



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

EFFECTO DE LOS ANTÍGENOS SECRETADOS
POR EL PARÁSITO HELMINTO *Taenia*
crassiceps EN DISTINTAS RUTAS DE
SEÑALIZACIÓN COMÚNMENTE AFECTADAS
EN CÁNCER COLORRECTAL

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

Norma Carraro Morales

DIRECTOR DE TESIS
Dr. Luis Enrique Arias Romero

LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO.

2019





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala por abrirme sus puertas y tener el honor de cursar la carrera de biología en sus aulas y laboratorios.

Al apoyo otorgado por la UNAM-DGAPA a través de los proyectos PAPIIT IA204115 al Dr. Luis Enrique Arias Romero.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT) por la beca de tesis folio 17ABTL0183

Al Dr. Luis Enrique Arias Romero por su apoyo para la realización del proyecto de investigación.

A los miembros del comité tutor: Dra. Miriam Rodriguez Sosa, M. en C. Pilar Amellali Badillo Suárez, Dr. Manuel Arias, Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés por sus valiosos comentarios y apoyo durante el desarrollo del presente proyecto de investigación.

Agradecimientos y dedicatorias

A mis padres Salvador Carraro y Merced Morales: Por su amor, su apoyo incondicional, sus enseñanzas y por siempre ser un ejemplo a seguir. Han sido mi mayor inspiración en cada paso en mi proyecto de vida. Este logro es el reflejo de su amor y soporte pues estuvieron en cada desvelada, examen y cada nuevo reto. Porque los logros en mi vida siempre serán para ustedes.

A mis hermanas Lucero, Karla y Cinthia: Ustedes han sido un ejemplo de superación y constancia que me ha motivado a ser mejor persona y profesionista. Este logro lo dedico a ustedes con mucho cariño, porque sé que en cada paso podré contar con ustedes y siempre serán un gran ejemplo e inspiración para mí.

A mi Esposo Ismael: Por ser mi compañero de escuela, mi maestro, mi familia y mi mayor apoyo, por siempre inspirarme a levantarme en cada tropiezo. Sabes que cada logro es tan tuyo como mío. Por estar conmigo en cada desvelo, en cada paso, en cada aprendizaje y por siempre motivarme a seguir creciendo. TE AMO

A mi segunda familia. Sofía e Ismael por abrirme las puertas de su casa y permitirme ser parte de ustedes. Eira, Cynthia, Ceci y Saúl, por todas las noches que pude compartir a su lado, todos esos consejos, vivencias y por también apoyarme a concluir esta etapa.

A mis amigos de toda la vida Mauro y Gladys, porque a través de los años han estado ahí, siempre apoyándome aún en la distancia. Hoy día sé que en cada paso de mi camino podré contar incondicionalmente con ustedes.

A mis dos mayores confidentes: mi pequeña Zuri sé que cuento contigo aun cuando nos dejemos de ver. Estuviste en este camino aun cuando no entendías lo que hacía, cuando entrabas a mis clases y me veías clasificando plantas, gracias por ser siempre un apoyo para

Norma Carraro Morales

mí. A Noemí por ser durante muchos años una parte fundamental para mí, por tu apoyo en los momentos más difíciles de mi camino y por enseñarme a confiar en las personas, siempre serás mi mejor recuerdo.

A mis compañeras y amigas Vanessa, Maggie, Michelle: Por formar parte de las tardígradas y ser más que un equipo de desvelo para estudiar. Por todas esas peleas que tuvimos en infinidad de trabajos en los que terminábamos siempre aprendiendo juntas y viviendo innumerables historias en cada práctica, cada proyecto, cada examen, cada trabajo. Porque mi aprendizaje en la carrera fue también por ustedes.

A mis compañeros de laboratorio, Brandon, Eloy e Iván por las tardes de experimentos en las que me apoyaron y me enseñaron tanto.

A todos los profesores que se encargaron de darme la formación académica, fueron una parte fundamental e indispensable para tener el amor y la paciencia académica que me permitió concluir al día de hoy. Gracias maestras Vianey y Martha, por ser parte de mis primeras etapas de aprendizaje y llegar más allá de lo que dicta su vocación. A mis profesores de secundaria: Juan Carlos (matemáticas), José Antonio (química) y Alejandro (español), por enseñarme a descubrir lo que era capaz y creer en mí. A Diego y Berta por enseñarme el amor a la biología y ser parte de mi inspiración para continuar en esta carrera. A mis profesores de la carrera la maestra Lolita, Ismael, José Luis Tello, Patricia, Hugo, Manuel Arias y Ángel Lara por ser excelentes profesores e impartir con pasión sus clases, siempre buscando lo mejor de sus alumnos. Gracias a todos por cada una de sus enseñanzas.

ÍNDICE

Índice de figuras	i
Índice de tablas	i
Abreviaturas.....	ii
I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCIÓN	3
1. Cáncer	3
1.1. Causas del cáncer	4
1.2. Cáncer colorrectal	5
2. Marcadores del cáncer e inmunidad tumoral	8
2.1. Marcadores del cáncer	8
2.1.1. Proliferación sostenida.....	9
2.1.2. Evasión de supresores de crecimiento	10
2.1.3. Resistencia a la muerte celular	10
2.1.4. Inmortalidad replicativa	11
2.1.5. Inducción de angiogénesis	11
2.1.6. Activación de invasión y metástasis	12
2.1.7. Inestabilidad genómica y mutaciones	13
2.1.8. Desregulación energética celular	13
2.1.9. Inflamación como promotor de tumores	14
2.1.10. Evasión del sistema inmune	14
2.2. Inmunidad tumoral.....	14
2.2.1. Eliminación	15
2.2.2. Equilibrio.....	16
2.2.3. Escape	16
3. Inflamación y cáncer	18
4. Modulación de respuesta inflamatoria por parásitos intestinales y su uso como terapias alternativas en enfermedades asociadas a la inflamación	18
5. CCR y las vías de señalización	21

5.1. Vía de las MAP cinasas. KRas	22
5.2. Vía de PI3K/AKT/mTOR.....	24
5.3. Vía Wnt/ β -catenina	26
III. HIPÓTESIS	29
IV. OBJETIVOS	29
V. MATERIAL Y METODO	30
1. Cultivo celular	30
2. Generación de curvas de sobrevivencia.....	30
3. Ensayo de Apoptosis	30
4. Ensayo de proliferación	31
5. Western blot	31
6. Inmunofluorescencia	32
7. Análisis estadístico	33
VI. RESULTADOS	34
1. Efecto de los antígenos de <i>T. crassiceps</i> en la sobrevivencia y viabilidad.....	34
2. Efecto de los antígenos de <i>T. crassiceps</i> en la proliferación	36
3. Análisis del efecto de los antígenos en las diferentes vías de señalización que regulan la sobrevivencia y proliferación celular	37
VII. DISCUSIÓN	40
VIII. CONCLUSIÓN	46
IX. LITERATURA CITADA	47

Índice de figuras

1. Casos y muertes estimadas por cáncer durante el 2014.....	4
2. Progresión del CCR.....	8
3. Marcadores del cáncer propuestos a través de los años.....	9
4. Inmunoedición del cáncer y las tres fases que la componen: Eliminación, Equilibrio y Escape.....	17
5. Vías de Señalización comúnmente afectadas en el CCR.....	22
6. Vía de señalización Ras/RAF/MEK/ERK.....	23
7. Vía de señalización de PI3K/AKT/mTOR.....	25
8. Vía canonica de señalización Wnt/ β -catenina.....	27
9. Curvas de sobrevivencia de las distintas líneas celulares de CCR tratadas con los antígenos de <i>T. crassiceps</i>	35
10. Apoptosis de las células después de 72 h con el tratamiento.....	36
11. Curva de proliferación celular de las distintas líneas celulares de CCR tratadas con los antígenos de <i>T. crassiceps</i>	37
12. Determinación de la presencia de las proteínas de las distintas vías de señalización comúnmente mutadas en CCR.....	38
13. Inmunodetección de la proteína ERK1/2 en su forma activa perteneciente a la vía MAPK afectada en al CCR.....	39

Índice de tablas

1. Helmintos utilizados para el tratamiento de enfermedades autoinmunes y alérgicas.....	20
---	----

Abreviaturas

AINE	Fármacos anti-inflamatorios no esteroideos
AKT	Proteína cinasa B
APC	Gen Adenomatous polyposis coli
BAX	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BRAF	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
BSA	Albumina de suero bovino
Buffer RIPA	Buffer para extracción e inmunoprecipitación de proteínas (por sus siglas en inglés <i>Radioimmunoprecipitation assay</i>)
CCR	Cáncer colorrectal
Células Treg	Células T reguladoras
c-Fos	Finkel–Biskis–Jinkins murine osteogenic sarcoma
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
Dvl	Dishevelled
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
Elk1	Ets LiKe gene1
ERK 1/2	Extracellular signal-regulated kinase 1 y 2
FBS	Suero fetal bovino
Fzd	Frizzled
GDP	Guanosin difosfato
Grb2	Proteína 2 de unión al receptor del factor de crecimiento
GSK3 β	Glucógeno sintasa cinasa 3 beta
GTP	Guanosin trifosfato
HER-2	Receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano
IC50	Índice de citotoxicidad media
IDO	Indolamina 2,3-dioxigenasa
IgE	Inmunoglobulina E
IL1 α	Interleucina 1 alfa
IL1 β	Interleucina 1 beta
IL4, IL5, IL6	Interleucina 4, 5, 6
INF- γ	Interferon gamma
Jak2	Proteína cinasa 2 (por sus siglas en inglés <i>Janus kinasas</i>)
KRas	Kirsten rat sarcoma viral
LOX	Lisil-oxidasa
MAGE	Células somáticas
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
MDSCs	Células supresoras de origen mieloide
MEC	Matriz extracelular
MEK	Proteína cinasa (de MAP cinasa/ERK cinasa)
MMP-9	Metaloproteasa 9

mTOR	Mammalian target of rapamycin
MTT	Bromuro de 3[4,5 dimetil-2-tiazolil]-2,5-difeniltetrazólico
NF-kB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NK	Células asesinas naturales
NKT	Células asesinas naturales T
NY-eSO-1	Antígeno tumoral de células de cáncer de testículo
p53	Fosfoproteína nuclear multifuncional de 53 kD
PBS	Buffer salino de fosfatos
PD-1	Programmed Death-1
PDK	Cinasa dependiente de fosfo-inositol
PD-L1	Ligando de la proteína PD-1
PFA	PaRAFormaldehido
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PIP2	4,5-fosfo-inositol
PIP3	3,4,5-fosfo-inositol trifosfato
PTEN	Supresor tumoral (fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa)
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
RAF	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
Ras	Rat sarcoma
Rb	Proteína del retinoblastoma
RSK	Proteína cinasa ribosomal S6
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SMAD	Proteína (por sus siglas en inglés “ <i>sma</i> ” <i>Mothers Against Decantaplegic</i>)
Sos 1/2	Proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina (por sus siglas en inglés <i>son of sevenless</i>)
STAT3	Proteína transmisora de señales y activadora de la transcripción 3
TBS	Buffer tris salino
TCR	Receptor de células T
TGF α y β	Factor de crecimiento transformante alfa y beta
TGFBR2	Receptor del factor de crecimiento transformante beta 2
Th1 y Th2	T helper 1 y 2
TSC1 y TSC2	Tuberous sclerosis complex 1 y 2
VEGF	Factores de crecimiento endotelial vascular
Wnt	Wingless

I. RESUMEN

Se define al cáncer como un trastorno caracterizado por la proliferación autónoma de células neoplásicas que crecen de forma invasiva y se propagan a través de los tejidos. El cáncer colorrectal (CCR) es la tercer neoplasia más frecuente en el mundo. Durante el desarrollo de CCR ciertas vías de señalización son claramente identificadas como factores clave en la formación de tumores. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de los antígenos secretados por el parásito helminto *T. crassiceps* en las rutas de señalización comúnmente afectadas en el CCR: Ras/RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT/mTOR y Wnt/ β -catenina. Para la realización de este proyecto se emplearon las líneas celulares de CCR HCT-116, HT-29, SW620 y LoVo. Las cuales presentan mutaciones en las vías de señalización antes mencionadas. En primer lugar. Se generaron curvas de sobrevivencia y se calcularon las IC50 para cada una de las líneas celulares. Los resultados obtenidos mostraron que la línea celular más sensible a los antígenos de *T. crassiceps* fue HCT-116, con una IC50 de 88 ng/mL, seguida de las líneas celulares SW620, LoVo y HT-29, que presentaron valores de IC50 de 896 ng/mL, 963 ng/mL y 6.7 μ g/mL respectivamente.

Con el propósito de analizar si los antígenos de *T. crassiceps* tienen un efecto citotóxico en las células cancerosas, se determinó si estas proteínas eran capaces de inducir apoptosis, no se observaron diferencias en la inducción de apoptosis en ninguna de las líneas celulares incubadas en presencia o en ausencia de los antígenos, lo que sugiere que estas moléculas no inducen la muerte celular programada.

Se evaluó si el efecto causado por los antígenos en las curvas de sobrevivencia se debía a un efecto citostático y no citotóxico, por lo que se realizaron ensayos de proliferación celular. Los resultados obtenidos, demuestran que los antígenos de *T. crassiceps* inhiben la proliferación celular exclusivamente en la línea celular HCT-116 y no tienen efecto en las otras líneas celulares, y que, por el contrario, en la línea HT-29 que es insensible a los antígenos, se observó un aumento significativo en la proliferación.

Posteriormente, se analizaron los efectos de los antígenos de *T. crassiceps* en los niveles de activación de las rutas de Ras/RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT y Wnt/ β -catenina

Norma Carraro Morales

mediante Western blot. Nuestros resultados mostraron que en la línea celular HCT-116 hay una reducción modesta (de aproximadamente 25%) en los niveles de fosforilación de ERK1/2, mientras que los componentes de las otras vías estudiadas no se ven afectados. De manera interesante, en la línea celular HT-29, que prolifera más en presencia de los antígenos, se observa un aumento considerable en los niveles de activación de β -catenina, lo cual explica su mayor tasa de división celular. Estos resultados sugerían los antígenos de *T. crassiceps* inhibían la activación de la vía de las MAPK en la línea celular HCT-116, la cual tiene mutaciones en Ras. El efector final de la vía es la proteína ERK, la cual una vez que es fosforilada por MEK se transloca al núcleo y promueve la transcripción de genes involucrados en la proliferación celular. Por este motivo, se estudió el efecto de los antígenos de *T. crassiceps* en la localización celular de ERK mediante microscopía de fluorescencia, los resultados demuestran que estos antígenos impiden la translocación de ERK al núcleo y por lo tanto la transcripción de genes de sobrevivencia y proliferación. En conjunto los resultados sugieren que los antígenos de *T. crassiceps* tuvieron efectos antiproliferativos en dos de las líneas celulares de CCR: HCT-116 y HT-29 las cuales presentan mutaciones en la vía de Ras/RAF/MEK/ERK y PI3K/AKT/mTOR respectivamente, en las otras dos líneas celulares estudiadas no se observó ningún efecto en los procesos celulares analizados.

II. INTRODUCCIÓN

1. Cáncer

Se define al cáncer como un trastorno caracterizado por la proliferación autónoma de células neoplásicas que crecen de forma invasiva y se propagan a través de los tejidos; esta enfermedad puede ser de origen genético y en algunos tipos, influenciado por factores hereditarios, así como cambios en el genoma (Karp 2011; ACS 2014; Hanahan y Weinberg 2011). Los mecanismos que controlan la diferenciación, crecimiento y proliferación celular se encuentran alterados en el cáncer, por ejemplo en los mecanismos de inmunidad celular, en la expresión de factores de crecimiento o la alteración de genes supresores de tumores como Rb (Proteína del retinoblastoma), p53 (fosfoproteína nuclear multifuncional de 53 kDa) (Medina Villaseñor y Martínez Macías 2009).

El cáncer representa una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial; en 2012 se reportaron 14 millones de casos nuevos y 8.2 millones de muertes relacionadas con el cáncer. Se prevé que para el 2034 el número de nuevos casos aumente en aproximadamente un 70% (Stewart y Wild 2014).

Esta enfermedad se puede presentar en diferentes órganos y tejidos, clasificándose de diferentes maneras, una de ellas es por origen: tumores de origen epitelial (carcinomas y adenocarcinomas), tumores mesenquimatosos (sarcomas de partes blandas y hueso) y de origen linfoide (linfomas) (Goodman y Fuller 2014). El epitelio es el tejido que recubre todas las superficies del organismo, así como el revestimiento interno de algunas cavidades, órganos huecos, conductos del cuerpo, piel, mucosas y glándulas. Cuando las células tumorales provienen del epitelio que recubre las glándulas se denomina adenocarcinoma y cuando el epitelio es de una superficie no glandular se llama carcinoma. Debido a la abundancia de epitelio en el cuerpo humano los carcinomas son el tipo de cáncer más común en la población, los carcinomas con mayor incidencia son el cáncer de mama, de próstata, colorrectal y el cáncer de pulmón (Fig. 1) (Valdespino Castillo *et al.*, 2014).

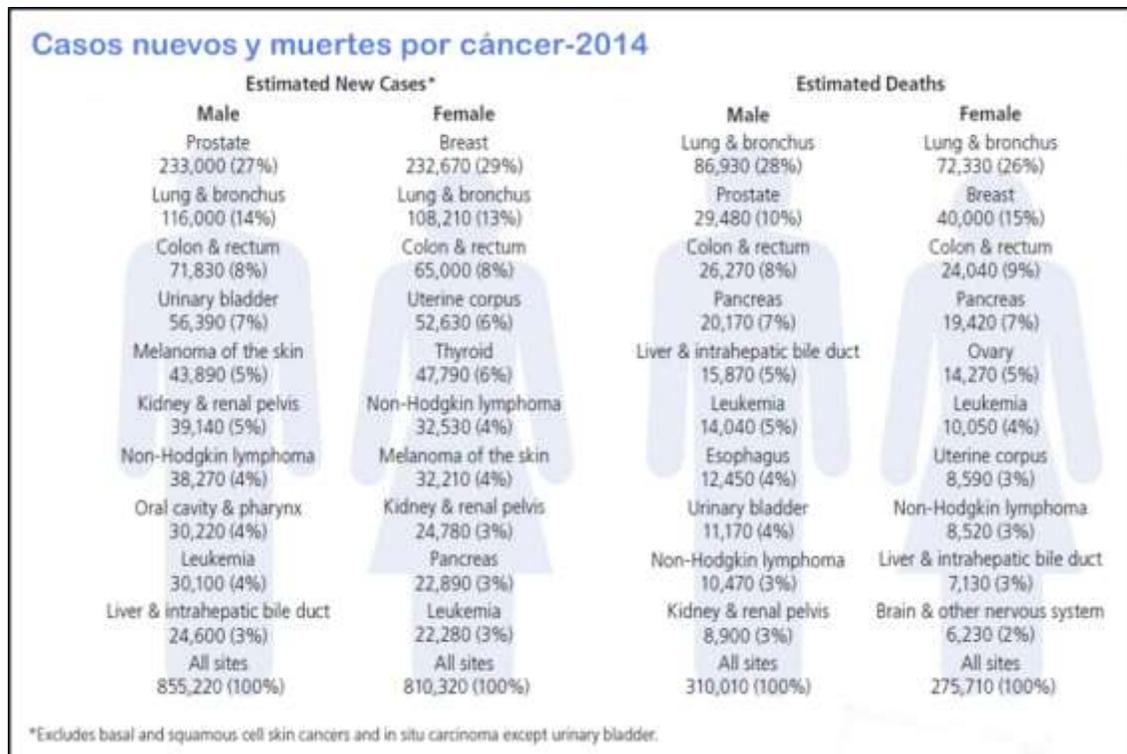


Figura 1. Casos y muertes por cáncer estimadas del 2014 (Tomado de ACS 2014).

1.1. Causas del cáncer

Las causas del cáncer pueden ser por diferentes factores entre los cuales se encuentran agentes que se denominan cancerígenos, agrupados en tres grandes grupos de acuerdo con la OMS (2015) a través del Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés):

- Cancerígenos físicos: radiaciones ionizantes y ultravioleta.
- Cancerígenos químicos: tabaco, alcohol, asbestos, arsénico, aflatoxinas.
- Cancerígenos biológicos: infecciones causadas por ciertos virus, bacterias o parásitos.

La exposición a estos agentes cancerígenos, en combinación con factores ambientales y genéticos, así como los estilos de vida poco saludables y el sedentarismo, son las causas más asociadas al desarrollo de cáncer (OMS 2014).

Además de la exposición a los agentes cancerígenos algunos autores han indicado que las diferencias geográficas tienen un papel importante en el desarrollo del cáncer. Moreels y Pelckmans (2006) plantearon a partir de la hipótesis de la higiene la baja incidencia de enfermedades inflamatorias del intestino (enfermedad que cuando es crónica y no se atiende adecuadamente, puede generar cáncer), mencionan que en países en desarrollo es más baja la incidencia a diferencia de los países desarrollados.

Una vez que se establece el cáncer (por factores genéticos o ambientales), algunas células cancerígenas desarrollan un fenotipo que les permite evadir los mecanismos de control que se presentan en el cuerpo, llegando a proliferar e invadir otros tejidos de manera exitosa. En la actualidad se han descrito algunas de las características necesarias para la supervivencia exitosa de las células cancerígenas, las cuales se describirán más adelante.

1.2. Cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal (CCR) es la tercer neoplasia más frecuente en el mundo (ACS 2014; Torre *et al.*, 2015; Siegel *et al.*, 2017). Cada año en los Estados Unidos se diagnostican 140 mil casos de CCR, de los cuales más de 50 mil pacientes mueren por esta enfermedad, siendo la segunda causa de muerte entre los adultos (Siegel *et al.*, 2017). Durante el 2010, en México se reportaron 74685 muertes por cáncer (13% de las muertes por enfermedades) de las cuales más de 4 mil casos fueron por CCR, aumentando de 2.6 a 3.6 casos por cada 100 mil habitantes en una década (Aldaco-Sarvide *et al.*, 2012). Diversas instituciones han hecho estimaciones sobre el número de casos de cáncer en México. El INEGI reportó que el CCR es la principal causa de muerte después del cáncer de mama. En la población de 20-50 años los tumores malignos de CCR son la principal causa de mortalidad con 32.52 casos por cada 100 mil habitantes, siendo una situación cada vez más alarmante (INEGI 2016).

La enfermedad comienza como un pólipo adenomatoso benigno, que se convierte en un adenoma avanzado con displasia de alto grado y luego progresa a un cáncer invasivo. Los cánceres invasivos que están confinados dentro de la pared del colon (nódulos tumorales - estadios de metástasis I y II) son curables, pero si no se tratan, se diseminan a los ganglios

linfáticos regionales (estadio III) y luego se metastatizan a sitios distantes (estadio IV) (Markowitz *et al.*, 2002).

La pérdida de la estabilidad genómica puede impulsar el desarrollo de CCR, facilitando la adquisición de múltiples mutaciones asociadas al tumor. En esta enfermedad, la inestabilidad genómica toma varias formas, cada una con causas diferentes. El tipo más común de inestabilidad genómica en CCR es la inestabilidad cromosómica, un mecanismo eficaz para causar la pérdida física de copias de genes supresores de tumores como APC (Adenomatous polyposis coli) y p53 (Lengauer *et al.*, 1997).

En el desarrollo de CCR se generan diversos cambios genéticos, pero ciertas vías de señalización son claramente identificadas como factores clave en la formación de tumores. Uno de estos cambios es la activación de la vía de señalización de Wnt (del inglés *Wingless*), lo cual se considera como el evento iniciador en el CCR. La señalización de Wnt ocurre cuando la oncoproteína β -catenina se une a receptores nucleares, miembros de la familia de factor celular T, para crear un factor de transcripción que regula los genes implicados en la activación celular. El complejo de degradación de β -catenina controla los niveles de la proteína β -catenina por proteólisis. Un componente de este complejo, APC, no sólo degrada la β -catenina sino que también inhibe su localización nuclear (Barber *et al.*, 2008; Goss y Groden 2000; Yin y Shen 2008).

La inactivación de la vía p53 por mutación es el segundo paso clave en el desarrollo del CCR. En la mayoría de los tumores, los dos alelos de p53 son inactivados, usualmente por una mutación errónea que inhibe la actividad transcripcional de p53 y una delección cromosómica que elimina el segundo alelo. Asimismo, p53 media el ciclo celular y participa en la regulación de la muerte celular. La inactivación de p53 a menudo coincide con la transición de grandes adenomas en carcinomas invasivos. En varios casos de CCR con defectos de reparación, p53 permanece como tipo nativo, aunque en este tipo de cáncer, la actividad de la vía p53 es probablemente atenuada por mutaciones en BAX (Bcl-2 associated X protein) el cual es inductor de apoptosis (Shen *et al.*, 2007 ; Baker *et al.*, 1989, 1990).

Un tercer paso en la progresión al CCR es la inactivación de la vía TGF- β (factor de crecimiento transformante β). En aproximadamente un tercio de los casos de CCR, las mutaciones somáticas inactivan al receptor 2 del factor de crecimiento transformante β (TGFBR2). En los tumores con defectos de reparación del DNA, TGFBR2 es inactivado por mutaciones distintivas en una repetición de poliadenina dentro de la secuencia codificante del TGFBR2. En al menos la mitad de los casos de CCR con la reparación de desajustes, la señalización por TGF- β se suprime mediante la inactivación de mutaciones erróneas que afectan al dominio de la cinasa TGFBR2 o, más comúnmente, mutaciones y deleciones que inactivan el componente de vía TGF o sus factores de transcripción asociados; SMAD2 y SMAD3 (Sjöblom *et al.*, 2006; Wood *et al.*, 2007).

Varios oncogenes desempeñan un papel clave en la promoción del CCR (Fig. 2). Las mutaciones oncogénicas de RAS y BRAF, que activan la vía de señalización de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK), se producen en el 37% y el 13% respectivamente en el desarrollo de cáncer colorrectal. Las mutaciones de Ras, principalmente de KRas, activan a la GTPasa que se une al dominio de unión a GTP de RAF, este fosforila a MEK, y MEK a su vez activa a ERK. Las mutaciones en BRAF generan una cinasa constitutivamente activa que promueve una hiperactividad de la vía de las MAPK. Las mutaciones BRAF son detectables incluso en pólipos pequeños, y en comparación con las mutaciones Ras, son más comunes en pólipos hiperplásicos, adenomas dentados y cáncer de colon proximal (Nosho *et al.*, 2008; Davies *et al.*, 2002; Siena *et al.*, 2009).

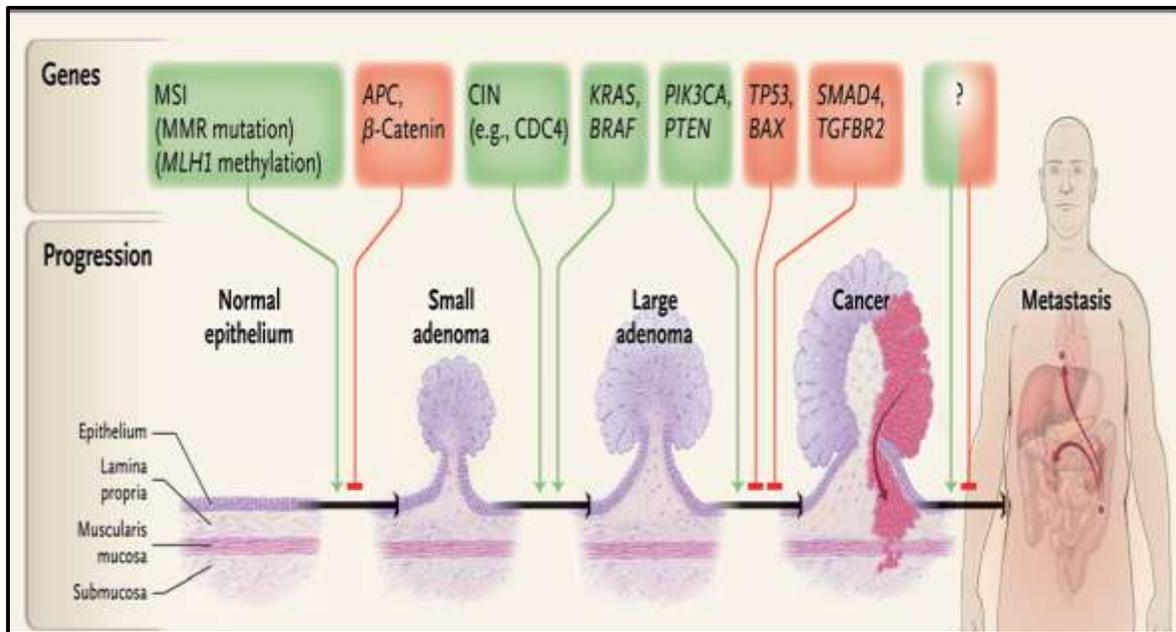


Figura 2. Progresión del CCR (Tomado de Markowitz y Bertagnoli 2009)

2. Marcadores del cáncer e inmunidad tumoral

2.1. Marcadores del cáncer

En los estudios de cáncer se han descrito algunas características biológicas que las células cancerosas adquieren para poder llevar a cabo procesos como la angiogénesis, proliferación, supervivencia, etc. Inicialmente se describieron 6 marcadores o características las cuales son fundamentales para el éxito de las células cancerosas: 1. proliferación sostenida, 2. evasión de supresores de crecimiento, 3. resistencia a la muerte celular, 4. inmortalidad replicativa, 5. Inducción de angiogénesis y 6. adquisición de propiedades invasivas y metástasis (Hanahan y Weinberg 2000). Sin embargo, con los nuevos descubrimientos se añadieron 4 características más: 1. inestabilidad genómica y mutaciones, 2. desregulación energética celular, 3. inflamación como promotor de tumores y 4. evasión del sistema inmune (Hanahan y Weinberg 2011), permitiendo comprender mejor el papel del sistema inmune en el desarrollo y progresión del cáncer (Fig. 3).

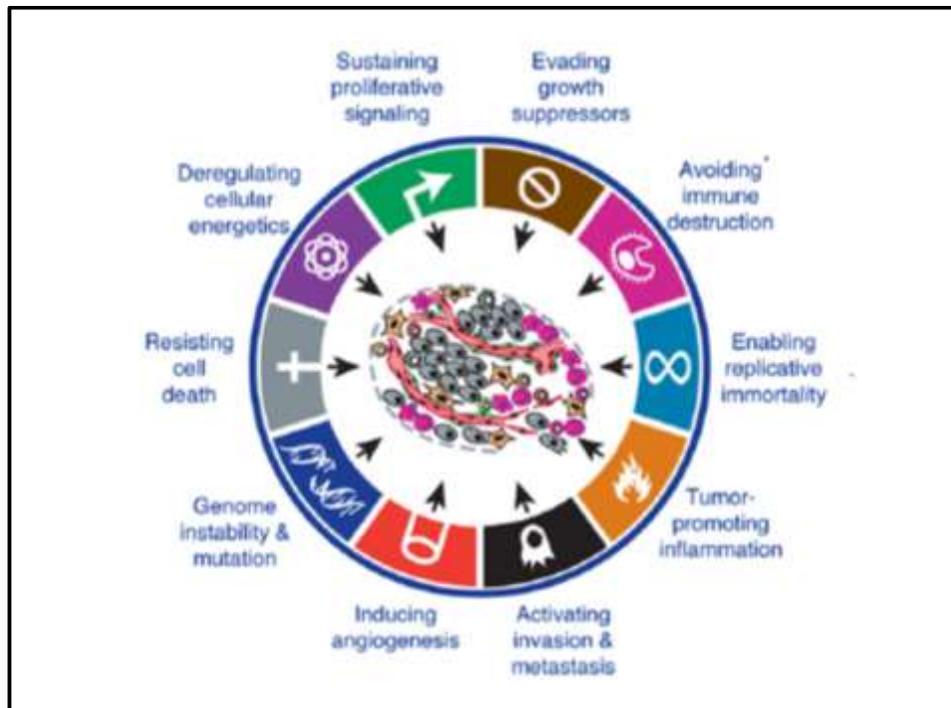


Figura 3. Marcadores del cáncer propuestos a través de los años (Tomado de Hanahan y Weinberg 2011).

2.1.1. Proliferación sostenida

En una célula normal existen señales de activación como los factores de crecimiento los cuales se unen a sus respectivos receptores de membrana con actividad de tirosina-cinasas, desencadenando la activación de diferentes vías de señalización que regulan el ciclo celular, la activación de la proliferación celular, metabolismo, etc. Las células cancerosas, a diferencia de una célula normal, no necesitan de la estimulación de señales externas (como lo son los factores de crecimiento) para multiplicarse (Karp 2011). Existen mecanismos que las células cancerosas presentan para poder llevar a cabo esto. Uno de ellos es la señalización autocrina o la retroalimentación negativa. Además, se pueden presentar modificaciones en la actividad de proteínas que de manera normal se activan a través de las señales de factores de crecimiento, pero que en el cáncer están activadas constitutivamente promoviendo la proliferación sostenida (Sporn y Roberts 1985; Graeber y Eisenberg 2001).

2.1.2. Evasión de supresores de crecimiento

Las células tienen mecanismos que impiden el crecimiento y la división celular descontrolados, estos mecanismos son regulados por los genes supresores de tumores. Las células cancerosas presentan diferentes mecanismos que evitan el funcionamiento adecuado de estas proteínas supresoras de tumores, como son las mutaciones en estos genes o la sobre-expresión de reguladores negativos de supresores tumorales, lo que permite que continúe la división celular, aun cuando haya anormalidades severas en las células (Markowitz y Bertagnolli 2009). Otro mecanismo es conocido como inhibición del crecimiento por contacto, en condiciones normales el contacto entre las células activa una serie de señales que evitan la división celular, no obstante durante el desarrollo del cáncer las células no presentan inhibición del crecimiento por contacto por lo que continúan creciendo y dividiéndose independientemente del entorno (Abercrombie 1979; Seluanov *et al.*, 2009).

2.1.3. Resistencia a la muerte celular

La apoptosis es un mecanismo de muerte celular fisiológica que presentan las células normales cuando se ha detectado algún daño o la célula está infectada por virus, bacterias o parásitos, sin embargo, las células cancerosas pierden la capacidad de entrar en apoptosis. Esto es posible mediante la alteración de los mecanismos que permiten detectar daño o anomalías en las células (Bold, *et al.*, 1997). También se puede dar por defectos en las proteínas río abajo en las vías de señalización implicadas en la apoptosis. Al respecto las proteínas Bcl-2 han sido reportadas como moduladores con actividades tanto apoptóticas como antiapoptóticas. La sobre-expresión o silenciamiento de dichas proteínas se encuentra relacionada con el desarrollo de neoplasias ya que ofrece atributos de inmortalidad a la célula cancerígena. Uno de los principales mecanismos que están implicados es la hipometilación del gen de Bcl-2, lo cual altera la regulación epigenética de Bcl-2 en diferentes tipos de cáncer. No sólo la actividad de las proteínas antiapoptóticas se encuentra alterada, se han descrito alteraciones en el DNA (Ácido Desoxirribonucleico) que ocasionan la supresión de subfamilias proapoptóticas, la más importante, el complejo Bax y la sincrónica supresión del p53 (Yip y Reed 2008; Zhu *et al.*, 1996).

2.1.4. Inmortalidad replicativa

Las células no cancerosas presentan un número limitado de divisiones antes de volverse incapaces de dividirse entrando en estado de senescencia, o apoptosis. Las células cancerosas presentan un estado de crecimiento y replicación indefinido llamado inmortalidad. El impedimento para que ocurra la inmortalización se debe principalmente a los telómeros. El DNA telomérico se acorta durante cada ciclo de división celular (se pierden nucleótidos en los extremos de los cromosomas), acortándose hasta el punto de la senescencia, por lo que la célula no puede dividirse más. La telomerasa es la enzima encargada de agregar nucleótidos en los telómeros por lo que en células normales esta enzima es prácticamente inactiva. En el caso de las células cancerosas no se presenta el estado de senescencia y la telomerasa se mantiene activa, conservando los telómeros, lo que genera que las células entren en un estado de inmortalización (Karp 2011; Ivancich *et al.*, 2017).

2.1.5. Inducción de angiogénesis

La angiogénesis es el proceso por el cual se forman nuevos vasos sanguíneos. En el cuerpo los tejidos normales tienen vasos sanguíneos a través de los cuales se reparten los nutrientes. Para que una célula pueda sobrevivir es necesario que se encuentre cerca de los vasos sanguíneos para recibir suficientes nutrientes. La formación de nuevos vasos sanguíneos se lleva a cabo durante la embriogénesis, la reparación de heridas y durante el ciclo reproductor femenino (Hinsbergh, *et al.*, 2008). Los tumores en expansión requieren de nuevos vasos sanguíneos para poder suministrar suficientes nutrientes a todas las células cancerosas, para que esto se lleve a cabo las células cancerosas adquieren la capacidad de organizar nueva vasculatura aumentando la producción de factores que promueven la formación de vasos sanguíneos. Los factores de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) han sido descritos como los factores proangiogénicos más importantes ya que inducen la proliferación de los vasos linfáticos en procesos tumorales. Se ha descrito que las citocinas proinflamatorias como IL6, IL1 β , IL1 α y TNF α inducen la expresión de VEGF-C. Asimismo, las condiciones hipóxicas o la presencia de especies reactivas de oxígeno generadas durante la inflamación inducen la expresión de VEGF-A, la cual estimula directamente la

linfangiogénesis o indirectamente a través de la síntesis de VEGF-C. Por otro lado, las células tumorales liberan VEGF-A y C, induciendo la proliferación de los vasos linfáticos en tejido conectivo peritumoral. Al mismo tiempo, los factores VEGF-A y -C son transportados hacia el ganglio centinela, induciendo la proliferación de los vasos sanguíneos y linfáticos en el mismo. Una vez que las células tumorales llegan al primer ganglio se produce un incremento de los factores VEGF-A y C, y de nuevo estos son transportados hacia los ganglios distantes (Hirakawa *et al.*, 2005; Joukov *et al.*, 1996).

2.1.6. Activación de invasión y metástasis

La metástasis ocurre cuando las células cancerosas se desprenden de su sitio u órgano de origen para invadir al tejido adyacente y poder diseminarse a distintas partes del cuerpo. Esta capacidad de migración es la que determina si un tumor es benigno o maligno y que este pueda diseminarse en todo el cuerpo. Para que una célula cancerosa pueda llevar a cabo la metástasis son necesarios una serie de procesos que van desde una invasión local, invasión de los vasos sanguíneos, supervivencia en el ambiente circulatorio, hasta salir de este sistema, adaptarse y comenzar a dividirse en el nuevo tejido invadido (Langley y Fidler 2007). El nicho metastásico tiene un papel fundamental dentro de los factores que determinan el éxito de la metástasis. En su formación ocurren una serie de eventos como son: la modificación de la matriz extracelular (MEC) la remodelación de la red vascular; la participación de células de la médula ósea; la hipoxia y la expresión de una gran variedad de moléculas de señalización. A ello se suma la participación de células no transformadas, como son los fibroblastos y las células endoteliales, más la deposición de moléculas tales como la fibronectina, la tenascina-c y la periostina. En cuanto a tejidos receptores particulares, se reduce la concentración de fibulina-5 para que la metaloproteasa 9 (MMP-9) remodele la matriz en la metástasis, contribuyendo de esta manera a la formación del nicho metastásico. La enzima lisil-oxidasa (LOX), participa activamente en la remodelación de la MEC y en la formación del nicho, ya que esta enzima tiene la capacidad de enlazarse al colágeno y la elastina (Møller *et al.*, 2011; Wong *et al.*, 2011; Oskarsson *et al.*, 2011).

La disrupción en la adhesión intercelular del tumor permite que algunas células tumorales se separen de la masa tumoral (desprendimiento), acto seguido las células invaden mediante la motilidad y migración de las células tumorales hacia la matriz extracelular. Algunas células tumorales penetrarán en los vasos sanguíneos, entrando en la circulación (intravasación). A partir de este punto, las células tumorales se alejan del sitio primario y viajan por el torrente sanguíneo, donde podrían encontrar cierta resistencia por parte del sistema inmunológico, así como las tensiones mecánicas del flujo sanguíneo. Algunas células tumorales finalmente sobrevivirán y adoptarán un proceso para dejar la circulación sanguínea, conocida como extravasación, en la cual las células se adhieren y salen del vaso sanguíneo (Martin *et al.*, 2013).

2.1.7. Inestabilidad genómica y mutaciones

La adquisición de las diferentes características que presentan las células cancerosas se debe en gran parte a la presencia de alteraciones en su genoma. Las células normales presentan una gran capacidad para detectar y resolver los defectos que se presenten en el DNA, teniendo una tasa de mutaciones muy baja. En la tumorigénesis estas tasas de mutación se ven aumentadas. Esta mutabilidad se lleva a cabo a través de un aumento a la sensibilidad de agentes mutagénicos, por medio de una avería en uno o varios componentes de la maquinaria encargada del mantenimiento genómico, o de ambos (Bergers, *et al.*, 2004). Para evitar que esto ocurra se han detectado diferentes componentes de la maquinaria del mantenimiento del DNA a los que se les ha denominado “guardianes” del genoma. El papel principal que desempeñan estos genes es: a) la detección de daño en el DNA y la activación de los mecanismos de reparación, b) la reparación directa del DNA y c) inactivar o interceptar aquellas moléculas que puedan ser mutagénicas antes de dañar el DNA. La alteración, activación desregulada o supresión de muchos de estos genes es lo que lleva inminentemente al cáncer (Levine, *et al.*, 2004).

2.1.8. Desregulación energética celular

En la neoplasia, la proliferación celular crónica desregulada implica que, además de no tener un control de la división celular, exista un descontrol en el metabolismo energético

para poder impulsar el crecimiento y la división celular. Las células cancerosas tiene la capacidad de metabolizar la glucosa aun en presencia de oxígeno, estado denominado “glucólisis aerobia” teniendo así mayor aporte energético que permite proliferación de las células (Marín-Hernández *et al.*, 2016).

2.1.9. Inflamación como promotor de tumores

La inflamación es otro factor que parece favorecer el desarrollo de cáncer. Ante la presencia de un tumor se presenta una respuesta inmune para atacar a las células cancerígenas, sin embargo, estas células inmunes ayudan a suplementar a las células con factores de crecimiento, de supervivencia, pro-angiogénicos, modificadores de la matriz extracelular y especies reactivas de oxígeno; lo cual favorece el desarrollo de cáncer. (Grivennikov *et al.*, 2010).

2.1.10. Evasión del sistema inmune

Las células y tejidos son monitoreados constantemente por el sistema inmune reconociendo y eliminando a la mayoría de las células cancerosas que empiezan a generarse y por lo tanto, a los tumores que empiezan a manifestarse. De acuerdo con esto el desarrollo de tumores sólidos ese debe a que las células han logrado evitar ser detectadas por los mecanismos del sistema inmune o han sido capaces de limitar la erradicación inmunológica (Schreiber *et al.*, 2011).

2.2. Inmunidad tumoral

El principio fundamental de la inmunología tumoral en las células cancerosas es la presencia de antígenos que distinguen a estas células. Estos antígenos tumorales son a menudo producto de mutaciones de algunos genes, expresiones aberrantes de los mismos o de genes que codifican las proteínas virales (Sahin *et al.*, 1995; Bruggen *et al.*, 1991; Knuth *et al.*, 1984; Old 1981). Dentro de los antígenos tumorales de humano se han descubierto diferentes tipos por ejemplo, los de diferenciación (antígenos de diferenciación de melanocitos), antígenos de mutación (p53), antígenos celulares sobreexpresados (como HER-2[receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano]), antígenos virales (como

proteínas de virus de papiloma humanos), y antígenos de cáncer de testículo que se expresan en células germinales de testículo y ovario, pero que están silenciados en las células somáticas normales (tales como MAGE y NY-eSO-1) (Cheever *et al.*, 2009). Estos hechos demuestran el papel que presenta el sistema inmune en el cáncer surgiendo la teoría de la inmunoedición del cáncer.

El concepto de inmunoedición del cáncer hace referencia al mecanismo supresor tumoral extrínseco el cual participa únicamente después de que la transformación celular ha ocurrido y los mecanismos de supresión tumoral intrínsecos han fallado. Este proceso consta de tres fases llamadas “eliminación”, “equilibrio” y “escape” (Fig. 4) (Vesely *et al.*, 2011).

2.2.1. Eliminación

Esta fase consiste en la participación del sistema inmune innato y adaptativo para detectar la presencia de un tumor en desarrollo y destruirlo antes de que sea clínicamente evidente. Cuando aparece un tumor se provoca la ruptura del tejido, esta ruptura alrededor de las células cancerígenas promueve la liberación de moléculas pro-inflamatorias como las citosinas, las cuales reclutan y activan otras células efectoras innatas como las asesinas naturales (NK), asesinas naturales T NKT y las células T γ y δ ; la activación de estas células desencadena una serie de señales en diferentes vías de transducción lo que permite que las células del sistema inmune se concentren en esta zona (Schreiber *et al.*, 2011; de Visser, Eichten y Coussens 2006; Wilczynski y Nowak 2014). El Interferon γ (INF- γ) es una de las moléculas que actúa durante este proceso induciendo la apoptosis de las células cancerosas y cuando esto ocurre se liberan antígenos que generan una respuesta adaptativa, estos antígenos son captados por las células dendríticas las cuales migran a los ganglios linfáticos en donde las células T CD4+ y CD8+ se infiltran al tumor para eliminar el resto de las células cancerosas que expresan los antígenos (Kim *et al.*, 2007). Sin embargo, la eliminación no siempre es exitosa ya que durante este proceso las células cancerosas pueden generar señales que causan una respuesta inflamatoria, estimulando la liberación de citosinas como la IL10 y TGF- β que promueven la progresión tumoral (Kim *et al.*, 2005). Cuando esto ocurre se presentan las etapas subsecuentes.

2.2.2. Equilibrio

Esta fase puede ser la más larga del proceso de inmunoección del cáncer. Se ha estimado que en tumores sólidos de humanos pueden pasar hasta 20 años entre la exposición inicial al carcinógeno y la detección clínica del tumor (Loeb *et al.*, 2003; Teng *et al.*, 2012). Cuando las células tumorales logran sobrevivir a la etapa de eliminación, entran en un equilibrio dinámico con el sistema inmune del hospedero en donde los linfocitos, la IL12, células T CD4+ y CD8+ y el IFN- γ ejercen una presión de selección a la células tumorales para contenerlas (Schreiber *et al.*, 2011; Wilczynski y Nowak 2014; Mittal *et al.*, 2014), por los que contienen una mayor cantidad de mutaciones e inestabilidad genética lo que proporciona cada vez más resistencia al ataque inmune dando como resultado una población de clonas tumorales (Dunn *et al.*, 2004; Mittal *et al.*, 2014; Wilczynski y Nowak 2014).

2.2.3. Escape

Una vez que las células tumorales resisten a las primeras dos etapas, adquieren la capacidad de evitar su reconocimiento y/o destrucción por parte del sistema inmune y se vuelven clínicamente detectables emergiendo como tumores que crecen progresivamente (Schreiber *et al.*, 2011).

El escape de las células tumorales puede ocurrir a través de distintos mecanismos como pueden ser: reducción del reconocimiento inmunológico (pérdida de antígenos), aumento a la resistencia a los efectos citotóxicos de la inmunidad o a promover la proliferación tumoral (expresión de BCL-2), desarrollo de un estado inmunosupresor en el microambiente tumoral (producción de citocinas como VEGF, TGF- β , galectina,IDO [indolamina 2,3-dioxigenasa], PD-1/PD-L1; reclutamiento de células inmunes reguladoras como células Treg [T reguladoras], MDSCs [células supresoras de origen mieloide]), entre otros (Mittal *et al.*, 2014; Schreiber *et al.*, 2011).

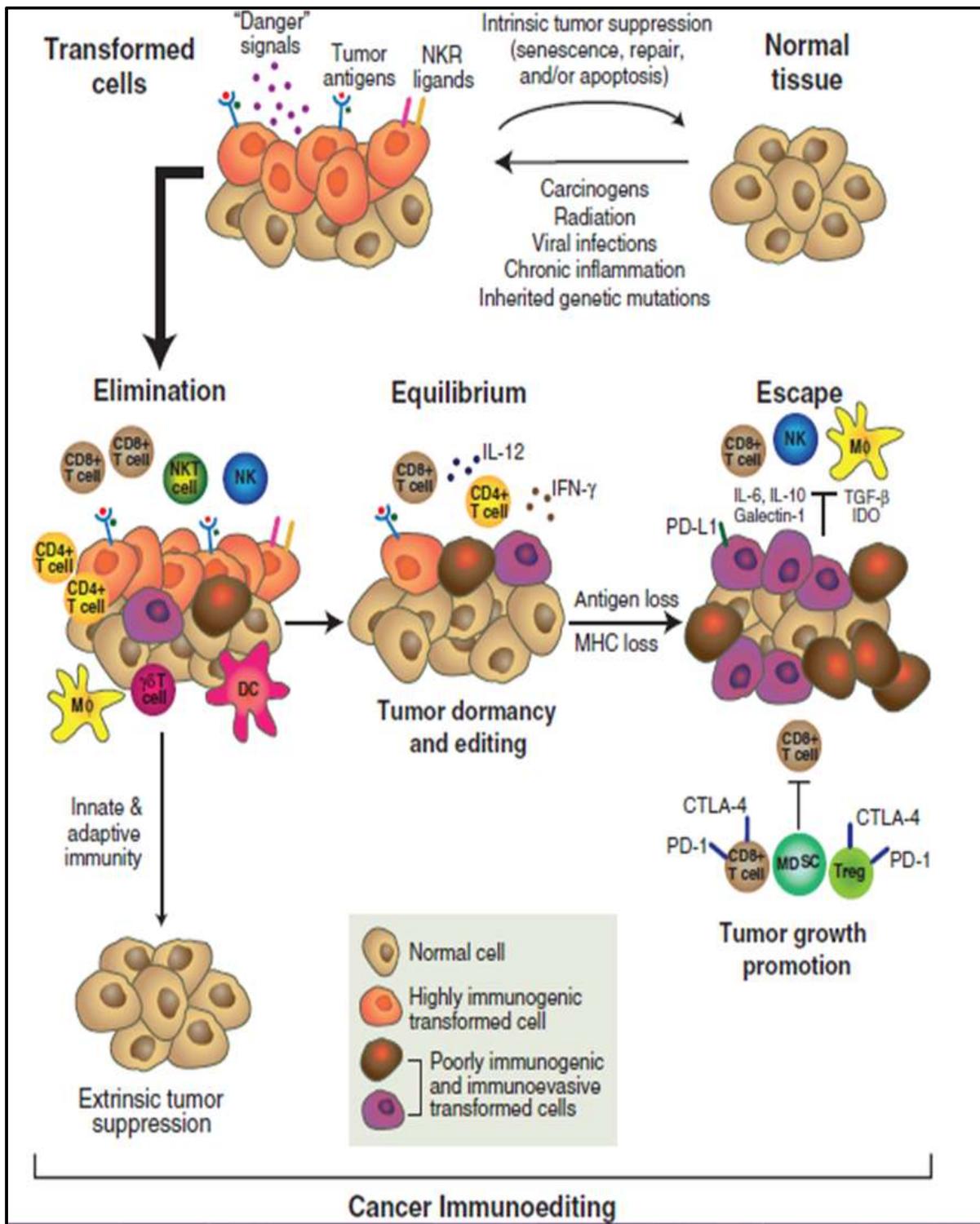


Figura 4. Inmunoección del cáncer y las tres fases que la componen: eliminación, equilibrio y escape (tomado de Schreiber *et al.*, 2011).

3. Inflamación y el cáncer

Actualmente, se acepta que la inflamación es un factor de riesgo para el desarrollo del cáncer. Al respecto, se observó en pacientes con la enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa o la enfermedad inflamatoria del intestino el desarrollo posterior de cáncer (Tanaka *et al.* 2003). Asimismo, estudios epidemiológicos han demostrado que en individuos con inflamación crónica se presenta una mayor predisposición a varios tipos de cáncer, mostrando que entre el 15-20% de muertes por cáncer a nivel mundial se relacionaron con procesos inflamatorios (Mantovani *et al.*, 2008).

Las bases para relacionar la inflamación y el cáncer se obtuvieron a partir de las siguientes observaciones: a) los tumores surgen en sitios de inflamación crónica, b) células inflamatorias del sistema inmune están presentes en los tumores, c) la sobreexpresión de citocinas y quimiocinas están involucradas en el desarrollo y progresión del cáncer, d) las mismas moléculas blanco y vías similares se activan o se apagan en la inflamación, así como en la carcinogénesis, e) se ha observado que procesos inflamatorios crónicos aumentan el riesgo de distintos tipos de cáncer, f) los fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINE) reducen la incidencia y la mortalidad de varios tipos de cáncer (Itzkowitz y Yio 2004; Mantovani *et al.*, 2008; INEGI 2016; Seruga *et al.*, 2008; Balkwill y Mantovani 2001).

4. Modulación de la respuesta inflamatoria por parásitos intestinales y su uso como terapias alternativas en enfermedades asociadas a la inflamación

Actualmente se ha observado que la distribución geográfica de las poblaciones juega un papel importante en la prevalencia de algunas enfermedades alérgicas, autoinmunes y en enfermedades mediadas por el sistema inmunitario. Como ejemplo, la enfermedad inflamatoria del intestino, la colitis ulcerativa y la enfermedad de Crohn, entre otras, suelen ser más comunes en países desarrollados en comparación con los países que se encuentran en vías de desarrollo. A este “fenómeno” se le denominó la hipótesis de la higiene (Strachan 1989; Fiasse y Latinne 2006; Elliott *et al.*, 2000).

La hipótesis de la higiene inicialmente hacía referencia a que la falta de exposición a agentes infecciosos, incrementaba la susceptibilidad a enfermedades alérgicas. Dicho concepto se amplió a enfermedades inflamatorias, así como la relación entre el aumento de su prevalencia a la exposición disminuida a algún tipo de agente infeccioso. Posteriormente se agregó que las medidas sanitarias, y por consecuencia la poca exposición con microorganismos, parásitos o sus derivados también se veía involucrada, y que la falta de exposición a cualquiera de estos va unida a una pérdida de interacciones reguladoras, y por consiguiente el sistema inmunológico podría haber evolucionado a cierta dependencia al contacto con microorganismos, parásitos o sus derivados (Rook 2009; Leibowitz *et al.*, 1966; Strachan 1989). Dentro de esta teoría se menciona cómo determinados parásitos, a través del proceso de co-evolución, modulan la respuesta inmune de sus hospederos (factor del éxito evolutivo de los parásitos), siendo esta la clave de las terapias inmunorreguladoras basadas en helmintos que se llevaron a cabo posteriormente (Pallardo Fernández 2015).

Existen diversos estudios que han utilizado parásitos helmintos, así como sus productos (secreciones, excreciones, huevecillos, larvas, etc.) para el tratamiento de enfermedades autoinmunes y alérgicas, ya que estos organismos modifican la respuesta inmunitaria del hospedero inhibiendo la respuesta inflamatoria (Tabla 1).

Tabla 1. Helmintos utilizados para el tratamiento de enfermedades autoinmunes y alérgicas

Autor	Helminto	Uso
Lima et al., 2002; McConchie et al., 2006; Schopf et al., 2005.	<i>Ascaris suum</i>	Suprimir la inflamación pulmonar en ratones (modelo de asma humano). Proteger contra la inflamación alérgica ocular en ratones (modelo de alergia ocular).
Imai et al., 2001.	<i>Dirofilaria immitis</i>	Inhibe el desarrollo de diabetes en un modelo de ratones obesos (modelo de diabetes en humanos).
Zaccone et al., 2006; Saunders et al., 2007.	<i>Heligmosomoides polygyrus</i>	Previene el desarrollo de diabetes tipo 1 en ratones obesos (modelo de diabetes en humanos).
Cooke et al., 1999; Mangan et al., 2006	<i>Schistosoma mansoni</i>	Reducir la inflamación de los árboles bronquiales en ratones (modelo de asma humana). Disminuir la actividad inflamatoria en la encefalitis autoinmune en ratones (modelo de esclerosis múltiple humano).
Summers et al., 2005, 2003 ; Reddy y Fried 2007	<i>Trichuris suis</i>	Reducir la actividad inflamatoria en enfermedades inflamatorias del intestino humano.
Johnston et al., 2010	<i>Hymenolepis diminuta</i>	Suprimir activación de macrófagos in vitro y alivian la colitis inducida en ratones.
Reardon et al., 2001; Khan et al., 2002	<i>Trichinella spiralis</i>	Tratamiento de la inflamación intestinal polarizando a las células de una respuesta Th1 a Th2.
León-Cabrera et al., 2014; Ledesma-Soto et al., 2015	<i>Taenia crassiceps</i>	Reduce los efectos causados por la colitis ulcerativa y la colitis asociada a tumorigénesis en ratones.

Una característica predominante en las infecciones con parásitos helmintos es que polarizan la respuesta inmunitaria de sus hospederos a una de tipo Th2, evadiendo la respuesta Th1 que ocurre en condiciones normales (Reardon *et al.*, 2001). La respuesta inmunitaria tipo Th2 se distingue por presentar un mayor número de células T CD4+ secretando citocinas tales como IL4, IL5, IL9 e IL13 y el número de eosinófilos, mastocitos y basófilos aumenta en la sangre y en el sitio de la infección (por ejemplo, intestino, hígado, pulmón, piel), pero el signo más grande de una infección por helmintos es la gran cantidad de inmunoglobulina E (IgE) detectada en el hospedero (Erb 2007).

Recientemente, León-Cabrera y colaboradores en 2014 observaron que el helminto *Taenia crassiceps* es capaz de modular la respuesta inflamatoria generada por el hospedero, y que ratones infectados con este parásito son resistentes al desarrollo de tumores en un modelo de CCR inducido con azoximetano. El mecanismo molecular por el cual éste parásito modula la respuesta inflamatoria aún es desconocido, sin embargo, se propone que una mezcla de antígenos secretada por el parásito afecta a las células dendríticas al inhibir la vía de NFκB (la cual es estimulada directamente por Ras), e inhibe la proliferación de células tumorales tanto *in vivo* como *in vitro*.

5. CCR y vías de señalización

El CCR se desarrolla como consecuencia de diversos factores; demográficos, ambientales, biológicos y genéticos. Dentro de los factores genéticos se han descrito mutaciones que causan la inactivación o activación constitutiva de supresores tumorales u oncogenes respectivamente (Blanke *et al.*, 2010).

Las alteraciones más frecuentes en el CCR corresponden a mutaciones en los oncogenes KRas, PI3K (cinasa de fosfatidilinositol 3) y APC, los cuales regulan distintas vías de señalización que controlan diversos procesos celulares tales como la proliferación, el crecimiento, la diferenciación y progreso del ciclo celular (Fig. 5) (Saif y Chu 2010).

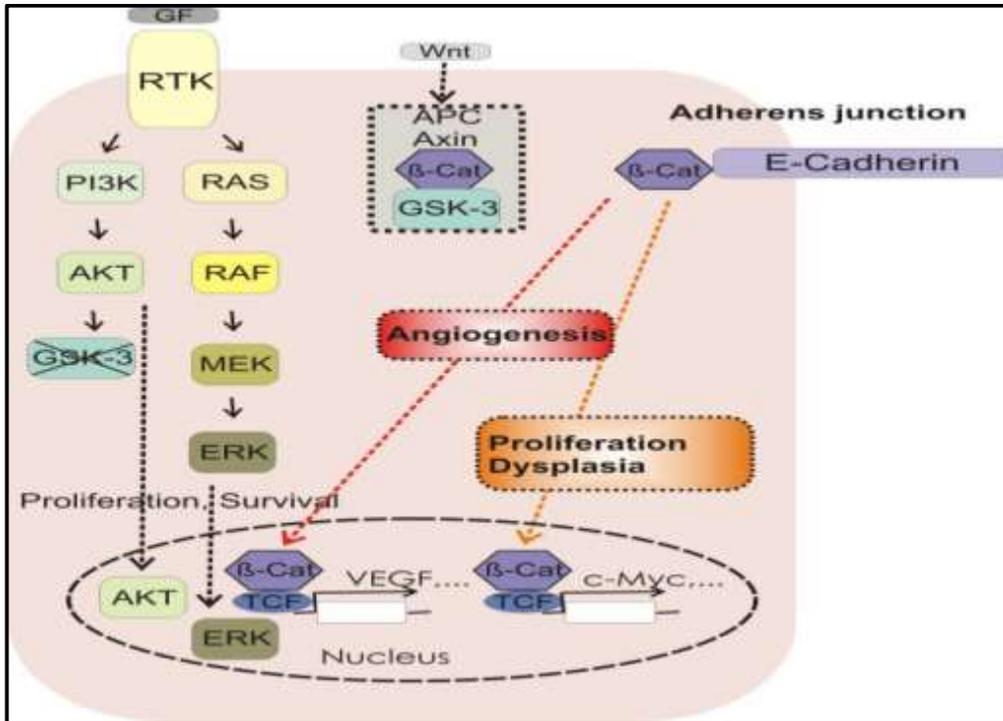


Figura 5. Vías de señalización comúnmente afectadas en el CCR.

5.1. Vía de las MAPK

Las MAPK son una familia de cinasas de serina-treonina que se activan a través de señales extracelulares y participan en diferentes procesos vitales para la célula. Esta familia se divide en tres subfamilias, una de las más importantes es Ras/RAF1/MEK/ERK (Dong *et al.*, 2002). La señalización de esta vía es indispensable para la proliferación celular, promoviendo el crecimiento y la diferenciación a través de factores de crecimiento y proto-oncogenes, por lo que cuando hay una alteración de la vía generan enfermedades como el cáncer (Troppmair *et al.*, 1994; deFazio *et al.*, 2000). Se ha documentado que esta ruta está involucrada en el CCR humano (Wang *et al.*, 2004).

Señalización: El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es un receptor que se encuentra en la superficie celular y se activa mediante la unión de ligandos específicos, por ejemplo, TGF α , factor de crecimiento epidérmico (EGF) y anfiregulinas. Tras la activación por el agonista, el receptor sufre una transición de una forma monomérica inactiva a una forma homodimérica activa. La dimerización del EGFR estimula la actividad intrínseca

de su dominio el cual posee actividad de cinasa de tirosina, causando la auto-fosforilación de varios residuos de tirosina, y la activación y el reclutamiento de otras proteínas que se asocian con las tirosinas fosforiladas. La cascada se inicia por la unión de la proteína adaptadora Grb2, que interacciona con Sos1/2. Así, tras la formación del complejo Grb2/Sos, éste se trasloca a la membrana plasmática estimulando el intercambio de GDP por GTP en Ras, una vez que Ras está activo se une al dominio de unión a GTPasa de sus efectores río abajo, entre los que se encuentran las cinasas de las familia RAF y comienza un serie de fosforilaciones que culmina con la activación de ERK, el cual se trasloca al núcleo donde promueve la transcripción de sus genes blanco, por ejemplo, c-Fos y Elk1, que regulan genes que aumentan la proliferación celular y protegen las células contra la apoptosis (Fig. 6).

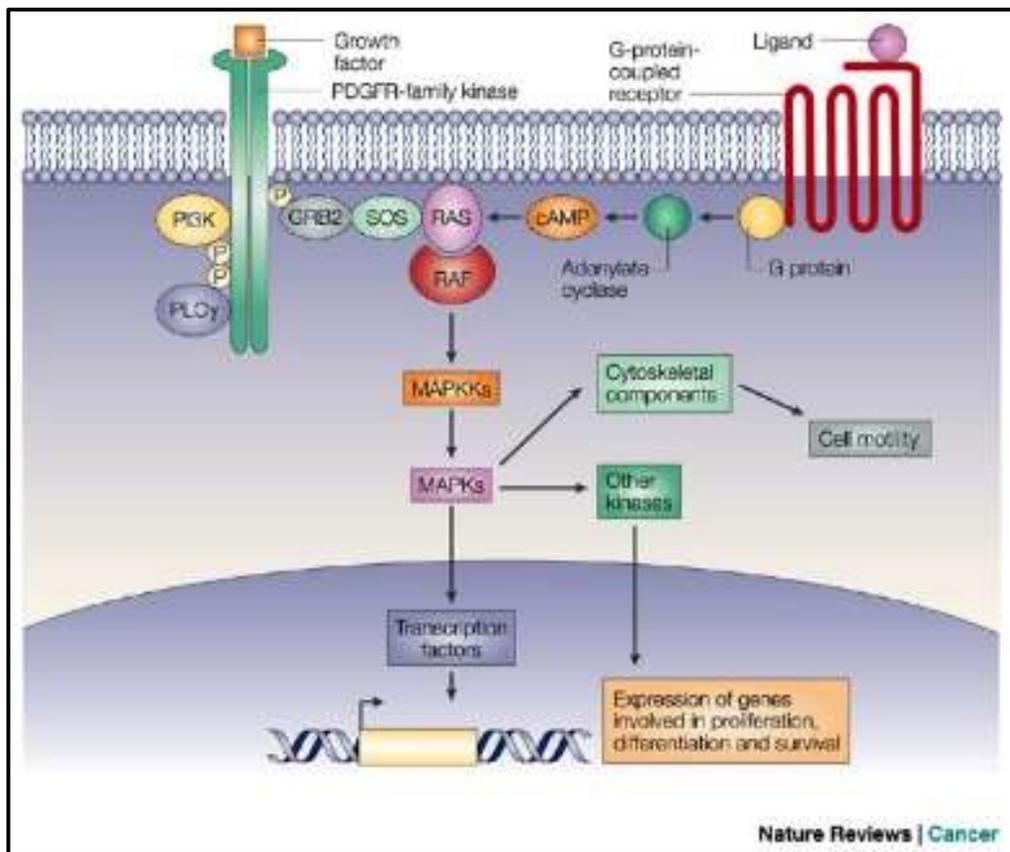


Figura 6. Vía de señalización Ras/RAF/MEK/ERK.

La cascada de Ras/RAF/MEK/ERK es una de las vías que frecuentemente se encuentra mutada en el cáncer, presentando alteraciones en funciones celulares críticas como

la proliferación, el crecimiento y la senescencia (Santarpia *et al.*, 2012). La vía está activada en distintos tumores encontrándose mutaciones principalmente en Ras (Schindler *et al.*, 2011). El papel de Ras en el desarrollo del cáncer ha sido estudiado y se ha reportado que aproximadamente del 15-20% de todos los cánceres presentan mutaciones en el gen. Entre las isoformas de Ras, se encuentra mutada KRas en el 30-40% de pacientes con CCR (Saif y Chu 2010; Modest *et al.*, 2011). Las proteínas KRas juegan un papel importante en la célula al transmitir señales intracelulares río abajo activando la transcripción de genes, los cuales están involucrados en el crecimiento celular, la proliferación, la supervivencia, la invasión y migración, e incluso la angiogénesis. Las proteínas mutantes de KRas, que están en una conformación constitutivamente activa, podrían hacer resistentes a las células tumorales a agentes anti-EGFR. Lo anterior se observó en estudios clínicos en los que se utilizaban terapias con neutralizantes anti-EGFR los cuales no eran efectivos en pacientes con CCR metastásico cuyos tumores expresaban a KRas mutante (Konstantinopoulos *et al.*, 2007).

5.2. Vía de PI3K/AKT/mTOR

La vía de señalización PI3K/AKT/mTOR es crucial en muchos aspectos del crecimiento y la supervivencia celular. Esta ruta se puede activar a través de muchos factores de crecimiento y factores reguladores. Existen diferentes alteraciones genéticas como amplificación, mutación y rearrreglos cromosómicos que pueden alterar a las proteínas que intervienen en la vía, generando su activación permanente (Pinzón *et al.*, 2009).

Señalización: En la ruta PI3K/AKT/mTOR participan tres proteínas moduladoras principales: PI3K, AKT y mTOR. PI3K es un hetero-dímero que consta de dos subunidades, que se asocian a los receptores con actividad cinasas de tirosina y receptores asociados a proteínas G heterodiméricas (Bartlett 2010; Cheaib *et al.*, 2015). La función principal de esta proteína es fosforilar a PIP2 (inositol-4,5-bisfosfato) dando origen a PIP3 (3,4,5-inositol trifosfato) (Chakrabarty *et al.*, 2013; Hernandez-Aya y Gonzalez-Angulo 2011; Chakrabarty *et al.*, 2012). El supresor de tumores PTEN actúa como regulador negativo a este nivel, defosforilando al PIP3 y transformándolo nuevamente en PIP2 (Saini *et al.*, 2013; Leary *et al.*, 2013). PIP3 activa a PDK la cual fosforila a AKT. AKT regula a su vez procesos de

metabolismo, proliferación, supervivencia, invasión, migración, apoptosis y reparación de DNA, a través de la modulación de proteínas como mTOR, Bad, Caspasa 9, Tuberina, GSK3 β y factores de transcripción de la familia forkhead. AKT disocia a mTOR de sus reguladores negativos TSC1 y TSC2. mTOR controla la síntesis de proteínas por fosforilación de 4EBP1 y S6K1, promoviendo la traducción (Hernandez-Aya y Gonzalez-Angulo 2011; Leary *et al.*, 2013; Chakrabarty *et al.*, 2012) (Fig. 7).

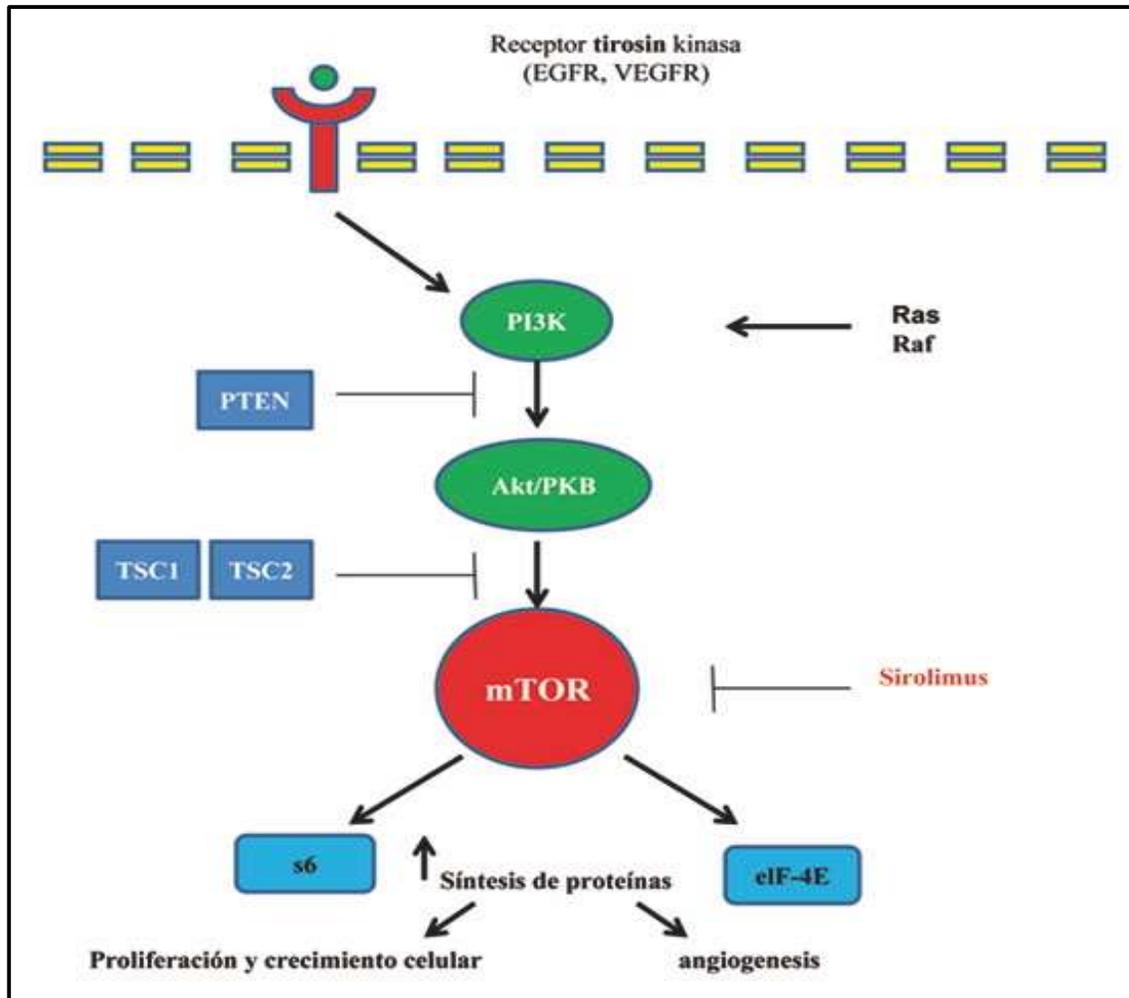


Figura 7. Vía de señalización de PI3K/AKT/mTOR.

La ruta PI3K/AKT/mTOR tiene un papel crítico en la proliferación celular, la resistencia a la apoptosis, la angiogénesis y la metástasis, mecanismos fundamentales para el desarrollo y mantenimiento del CCR. Dentro de las mutaciones que presenta esta vía en CCR

se ha reportado la activación constitutiva de AKT (Khaleghpour *et al.*, 2004; Itoh *et al.*, 2002). Diversos estudios indican que el inhibir esta ruta de señalización con agentes farmacológicos afecta la proliferación celular, aumenta la apoptosis y la sensibilidad a la quimioterapia disminuyendo la capacidad de metástasis en pacientes con CCR (Sheng *et al.*, 2003; Rychahou *et al.*, 2006; Rychahou *et al.*, 2005; Rychahou *et al.*, 2008). Por otro lado, se ha observado que la actividad de PI3K/AKT/mTOR, regula procesos como la traducción de proteínas, el crecimiento celular, el metabolismo y la angiogénesis; por lo que, al ser bloqueada la actividad de estas moléculas, se presenta la inhibición del crecimiento y la inducción de apoptosis (Guertin y Sabatini 2007).

5.3. Vía Wnt/ β -catenina

La cascada de WNT/ β -catenina tiene un papel importante en los procesos de regulación, diferenciación y proliferación y muerte celular. Río abajo en esta vía, se encuentra la β -catenina la cual se trasloca al núcleo para activar a los factores de transcripción, por lo que en ausencia de Wnt los niveles de β -catenina en el citoplasma son bajos. Wnt estabiliza esta proteína aumentando sus niveles citoplasmáticos y su paso al núcleo, una vez ahí se une a los promotores de genes diana dando lugar a la transcripción de estos.

Señalización: Las proteínas Wnt son glucoproteínas de secreción que actúan como ligandos para estimular vías de transducción de señal mediadas por receptores (Døsen *et al.*, 2006). La actividad de la vía depende de la concentración citoplasmática de β -catenina. Esta proteína se encuentra en bajas concentraciones en el citoplasma de manera normal, esto se debe a un proceso de degradación dependiente de ubiquitina-proteosoma. Cuando se une el ligando Wnt se activa la vía y se inhibe la degradación de β -catenina impidiendo su fosforilación (Ochoa-Hernández *et al.*, 2012). La activación de la vía se inicia con la secreción de las proteínas Wnt y su unión a los receptores de superficie celular Fzd (del inglés Frizzled), en donde se requiere de los receptores LRP5 o LRP6 (Takahashi-Yanaga y Sasaguri 2007; Winn *et al.*, 2006). La activación de Fzd recluta a la proteína Dvl (del inglés Dishevelled) para, posteriormente, ser fosforilada, una vez activa Fzd bloquea al complejo

proteico citoplasmático encargado de degradar la β -catenina. Este complejo comprende: a) la enzima GSK-3 β cuya función es fosforilar a la β -catenina para su ubiquitinación y su degradación mediante la vía del proteosoma, b) la proteína supresora de tumores APC, que incrementa la afinidad del complejo de degradación hacia β -catenina, c) la proteína axina encargada de mantener al complejo unido y d) la enzima CK1 α que ayuda a mediar la fosforilación de β -catenina (Takahashi-Yanaga y Sasaguri 2007; Hendrickx y Leyns 2008; Winn *et al.*, 2006). En el núcleo, en ausencia β -catenina, los genes diana de la vía son inhibidos por el complejo LEF-1/TCF. Cuando se inhibe la degradación de β -catenina esta se acumula en el citoplasma permitiendo su traslocación al núcleo formando un complejo con LEF-1/TCF induciendo la transcripción de los genes diana: c-Myc, c-Jun, CCND1, PPAR δ , FOSL1, entre otros (Polakis 2012; Willert y Jones 2006) (Fig. 8).

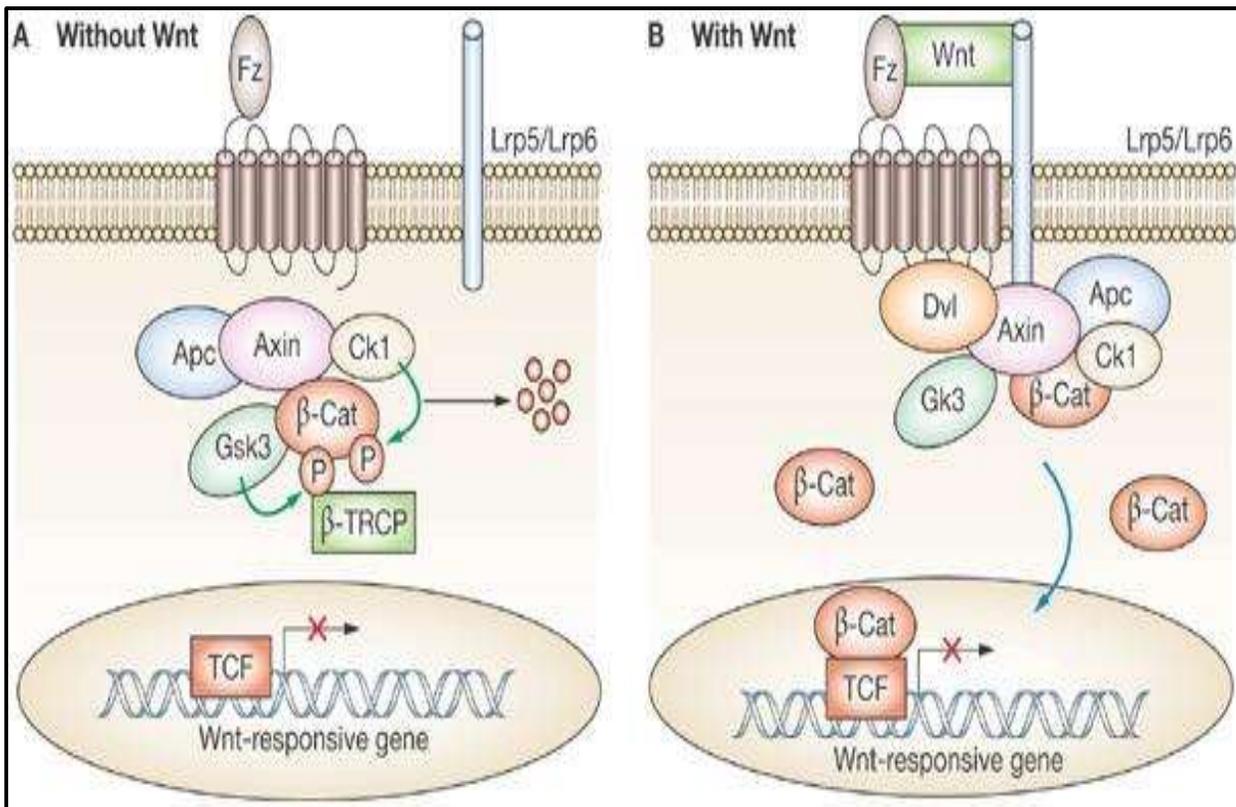


Figura 8. Vía canónica de señalización Wnt/ β -catenina.

La familia de Wnt se describió originalmente como un grupo de proto-oncogenes, y dentro de las consecuencias en la alteración de esta vía se deriva el cáncer (Chen *et al.*, 2005).

Se estima que entre el 70-80% de los casos de CCR presentan defectos en la ruta de Wnt/ β -catenina (Fodde *et al.*, 2001; Bienz y Clevers 2000). Esta vía regula procesos de crecimiento, apoptosis y diferenciación celular (Cadigan y Nusse 1997). La inhibición del oncogen APC causa una activación constitutiva de la β -catenina, promoviendo la transcripción de genes involucrados en proliferación y progresión del ciclo celular, dando origen a adenomas y carcinomas (Powell *et al.*, 1992).

Debido a la relevancia que presentan estas tres vías de señalización en el CCR, se ha propuesto como potenciales sitios de intervención terapéutica en distintos tipos de tumores incluyendo el CCR (Blanke *et al.*, 2010). Considerando los antecedentes sobre el uso de helmintos, en específico de *T. crassiceps*, en el presente estudio se empleó una fracción semipurificada de los antígenos de dicho parásito para determinar si tienen algún efecto sobre alguna de las tres vías de señalización comúnmente afectadas en el CCR.

III. HIPÓTESIS

Los antígenos secretados por el helminto parásito *T. crassiceps* modularán negativamente una o varias rutas de señalización involucradas en el crecimiento y proliferación de las células de CCR.

IV. OBJETIVOS

GENERAL:

Evaluar el efecto de los antígenos secretados por el parásito helminto *T. crassiceps* en las rutas de señalización comúnmente afectadas en CCR: Ras/RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT/mTOR y Wnt/ β -catenina.

PARTICULARES:

- Evaluar el efecto de los antígenos de *T. crassiceps* en cuatro líneas celulares de CCR (HCT-116, HT-29, SW620 y LoVo) con mutaciones en alguna de las tres rutas de señalización.
- Determinar si los antígenos de *T. crassiceps* tienen un efecto citotóxico o citostático en las cuatro líneas celulares de CCR.
- Analizar si los antígenos de *T. crassiceps* afectan la activación de alguna de estas rutas de señalización en líneas celulares de CCR.

V. MATERIAL Y METODO

1. CULTIVO CELULAR

Las líneas celulares empleadas para el presente trabajo fueron HCT-116, HT-29, SW620 y LoVo, las cuales corresponden a líneas de CCR humano. Todas son de tipo adherente y crecen en monocapa. Se cultivaron en cajas Petri de 100 mm y se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

Para la línea celular HCT-116 (con mutación en KRas) y la HT-29 (mutada en PI3K) se utilizó el medio de cultivo McCoy's 5A suplementado con 10% de FBS (suero fetal bovino); la línea LoVo (mutada en APC) en medio F-12k suplementado con 10% de FBS; y la línea SW620 (mutada en APC) en medio DMEM suplementado con 10% de FBS.

2. GENERACIÓN DE CURVAS DE SOBREVIVENCIA

Para conocer el efecto citotóxico de los antígenos en las células se calculó la IC₅₀ (cantidad de compuesto necesario para alcanzar el 50% de la concentración inhibitoria máxima) empleando la técnica de MTT (bromuro de 3[4,5-dimetil-2-tiazol]-2,5-difeniltetrazol). Las distintas líneas celulares fueron sembradas en placas de 96 pozos e incubadas durante 72 h en presencia de concentraciones crecientes de la mezcla de antígenos de *T. crassiceps*, las concentraciones empleadas fueron: 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml y 100 µg/ml, como control se emplearon células sin tratamiento. Transcurridas las 72 horas, a cada pozo se le adicionaron 10 µl de una solución de MTT a una concentración de 5 mg/ml, se incubaron a 37°C durante 3 h, posteriormente se retiró el medio y se adicionaron 100 µl de DMSO por pozo, las muestras se incubaron nuevamente a 37°C durante 30 min y se leyó la absorbancia a 540 nm.

3. ENSAYO DE APOPTOSIS

Para este ensayo se utilizó el kit commercial FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit with FITC annexin V and PI, for Flow Cytometry (Invitrogen). Se sembraron 50,000 células por pozo, en una placa de 24 pozos adicionando la dosis correspondiente de antígenos

cada 24 h durante 3 días, posteriormente se colectó el medio de cultivo con el propósito de recuperar a las células que murieron y se despegaron de la placa durante el transcurso del experimento, las células restantes se lavaron 2 veces con PBS, se les agregaron 100 µl de tripsina al 0.04% y se incubaron 5 min a 37°C. En seguida se les agregaron 900 µl de medio para neutralizar la tripsina y se transfirieron a tubos Eppendorf para centrifugar durante 10 min a 1,500 rpm. Se retiró el medio y se resuspendió en 25µl de buffer de unión a anexina 1x en presencia de yoduro de propidio y de anexina V conjugada a FITC, las muestras se incubaron 15 min en obscuridad a temperatura ambiente. Finalmente, se adicionaron 100 µl de buffer de unión a anexina 1x y 375 µl de PBS y las muestras fueron analizadas mediante citometría de flujo.

4. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN

Para conocer el efecto de los antígenos de *T. crassiceps* en la proliferación celular, se realizaron conteos celulares cada 24 h, en presencia o ausencia de los antígenos durante 3 días. Brevemente, para cada línea celular, se sembraron por duplicado 2500 células en una placa de 24 pozos y se adicionó la dosis correspondiente de antígenos, las muestras fueron colectadas a las 24, 48 y 72hr; como control se utilizaron células sin tratar. Para realizar los conteos, las células fueron lavadas dos veces con PBS 1X, tripsinizadas, resuspendidas en un volumen final de 1 ml de medio y contadas en una cámara de Neubauer.

5. WESTERN BLOT

Extracción de proteínas: los extractos proteicos de las distintas líneas celulares fueron obtenidos lisando a las células en buffer RIPA suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas de acuerdo a la siguiente metodología. Las células fueron cultivadas en cajas Petri de 100 mm y cuando alcanzaron el 80% de confluencia se incubaron en medio sin suero en presencia o ausencia de los antígenos de *T. crassiceps* durante 3 h. Posteriormente fueron estimuladas con 10 ng/ml de EGF con el propósito de activar las rutas de señalización de interés, las células fueron lavadas dos veces con PBS 1x, lisadas en 150 µl de amortiguador RIPA con ayuda de un gendarme y transferidas a un tubo Eppendorff para ser centrifugadas

a 13,500 rpm durante 10 min. Finalmente, los sobrenadantes fueron transferidos a tubos nuevos y las proteínas se cuantificaron mediante la técnica de Bradford.

Electroforesis de proteínas SDS-PAGE: las proteínas obtenidas fueron desnaturalizadas por ebullición durante 5 min en buffer de Laemmli a una concentración final de 1x, separadas en geles de poliacrilamida-SDS al 10% y transferidas a una membrana de PVDF que fue bloqueada en una solución de TBS-Tween 20 al 0.1% y leche descremada al 5% durante 1 hr. La inmunodetección de las proteínas se realizó empleando los anticuerpos primarios: anti ERK1/2, p-ERK1/2, β -catenina, β -catenina activa, AKT, p-AKT y actina (Cell Signaling Technologies), este último como control de carga, a una dilución de 1:1000 y se incubaron toda la noche a 4°C en agitación constante. Enseguida, las membranas se lavaron tres veces durante 15min con TBS-Tween en agitación constante. Posteriormente las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario, anti-conejo y anti-ratón conjugados a la peroxidasa del rábano macho, en una dilución 1:10000 durante 1hr a temperatura ambiente en agitación constante. Finalmente se realizaron tres lavados de 10 min cada uno con TBS-Tween.

La inmunodetección de las proteínas se realizó mediante quimioluminiscencia empleando el kit de BioRad “Clarity™ Western ECL Substrate” de acuerdo al protocolo sugerido por el fabricante. Finalmente, las membranas fueron expuestas a una placa autorradiográfica (HyBlot ES™). Las imágenes fueron analizadas con el software ImageJ.

6. INMUNOFLUORESCENCIA

Para determinar el efecto de los antígenos de *T. crassiceps* en la activación de la vía de las MAPK, se realizó la inmunodetección de la forma activa de ERK1/2, empleando anticuerpos que reconocen la forma fosforilada (Cell Signaling Technologies). Para realizar la inmunofluorescencia se sembraron 5000 células sobre un cubreobjetos estéril en placas de 6 pozos. Cuando las células alcanzaron una confluencia de 70-80% se sometieron a ayuno durante 3h a 37°C en presencia o ausencia de los antígenos de *T. crassiceps*. Posteriormente las células fueron estimuladas con EGF a una concentración final de 10 ng/ml y se incubaron durante 1h a 37°C.

A continuación, las células fueron lavadas 3 veces con PBS 1x y fijadas con PFA al 4% en PBS incubando las muestras durante 30min a temperatura ambiente. Las laminillas fueron lavadas 3 veces con PBS y permeabilizadas con PBS-Tritón 0.1% durante 15min a 4 °C. Posteriormente las laminillas fueron bloqueadas con BSA al 1% en PBS-Tritón a 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente se adicionó el anticuerpo primario en dilución 1:100 en solución de bloqueo y las muestras se incubaron durante 2h a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados de 5min cada uno con PBS-Tritón0.5% y se adicionó el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a Alexa 486 en una dilución 1:200 en solución de bloqueo durante 2h a temperatura ambiente y en obscuridad. Finalmente se hicieron tres lavados con PBS-BSA 1% y las laminillas se montaron en el portaobjetos con la solución Vectashield con Dapi. La captura de las imágenes de las células se realizó en un microscopio confocal Leica TCS SP8X y el análisis de las imágenes a través del software LAS X 2.0.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinar las diferencias entre las células control y las células con tratamiento se realizó un ANOVA. La significancia estadística se definió como valores de $*p < 0.05$.

VI. RESULTADOS

1. Efecto de los antígenos de *T. crassiceps* en la sobrevivencia y apoptosis

Para determinar la IC₅₀ de los antígenos en las distintas líneas celulares de CCR se realizó el ensayo de MTT, empleando las siguientes concentraciones de los antígenos: 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml y 100 µg/ml. Las células fueron incubadas durante 72 h, adicionando los antígenos cada 24 h. Los resultados obtenidos muestran que el grado de sensibilidad de cada línea celular fue diferente de acuerdo con la mutación que presentaba. Como se puede observar en la figura 9, la línea celular más sensible fue la HCT-116 (Fig. 9A) con una IC₅₀ de 88ng/ml, seguido de las líneas SW620 y LoVo (Fig. 9C y 9D) con 896 y 963 ng/ml respectivamente siendo 10 veces más alta la dosis necesaria comparada con la línea HCT-116. Por otro lado, la línea celular HT-29 (Fig. 9B) presentó una menor sensibilidad al tener una IC₅₀ de 6.7 µg/ml. Como se esperaba la línea que presentó una mayor sensibilidad fue la HCT-116 al tener una mutación en la vía de Ras, y las líneas SW620 y LoVo presentaron un valor de IC₅₀ similar al estar mutadas en la vía de β-catenina.

Para determinar si el efecto de los antígenos en la sobrevivencia de las distintas líneas celulares de CCR que observamos en la figura 9 era debido un efecto citotóxico, se determinó si estos antígenos inducían apoptosis. Las líneas celulares fueron expuestas a los antígenos durante 72 h y posteriormente el porcentaje de células apoptóticas se determinó mediante citometría de flujo. Los resultados obtenidos fueron graficados, y como se observa en la figura 10, el porcentaje de apoptosis no presenta diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las líneas celulares empleadas.

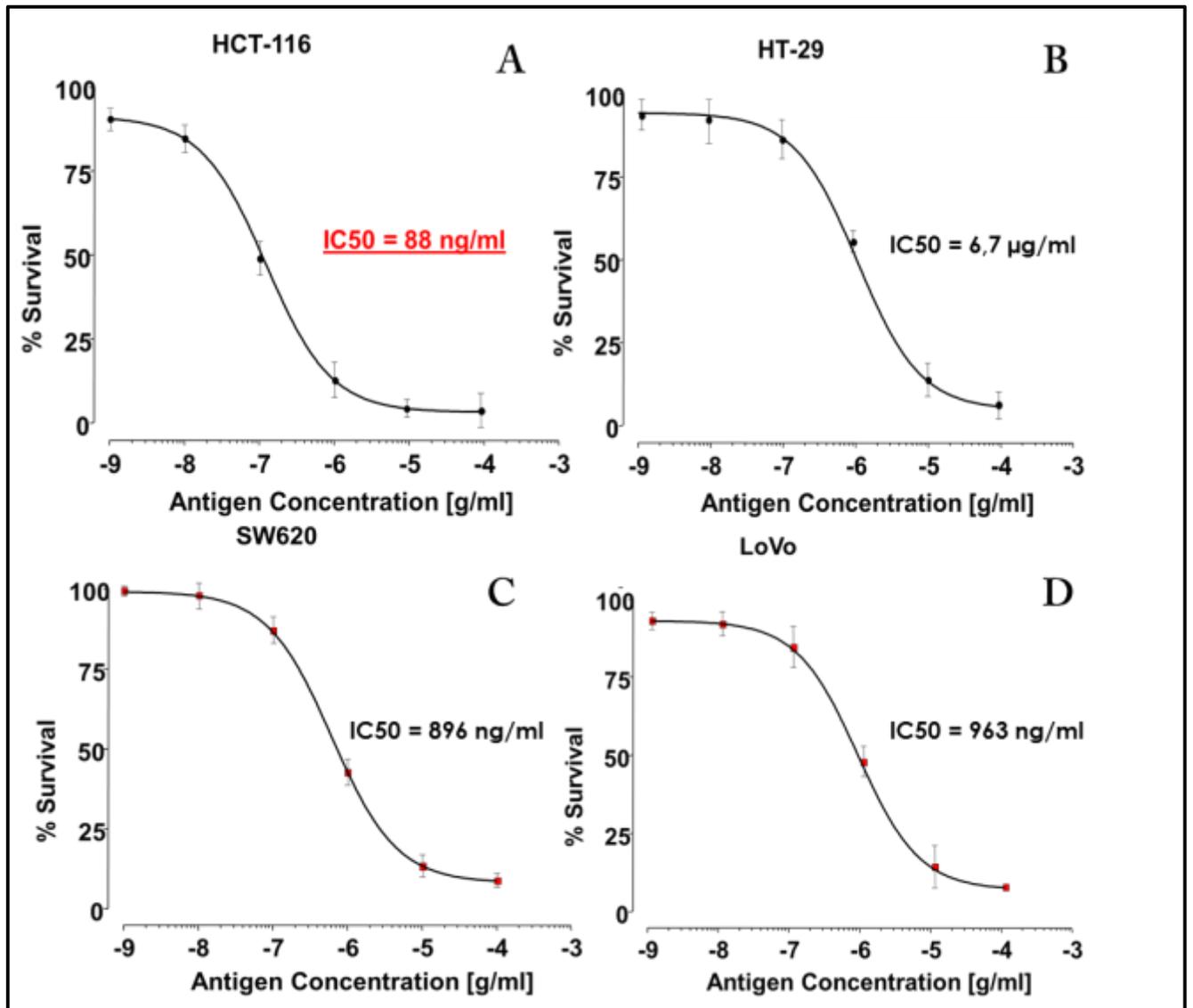


Figura 9. Curvas de sobrevivencia de las distintas líneas celulares de CCR tratadas con los antígenos de *T. crassiceps*.

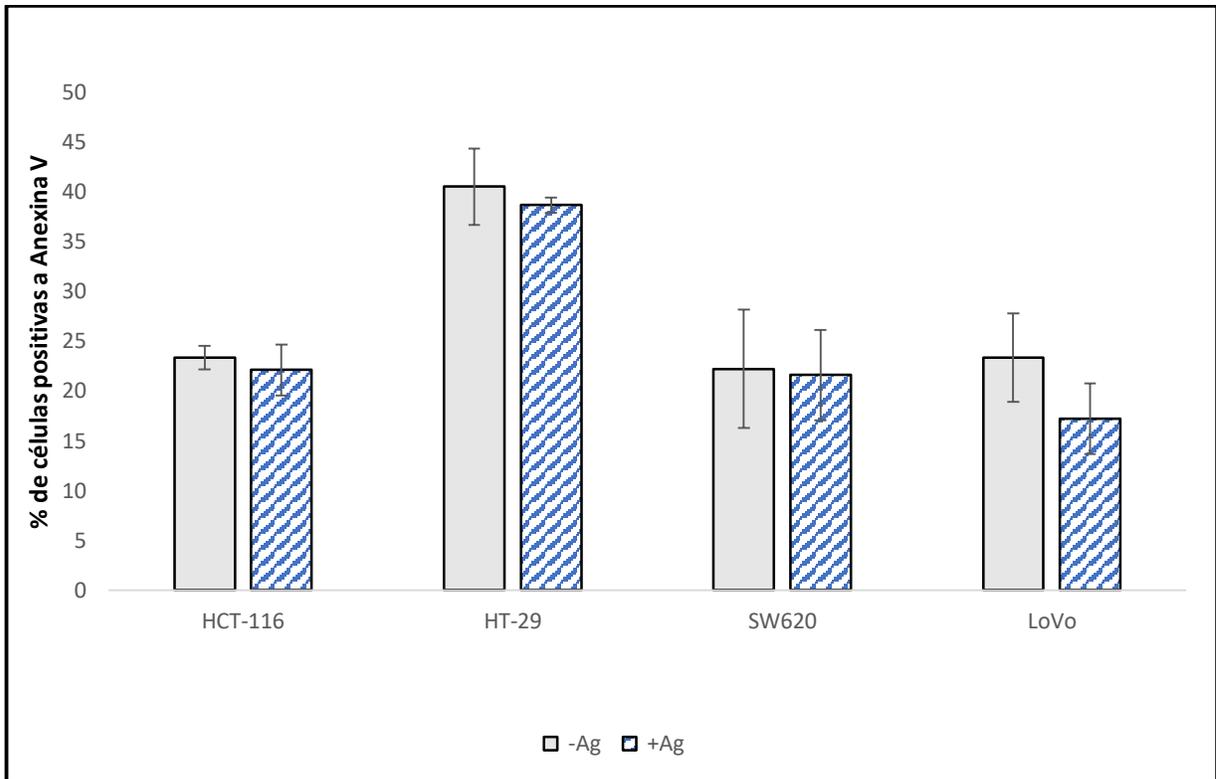


Figura 10. Efecto de los antígenos de *T. crassiceps* en las diferentes líneas celulares afectadas en CCR. Apoptosis de las células después de 72 h con el tratamiento. –Ag: células control o sin tratar con los antígenos, +Ag: células tratadas con los antígenos.
* $p < 0.05$

2. Efecto de los antígenos de *T. crassiceps* en la proliferación

Debido a que los resultados de apoptosis no mostraron diferencia significativa entre los grupos controles y los tratados con los antígenos de *T. crassiceps* se evaluó si los antígenos afectan la proliferación celular. Se sembraron 10,000 células por pozo de cada una de las distintas líneas celulares de CCR y se incubaron en presencia o ausencia de los antígenos. Las células fueron colectadas y contadas cada 24 h durante 72 h (Fig. 11). Los resultados obtenidos muestran que la línea celular HCT-116 (Fig. 11A) hay una menor proliferación en presencia de los antígenos, disminuyendo drásticamente a la mitad el número de células, pasando de 125,000 en el control a 60,000 en las tratadas. En contraste a la línea HCT-116, las células HT-29 (Fig. 11B) mostraron un comportamiento contrario, esta línea celular presentó un incremento del 85% en la proliferación en presencia de los antígenos. En la línea celular SW620 (Fig. 11C), a pesar de observarse una disminución en la proliferación

de las células con tratamiento con respecto al control, esta no fue estadísticamente significativa al igual que en la línea LoVo (Fig. 11D).

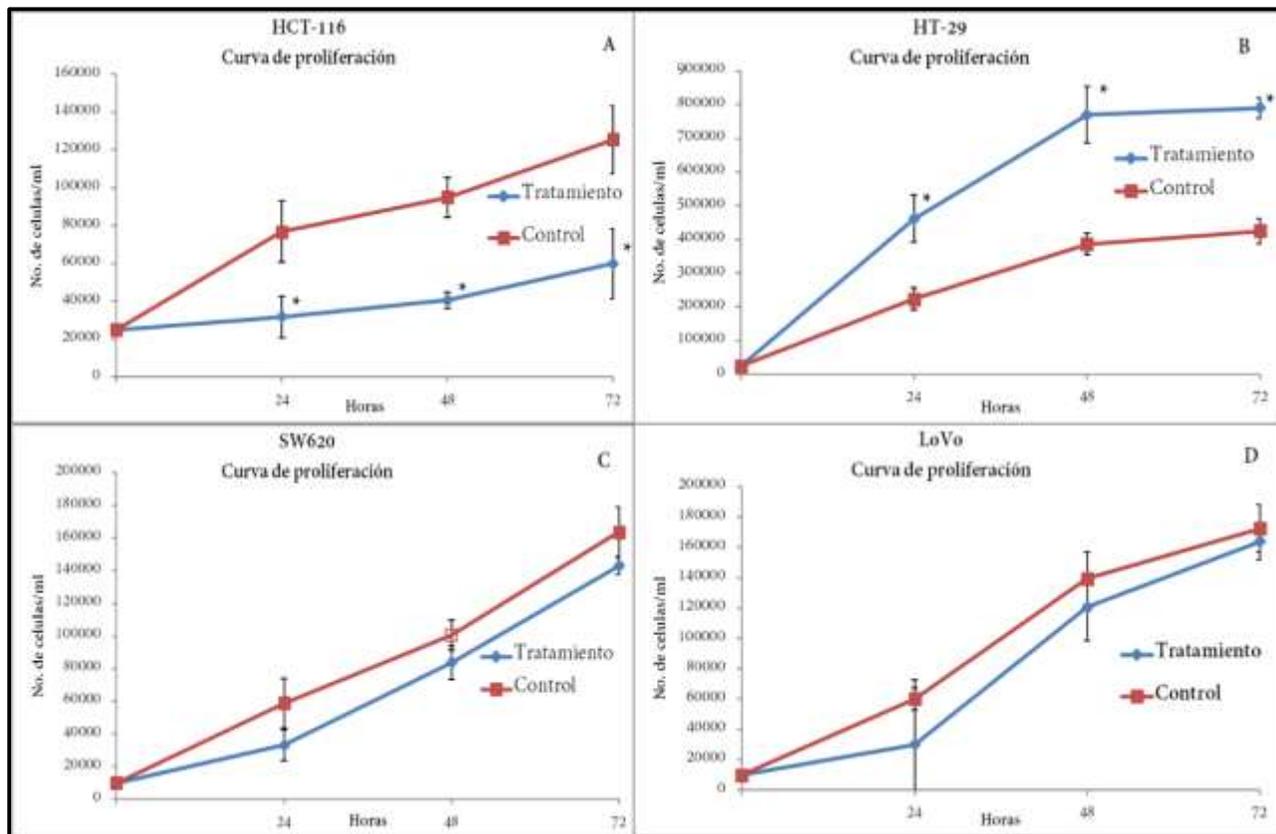


Figura 11. Curva de proliferación celular de las distintas líneas celulares de CCR tratadas con los antígenos de *T. crassiceps*. * $p < 0.05$

3. Análisis del efecto de los antígenos en las diferentes vías de señalización que regulan la sobrevivencia y proliferación celular

Con la finalidad de determinar el efecto de los antígenos de *T. crassiceps* en las distintas rutas de señalización involucradas en la proliferación y sobrevivencia, se analizaron los niveles de activación de proteínas efectoras de las vías de las MAPK (ERK1/2), PI3K/AKT/mTOR (AKT1/2) y Wnt/ β -catenina (β -catenina); como control de carga se empleó la actina. Los resultados obtenidos (Fig. 12) muestran que en la línea celular HCT-116 hubo una disminución de 35% en los niveles de activación de ERK1/2 (marcado en el

círculo rojo), mientras que no se observó ningún efecto de los antígenos en la activación de las demás moléculas señalizadoras. En el resto de las líneas celulares no se vio afectada la activación de ninguna de estas moléculas, lo que podría explicar su resistencia al efecto de los antígenos. Por el contrario, en la línea celular SW-620, se aumenta en la cantidad y la actividad de β -catenina en presencia de los antígenos. Con la finalidad de corroborar el efecto de los antígenos en la activación de ERK1/2, se determinó la localización celular de la forma activa de ERK1/2 en las distintas líneas celulares, en presencia o ausencia de los antígenos. Los resultados obtenidos (Fig. 13) confirmaron que en la línea celular HCT-116, la exposición a los antígenos regula negativamente la actividad de la vía de las MAPK.

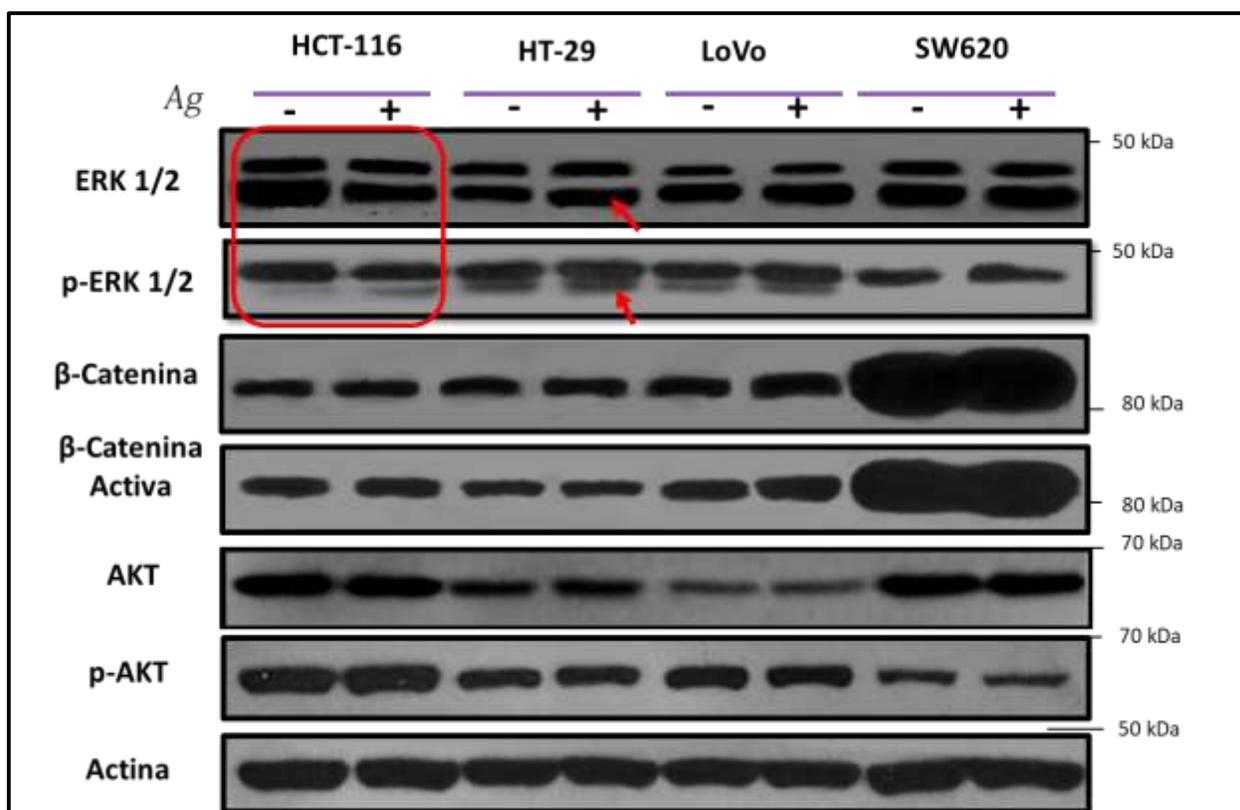


Figura 12. Determinación de la presencia de las proteínas de las distintas vías de señalización comúnmente mutadas en CCR en ausencia (-Ag) o presencia (+Ag) de los antígenos de *T. crassiceps*

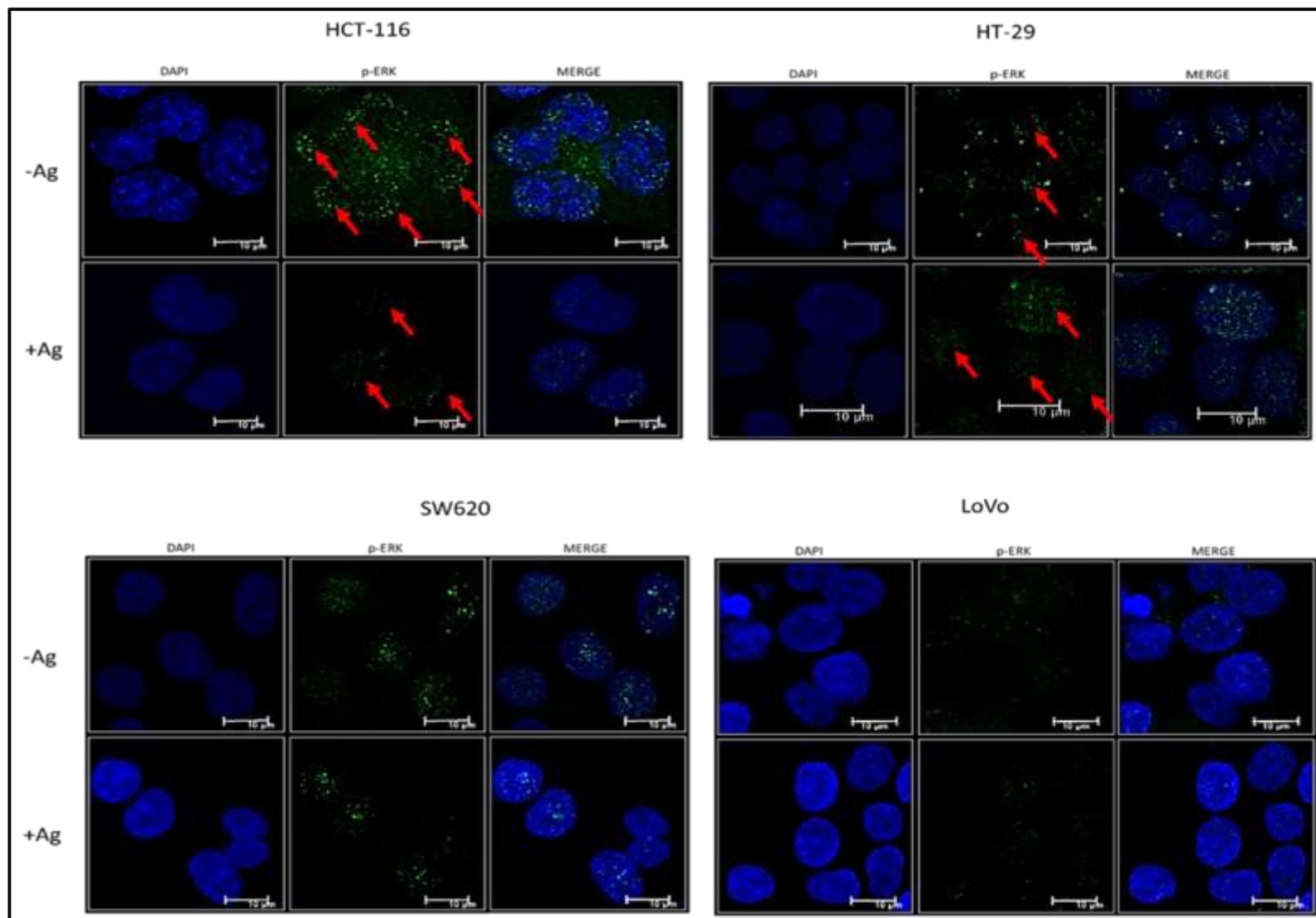


Figura 13. Inmunodetección de la proteína ERK1/2 en su forma activa perteneciente a la vía MAPK afectada en al CCR en ausencia (-Ag) o presencia (+Ag) de los antígenos de *T. crassiceps*

VII. DISCUSIÓN

El CCR es un problema de salud importante a nivel mundial. Es conocido que esta enfermedad tiene una estrecha relación con la inflamación crónica de los tejidos. Al respecto se ha documentado que, tras la presencia de la enfermedad inflamatoria del intestino, la colitis ulcerativa o la enfermedad de Crohn, existe una alta predisposición a desarrollar cáncer (Kraus y Arber 2009; Lakatos y Lakatos 2008). La base para llegar a esta conclusión fue la presencia de algunas moléculas del sistema inmune (como las citocinas y las quimiocinas) que interactúan en los procesos inflamatorios en los tumores (Mantovani *et al.*, 2008), abriendo un campo de investigación para intentar contrarrestar a las células tumorales, estudiando el papel que juega el sistema inmune en el desarrollo de tumores.

La inflamación es una función crucial del sistema inmune innato, en condiciones normales, el proceso inflamatorio constituye una defensa de nuestro sistema inmune. Asimismo, la inflamación es una respuesta aguda, agresiva, rápida e inespecífica contra microorganismos y cuerpos extraños que invadan nuestros sistemas, aislándolos y evitando daños al tejido sano e iniciando el proceso de reparación (Balkwill *et al.*, 2005).

Las citocinas pro-inflamatorias TNF- α e INF- γ estimulan la fase aguda de la reacción inflamatoria, aunque cuando están presentes de manera continua y prolongada son los principales mediadores de las enfermedades de inflamación crónica. Además, el TNF- α media la adherencia de los leucocitos al endotelio vascular, así restringe y dirige los leucocitos en áreas específicas a reparar (Coussens y Werb 2002). Por otro lado, la IL1 β es una citocina pro-inflamatoria producida principalmente por macrófagos activados y en cáncer se ha reportado que participa de manera activa para inducir y mantener la señalización y el crecimiento de células tumorales vía canónica de Wnt, a través de la inactivación de GSK3 β (Klampfer 2011; Kaler *et al.*, 2009).

La inflamación puede cursar por periodos agudos y prolongados, llevando a un proceso de inflamación crónica el cual se desarrolla de forma rápida, en el que moléculas mediadoras son inducidas de forma secuencial, promoviendo que las células inmunes se muevan dentro y fuera de la zona afectada, destruyendo agentes infecciosos, reparando el tejido dañado e iniciando la respuesta inmune específica y de largo plazo (inmunidad

Norma Carraro Morales

adaptativa) (Balkwill *et al.*, 2005). La inflamación latente y a menudo crónica, parece estar relacionada con el desarrollo de diversos trastornos, por lo que se considera un factor considerable en la progresión maligna de varias enfermedades entre las que se encuentra el cáncer.

Una de los principales objetivos al estudiar el cáncer es encontrar formas efectivas y menos agresivas que permitan erradicar a las células tumorales y contrarrestar las diferentes alteraciones que presenta cada subtipo de cáncer ya que las terapias comunes contra el cáncer (quimio y radioterapia) no son del todo efectivas y comúnmente ocurren recaídas y metástasis después de dichos tratamientos. Asimismo, se ha observado resistencia a los fármacos empleados en las terapias, lo que lleva a la búsqueda de terapias novedosas más naturales (Jacobo-Herrera *et al.*, 2016). Estudios de todo el mundo indican que los pacientes con cáncer suelen recurrir a alternativas naturales como un recurso simultáneo para encontrar una cura (Kraus y Arber 2009; Jacobo-Herrera *et al.*, 2016; Alonso-Castro *et al.*, 2011).

En la búsqueda de alternativas de tratamiento a diversas enfermedades principalmente las que comprenden procesos inflamatorios se han utilizado algunos parásitos helmintos (por ejemplo, *Ascaris suum*, *Dirofilaria immitis*, *Schistosoma mansoni*, *Trichuris suis*, entre otros (Lima *et al.*, 2002; McConchie *et al.*, 2006; Schopf *et al.*, 2005; Imai *et al.*, 2001; Cooke *et al.*, 1999; Mangan *et al.*, 2006; Summers *et al.*, 2005, 2003; Reddy y Fried 2007). Uno de estos organismos es el parásito helminto *T. crassiceps*, del cual se observó que su presencia genera una mejoría en colitis ulcerativa (Ledesma-Soto *et al.*, 2015). Posteriormente al utilizar ésta misma infección intraperitoneal en un modelo murino de colitis asociada a tumorigénesis, se encontró una reducción en el tamaño de los tumores de los ratones que fueron infectados previamente con el parásito, sin embargo en ese momento se desconocía el mecanismo de acción (León-Cabrera *et al.*, 2014). Dentro de las investigaciones con el parásito se encontró que los antígenos secretados por éste afecta a las células dendríticas al inhibir la vía de NFκB (la cual es estimulada directamente por Ras). La activación de NFκB ocurre rápidamente en respuesta a estímulos muy diversos como la unión de patógenos a receptores de superficie (vía receptores tipo Toll), la inducción por citocinas (TNF-α e IL-1) o tras la activación del receptor de células T (TCR). En todos los casos ocurre

la traslocación de NF- κ B al núcleo. Una vez en el núcleo promueve la transcripción de numerosos genes implicados en procesos inflamatorios como las citocinas, las quimiocinas, moléculas de adhesión y metaloproteinasas (Li y Verma 2002; Karban *et al.*, 2004). En procesos de inflamación intestinal y CCR se ha identificado una activación persistente de NF κ B con elevados niveles de las subunidades que lo constituyen y una alta actividad de unión al DNA. Por tanto, este factor de transcripción podría ser un importante modulador de la respuesta inflamatoria en CCR tanto a nivel molecular como genético (Candido y Hagemann 2013).

Para conocer mejor cual es mecanismos de acción de los antígenos secretados por *T. crassiceps* se realizó un experimento *in vitro* con diferentes líneas celulares de CCR que presentaban mutaciones en las tres vías de señalización más comunes en el cáncer. Dentro de estas vías se encuentran: Ras/RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT/mTOR y Wnt/ β -catenina. La expectativa del experimento era que los antígenos afectaran principalmente a la vía de Ras por el antecedente que se tenía lo cual se pudo comprobar. Al analizar los resultados se encontró que los antígenos tuvieron un mayor efecto en la línea celular HCT-116, la cual presenta una mutación de Ras, a diferencia de la línea HT-29 con mutaciones en la vía de AKT y las líneas celulares SW620 y LoVo con mutaciones en la vía de la β -catenina. Al realizar ensayos de proliferación y apoptosis se observó que el mecanismo que se afectó fue la proliferación y únicamente en las líneas HCT-116 y HT-29 con mutaciones en Ras y AKT respectivamente. Esto podría indicar que el efecto de los antígenos es río arriba de estas vías ya que en las células mutadas en β -catenina no se observó ningún efecto.

La familia de los genes Ras es uno de los grupos de oncogenes más frecuentemente alterados en las neoplasias humanas (Jančík *et al.*, 2010). El oncogén KRas se localiza en el cromosoma 12 y participa en la señalización a través de las vías PI3K/PTEN/AKT y RAF/MEK/ERK (Levidou *et al.*, 2012). Las proteínas codificadas por estos genes presentan una masa molecular de 21 kDa (de ahí el nombre de p21), que posee actividad de GTPasa, actuando en la vía de transducción de señales de crecimiento y diferenciación celular. La mutación de este gen es el evento genético más comúnmente observado en el desarrollo de

tumores en el ser humano (pulmón 30%, colon 40%, páncreas 80%, tiroides 55%, etc.) (Makrodouli *et al.*, 2011).

Las mutaciones de KRas más comunes se encuentran en los codones 12, 13 y 61, que corresponden al dominio de unión GTP/GDP de la proteína. Estas mutaciones alteran la actividad GTPasa KRas, permitiendo que se mantenga constitutivamente activa. La consecuencia de estas mutaciones es un aumento en la fracción del KRas activado en la célula, estimulando la ruta de señalización Ras/RAF/MAPK de manera permanente, promoviendo la proliferación celular e incrementado su supervivencia, así como otros efectos pro-tumorigénicos. En el CCR se ha encontrado mutación del gen KRas entre 30 y 50% de los casos (Neumann *et al.*, 2009; Knijn *et al.*, 2011). La terapia actual en algunos estadios avanzados de cáncer de colon y de recto incluyen el uso de anticuerpos monoclonales (Panitumumab, Cetuximab), capaces de bloquear la activación del EGFR. En los pacientes que no responden a esta terapia se demostró que las células tumorales eran portadoras de una de las mutaciones que activan al gen KRas que se encuentra localizado río abajo en la vía del EGFR, lo que producía la activación de esta vía independiente del bloqueo del receptor. También se demostró que la determinación del estado nativo (no mutado) o mutado del gen KRas era capaz de predecir la respuesta del tumor al uso de inhibidores del EGFR, siendo esta determinación clínicamente útil (Dahabreh *et al.*, 2011; Petrelli *et al.*, 2011). Algunos estudios han demostrado que tipos específicos de mutación de KRas tienen relación con la supervivencia del paciente, como la mutación G12V, la que se asociaría a un pronóstico más adverso de la enfermedad en relación a otros tipos de mutaciones (Winder *et al.*, 2009; Pérez-Ruiz *et al.*, 2012).

Las tres rutas principales que cumplen un papel fundamental en la transformación y tumorigénesis desencadenadas por el oncogén Ras son la ruta Ras/RAF/MAPK/ERK, la ruta dependiente de la PI3K/AKT y la ruta Jak2/STAT3 (Giehl 2005). Cuando el ligando extracelular (EGF) se une al EGFR se produce dimerización de éste, lo que da lugar a la activación del dominio con actividad cinasa de tirosina en su extremo C-terminal. Los residuos de fosfotirosina del receptor activado son reconocidos por proteínas que poseen dominios SH2 o dominios PTB. A través de dos mediadores (Grb2 y Sos1/2) se promueve el

intercambio del GDP por GTP de Ras, activando esta proteína, que dirigirá su señal al núcleo a través de otras cinasas de serina treonina (RAF, MAPK/ ERK). La consecuencia de esta activación será la diferenciación, la proliferación o apoptosis celular (Roberts y Der 2007; Makrodouli *et al.*, 2011).

Se han realizado estudios en células de CCR analizando las tres rutas anteriormente mencionadas, en los que se observó el papel de Ras en las vías de ERK y PI3K con respecto a la proliferación y su incremento por la administración de grelina, así como la atenuación del afecto en la proliferación por el uso de inhibidores de Ras, PI3K, Akt y mTOR, demostrando que estas vías están involucradas durante la proliferación en el CCR (Lien *et al.*, 2016; Waseem *et al.*, 2014). La interacción entre ERK y PI3K y la relación cruzada que existe entre sus componentes ha sido estudiada por su importancia en las nuevas terapias contra el cáncer (Mendoza *et al.*, 2011). Debido a las funciones vitales en las que participan estas vías y a que se encuentran comúnmente activas durante la oncogénesis, ha sido difícil el encontrar un tratamiento exitoso contra el cáncer. La activación de estas vías reduce la acción de los fármacos, favoreciendo la resistencia a las terapias dirigidas, por lo que surge la necesidad de tratamientos más específicos hacia las mutaciones presentes durante el desarrollo de CCR (Di Nicolantonio *et al.*, 2010; Burgess *et al.*, 2014; Dinner y Plataniias 2016).

Las vías Ras/ERK y PI3K/AKT/mTOR se pueden regular negativamente entre ellas, cuando una de las dos rutas es bloqueada por algún químico. Por ejemplo al utilizar algún inhibidor de MEK se produce la activación de AKT inducida por EGF, proceso que desencadena la fosforilación de ERK inhibiendo el reclutamiento de PI3K (Hoefflich *et al.*, 2009). La vía de Ras también puede activar a la ruta PI3K/AKT/mTOR mediante la regulación de PI3K y mTOR a través de la activación de algunas proteínas como RSK y Ekr. Por ejemplo; TSC es inhibido por acción de ambas proteínas lo que promueve la actividad de mTOR y la tumorigénesis (Zoncu *et al.*, 2011; Suire *et al.*, 2002).

Waseem y colaboradores (2014) realizaron un estudio con células de colon, tratadas con grelina. Observaron que hay una regulación cruzada en las vías de PI3K y ERK, participando en los mecanismos de proliferación. Dichos autores sugieren que la grelina

Norma Carraro Morales

media la trans-activación del EGFR y la fosforilación de PI3K/AKT, las cuales convergen para inducir la fosforilación de ERK1/2 río abajo, provocando la proliferación de las células de colon, debido al ya conocido papel pro-proliferativo que presenta ERK (Pombo *et al.*, 2000). Este mecanismo podría explicar los resultados obtenidos en nuestro estudio, en donde observamos que la línea celular HTC-116, con mutaciones en Ras, tuvo una disminución de la proliferación, mientras que en la línea HT-29, con mutaciones en PI3K, hubo un incremento (Fig. 11 A y B). Es probable que los antígenos de *T. crassiceps* tuvieran una interacción río arriba de Ras, provocando que en las células con mutaciones en esta proteína se presentara un efecto inhibitorio, disminuyendo la proliferación. Sin embargo, cuando las células presentan mutaciones en PI3K puede generar señales en las células que causen un efecto compensatorio ante la disminución en los niveles de ERK, y en consecuencia activar mecanismos para la fosforilación de ERK1/2, incrementando la proliferación celular. Lo anterior se puede observar en las inmunofluorescencias (Fig. 13), disminuyendo la presencia de p-ERK 1/2 en la línea HCT-116 e incrementando en HT-29.

VIII. CONCLUSIÓN

Los antígenos de *T. crassiceps* tuvieron efectos antiproliferativos en dos de las líneas celulares de CCR: HCT-116 y HT-29 las cuales presentan mutaciones en la vía de Ras/RAF/MEK/ERK y PI3K/AKT/mTOR respectivamente, en las otras dos líneas celulares estudiadas no se observó ningún efecto en los procesos celulares analizados.

En la línea celular HCT-116 se detectó una disminución considerable en la proliferación celular a lo largo de 72 h, mientras que en la línea celular HT-29 los antígenos de *T. crassiceps* promovieron un incremento significativo en la proliferación celular.

Con respecto a la vía de las MAPK, se encontró una disminución en los niveles de activación de ERK1/2 en la línea celular HCT-116.

Norma Carraro Morales

LITERATURA CITADA

1. ABERCROMBIE, M., 1979. Contact inhibition and malignancy. *Nature*, vol. 281, no. 5729, pp. 259-262.
2. ACS, American Cancer Society., 2014. Cancer Facts & Figures 2014. [en línea]. [Consulta: 9 noviembre 2016]. Disponible en: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/webcontent/acspc-042151.pdf>.
3. ALDACO-SARVIDE, F., PÉREZ-PÉREZ, P., CERVANTES-SÁNCHEZ, G., TORRECILLAS-TORRES, L. y ERAZO-V, A.E., 2012. Mortalidad por cáncer en México 2000-2010: el recuento de los daños. *Gaceta Mexicana de Oncología*, pp. 371-379.
4. ALONSO-CASTRO, A.J., VILLARREAL, M.L., SALAZAR-OLIVO, L.A., GOMEZ-SANCHEZ, M., DOMINGUEZ, F. y GARCIA-CARRANCA, A., 2011. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: Pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 133, no. 3, pp. 945-972.
5. BAKER, S.J., FEARON, E.R., NIGRO, J.M., HAMILTON, PREISINGER, A.C., JESSUP, J.M., VANTUINEN, P., LEDBETTER, D.H., BARKER, D.F., NAKAMURA, Y., WHITE, R. y VOGELSTEIN, B., 1989. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science*, vol. 244, no. 4901, pp. 217-221.
6. BAKER, S.J., MARKOWITZ, S., FEARON, E.R., WILLSON, J.K. y VOGELSTEIN, B., 1990. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science*, vol. 249, no. 4971, pp. 912-915.
7. BALKWILL, F., CHARLES, K.A. y MANTOVANI, A., 2005. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell*, vol. 7, no. 3, pp. 211-217.
8. BALKWILL, F. y MANTOVANI, A., 2001. Inflammation and cancer: back to Virchow? *The Lancet*, vol. 357, no. 9255, pp. 539-545.
9. BARBER, T.D., MCMANUS, K., YUEN, K.W.Y., REIS, M., PARMIGIANI, G., SHEN, D., BARRETT, I., NOUHI, Y., SPENCER, F., MARKOWITZ, S., VELCULESCU, V.E., KINZLER, K.W., VOGELSTEIN, B., LENGAUER, C. y HIETER, P., 2008. Chromatid cohesion defects may underlie chromosome instability in human colorectal cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, no. 9, pp. 3443-3448.

10. BARTLETT, J.M.S., 2010. Biomarkers and patient selection for PI3K/AKT/mTOR targeted therapies: current status and future directions. *Clinical Breast Cancer*, vol. 10 Suppl 3, pp. S86-95.
11. BERGERS, G., HANAHAN, D. y COUSSENS, L.M., 2004. Angiogenesis and apoptosis are cellular parameters of neoplastic progression in transgenic mouse models of tumorigenesis. *International Journal of Developmental Biology*, vol. 42, no. 7, pp. 995-1002.
12. BIENZ, M. y CLEVERS, H., 2000. Linking Colorectal Cancer to Wnt Signaling. *Cell*, vol. 103, no. 2, pp. 311-320.
13. BLANKE, C.D., RÖDEL, C. y TALAMONTI, M.S., 2010. *Gastrointestinal Oncology: A Practical Guide*. S.l.: Springer Science & Business Media.
14. BOLD, R.J., TERMUHLLEN, P.M. y MCCONKEY, D.J., 1997. Apoptosis, cancer and cancer therapy. *Surgical Oncology*, vol. 6, no. 3, pp. 133-142.
15. BRUGGEN, P. van der, TRAVERSARI, C., CHOMEZ, P., LURQUIN, C., PLAEN, E.D., EYNDE, B.V. den, KNUTH, A. y BOON, T., 1991. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*, vol. 254, no. 5038, pp. 1643-1647.
16. BURGESS, M.R., HWANG, E., FIRESTONE, A.J., HUANG, T., XU, J., ZUBER, J., BOHIN, N., WEN, T., KOGAN, S.C., HAIGIS, K.M., SAMPATH, D., LOWE, S., SHANNON, K. y LI, Q., 2014. Preclinical efficacy of MEK inhibition in Nras-mutant AML. *Blood*, vol. 124, no. 26, pp. 3947-3955.
17. CADIGAN, K.M. y NUSSE, R., 1997. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes & Development*, vol. 11, no. 24, pp. 3286-3305.
18. CANDIDO, J. y HAGEMANN, T., 2013. Cancer-Related Inflammation. *Journal of Clinical Immunology*, vol. 33, no. 1, pp. 79-84.
19. CHAKRABARTY, A., BHOLA, N.E., SUTTON, C., GHOSH, R., KUBA, M.G., DAVE, B., CHANG, J.C. y ARTEAGA, C.L., 2013. Trastuzumab-Resistant Cells Rely on a HER2-PI3K-FoxO-Survivin Axis and Are Sensitive to PI3K Inhibitors. *Cancer Research*, vol. 73, no. 3, pp. 1190-1200.
20. CHAKRABARTY, A., SÁNCHEZ, V., KUBA, M.G., RINEHART, C. y ARTEAGA, C.L., 2012. Feedback upregulation of HER3 (ErbB3) expression and activity attenuates antitumor effect of PI3K inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 109, no. 8, pp. 2718-2723.
21. CHEAIB, B., AUGUSTE, A. y LEARY, A., 2015. The PI3K/Akt/mTOR pathway in ovarian cancer: therapeutic opportunities and challenges. *Chinese Journal of Cancer*, vol. 34, no. 1, pp. 4-16.

Norma Carraro Morales

22. CHEEVER, M.A., ALLISON, J.P., FERRIS, A.S., FINN, O.J., HASTINGS, B.M., HECHT, T.T., MELLMAN, I., PRINDIVILLE, S.A., VINER, J.L., WEINER, L.M. y MATRISIAN, L.M., 2009. The Prioritization of Cancer Antigens: A National Cancer Institute Pilot Project for the Acceleration of Translational Research. En: PMID: 19723653, *Clinical Cancer Research*, vol. 15, no. 17, pp. 5323-5337.
23. CHEN, A.E., GINTY, D.D. y FAN, C.-M., 2005. Protein kinase A signalling via CREB controls myogenesis induced by Wnt proteins. *Nature*, vol. 433, no. 7023, pp. 317-322.
24. COOKE, A., TONKS, P., JONES, F.M., O'SHEA, H., HUTCHINGS, P., FULFORD, A.J. c. y DUNNE, 1999. Infection with *Schistosoma mansoni* prevents insulin dependent diabetes mellitus in non-obese diabetic mice. *Parasite Immunology*, vol. 21, no. 4, pp. 169-176.
25. COUSSENS, L.M. y WERB, Z., 2002. Inflammation and cancer. *Nature*, vol. 420, no. 6917, pp. 860-867.
26. DAHABREH, I.J., TERASAWA, T., CASTALDI, P.J. y TRIKALINOS, T.A., 2011. Systematic review: Anti-epidermal growth factor receptor treatment effect modification by KRAS mutations in advanced colorectal cancer. *Annals of Internal Medicine*, vol. 154, no. 1, pp. 37-49.
27. DAVIES, H., BIGNELL, G.R., COX, C., STEPHENS, P., EDKINS, S., CLEGG, S., TEAGUE, J., WOFFENDIN, H., GARNETT, M.J., BOTTOMLEY, W., DAVIS, N., DICKS, E., EWING, R., FLOYD, Y., GRAY, K., HALL, S., HAWES, R., HUGHES, J., KOSMIDOU, V., MENZIES, A., MOULD, C., PARKER, A., STEVENS, C., WATT, S., HOOPER, S., WILSON, R., JAYATILAKE, H., GUSTERSON, B.A., COOPER, C., SHIPLEY, J., HARGRAVE, D., PRITCHARD-JONES, K., MAITLAND, N., CHENEVIX-TRENCH, G., RIGGINS, G.J., BIGNER, D.D., PALMIERI, G., COSSU, A., FLANAGAN, A., NICHOLSON, A., HO, J.W.C., LEUNG, S.Y., YUEN, S.T., WEBER, B.L., SEIGLER, H.F., DARROW, T.L., PATERSON, H., MARAIS, R., MARSHALL, C.J., WOOSTER, R., STRATTON, M.R. y FUTREAL, P.A., 2002. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, vol. 417, no. 6892, pp. 949-954.
28. DE VISSER, K.E., EICHTEN, A. y COUSSENS, L.M., 2006. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nature Reviews Cancer*, vol. 6, no. 1, pp. 24-37.
29. DEFAZIO, A., CHIEW, Y.-E., SINI, R.L., JANES, P.W. y SUTHERLAND, R.L., 2000. Expression of c-erbB receptors, heregulin and oestrogen receptor in human breast cell lines. *International Journal of Cancer*, vol. 87, no. 4, pp. 487-498.
30. DI NICOLANTONIO, F., ARENA, S., TABERNERO, J., GROSSO, S., MOLINARI, F., MACARULLA, T., RUSSO, M., CANCELLIERE, C., ZECCHIN, D., MAZZUCHELLI, L., SASAZUKI, T., SHIRASAWA, S., GEUNA, M., FRATTINI, M., BASELGA, J., GALLICCHIO, M., BIFFO, S. y BARDELLI, A., 2010. Dereglulation

- of the PI3K and KRAS signaling pathways in human cancer cells determines their response to everolimus. *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 120, no. 8, pp. 2858-2866.
31. DINNER, S. y PLATANIAS, L.C., 2016. Targeting the mTOR Pathway in Leukemia. *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 117, no. 8, pp. 1745-1752.
 32. DONG, C., DAVIS y FLAVELL, R.A., 2002. Map Kinases in the Immune Response. *Annual Review of Immunology*, vol. 20, no. 1, pp. 55-72.
 33. DØSEN, G., TENSTAD, E., NYGREN, M.K., STUBBERUD, H., FUNDERUD, S. y RIAN, E., 2006. Wnt expression and canonical Wnt signaling in human bone marrow B lymphopoiesis. *BMC Immunology*, vol. 7, pp. 13.
 34. DUNN, G.P., OLD, L.J. y SCHREIBER, R.D., 2004. The Three Es of Cancer Immunoediting. *Annual Review of Immunology*, vol. 22, no. 1, pp. 329-360.
 35. ELLIOTT, D.E., URBAN, J.F., ARGO, C.K. y WEINSTOCK, J.V., 2000. Does the failure to acquire helminthic parasites predispose to Crohn's disease? *The FASEB Journal*, vol. 14, no. 12, pp. 1848-1855.
 36. ERB, K.J., 2007. Helminths, allergic disorders and IgE-mediated immune responses: Where do we stand? *European Journal of Immunology*, vol. 37, no. 5, pp. 1170-1173.
 37. FIASSE, R. y LATINNE, D., 2006. Intestinal helminths: a clue explaining the low incidence of inflammatory bowel diseases in Subsaharan Africa? Potential benefits and hazards of helminth therapy. *Acta Gastro-Enterologica Belgica*, vol. 69, no. 4, pp. 418-422.
 38. FODDE, R., SMITS, R. y CLEVERS, H., 2001. APC, Signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nature Reviews Cancer*, vol. 1, no. 1, pp. 55-67.
 39. GIEHL, K., 2005. Oncogenic Ras in tumour progression and metastasis. *Biological Chemistry*, vol. 386, no. 3, pp. 193-205.
 40. GOODMAN, C.C. y FULLER, K.S., 2014. *Pathology - E-Book: Implications for the Physical Therapist*. S.l.: Elsevier Health Sciences.
 41. GOSS, K.H. y GRODEN, J., 2000. Biology of the Adenomatous Polyposis Coli Tumor Suppressor. *Journal of Clinical Oncology*, vol. 18, no. 9, pp. 1967-1979.
 42. GRAEBER, T.G. y EISENBERG, D., 2001. Bioinformatic identification of potential autocrine signaling loops in cancers from gene expression profiles. *Nature Genetics*, vol. 29, no. 3, pp. 295-300.
 43. GRIVENNIKOV, S.I., GRETEN, F.R. y KARIN, M., 2010. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*, vol. 140, no. 6, pp. 883-899.

Norma Carraro Morales

44. GUERTIN, D.A. y SABATINI, D.M., 2007. Defining the Role of mTOR in Cancer. *Cancer Cell*, vol. 12, no. 1, pp. 9-22.
45. HANAHAN, D. y WEINBERG, R.A., 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, vol. 100, no. 1, pp. 57-70.
46. HANAHAN, D. y WEINBERG, R.A., 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646-674.
47. HENDRICKX, M. y LEYNS, L., 2008. Non-conventional Frizzled ligands and Wnt receptors. *Development, Growth & Differentiation*, vol. 50, no. 4, pp. 229-243.
48. HERNANDEZ-AYA, L.F. y GONZALEZ-ANGULO, A.M., 2011. Targeting the Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling Pathway in Breast Cancer. *The Oncologist*, vol. 16, no. 4, pp. 404-414.
49. HINSBERGH, V., W.M, V. y KOOLWIJK, P., 2008. Endothelial sprouting and angiogenesis: matrix metalloproteinases in the lead. *Cardiovascular Research*, vol. 78, no. 2, pp. 203-212.
50. HIRAKAWA, S., KODAMA, S., KUNSTFELD, R., KAJIYA, K., BROWN, L.F. y DETMAR, M., 2005. VEGF-A induces tumor and sentinel lymph node lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 201, no. 7, pp. 1089-1099.
51. HOEFLICH, K.P., O'BRIEN, C., BOYD, Z., CAVET, G., GUERRERO, S., JUNG, K., JANUARIO, T., SAVAGE, H., PUNNOOSE, E., TRUONG, T., ZHOU, W., BERRY, L., MURRAY, L., AMLER, L., BELVIN, M., FRIEDMAN, L.S. y LACKNER, M.R., 2009. In vivo Antitumor Activity of MEK and Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibitors in Basal-Like Breast Cancer Models. *Clinical Cancer Research*, vol. 15, no. 14, pp. 4649-4664.
52. IMAI, S., TEZUKA, H. y FUJITA, K., 2001. A Factor of Inducing IgE from a Filarial Parasite Prevents Insulin-Dependent Diabetes Mellitus in Nonobese Diabetic Mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 286, no. 5, pp. 1051-1058.
53. INEGI, Instituto Nacional de Estadística y Geografía 2016. ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL... DÍA MUNDIAL CONTRA EL CÁNCER (4 DE FEBRERO). [en línea]. [Consulta: 7 enero 2017]. Disponible en: http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2016/cancer2016_0.pdf.
54. ITOH, N., SEMBA, S., ITO, M., TAKEDA, H., KAWATA, S. y YAMAKAWA, M., 2002. Phosphorylation of Akt/PKB is required for suppression of cancer cell apoptosis and tumor progression in human colorectal carcinoma. *Cancer*, vol. 94, no. 12, pp. 3127-3134.

55. ITZKOWITZ, S.H. y YIO, X., 2004. Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 287, no. 1, pp. G7-17.
56. IVANCICH, M., SCHRANK, Z., WOJDYLA, L., LEVISKAS, B., KUCKOVIC, A., SANJALI, A. y PURI, N., 2017. Treating Cancer by Targeting Telomeres and Telomerase. *Antioxidants*, vol. 6, no. 1, pp. 15.
57. JACOBO-HERRERA, N.J., JACOBO-HERRERA, F.E., ZENTELLA-DEHESA, A., ANDRADE-CETTO, A., HEINRICH, M. y PÉREZ-PLASENCIA, C., 2016. Medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of colorectal cancer. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 179, pp. 391-402.
58. JANČÍK, S., DRÁBEK, J., RADZIOCH, D. y HAJDÚCH, M., 2010. Clinical Relevance of KRAS in Human Cancers. *BioMed Research International*.
59. JOHNSTON, M.J.G., WANG, A., CATARINO, M.E.D., BALL, L., PHAN, V.C., MACDONALD, J.A. y MCKAY, D.M., 2010. Extracts of the Rat Tapeworm, *Hymenolepis diminuta*, Suppress Macrophage Activation In Vitro and Alleviate Chemically Induced Colitis in Mice. *Infection and Immunity*, vol. 78, no. 3, pp. 1364-1375.
60. JOUKOV, V., PAJUSOLA, K., KAIPAINEN, A., CHILOV, D., LAHTINEN, I., KUKK, E., SAKSELA, O., KALKKINEN, N. y ALITALO, K., 1996. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *The EMBO Journal*, vol. 15, no. 2, pp. 290-298.
61. KALER, P., AUGENLICHT, L. y KLAMPFER, L., 2009. Macrophage-derived IL-1 β stimulates Wnt signaling and growth of colon cancer cells; a crosstalk interrupted by vitamin D3. *Oncogene*, vol. 28, no. 44, pp. 3892-3902.
62. KARBAN, A.S., OKAZAKI, T., PANHUYSEN, C.I.M., GALLEGOS, T., POTTER, J.J., BAILEY-WILSON, J.E., SILVERBERG, M.S., DUERR, R.H., CHO, J.H., GREGERSEN, P.K., WU, Y., ACHKAR, J.-P., DASSOPOULOS, T., MEZEY, E., BAYLESS, T.M., NOUVET, F.J. y BRANT, S.R., 2004. Functional annotation of a novel NFKB1 promoter polymorphism that increases risk for ulcerative colitis. *Human Molecular Genetics*, vol. 13, no. 1, pp. 35-45.
63. KARP, G., 2011. *Biología celular y molecular: conceptos y experimentos*. Cuarta edición. México, D.F: McGraw-Hill Interamericana. McGraw-Hill educación.
64. KHALEGHPOUR, K., LI, Y., BANVILLE, D., YU, Z. y SHEN, S.-H., 2004. Involvement of the PI 3-kinase signaling pathway in progression of colon adenocarcinoma. *Carcinogenesis*, vol. 25, no. 2, pp. 241-248.

65. KHAN, W.I., BLENNERHASSET, P.A., VARGHESE, A.K., CHOWDHURY, S.K., OMSTED, P., DENG, Y. y COLLINS, S.M., 2002. Intestinal Nematode Infection Ameliorates Experimental Colitis in Mice. *Infection and Immunity*, vol. 70, no. 11, pp. 5931-5937.
66. KIM, R., EMI, M. y TANABE, K., 2005. Cancer cell immune escape and tumor progression by exploitation of anti-inflammatory and pro-inflammatory responses. *Cancer Biology & Therapy*, vol. 4, no. 9, pp. 924-933.
67. KIM, R., EMI, M. y TANABE, K., 2007. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*, vol. 121, no. 1, pp. 1-14.
68. KLAMPFER, L., 2011. CYTOKINES, INFLAMMATION AND COLON CANCER. *Current cancer drug targets*, vol. 11, no. 4, pp. 451-464.
69. KNIJN, N., MEKENKAMP, L.J.M., KLOMP, M., VINK-BÖRGER, M.E., TOL, J., TEERENSTRA, S., MEIJER, J.W.R., TEBAR, M., RIEMERSMA, S., VAN KRIEKEN, J.H.J.M., PUNT, C.J.A. y NAGTEGAAL, I.D., 2011. KRAS mutation analysis: a comparison between primary tumours and matched liver metastases in 305 colorectal cancer patients. *British Journal of Cancer*, vol. 104, no. 6, pp. 1020-1026.
70. KNUTH, A., DANOWSKI, B., OETTGEN, H.F. y OLD, L.J., 1984. T-cell-mediated cytotoxicity against autologous malignant melanoma: analysis with interleukin 2-dependent T-cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 81, no. 11, pp. 3511-3515.
71. KONSTANTINOPOULOS, P.A., KARAMOUZIS, M.V. y PAPAVALASSILIOU, A.G., 2007. Post-translational modifications and regulation of the RAS superfamily of GTPases as anticancer targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 6, no. 7, pp. 541-555.
72. KRAUS, S. y ARBER, N., 2009. Inflammation and colorectal cancer. *Current Opinion in Pharmacology*, vol. 9, no. 4, pp. 405-410.
73. LAKATOS, P.L. y LAKATOS, L., 2008. Risk for colorectal cancer in ulcerative colitis: Changes, causes and management strategies. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, vol. 14, no. 25, pp. 3937-3947.
74. LANGLEY, R.R. y FIDLER, I.J., 2007. Tumor Cell-Organ Microenvironment Interactions in the Pathogenesis of Cancer Metastasis. *Endocrine Reviews*, vol. 28, no. 3, pp. 297-321.
75. LEARY, A., AUCLIN, E., PAUTIER, P. y LHOMME, C., 2013. The PI3K/Akt/mTOR Pathway in Ovarian Cancer: Biological Rationale and Therapeutic Opportunities. [en línea], [Consulta: 16 mayo 2017]. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/ovarian-cancer-a-clinical-and-translational->

update/the-pi3k-Akt-mtor-pathway-in-ovarian-cancer-biological-rationale-and-therapeutic-opportunities.

76. LEDESMA-SOTO, Y., CALLEJAS, B.E., TERRAZAS, C.A., REYES, J.L., ESPINOZA-JIMÉNEZ, A., GONZÁLEZ, M.I., LEÓN-CABRERA, S., MORALES, R., OLGUÍN, J.E., SAAVEDRA, R., OGHUMU, S., SATOSKAR, A.R. y TERRAZAS, L.I., 2015. Extraintestinal Helminth Infection Limits Pathology and Proinflammatory Cytokine Expression during DSS-Induced Ulcerative Colitis: A Role for Alternatively Activated Macrophages and Prostaglandins. *BioMed Research International*, vol. 2015.
77. LEIBOWITZ, U., ANTONOVSKY, A., MEDALIE, J.M., SMITH, H.A., HALPERN, L. y ALTER, M., 1966. Epidemiological study of multiple sclerosis in Israel. II. Multiple sclerosis and level of sanitation. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, vol. 29, no. 1, pp. 60-68.
78. LENGAUER, C., KINZLER, K.W. y VOGELSTEIN, B., 1997. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature*, vol. 386, no. 6625, pp. 623-627.
79. LEÓN-CABRERA, S., CALLEJAS, B.E., LEDESMA-SOTO, Y., CORONEL, J., PÉREZ-PLASENCIA, C., GUTIÉRREZ-CIRLOS, E.B., ÁVILA-MORENO, F., RODRÍGUEZ-SOSA, M., HERNÁNDEZ-PANDO, R., MARQUINA-CASTILLO, B., CHIRINO, Y.I. y TERRAZAS, L.I., 2014. Extraintestinal Helminth Infection Reduces the Development of Colitis-Associated Tumorigenesis. *International Journal of Biological Sciences*, vol. 10, no. 9, pp. 948-956.
80. LEVIDOU, G., SAETTA, A.A., GIGELOU, F., KARLOU, M., PAPANASTASIOU, P., STAMATELLI, A., KAVANTZAS, N., MICHALOPOULOS, N.V., AGROGIANNIS, G., PATSOIRIS, E. y KORKOLOPOULOU, P., 2012. ERK/pERK expression and B-RAF mutations in colon adenocarcinomas: correlation with clinicopathological characteristics. *World Journal of Surgical Oncology*, vol. 10, pp. 47.
81. LEVINE, A.J., FINLAY, C.A. y HINDS, P.W., 2004. P53 is a tumor suppressor gene. *Cell*, vol. 116, no. 2 Suppl, pp. S67-69.
82. LI, Q. y VERMA, I.M., 2002. NF- κ B regulation in the immune system. *Nature Reviews Immunology*, vol. 2, no. 10, pp. 725-734.
83. LIEN, G.-S., LIN, C.-H., YANG, Y.-L., WU, M.-S. y CHEN, B.-C., 2016. Ghrelin induces colon cancer cell proliferation through the GHS-R, Ras, PI3K, AKT, and mTOR signaling pathways. *European Journal of Pharmacology*, vol. 776, pp. 124-131.
84. LIMA, C., PERINI, A., GARCIA, M.L.B., MARTINS, M.A., TEIXEIRA, M.M. y MACEDO, M.S., 2002. Eosinophilic inflammation and airway hyper-responsiveness are profoundly inhibited by a helminth (*Ascaris suum*) extract in a murine model of asthma. *Clinical & Experimental Allergy*, vol. 32, no. 11, pp. 1659-1666.

85. LOEB, L.A., LOEB, K.R. y ANDERSON, J.P., 2003. Multiple mutations and cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 100, no. 3, pp. 776-781.
86. MAKRODOULI, E., OIKONOMOU, E., KOC, M., ANDERA, L., SASAZUKI, T., SHIRASAWA, S. y PINTZAS, A., 2011. BRAF and RAS oncogenes regulate Rho GTPase pathways to mediate migration and invasion properties in human colon cancer cells: a comparative study. *Molecular Cancer*, vol. 10, pp. 118.
87. MANGAN, N.E., ROOIJEN, N. van, MCKENZIE, A.N.J. y FALLON, P.G., 2006. Helminth-Modified Pulmonary Immune Response Protects Mice from Allergen-Induced Airway Hyperresponsiveness. *The Journal of Immunology*, vol. 176, no. 1, pp. 138-147.
88. MANTOVANI, A., ALLAVENA, P., SICA, A. y BALKWILL, F., 2008. Cancer-related inflammation. *Nature*, vol. 454, no. 7203, pp. 436-444.
89. MARÍN-HERNÁNDEZ, Á., RODRÍGUEZ-ZAVALA, J.S., DEL MAZOMONSALVO, I., RODRÍGUEZ-ENRÍQUEZ, S., MORENO-SÁNCHEZ, R. y SAAVEDRA, E., 2016. Inhibition of Non-flux-Controlling Enzymes Deters Cancer Glycolysis by Accumulation of Regulatory Metabolites of Controlling Steps. *Frontiers in Physiology*, vol. 7.
90. MARKOWITZ, S.D. y BERTAGNOLLI, M.M., 2009. Molecular Basis of Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine*, vol. 361, no. 25, pp. 2449-2460.
91. MARKOWITZ, S.D., DAWSON, D.M., WILLIS, J. y WILLSON, J.K.V., 2002. Focus on colon cancer. *Cancer Cell*, vol. 1, no. 3, pp. 233-236.
92. MARTIN, T.A., YE, L., SANDERS, A.J., LANE, J. y JIANG, W.G., 2013. *Cancer Invasion and Metastasis: Molecular and Cellular Perspective* [en línea]. S.l.: Landes Bioscience. [Consulta: 1 abril 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK164700/>.
93. MCCONCHIE, B.W., NORRIS, H.H., BUNDOC, V.G., TRIVEDI, S., BOESEN, A., URBAN, J.F. y KEANE-MYERS, A.M., 2006. Ascaris suum-Derived Products Suppress Mucosal Allergic Inflammation in an Interleukin-10-Independent Manner via Interference with Dendritic Cell Function. *Infection and Immunity*, vol. 74, no. 12, pp. 6632-6641.
94. MEDINA VILLASEÑOR, E. y MARTÍNEZ MACÍAS, R. (eds.), 2009. *Fundamentos de oncología*. México: UNAM, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza: Consejo Mexicano de Oncología.
95. MENDOZA, M.C., ER, E.E. y BLENIS, J., 2011. The Ras-ERK and PI3K-mTOR Pathways: Cross-talk and Compensation. *Trends in biochemical sciences*, vol. 36, no. 6, pp. 320-328.

96. MITTAL, D., GUBIN, M.M., SCHREIBER, R.D. y SMYTH, M.J., 2014. New insights into cancer immunoediting and its three component phases — elimination, equilibrium and escape. *Current opinion in immunology*, vol. 27, pp. 16-25.
97. MODEST, D.P., STINTZING, S., LAUBENDER, R.P., NEUMANN, J., JUNG, A., GIESSEN, C., HAAS, M., AUBELE, P., SCHULZ, C., BOECK, S., STEMMLER, H.-J., KIRCHNER, T. y HEINEMANN, V., 2011. Clinical characterization of patients with metastatic colorectal cancer depending on the KRAS status. En: PMID: 21795973, *Anti-Cancer Drugs*, vol. 22, no. 9, pp. 913-918.
98. MØLLER, H.D., RALFKJÆR, U., CREMERS, N., FRANKEL, M., PEDERSEN, R.T., KLINGELHÖFER, J., YANAGISAWA, H., GRIGORIAN, M., GULDBERG, P., SLEEMAN, J., LUKANIDIN, E. y AMBARTSUMIAN, N., 2011. Role of Fibulin-5 in Metastatic Organ Colonization. *Molecular Cancer Research*, vol. 9, no. 5, pp. 553-563.
99. MOREELS, T.G. y PELCKMANS, P.A., 2006. The hygiene hypothesis and inflammatory bowel diseases: role of helminths. *Acta Gastro-Enterologica Belgica*, vol. 69, no. 4, pp. 413-417.
100. NEUMANN, J., ZEINDL-EBERHART, E., KIRCHNER, T. y JUNG, A., 2009. Frequency and type of KRAS mutations in routine diagnostic analysis of metastatic colorectal cancer. *Pathology - Research and Practice*, vol. 205, no. 12, pp. 858-862.
101. NOSHO, K., IRAHARA, N., SHIMA, K., KURE, S., KIRKNER, G.J., SCHERNHAMMER, E.S., HAZRA, A., HUNTER, D.J., QUACKENBUSH, J., SPIEGELMAN, D., GIOVANNUCCI, E.L., FUCHS, C.S. y OGINO, S., 2008. Comprehensive Biostatistical Analysis of CpG Island Methylator Phenotype in Colorectal Cancer Using a Large Population-Based Sample. *PLoS ONE*, vol. 3, no. 11, pp. 1-12.
102. OCHOA-HERNÁNDEZ, A.B., JUÁREZ-VÁZQUEZ, C.I., ROSALES-REYNOSO, M.A. y BARROS-NÚÑEZ, P., 2012. La vía de señalización Wnt- β -catenina y su relación con cáncer. *Cirugía y Cirujanos*, vol. 80, no. 4, pp. 389-398.
103. OLD, L.J., 1981. Cancer Immunology: The Search for Specificity—G. H. A. Clowes Memorial Lecture. *Cancer Research*, vol. 41, no. 2, pp. 361-375.
104. Organización Mundial de la Salud (OMS), 2014. 10 datos sobre el cáncer. *WHO* [en línea]. [Consulta: 16 agosto 2016]. Disponible en: <http://www.who.int/features/factfiles/cancer/es/>.
105. Organización Mundial de la Salud (OMS). Cáncer. Nota descriptiva N° 297. *WHO* [en línea]. [Consulta: 16 agosto 2016]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>.

106. OSKARSSON, T., ACHARYYA, S., ZHANG, X.H.-F., VANHARANTA, S., TAVAZOIE, S.F., MORRIS, P.G., DOWNEY, R.J., MANOVA-TODOROVA, K., BROGI, E. y MASSAGUÉ, J., 2011. Breast cancer cells produce tenascin C as a metastatic niche component to colonize the lungs. *Nature medicine*, vol. 17, no. 7, pp. 867-874.
107. PALLARDO FERNÁNDEZ, I., 2015. Enfermedades Autoinmunes, tratamiento con *Trichuris suis* y otros helmintos. *Ars Pharmaceutica*, vol. 56, no. 2, pp. 65-75.
108. PÉREZ-RUIZ, E., ALCAIDE, J., PEREDA, T., BAUTISTA, D., RIVAS RUIZ, F., VILLATORO, R., REDONDO, M., PEREZ, D. y RUEDA, A., 2012. Involvement of K-RAS mutations and amino acid substitutions in the survival of metastatic colorectal cancer patients. *Journal of Clinical Oncology*, vol. 30, no. 15_suppl, pp. e14116-e14116.
109. PETRELLI, F., BORGONOVO, K., CABIDDU, M., GHILARDI, M. y BARNI, S., 2011. Cetuximab and panitumumab in KRAS wild-type colorectal cancer: a meta-analysis. *International Journal of Colorectal Disease*, vol. 26, no. 7, pp. 823-833.
110. PINZÓN, C.E., SERRANO, M.L. y SANABRIA, M.C., 2009. Papel de la vía fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K/Akt) en humanos. *Revista Ciencias de la Salud*. Vol 7 no. 2 pp. 47-66
111. POLAKIS, P., 2012. Wnt Signaling in Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, vol. 4, no. 5. pp 1-13.
112. POMBO, C.M., ZALVIDE, J., GAYLINN, B.D. y DIÉGUEZ, C., 2000. Growth Hormone-Releasing Hormone Stimulates Mitogen-Activated Protein Kinase. *Endocrinology*, vol. 141, no. 6, pp. 2113-2119.
113. POWELL, S.M., ZILZ, N., BEAZER-BARCLAY, Y., BRYAN, T.M., HAMILTON, S.R., THIBODEAU, S.N., VOGELSTEIN, B. y KINZLER, K.W., 1992. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature*, vol. 359, no. 6392, pp. 235-237.
114. REARDON, C., SANCHEZ, A., HOGABOAM, C.M. y MCKAY, D.M., 2001. Tapeworm Infection Reduces Epithelial Ion Transport Abnormalities in Murine Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis. *Infection and Immunity*, vol. 69, no. 7, pp. 4417-4423.
115. REDDY, A. y FRIED, B., 2007. The use of *Trichuris suis* and other helminth therapies to treat Crohn's disease. *Parasitology Research*, vol. 100, no. 5, pp. 921-927.
116. ROBERTS, P.J. y DER, C.J., 2007. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*, vol. 26, no. 22, pp. 3291-3310.
117. ROOK, G.A.W., 2009. Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: The broader implications of the hygiene hypothesis. *Immunology*, vol. 126, no. 1, pp. 3-11.

Norma Carraro Morales

118. RYCHAHOU, P.G., JACKSON, L.N., SILVA, S.R., RAJARAMAN, S. y EVERS, B.M., 2006. Targeted Molecular Therapy of the PI3K Pathway. *Annals of Surgery*, vol. 243, no. 6, pp. 833-844.
119. RYCHAHOU, P.G., KANG, J., GULHATI, P., DOAN, H.Q., CHEN, L.A., XIAO, S.-Y., CHUNG, D.H. y EVERS, B.M., 2008. Akt2 overexpression plays a critical role in the establishment of colorectal cancer metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, no. 51, pp. 20315-20320.
120. RYCHAHOU, P.G., MURILLO, C.A. y EVERS, B.M., 2005. Targeted RNA interference of PI3K pathway components sensitizes colon cancer cells to TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Surgery*, vol. 138, no. 2, pp. 391-397.
121. SAHIN, U., TÜRECI, O., SCHMITT, H., COCHLOVIUS, B., JOHANNES, T., SCHMITS, R., STENNER, F., LUO, G., SCHOBERT, I. y PFREUNDSCHUH, M., 1995. Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 92, no. 25, pp. 11810-11813.
122. SAIF, M.W. y CHU, E., 2010a. Biology of colorectal cancer. *Cancer Journal (Sudbury, Mass.)*, vol. 16, no. 3, pp. 196-201.
123. SAIF, M.W. y CHU, E., 2010b. Biology of colorectal cancer. En: PMID: 20526096, *Cancer Journal (Sudbury, Mass.)*, vol. 16, no. 3, pp. 196-201.
124. SAINI, K.S., LOI, S., AZAMBUJA, E. de, METZGER-FILHO, O., SAINI, M.L., IGNATIADIS, M., DANCEY, J.E. y PICCART-GEBHART, M.J., 2013. Targeting the PI3K/AKT/mTOR and Raf/MEK/ERK pathways in the treatment of breast cancer. *Cancer Treatment Reviews*, vol. 39, no. 8, pp. 935-946.
125. SANTARPIA, L., LIPPMAN, S.M. y EL-NAGGAR, A.K., 2012. Targeting the MAPK–RAS–RAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, vol. 16, no. 1, pp. 103-119.
126. SAUNDERS, K.A., RAINE, T., COOKE, A. y LAWRENCE, C.E., 2007. Inhibition of Autoimmune Type 1 Diabetes by Gastrointestinal Helminth Infection. *Infection and Immunity*, vol. 75, no. 1, pp. 397-407.
127. SCHINDLER, G., CAPPER, D., MEYER, J., JANZARIK, W., OMRAN, H., HEROLD-MENDE, C., SCHMIEDER, K., WESSELING, P., MAWRIN, C., HASSELBLATT, M., LOUIS, D.N., KORSHUNOV, A., PFISTER, S., HARTMANN, C., PAULUS, W., REIFENBERGER, G. y DEIMLING, A. von, 2011. Analysis of BRAF V600E mutation in 1,320 nervous system tumors reveals high mutation frequencies in pleomorphic xanthoastrocytoma, ganglioglioma and extra-cerebellar pilocytic astrocytoma. *Acta Neuropathologica*, vol. 121, no. 3, pp. 397-405.

128. SCHOPF, L., LUCCIOLI, S., BUNDOC, V., JUSTICE, P., CHAN, C.-C., WETZEL, B.J., NORRIS, H.H., URBAN, J.F. y KEANE-MYERS, A., 2005. Differential Modulation of Allergic Eye Disease by Chronic and Acute *Ascaris* Infection. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 46, no. 8, pp. 2772-2780.
129. SCHREIBER, R.D., OLD, L.J. y SMYTH, M.J., 2011. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science (New York, N.Y.)*, vol. 331, no. 6024, pp. 1565-1570.
130. SELUANOV, A., HINE, C., AZPURUA, J., FEIGENSON, M., BOZZELLA, M., MAO, Z., CATANIA, K.C. y GORBUNOVA, V., 2009. Hypersensitivity to contact inhibition provides a clue to cancer resistance of naked mole-rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 106, no. 46, pp. 19352-19357.
131. SERUGA, B., ZHANG, H., BERNSTEIN, L.J. y TANNOCK, I.F., 2008. Cytokines and their relationship to the symptoms and outcome of cancer. *Nature Reviews. Cancer*, vol. 8, no. 11, pp. 887-899.
132. SHEN, L., TOYOTA, M., KONDO, Y., LIN, E., ZHANG, L., GUO, Y., HERNANDEZ, N.S., CHEN, X., AHMED, S., KONISHI, K., HAMILTON, S.R. y ISSA, J.-P.J., 2007. Integrated genetic and epigenetic analysis identifies three different subclasses of colon cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, no. 47, pp. 18654-18659.
133. SHENG, H., SHAO, J., TOWNSEND, C.M. y EVERS, B.M., 2003. Phosphatidylinositol 3-kinase mediates proliferative signals in intestinal epithelial cells. *Gut*, vol. 52, no. 10, pp. 1472-1478.
134. SIEGEL, R.L., MILLER, K.D. y JEMAL, A., 2017. Cancer statistics, 2017. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, vol. 67, no. 1, pp. 7-30.
135. SJÖBLOM, T., JONES, S., WOOD, L.D., PARSONS, D.W., LIN, J., BARBER, T.D., MANDELKER, D., LEARY, R.J., PTAK, J., SILLIMAN, N., SZABO, S., BUCKHAULTS, P., FARRELL, C., MEEH, P., MARKOWITZ, S.D., WILLIS, J., DAWSON, D., WILLSON, J.K.V., GAZDAR, A.F., HARTIGAN, J., WU, L., LIU, C., PARMIGIANI, G., PARK, B.H., BACHMAN, K.E., PAPADOPOULOS, N., VOGELSTEIN, B., KINZLER, K.W. y VELCULESCU, V.E., 2006. The Consensus Coding Sequences of Human Breast and Colorectal Cancers. *Science*, vol. 314, no. 5797, pp. 268-274.
136. SPORN, M.B. y ROBERTS, A.B., 1985. Autocrine growth factors and cancer. *Nature*, vol. 313, no. 6005, pp. 745-747.
137. STEWART, B.W. y WILD, C.P. (eds.), 2014. World Cancer Report 2014. En: , *International Agency for Research on Cancer*. [en línea], [Consulta: 16 enero 2017].

Disponible en: https://med.unsw.edu.au/sites/default/files/_local_upload/others/World-Cancer-Report-2014-Press-Release.pdf.

138. STRACHAN, D.P., 1989. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ: British Medical Journal*, vol. 299, no. 6710, pp. 1259-1260.
139. SUIRE, S., HAWKINS, P. y STEPHENS, L., 2002. Activation of Phosphoinositide 3-Kinase γ by Ras. *Current Biology*, vol. 12, no. 13, pp. 1068-1075.
140. SUMMERS, R.W., ELLIOTT, D.E., QADIR, K., URBAN, J.F., THOMPSON, R. y WEINSTOCK, J.V., 2003. Trichuris suis seems to be safe and possibly effective in the treatment of inflammatory bowel disease. *The American Journal of Gastroenterology*, vol. 98, no. 9, pp. 2034-2041.
141. SUMMERS, R.W., ELLIOTT, D.E., URBAN, J.F., THOMPSON, R.A. y WEINSTOCK, J.V., 2005. Trichuris suis therapy for active ulcerative colitis: A randomized controlled trial. *Gastroenterology*, vol. 128, no. 4, pp. 825-832.
142. TAKAHASHI-YANAGA, F. y SASAGURI, T., 2007. The Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway as a Target in Drug Discovery. *Journal of Pharmacological Sciences*, vol. 104, no. 4, pp. 293-302.
143. TANAKA, T., KOHNO, H., SUZUKI, R., YAMADA, Y., SUGIE, S. y MORI, H., 2003. A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Science*, vol. 94, no. 11, pp. 965-973.
144. TENG, M.W.L., VESELY, M.D., DURET, H., MCLAUGHLIN, N., TOWNE, J.E., SCHREIBER, R.D. y SMYTH, M.J., 2012. Opposing Roles for IL-23 and IL-12 in Maintaining Occult Cancer in an Equilibrium State. *Cancer Research*, vol. 72, no. 16, pp. 3987-3996.
145. TORRE, L.A., BRAY, F., SIEGEL, R.L., FERLAY, J., LORTET-TIEULENT, J. y JEMAL, A., 2015. Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, vol. 65, no. 2, pp. 87-108.
146. TROPPEMAIR, J., BRUDER, J.T., MUNOZ, H., LLOYD, P.A., KYRIAKIS, J., BANERJEE, P., AVRUCH, J. y RAPP, U.R., 1994. Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated protein kinase activation by oncogenes, serum, and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate requires RAF and is necessary for transformation. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, no. 9, pp. 7030-7035.
147. VALDESPINO CASTILLO, V.E., BOLOGNA MOLINA, R., LÓPEZ LÓPEZ, M., ALEJANDRE CRUZ, J.E., ORTIZ MUÑIZ, A.R., MANTILLA MORALES, A., MATSUMURA, P.D., GONZÁLEZ NÚÑEZ, L. y VALDESPINO GÓMEZ, V.M., 2014. *Biología celular- molecular del cáncer*. México, D.F: UAM, Unidad Xochimilco.

148. VESELY, M.D., KERSHAW, M.H., SCHREIBER, R.D. y SMYTH, M.J., 2011. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annual Review of Immunology*, vol. 29, pp. 235-271.
149. WANG, X., WANG, Q., HU, W. y EVERS, B.M., 2004. Regulation of phorbol ester-mediated TRAF1 induction in human colon cancer cells through a PKC/RAF/ERK/NF- κ B-dependent pathway. *Oncogene*, vol. 23, no. 10, pp. 1885-1895.
150. WASEEM, T., DUXBURY, M., ASHLEY, S.W. y ROBINSON, M.K., 2014. Ghrelin promotes intestinal epithelial cell proliferation through PI3K/AKT pathway and EGFR trans-activation both converging to ERK 1/2 phosphorylation. *Peptides*, vol. 52, pp. 113-121.
151. WILCZYNSKI, J.R. y NOWAK, M., 2014. Cancer Immunoediting: Elimination, Equilibrium, and Immune Escape in Solid Tumors. En: M. KLINK (ed.), *Interaction of Immune and Cancer Cells*. S.l.: Springer Vienna, pp. 143-205.
152. WILLERT, K. y JONES, K.A., 2006. Wnt signaling: is the party in the nucleus? *Genes & Development*, vol. 20, no. 11, pp. 1394-1404.
153. WINDER, T., MÜNDLEIN, A., RHOMBERG, S., DIRSCHMID, K., HARTMANN, B.L., KNAUER, M., DREXEL, H., WENZL, E., DE VRIES, A. y LANG, A., 2009. Different types of K-Ras mutations are conversely associated with overall survival in patients with colorectal cancer. *Oncology Reports*, vol. 21, no. 5, pp. 1283-1287.
154. WINN, R.A., SCOYK, M.V., HAMMOND, M., RODRIGUEZ, K., CROSSNO, J.T., HEASLEY, L.E. y NEMENOFF, R.A., 2006. Antitumorigenic Effect of Wnt 7a and Fzd 9 in Non-small Cell Lung Cancer Cells Is Mediated through ERK-5-dependent Activation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ . *Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no. 37, pp. 26943-26950.
155. WONG, C.C.-L., GILKES, D.M., ZHANG, H., CHEN, J., WEI, H., CHATURVEDI, P., FRALEY, S.I., WONG, C.-M., KHOO, U.-S., NG, I.O.-L., WIRTZ, D. y SEMENZA, G.L., 2011. Hypoxia-inducible factor 1 is a master regulator of breast cancer metastatic niche formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 108, no. 39, pp. 16369-16374.
156. WOOD, L.D., PARSONS, D.W., JONES, S., LIN, J., SJÖBLOM, T., LEARY, R.J., SHEN, D., BOCA, S.M., BARBER, T., PTAK, J., SILLIMAN, N., SZABO, S., DEZSO, Z., USTYANKSKY, V., NIKOLSKAYA, T., NIKOLSKY, Y., KARCHIN, R., WILSON, P.A., KAMINKER, J.S., ZHANG, Z., CROSHAW, R., WILLIS, J., DAWSON, D., SHIPITSIN, M., WILLSON, J.K.V., SUKUMAR, S., POLYAK, K., PARK, B.H., PETHIYAGODA, C.L., PANT, P.V.K., BALLINGER, D.G., SPARKS, A.B., HARTIGAN, J., SMITH, D.R., SUH, E., PAPADOPOULOS, N., BUCKHAULTS, P., MARKOWITZ, S.D., PARMIGIANI, G., KINZLER, K.W.,

- VELCULESCU, V.E. y VOGELSTEIN, B., 2007. The Genomic Landscapes of Human Breast and Colorectal Cancers. *Science*, vol. 318, no. 5853, pp. 1108-1113.
157. YIN, Y. y SHEN, W.H., 2008. PTEN: a new guardian of the genome. *Oncogene*, vol. 27, no. 41, pp. 5443-5453.
158. YIP, K.W. y REED, J.C., 2008. Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene*, vol. 27, no. 50, pp. 6398-6406.
159. ZACCONE, P., FEHERVARI, Z., PHILLIPS, J.M., DUNNE, D.W. y COOKE, A., 2006. Parasitic worms and inflammatory diseases. *Parasite Immunology*, vol. 28, no. 10, pp. 515-523.
160. ZHU, W., COWIE, A., WASFY, G.W., PENN, L.Z., LEBER, B. y ANDREWS, D.W., 1996. Bcl-2 mutants with restricted subcellular location reveal spatially distinct pathways for apoptosis in different cell types. *The EMBO Journal*, vol. 15, no. 16, pp. 4130-4141.
161. ZONCU, R., SABATINI, D.M. y EFEYAN, A., 2011. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, vol. 12, no. 1, pp. 21-35.