21 y un incremento a la terapia con 5-FU [38].

Los resultados obtenidos con la administración de los productos derivados de *T. crassiceps* (Tces) nos llevaron a realizar un abordaje más amplio sobre el papel de P21 en apoptosis y sobre el posible papel protector de esta proteína con fármacos inhibidores tirosina-quinasa. Tal como se observaron en nuestros resultados, los grupos que recibieron la administración de los TcES tuvieron una reducción en el número de tumores en el colon, y una mejor respuesta a la terapia cuando esta fue utilizada en conjunto con el 5-FU, lo cual se relaciona con el

incremento de la proteína P21, tal como se ha reportado en trabajos previos donde se han realizado metaanálisis revelando que una baja expresión de P21 se asocia con características clínico patológicas como mala diferenciación, metástasis ganglionares, agresividad, mayor grado y estadio clínico. Así mismo existe amplia evidencia que indica que la expresión elevada de P21 es un indicador importante de buen pronóstico para los pacientes [39]. Es bien sabido que la expresión de P21 se encuentra regulada principalmente por la actividad de la proteína P53, por lo cual, el efecto en incremento de la expresión al igual en esta proteína, podría ser la clave en la recuperación de la expresión de P21, tal como lo observamos en nuestros resultados.

P53 es una molécula antitumoral supresora de tumores que esta frecuentemente inactivada por mutaciones y/o deleciones en diferentes tipos de neoplasias, incluyendo el CCR [40]. En CCR se ha reportado que 70% de los pacientes presentan alteraciones en la expresión de esta proteína. Distintos trabajos han reportado que uno de los principales mecanismos asociados a la disminución de la expresión de la proteína P53 es a través de la regulación de la proteína MDM2, la cual es un regulador negativo de P53 y el principal supresor de la función. La proteína MDM2 regula negativamente la expresión de P53, en una célula normal cuando ya no es necesario la expresión de P53, se comienza a sintetizar la proteína MDM2, que ubiquitina a la proteína P53 para marcarla y enviarla al proteosoma para su degradación [41]. En el CCR, así como otras neoplasias, se ha demostrado un incremento de la proteína MDM2 en las células cancerosas lo cual disminuye drásticamente los niveles de expresión de P53 evitando de esta manera que pueda ejercer su función, favoreciendo la tumorigenesis y malignidad de las células tumorales [42]. Por lo tanto, evitar la

expresión de los principales reguladores negativos de P53, como es MDM2, podría favorecer la estabilización de las funciones de la proteína P53, tal como se reportó en un trabajo realizado en células de cáncer de mama, en las cuales se observó que oligodesoxinucleótido anti sentido de MDM2 inhibió la expresión de esta proteína en células tumorales con una alta expresión de esta proteína. Favoreciendo de esta manera la recuperación de los niveles de la proteína P53 y una mayor efectividad en los tratamientos con fármacos inductores de daño al DNA [43]. En nuestros resultados nosotros pudimos ver algo similar a lo anteriormente reportado al observar que los animales tratados con la terapia con 5-FU y TcES en conjunto, presentaron un incremento en la expresión a nivel de proteína de P53, lo cual se relacionó con una marcada disminución en la expresión de MDM2 en el tejido de los mismos animales. Si analizamos la vinculación entre el tamaño del tumor y la expresión de la proteína p53 podemos observar que existe dependencia entre ésta y el tamaño promedio del tumor, existiendo una relación directamente proporcional con las diferentes terapias utilizadas, donde las terapias individuales tuvieron una expresión moderada de nuestra proteína de interés; por lo cual podemos proponer que uno de los principales mecanismos a través del cual los TcES pueden ejercer su efecto adyuvante, es por la disminución de los niveles de la proteína MDM2, lo cual permite la proteína P53 se pueda recuperar y a su vez activar a la proteína P21.

### **13. Conclusiones Generales**

- Moléculas derivadas de *T. crassiceps* (TcES) inhiben el desarrollo del CAC, reduciendo el tamaño de los tumores.
- El uso de los TcES, como terapia adyuvante potencia el efecto del 5-FU en el tratamiento de CAC en un modelo murino.
- El uso de los TcES regula positivamente la expresión de P53
- Los TcES regulan positivamente la expresión de P21 a través de la expresión de P53 e inhibición de la proteína MDM2, principal regulador negativo de P53.

## **14. Perspectivas**

Realizar ensayos funcionales para evaluar la regulación de la expresión de MDM2 a través del TcES y determinar si esta regulación se da a través de la vía AKT.

## 15.REFERENCIAS

1. 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*. 2021;71.
2. Hano García OM, Wood Rodríguez L, Galbán García E, Abreu Vázquez M del R. Factores de riesgo para el cáncer colorrectal. *Rev Cubana Med*. 2011;50.
3. Shawki S, Ashburn J, Signs SA, Huang E. Colon Cancer: Inflammation-Associated Cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2018.
4. De León J, Pareja A. ARTÍCULO DE REVISIÓN Inmunología del cáncer I: bases moleculares y celulares de la respuesta inmune antitumoral *Cancer immunology I: molecular and cellular bases of the antitumor immune response*. *Horiz Med [Internet]*. 2018 [cited 2023 May 17];18:80–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.24265/horizmed.2018.v18n3.11>
5. Cruz-Bustillo Clarens D. Genética molecular del cáncer colorrectal. *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas*. 2004.
6. Testa U, Pelosi E, Castelli G. Colorectal cancer: genetic abnormalities, tumor progression, tumor heterogeneity, clonal evolution and tumor-initiating cells. *Med Sci (Basel)*. 2018.
7. Grivennikov SI. Inflammation and colorectal cancer: Colitis-associated neoplasia. *Semin Immunopathol*. 2013.
8. Bosman MCJ, Schuringa JJ, Vellenga E. Constitutive NF- $\kappa$ B activation in AML: Causes and treatment strategies. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016.
9. Francescone R, Hou V, Grivennikov SI. Cytokines, IBD, and colitis-associated cancer. *Inflamm Bowel Dis*. 2015.

10. Schreuders EH, Ruco A, Rabeneck L, Schoen RE, Sung JJY, Young GP, et al. Colorectal cancer screening: A global overview of existing programmes. *Gut*. 2015;64.
11. Goldstein DA, Zeichner SB, Bartnik CM, Neustadter E, Flowers CR. Metastatic Colorectal Cancer: A Systematic Review of the Value of Current Therapies. *Clin Colorectal Cancer*. 2016.
12. Matus-Santos JA, Aguilar-Ponce JL, Lara-Medina FU, Herrera-Gómez Á, Meneces-García A, López-Gamboa M. Revisión del monitoreo farmacocinético del 5-fluorouracilo como herramienta para incrementar eficacia y seguridad. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2016;54.
13. Mini E, Trave F, Rustum YM, Bertino JR. Enhancement of the antitumor effects of 5-fluorouracil by folinic acid. *Pharmacol Ther*. 1990.
14. Schwartzmann G, Peters GJ, Laurensse E, de Waal FC, Loonen AH, Leyva A, et al. DUP 785 (NSC 368390): Schedule-dependency of growth-inhibitory and antiprimidine effects. *Biochem Pharmacol*. 1988;37.
15. Sood A, Ma S, Pradeep S, Hu W, Zhang D, Coleman R. The role of tumor microenvironment in resistance to anti-angiogenic therapy. *F1000Res*. 2018.
16. Rey-Caro LA, Pinzón P, Cruz-Rodríguez N. Mecanismos moleculares emergentes y células madre leucémicas en la quimiorresistencia de tumores hematológicos. *Revista de la Universidad Industrial de Santander Salud*. 2020;52.
17. Hu T, Li Z, Gao CY, Cho CH. Mechanisms of drug resistance in colon cancer and its therapeutic strategies. *World J Gastroenterol*. 2016.
18. Williams GH, Stoeber K. The cell cycle and cancer. *Journal of Pathology*. 2012.

19. Tume-farfán L. Implicaciones del estudio de inestabilidad del ciclo celular en la biología del cáncer. *Revista CENIC : Ciencias Biológicas*. 2014;45.
20. Vigneron A, Cherier J, Barré B, Gamelin E, Coqueret O. The cell cycle inhibitor p21waf1 binds to the myc and cdc25A promoters upon DNA damage and induces transcriptional repression. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281.
21. Ramos Guette PL, Ramos Escalante MA. Supervivencia cáncer de mama metastásico receptor hormonal positivo. *Revista Colombiana de Hematología y Oncología*. 2022;8.
22. Carné Trécesson S De, Guillemain Y, Bélanger A, Bernard AC, Preisser L, Ravon E, et al. Escape from p21-mediated oncogene-induced senescence leads to cell dedifferentiation and dependence on anti-apoptotic Bcl-xL and MCL1 proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 2011;286.
23. Devgan V, Mammucari C, Millar SE, Brisken C, Dotto GP. p21WAF1/Cip1 is a negative transcriptional regulator of Wnt4 expression downstream of Notch1 activation. *Genes Dev*. 2005;19.
24. Chang CN, Feng MJ, Chen YL, Yuan RH, Jeng YM. p15PAF Is an Rb/E2F-Regulated S-Phase Protein Essential for DNA Synthesis and Cell Cycle Progression. *PLoS One*. 2013;8.
25. Villunger A, Michalak EM, Coultas L, Müllauer F, Böck G, Ausserlechner MJ, et al. p53- and Drug-Induced Apoptotic Responses Mediated by BH3-Only Proteins Puma and Noxa. *Science (1979)*. 2003;302.
26. Rejhová A, Opattová A, Čumová A, Slíva D, Vodička P. Natural compounds and combination therapy in colorectal cancer treatment. *Eur J Med Chem*. 2018.

27. Veloz A, Reyes-Vázquez L, Patricio-Gómez JM, Romano MC. Effect of mice *Taenia crassiceps* WFU cysticerci infection on the ovarian folliculogenesis, enzyme expression, and serum estradiol. *Exp Parasitol.* 2019;207.
28. Oficina General de Epidemiología. Teniasis/Cisticercosis Por *Taenia Solium*, Un Serio Problema De Salud Pública En El Perú. Serie informes técnicos de investigación Epidemiológica N°025. 2001;
29. Nappi A, Berretta M, Romano C, Tafuto S, Cassata A, Casaretti R, et al. Metastatic Colorectal Cancer: Role of Target Therapies and Future Perspectives. *Curr Cancer Drug Targets.* 2017;18.
30. Callejas BE, Martínez-Saucedo D, Terrazas LI. Parasites as negative regulators of cancer. *Biosci Rep.* 2018.
31. Ranasinghe SL, McManus DP. *Echinococcus granulosus*: Cure for cancer revisited. *Front Med (Lausanne).* 2018.
32. Atayde VD, Jasiulionis MG, Cortez M, Yoshida N. A recombinant protein based on *Trypanosoma cruzi* surface molecule gp82 induces apoptotic cell death in melanoma cells. *Melanoma Res.* 2008;18.
33. Akgül H, Tez M, Unal AE, Keşkek M, Sayek I, Özçelik T. *Echinococcus* against cancer: why not? *Cancer.* 2003.
34. Brunen D, Willems SM, Kellner U, Midgley R, Simon I, Bernards R. TGF- $\beta$ : An emerging player in drug resistance. *Cell Cycle.* 2013;12.
35. Chang J, Zhang W, Lin G, Tong D, Zhu D, Zhao J, et al. Tumor response to irinotecan is associated with il-10 expression level in metastatic colorectal cancer- results from mcrb biomarker study. *Onco Targets Ther.* 2020;13.

36. Kinoshita M, Kobayashi S, Gotoh K, Kubo M, Hayashi K, Iwagami Y, et al. Heterogeneity of Treg/Th17 According to Cancer Progression and Modification in Biliary Tract Cancers via Self-Producing Cytokines. *Dig Dis Sci*. 2020;65.
37. Gorospe M, Cirielli C, Wang X, Seth P, Capogrossi MC, Holbrook NJ. p21(Waf1/Cip1) protects against p53-mediated apoptosis of human melanoma cells. *Oncogene*. 1997;14.
38. Zhang Y, Geng L, Talmon G, Wang J. MicroRNA-520g confers drug resistance by regulating p21 expression in colorectal cancer. *Journal of Biological Chemistry*. 2015;290.
39. Wang L, Han H, Dong L, Wang Z, Qin Y. Function of p21 and its therapeutic effects in esophageal cancer (Review). *Oncol Lett*. 2021.
40. Roa S JC, Roa E I, Araya O JC, Villaseca H MA, Melo A A, Burgos S L. p53 tumor supresor gene in digestive cancer. *Rev Med Chil*. 2000;128.
41. Silva A, del Arroyo AG, Arias C, Lazaro I. Estructura, regulación y funciones del gen supresor de tumores p53. V congreso virtual hispanoamericano de anatomía patológica. 2021;
42. Flores P C, Sobrevia L L. Tumorigenesis and mdm2 protein. *Rev Med Chil*. 2000;128.
43. Chen L, Agrawal S, Zhou W, Zhang R, Chen J. Synergistic activation of p53 by inhibition of MDM2 expression and DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95.