



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
CARRERA DE QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA

**ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS PARA EL
AISLAMIENTO, DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE
CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES EN CÁNCER DE
COLON**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:
REYNA TERESA OREGON JIMÉNEZ

JURADO DE EXAMEN:

DIRECTOR: DR. EDUARDO MANUEL VADILLO ROSADO

ASESORA: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ

ASESOR: M EN C. OMAR FERNÁNDEZ RIVERA

SINODAL: DRA. RAQUEL RETANA UGALDE

SINODAL: DRA. MARÍA ISABEL GARDUÑO POZADAS



CIUDAD DE MÉXICO, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más profundo agradecimiento a mis padres y mi hermano, Marisol Jiménez de la Luz, Alejandro Oregon Ramírez y Alexis Miguel Oregon Jiménez, que, sin su amor, sacrificio y apoyo inquebrantables, no estaría donde estoy hoy. Gracias por ser mi fuente de inspiración.

A mis amigos Tania González Flores y Esteban Santaella Cruz, que han sido una fuente constante de ánimo, apoyo y un testimonio del poder de la amistad para alcanzar nuestros sueños.

A mi cariñoso y comprensivo novio, Facundo Nicolas Zarain, que me ha proporcionado amor, ánimo, paciencia y un apoyo inquebrantable a lo largo de este proceso.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme la oportunidad de cursar mis estudios de licenciatura y por los recursos y conocimientos que me ha impartido durante todo este tiempo.

A la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas (UIMEO) en el Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional SXXI, por haberme brindado el acceso a sus instalaciones de investigación y las oportunidades de colaborar con otros académicos que se ha vuelto parte de mi vida profesional.

A mi equipo de investigación; Dr. Eduardo Manuel Vadillo Rosado, TLC. María del Carmen Fuentes Castañeda y Juan Tlanezmitl Badillo Juárez, quienes con orientación y experiencia me ha desafiado constantemente a pensar de forma crítica, a plantearme preguntas difíciles y a esforzarme más allá de mis límites.

A mis asesores y sinodales de tesis; Dr. Eduardo Manuel Vadillo Rosado, Dra. María Isabel Soto Cruz, M en C. Omar Fernández Rivera, Dra. Retana Ugalde Raquel y Dra. Garduño Pozadas María Isabel, por las horas que han dedicado a mi proyecto, ofreciéndome valiosas ideas y sugerencias que han mejorado enormemente la calidad de mi trabajo. Gracias a todos por sus contribuciones a esta tesis y por su apoyo incondicional a lo largo de mi carrera académica.

ÍNDICE

I	RESUMEN.....	8
II	INTRODUCCIÓN.....	9
III	MARCO TEÓRICO.....	11
3.1	Epidemiología	11
3.2	Carcinogénesis	12
3.2.1	Vía de inestabilidad cromosómica	13
3.3	Metástasis.....	16
3.3.1	Invasión local.....	17
3.3.2	Intravasación	19
3.3.3	Diseminación.....	19
3.3.4	Sobrevivencia en circulación	21
3.3.5	Extravasación	24
3.3.6	Colonización y metástasis	25
3.4	Metástasis en CCR	26
3.4.1	Metástasis en ganglios linfáticos	27
3.4.2	Metástasis en hígado	27
3.4.3	Metástasis en pulmón.....	28
3.5	Biomarcadores tumorales en CCR.....	29
3.5.1	Marcadores en heces	29
3.5.2	Marcadores serológicos	30
3.6	Células tumorales circulantes	31
3.6.1	Utilidad clínica en el CCR.....	31
3.6.2	Marcadores celulares de las CTC	35
3.6.3	Aislamiento, detección y caracterización de CTC	39
3.6.4	Expectativas	42
IV	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	43
V	PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	43
VI	HIPÓTESIS	43
VII	OBJETIVOS	44
7.1	Objetivo general.....	44

7.2	Objetivos específicos	44
VIII	MATERIAL Y MÉTODOS	44
8.1	Diseño de estudio	44
8.2	Universo.....	44
8.3	Variables	45
8.4	Técnicas o instrumentos	45
8.5	Procedimiento	46
8.5.1	Fenotipificación de líneas celulares SW 620 y HCT 116	46
8.5.2	Detección de células HCT 116 en sangre periférica.....	48
8.5.3	Cuantificación de células HCT 116 en sangre periférica	50
8.5.4	Aislamiento de CTC de cáncer de colon en sangre periférica	53
8.6	Análisis estadísticos.....	55
IX	RESULTADOS	56
9.1	Fenotipificación de líneas celulares SW 620 y HCT 116.....	56
9.2	Detección de células HCT 116 en sangre periférica	58
9.3	Cuantificación de células HCT 116 en sangre periférica.....	60
9.4	Aislamiento de CTC de cáncer de colon en sangre periférica	63
X	DISCUSIÓN.....	66
XI	CONCLUSIONES.....	72
XII	PERSPECTIVAS	73
XIII	REFERENCIAS	74
XIV	ANEXOS.....	90
14.1	ANEXO 1. Constancia de participación en el XXV Congreso Nacional de Inmunología, Querétaro, 2023	90
14.2	ANEXO 2. Resumen del trabajo presentado en el XXV Congreso Nacional de Inmunología, Querétaro, 2023	91
14.3	ANEXO 3. Constancia de participación en el 6° Foro Estudiantil Universitario: Buenas prácticas del Servicio Social, Voluntariado Universitario y Prácticas Profesionales.....	92
14.4	ANEXO 4. Artículo de divulgación publicado en la revista “El Infocito” de la Sociedad Mexicana de Inmunología A.C (SMI)	93
14.5	ANEXO 5. Premio al Servicio Social “Dr. Gustavo Baz Prada”, 2023 por la participación en un programa de impacto social en la carrera de QFB.....	94

ABREVIATURAS

	<i>Significado en inglés</i>	<i>Significado en español</i>
ACE	Carcinoembryonic antigen	Antígeno carcinoembrionario
ADN	Deoxyribonucleic acid	Ácido desoxirribonucleico
AMF	Autocrine motility factor	Factor de motilidad autócrina
APC	Adenomatous polyposis coli	Poliposis coli adenomatosa
ASCO	The American Society of Clinical Oncology	Sociedad Estadounidense de Oncología Clínica
ATP	Adenosine triphosphate	Adenosín trifosfato
CA	Carbohydrate antigen	Antígeno carbohidrato
CCR	Colorectal cancer	Cáncer colorrectal
CD	Cluster of Differentiation	Cluster de diferenciación
CIMP	CpG island methylator phenotype	Fenotipo metilador de islas CpG
CIN	Chromosome instability	Inestabilidad cromosómica
CK	Cytokeratin	Citoqueratina
CTC	Circulating tumor cells	Células tumorales circulantes
DDC	Deleted in colorectal cancer	Eliminado en cáncer colorrectal
DTC	Disseminated tumor cells	Células tumores diseminadas
EGF	Epidermal growth factor	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Epidermal growth factor receptor	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EGTM	European Group on Tumour Markers	Grupo Europeo sobre Marcadores Tumorales
EMT	Epithelial-mesenchymal transition	Transición epitelial- mesenquimatosa
EpCAM	Epithelial cell adhesion molecule	Molécula de adhesión celular epitelial

ERK	Extracellular signal-regulated kinases	Quinasas reguladas por señales extracelulares
FDA	Food and Drug Administration	Administración Federal de Drogas y Alimentos
FGF	Fibroblast growth factor	Factor de crecimiento fibroblástico
FISH	Fluorescent in situ hybridization	Hibridación fluorescente in situ
FSC	Forward scatter	Dispersión frontal
FT	Tissue factor	Factor tisular
GAP	GTPase-activating protein	Proteínas activadoras de GTPasas
GDP	Guanosine diphosphate	Guanosín difosfato
GTP	Guanosine triphosphate	Guanosín trifosfato
ICAM	Intercellular adhesion molecule	Molécula de adhesión intercelular
IF	Immunofluorescence	Inmunofluorescencia
IHC	Immunohistochemistry	Inmunohistoquímica
IL	Interleukin	Interleucina
IMF	Mean fluorescence intensity	Intensidad media de fluorescencia
ISET	Isolation by size of tumor cells	Aislamiento por tamaño de células tumorales
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene	Oncogén viral del sarcoma de rata de Kirsten
LOH	Loss of heterozygosity	Pérdida de heterocigocidad
MEK	Mitogen-activated protein kinase	Proteína quinasa activada por mitógenos
MEC	Extracellular matrix	Matriz extracelular
MET	Mesenchymal-epithelial transition	Transición mesenquimatoso-epitelial
MHC	Major histocompatibility complex	Complejo principal de histocompatibilidad

MMP	Matrix metalloproteinases	Metaloproteinasas de matriz
MSI	Microsatellite instability	Inestabilidad de microsatélites
NACB	National Academy of Clinical Biochemistry	Academia Nacional de Bioquímica Clínica
NCCN	National Comprehensive Cancer Network	Red Nacional Integral del Cáncer
NET	Neutrophil extracellular traps	Trampas extracelulares de neutrófilos
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NK	Natural killer	Asesina natural
PDGF	Platelet derived growth factor	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
RT-qPCR	Quantitative reverse transcription PCR	PCR de transcripción inversa cuantitativa
SFB	Fetal Bovine Serum	Suero fetal bovino
SG	Overall survival	Supervivencia general
SLP	Progression free survival	Supervivencia libre de progresión
SNG	Next Generation Sequencing	Secuenciación de próxima generación
SSC	Side scatter	Dispersión lateral
TEM	Transendothelial migration	Migración transendotelial
TGF-β	Transforming growth factor beta	Factor de crecimiento transformante beta
TLR	Toll receptor	Receptor tipo toll
TNF	Tumor necrosis factor	Factor de necrosis tumoral
UIMEO	Medical Research Unit in Oncologic Diseases	Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas
VCAM	Vascular cell adhesion protein	Proteína de adhesión celular vascular

I RESUMEN

En el cáncer colorrectal (CCR), casi el 90% de la mortalidad se asocia actualmente a metástasis. Desde una perspectiva clínica, es muy importante desarrollar y establecer técnicas que ayuden a predecir el pronóstico de los pacientes con CCR y otras neoplasias. La cuantificación de células tumorales circulantes (CTC) es una prueba que ayuda en la detección temprana y evaluación de la respuesta al tratamiento en CCR. En este proyecto se estandarizaron los métodos de cuantificación y purificación de CTC para su aplicación en CCR. La cuantificación de células de CCR en sangre periférica se llevó a cabo mediante citometría de flujo espectral. La purificación de las CTC se realizó utilizando el método de filtración presurizada de sangre periférica. El establecimiento de los métodos mostró que la citometría de flujo espectral era eficiente y sensible para detectar CTC en números semejantes a 10 células por mL de sangre periférica; la técnica de filtración no es lo suficientemente sensible para la cuantificación de CTC, pero sí efectiva para su aislamiento y cultivo.

II INTRODUCCIÓN

El CCR es el tercer tipo de cáncer con mayor incidencia y el segundo causante de mortalidad a nivel global. Cabe destacar que el CCR cada vez se presenta a más temprana edad, con un aumento anual estimado del 2% en la incidencia en pacientes menores de 50 años (1).

A pesar de los avances significativos en los métodos diagnósticos, la clínica y la investigación básica, casi el 90% de la mortalidad relacionada con el cáncer se asocia actualmente con metástasis. Esta última puede entenderse como una cascada de eventos que comienza con la invasión local de un tumor a tejidos circundantes (2). Las células tumorales que escapan del tumor primario y se diseminan a través del torrente sanguíneo o la circulación linfática se denominan CTC (3).

Desde un punto de vista clínico, varios aspectos de la metástasis siguen sin resolverse. Uno de ellos es el desarrollo de mejores instrumentos y pruebas clínicas para la detección temprana de lesiones que no pueden ser diagnosticadas por métodos tradicionales. En este sentido, el desarrollo de biomarcadores predictivos en cáncer, es un área de intensa investigación. En CCR, se han propuesto algunos biomarcadores para evaluar el pronóstico de los pacientes antes y después del tratamiento, sin embargo, aún existe poca información sobre la evaluación de la respuesta al tratamiento en el CCR (4). Es bien sabido que algunas pruebas como la sangre oculta en heces o el antígeno carcinoembrionario (ACE), se asocian con altas tasas de falsos positivos y baja sensibilidad, respectivamente. Por lo tanto, existe una necesidad clínica de contar con más herramientas para complementar estas pruebas con el objetivo de reducir la mortalidad de los pacientes (5).

La detección de CTC, es un método no invasivo que implica al momento de la toma de muestra de análisis de laboratorio, la adquisición de sangre periférica anticoagulada. Las CTC en CCR pueden detectarse mediante anticuerpos monoclonales contra *clusters* de diferenciación (CD) como CD29 o CD133 (6) y

su detección, en comparación con los niveles del antígeno carcinoembrionario puede predecir la respuesta al tratamiento en esta patología (7).

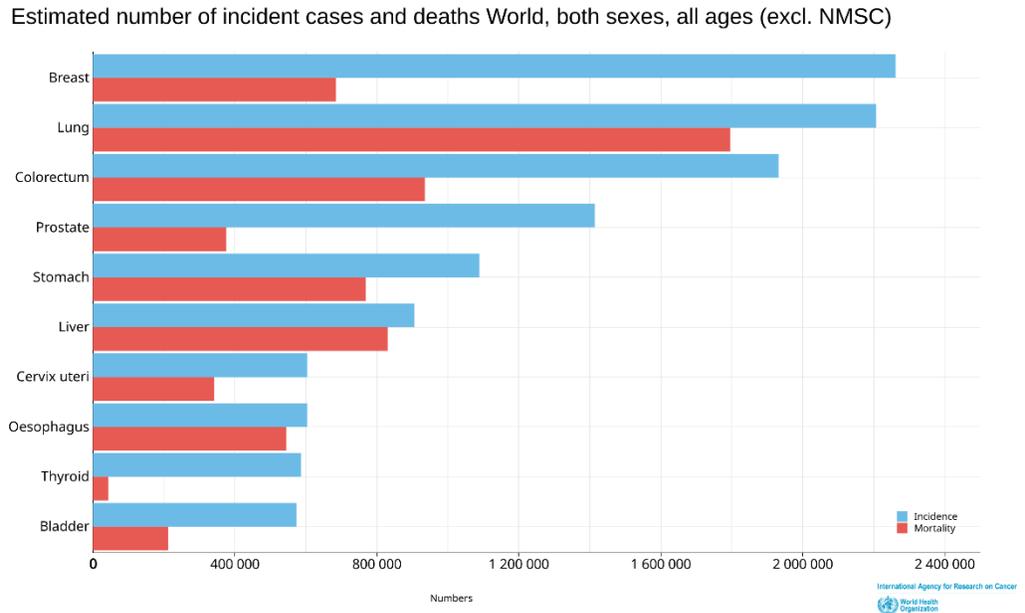
El objetivo de este proyecto, es obtener un método estandarizado de aislamiento, detección y cuantificación que permita utilizar las CTC en cáncer de colon para investigaciones futuras como medida de evaluación de la respuesta al tratamiento y predicción de la recurrencia en el cáncer de colon. Para ello, se realizará la estandarización del aislamiento de líneas celulares de cáncer de colon por filtración y la estandarización de la detección y cuantificación de líneas celulares de cáncer de colon por citometría de flujo espectral.

III MARCO TEÓRICO

3.1 Epidemiología

El cáncer es la principal causa de muerte en el mundo. A nivel mundial, en el 2020 el CCR se posicionó como el tercer tipo de cáncer con mayor incidencia (1 931 590 casos) y como el segundo causante de mortalidad (935 173 muertes) en ambos sexos (**Figura 1a**). En México, esta enfermedad ocupa el tercer lugar en incidencia (14 901 casos) y el segundo en mortalidad (7 755 muertes) en ambos sexos, por lo que es un grave problema de salud pública en el mundo y el país (**Figura 1b**) (8). Anteriormente, el CCR era considerado como una enfermedad en la que solo el 3% de los casos eran pacientes menores de 50 años, no obstante, en este grupo la incidencia aumentó anualmente un 2% (9).

(a)



(b)

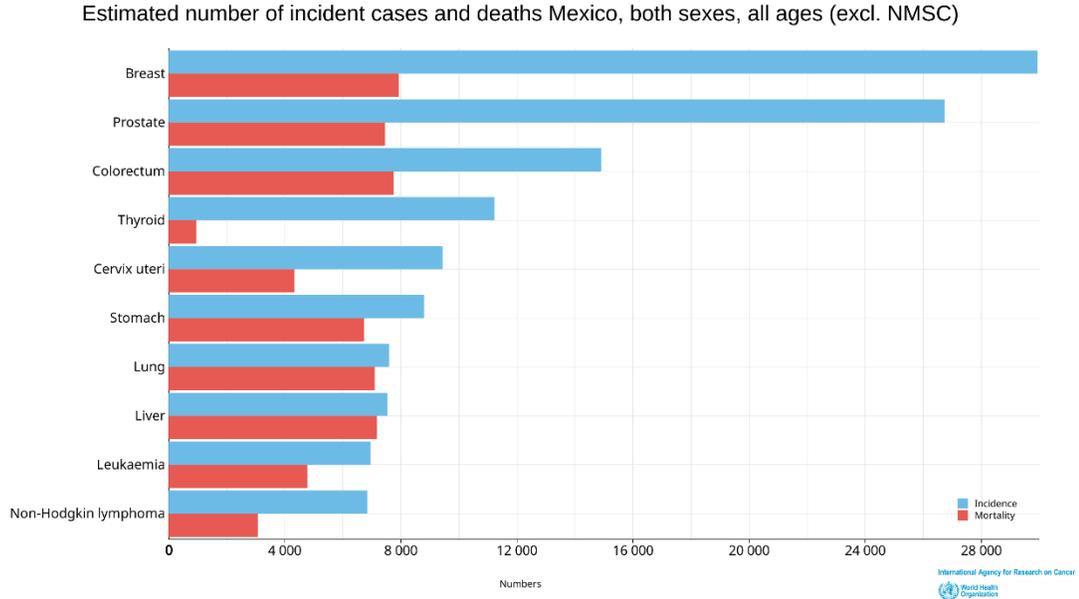


Figura 1. (a) Estimación del número de casos incidentes y muertes por diferentes tipos de cáncer en el año 2020 en el mundo para ambos sexos sin incluir cáncer de piel. (b) Estimación del número de casos incidentes y muertes por diferentes tipos de cáncer en el año 2020 en México para ambos sexos sin incluir cáncer de piel.

3.2 Carcinogénesis

El CCR evoluciona gracias a una acumulación de mutaciones genéticas y epigenéticas progresivas que son capaces de modificar las rutas de señalización que están implicadas en el metabolismo, diferenciación, proliferación, supervivencia y apoptosis celular, de manera que se produce una transformación de la membrana mucosa normal del colon a un cáncer invasivo (10,11). En el CCR las células son transformadas principalmente por mutaciones acumuladas en genes supresores tumorales, oncogenes y genes reparadores del ácido desoxirribonucleico (ADN) (12). Los genes supresores tumorales, son aquellos que tienen como función el suprimir y regular el crecimiento de la célula, de manera que se tienen que mutar o perder ambas copias del gen para inactivarlo,

lo que induce que se pierda o disminuya la regulación del crecimiento (12). Los oncogenes son un grupo de genes que estimulan el crecimiento celular, sin embargo, a diferencia del gen supresor, solo tiene que mutar una sola copia de oncogén para que la estimulación del crecimiento esté continuamente activada (12). Los genes reparadores del ADN tienen como función el arreglar las partes dañadas del ADN, pero cuando estos genes son afectados funcionan de manera inadecuada y producen daños en el material genético que conducen a la progresión del cáncer (12).

Las vías de carcinogénesis se consideran como la secuencia de dichas alteraciones moleculares que conllevan a la evolución del tumor. Hasta el día de hoy, se reconocen tres vías moleculares: (13).

- Vía de inestabilidad cromosómica (CIN).
- Vía de inestabilidad de microsatélites (MSI).
- Vía del fenotipo metilador de islas CpG (CIMP).

3.2.1 Vía de inestabilidad cromosómica

En 1988, Volgestein describió lo que hoy conocemos como la primera vía de carcinogénesis, que corresponde a la vía supresora o vía de inestabilidad cromosómica (**Figura 2**) (14). Esta vía es la más común y representa el 65-70% de los CCR esporádicos, es decir, CCR en aquellos pacientes que no tienen historia familiar de cáncer. Se caracteriza principalmente por la ganancia o pérdida de cromosomas enteros o de regiones cromosómicas que albergan los genes responsables del CCR, como consecuencia, se genera un desequilibrio en el número de cromosomas (aneuploidía) y una pérdida de heterocigocidad (LOH), aunado a mutaciones en genes supresores de tumores y protooncogenes (13).

En el 80% de los casos, el desarrollo del CCR por la vía CIN comienza con mutaciones en el gen *adenomatous polyposis coli* (APC), un gen descrito como el “guardián” de la proliferación celular en el colon al ser importante en la vía de

señalización Wnt/ β -catenina (13,14). La proteína APC se une a la β -catenina e induce su degradación. Cuando el gen se inactiva, produce una proteína defectuosa que impide la degradación de la β -catenina. La β -catenina se acumula en citoplasma y se transloca al núcleo donde activa la transcripción de otros genes involucrados en la proliferación celular, y, por tanto, la formación de un adenoma temprano en el epitelio intestinal (15).

Posteriormente, comienzan a mutar otros genes, entre ellos el gen *K-ras*. Este es un protooncogén que se encuentra mutado en el 60% de los CCR, encargado de codificar la proteína K-Ras. Esta proteína tiene actividad GTP-asa, lo que les permite funcionar como interruptor en la transducción de señales (15). Las proteínas Ras participan en la señalización de la vía RAF/MEK/ERK, una ruta que se sitúa corriente abajo del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (14,15). Esta vía de señalización se activa cuando el factor de crecimiento epidérmico (EGF) se une a su receptor, y desencadena la activación de la proteína Ras al intercambiar el GDP por GTP. La proteína Ras-GTP se une a Raf y de este modo, queda activa. La unión de Ras a Raf forma un complejo que fosforila a MEK y se activa para fosforilar a ERK. La proteína ERK activada puede translocarse al núcleo para regular la transcripción de genes que están asociados al crecimiento, proliferación y supervivencia de la célula. (11,16,17).

La proteína Ras se inactiva por proteínas activadoras de GTPasas (GAP), las cuales estimulan la actividad de GTPasa de Ras para que la proteína Ras regrese a su forma inactiva unida al GDP (Ras-GDP). Cuando el gen muta, la proteína Ras cambia su conformación y vuelve inaccesible al dominio G que se une GAP, por lo que se vuelve insensible a la inactivación y de este modo, la proteína Ras se vuelve una proteína que permanece en estado activo de manera constitutiva (17). Estas mutaciones permiten que se estimule la vía de señalización RAF/MEK/ERK independiente de la regulación del EGFR, haciendo así que el adenoma temprano evolucione a un adenoma intermedio (13,15).

El gen *deleted in colorectal cancer (DCC)*, es un gen supresor de tumores que se encuentra mutado en el 70% de los CCR. Es un gen que codifica a un receptor

celular de netrina 1. La netrina 1 tiene función de guía en axones y células que migran, por lo que sirve de quimioatrayente o de quimiorepulsión (18). Estudios han revelado que el gen *DCC* está relacionado con la regulación del desarrollo axonal, aunque se ha descubierto que los altos niveles del receptor DCC induce la apoptosis (19). Aún se desconoce la vía exacta por la cual sucede la apoptosis, pero se ha propuesto que cuando el receptor no se une a netrina 1, DDC interactúa con la caspasa 9 para inducir la activación de la caspasa 3 e iniciar la apoptosis sin la formación de un apoptosoma (20,21). Por el contrario, cuando DCC se activa con netrina 1, se activa la vía MAPK1/3, la cual promueve el desarrollo tumoral, y una evolución de adenoma intermedio a adenoma tardío (15,17,20).

Un gen muy importante en la evolución el CCR, es el gen *TP53*. Este gen es un supresor de tumores que codifica la proteína p53, la cual es un factor de transcripción que, en condiciones normales, cuando existe daño en el ADN induce que el ciclo celular se detenga para permitir la reparación del mismo. Si el proceso de reparación no es llevado a cabo, la proteína p53 conduce a la apoptosis celular (12). Cuando *TP53* muta no se puede reparar el ADN y, por tanto, las mutaciones a través del genoma persisten y se acumulan haciendo que se pueda mediar la transición de adenoma tardío a carcinoma, por lo tanto, la mutación del gen supresor tumoral *TP53*, es un acontecimiento tardío en el proceso de tumorigénesis colorrectal (13).

En un carcinoma invasivo las células tumorales tienden a propagarse desde la superficie interna del colon hacia otros tejidos locales como la submucosa, el musculo y el tejido adiposo. Cuando las células tumorales llegan a la superficie exterior del colon, pueden propagarse a otros tejidos u órganos distantes (10).

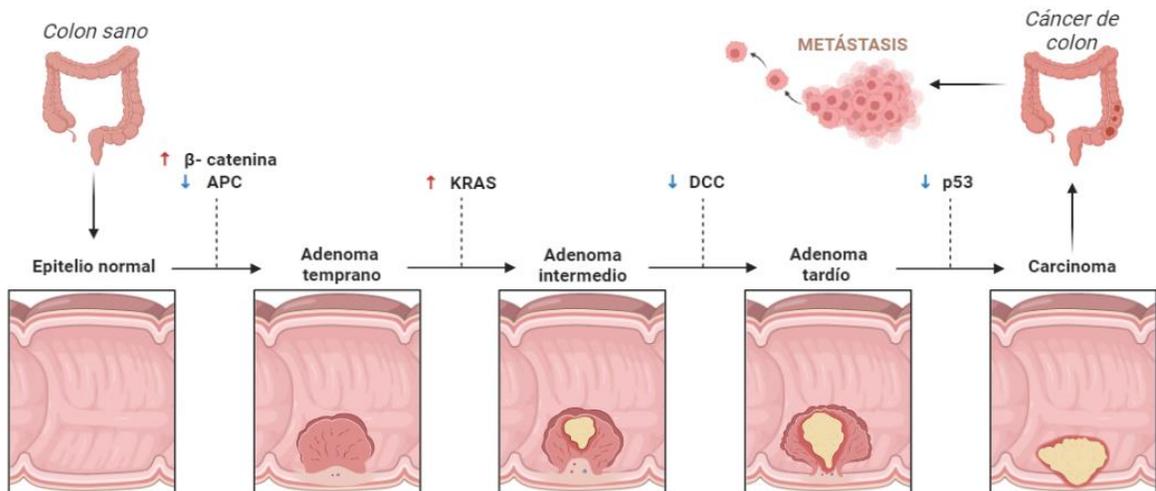


Figura 2. Vía de inestabilidad cromosómica propuesta por Volgestein, donde explica la evolución del CCR. La disminución de la proteína APC con el aumento de β-catenina lleva a un adenoma temprano. El aumento en la activación constitutiva de la proteína Kras lleva a un adenoma intermedio. La disminución del gen DDC lleva a un adenoma tardío. La disminución de la proteína p53 lleva a un carcinoma invasivo que puede causar metástasis.

3.3 Metástasis

Cuando hay desarrollo de un tumor secundario en una parte del cuerpo alejada del tumor primario se denomina “metástasis” (22). La metástasis representa aproximadamente el 90% de las muertes. A pesar de que diariamente en los pacientes con cáncer se liberan células tumorales en la sangre, solo el <0.1% de estas son capaces de generar una metástasis, ya que requieren adquirir características que le permitan hacerlo y ser capaces de pasar a través de los diferentes estadios, tal como la invasión local, intravasación, diseminación, supervivencia en circulación, extravasación y finalmente colonización y metástasis (**Figura 3**) (22,23).

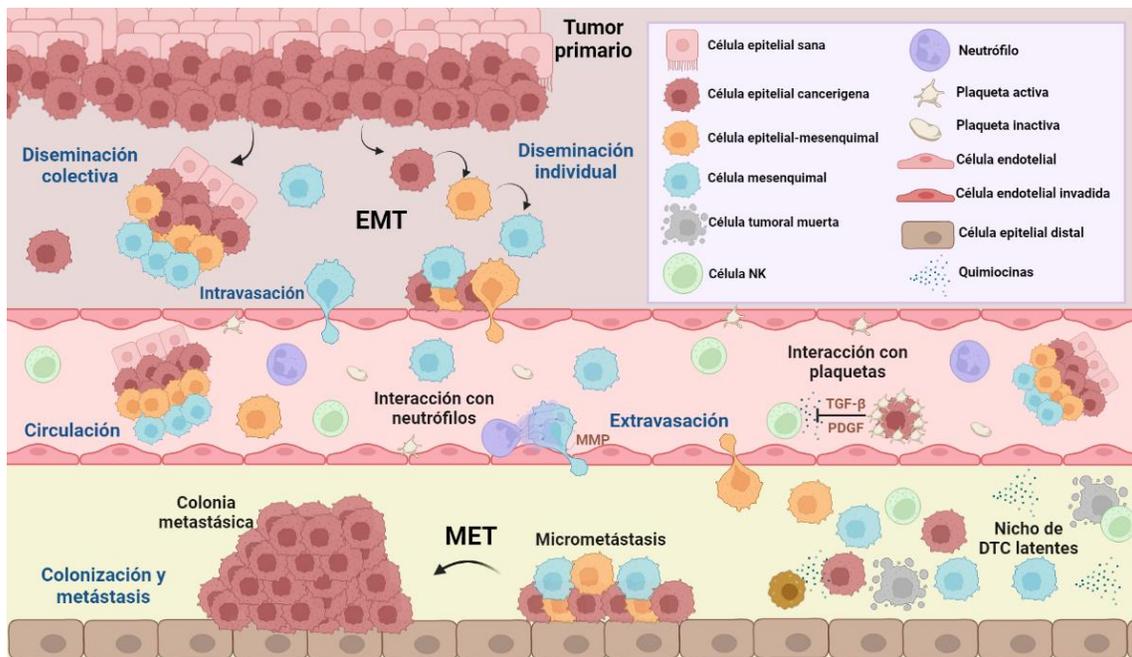


Figura 3. Cascada metastásica: Diseminación colectiva e individual, intravasación, circulación, extravasación y colonización, incluyendo la transición epitelio-mesenquimal (EMT) e interacciones en circulación con neutrófilos y plaquetas.

3.3.1 Invasión local

La invasión local se define como la capacidad de las células tumorales del sitio primario para entrar en los tejidos locales y atravesar las barreras tisulares como el tejido epitelial, basal y conectivo (24,25). A este proceso se le conoce también como invasión primaria, pues se considera la etapa inicial del proceso metastásico donde las células tumorales migran desde su lugar de origen a través de la matriz extracelular (MEC) hasta alcanzar los vasos sanguíneos e intravasarse (22,26).

Para que las células tumorales puedan iniciar el proceso de invasión, deben penetrar primero la membrana basal y posteriormente invadir el estroma

intersticial. La membrana basal está constituida por colágeno, laminina, entactina, proteoglicano BM1 y fibronectina. El estroma intersticial está constituido por colágeno, elastina, fibronectina, proteoglicanos y glicoproteínas (26). La interacción de las células tumorales con la membrana basal se caracteriza principalmente por la capacidad de adherirse, realizar proteólisis de la MEC y migrar hacia la matriz modificada (24).

La capacidad de las células tumorales para adherirse a la membrana basal consiste en su unión a la fibronectina, el colágeno y la laminina, a través de receptores de tipo integrina y no integrina. La E-cadherina es una molécula de adhesión celular que se ha considerado importante en cuanto a la adhesión de la célula tumoral con la MEC (25,26).

Cuando la célula tumoral ha logrado adherirse a la MEC, estas buscaran abrirse paso a través de ella mediante un proceso llamado proteólisis. En este proceso intervienen enzimas proteolíticas como activadores del plasminógeno, colagenasas, proteoglicanasas (glucosidasas y proteinasas) y catepsinas, las cuales pueden ser liberadas al medio o estar en la superficie de las células tumorales. En los tumores la cantidad de enzimas proteolíticas supera la acción de los sus inhibidores, por lo que la matriz tiende a disminuir la organización molecular y la resistencia del tejido, lo que ayuda a la célula tumoral a invadir y mezclarse en la MEC (24,27).

Una vez que las células tumorales han logrado invadir y modificar la MEC, pierden la capacidad de adhesión intercelular gracias a la disociación enzimática de las uniones intercelulares. Esta disociación favorece a la célula para liberarse y migrar a través de la MEC respondiendo a estímulos quimiotácticos, como el hialuronato y citocinas provenientes de las células tumorales como el factor de motilidad autocrina (AMF) (25,28). Las células tumorales que ahora pueden migrar libremente, pueden intravasarse para diseminarse hacia el flujo sanguíneo (26).

3.3.2 Intravasación

La intravasación se define como el movimiento migratorio de la célula tumoral a través de la pared del vaso sanguíneo (2). Existen actualmente mecanismos propuestos por los cuales las células tumorales pueden intravasarse. El proceso de intravasación se puede llevar a cabo de manera activa empujando su camino a través de las células endoteliales efectuando movimientos ameboides (2,29), o mediante la liberación de metaloproteinasas de matriz (MMP) como la colagenasa tipo IV, que degrada el colágeno presente en los vasos sanguíneos y facilita la entrada a circulación (30,31). De igual modo, las células tumorales pueden aprovechar la capacidad de los capilares para contraer las células endoteliales (mediada por la histamina y la trombina), lo que hace que se liberen periódicamente las células a circulación de forma pasiva (31). Sin embargo, comúnmente esta etapa se considera semejante al de la extravasación, donde tanto integrinas como lecitinas toman un papel importante en la adhesión entre las células endoteliales y las tumorales (32). Se ha comprobado que una sobreexpresión de la alfa-6 beta-1 integrina (receptor de la laminina) en células tumorales tienen una gran capacidad metastásica (32,33).

Una vez que las células tumorales han logrado migrar del tumor primario hacia la circulación, estas se diseminan a órganos distantes para establecer un tumor secundario.

3.3.3 Diseminación

La diseminación se define como la etapa donde las células tumorales se han desprendido del tumor primario y viajan por circulación sanguínea hacia un nuevo órgano. Dicha diseminación puede darse de manera colectiva a través de células tumorales que avanzan en grupo (*clusters*) o de manera individual (34).

Para que las células tumorales puedan diseminarse, estas deben adquirir características que le permiten abandonar el tumor primario y viajar a otra parte del cuerpo (34). Las células tumorales comienzan siendo células epiteliales inmóviles con uniones intercelulares (22). A lo largo de los años se han planteado diferentes procesos por los que las células tumorales pueden adquirir características que le permitan diseminarse, sin embargo, la EMT es el proceso más estudiado (2). La EMT se considera un proceso en el que las células tumorales con características epiteliales adquieren un fenotipo mesenquimatoso, por lo que pierden la interacción intercelular y ganan la capacidad de producir enzimas proteolíticas que modifican la MEC, lo que le confiere la posibilidad de tener mayor movilidad e invadir (34).

La transición de un estado a otro está coordinada por distintos factores, entre ellos se encuentran el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), además de factores de transcripción como *Snail1* que pueden reprimir genes epiteliales como la producción de E-cadherina (22,34–36). La hipoxia, se considera igualmente un desencadenante debido a que induce la expresión de Snail. (37,38).

Durante años, la EMT ha sido objeto de investigación ya que se ha pensado que no es necesaria para el inicio de la metástasis, pues se ha comprobado que comúnmente existe una migración colectiva de células con interacciones intercelulares, de manera que, si estas células han pasado a través de un EMT, no podrían diseminarse en forma de grupo (39). De igual modo, estos *clusters* de células tumorales han demostrado que son mucho más metastásicas que las células tumorales que se diseminan individualmente. Investigaciones como las de Aceto, et al (40,41) demuestran que los *clusters* introducidos experimentalmente en la circulación venosa de ratones, han sido son mucho más eficientes en la siembra de colonias metastásicas. Además, Liu (42) comprobó a través de un experimento ex vivo que las células tumorales individuales buscan agregarse para formar grupos, los cuales mostraron una supervivencia mayor a las células individuales.

Actualmente, se ha encontrado que las células que han completado la EMT, son células que pierden la capacidad de iniciar tumores y fundar colonias metastásicas, pero las que tienen un fenotipo epitelial-mesenquimal mixto parecen ser células que son altamente metastásicas, lo que podría explicar por qué algunas de ellas son capaces de diseminarse colectivamente y tener características mesenquimales que le permitan invadir (34).

3.3.4 *Sobrevivencia en circulación*

Las células que intravasan hacia la sangre ya sea como células individuales o *clusters* tienen que interactuar con los componentes sanguíneos, de manera que estos van a determinar la supervivencia de las células y su capacidad para extravasarse una vez que encuentran vasos sanguíneos en tejidos distantes (22,34). Las interacciones más comunes entre las células tumorales y las células sanguíneas son:

3.3.4.1 *Interacción con neutrófilos*

A pesar de que una célula tumoral no se encuentra mucho tiempo en circulación, estas interactúan con células inmunitarias (leucocitos) que tienen como objetivo eliminarlas por completo (34). No obstante, una población de leucocitos, los neutrófilos, ha sido cada vez más estudiada debido a que pueden desempeñar un papel importante en la metástasis (43). Los neutrófilos son los leucocitos predominantes en la sangre, los cuales tienen un papel importante en la defensa contra infecciones gracias a su capacidad fagocítica, la producción de citocinas y la liberación del contenido de sus gránulos en el exudado inflamatorio (44). A pesar de ello, los mecanismos de defensa de estas células, podrían ayudar a las células tumorales y promover la progresión y la metástasis. Por ejemplo, los neutrófilos pueden promover la invasión y migración de células

tumorales a través de la producción y liberación de proteinasas como MMP-8 y MMP-9, las cuales tienen la capacidad de degradar componentes de la MEC, facilitando así la extravasación de la célula a un tejido distante (43,45). Asimismo, los neutrófilos pueden promover la EMT de la célula tumoral, ya que el TGF- β derivado de neutrófilos regula negativamente la expresión de E-cadherina y positivamente la expresión de vimentina, lo que provoca que la célula tumoral adquiera un fenotipo mesenquimatoso (46).

Algunos estudios han demostrado que los neutrófilos facilitan la adhesión de células tumorales al endotelio en sitios metastásicos. En estos estudios se menciona la interacción de CD18 y galectina 3 en neutrófilos, molécula de adhesión intercelular (ICAM)-1 en endotelio y antígeno T en células tumorales (43,47–49). Además, se ha demostrado que la producción de trampas extracelulares de neutrófilos (NET) también puede facilitar la adhesión al endotelio (43). Las NET son redes extracelulares compuestas de ADN derivado de neutrófilos que forman complejos con proteínas como las MMPs (50). Los neutrófilos producen las NET en respuesta a señales inflamatorias para combatir patógenos. Sin embargo, la interacción de células tumorales con las NET puede ayudar a la extravasación de células tumorales gracias a la integrina β 1 (50). Asimismo, las NET pueden activar el receptor tipo toll (TLR)-9 debido a que estas están compuestas de ADN, de manera que pueden promover la migración, el crecimiento celular, la proliferación y la invasión a través de la activación de MAPK en el CCR (51).

3.3.4.2 *Interacción con plaquetas*

El papel de las plaquetas en la progresión del cáncer ha sido tema de debate desde hace mucho tiempo, cuando se informó una relación entre el recuento elevado de plaquetas y la malignidad del tumor. Se ha descrito que las células tumorales presentan en su superficie factor tisular (FT), lo que provoca que las plaquetas se unan a ellas para formar una especie de escudo que las protege de

la lisis por parte de las células asesinas naturales (NK) y les proporciona una estructura capaz de soportar el estrés físico (22). Las plaquetas son capaces de proteger a las células tumorales de las NK gracias a la producción de factores solubles como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y TGF- β que inhiben a estas células inmunes, además, TGF- β se ve involucrado en la activación de la vía NF- κ B en las células tumorales, lo que induce o mantiene la EMT (34).

En un estudio realizado por Placke, et al (52) se ha demostrado que cuando las células tumorales se recubren de plaquetas, existe una transferencia del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I derivado de plaquetas a las células tumorales. Esto produce un mimetismo molecular que contribuye a la evasión del sistema inmune, ya que se reduce la presentación de antígenos tumorales a través de la regulación negativa del MHC de clase I, haciendo que haya una falta de autorreconocimiento y, por lo tanto, la reactividad antitumoral de las células NK. Además, se descubrió en el mismo estudio mediante citometría de flujo, que las plaquetas expresan niveles altos de CD41a y MHC clase I, junto con niveles bajos de CD62P. Las células tumorales solas no expresan CD41a y expresan MHC de clase I en niveles variables. No obstante, cuando las células tumorales entran en contacto con plaquetas, existe la adhesión de plaquetas a la superficie de la célula tumoral y da como resultado una "pseudoexpresión" de CD41a y CD62P en la superficie de célula tumoral (52). Por otra parte, se ha descrito que la fibrina se une a las integrinas, α v β 3 en las células tumorales y α IIb β 3 en las plaquetas activadas, haciendo que se formen agregados de células tumorales, fibrina y plaquetas. De modo que, el bloqueo de estas integrinas β 3 puede ayudar a prevenir la progresión del cáncer (53).

La interacción entre las plaquetas y las células del endotelio vascular ha sido estudiada de igual modo. Las plaquetas que están unidas a las células tumorales son capaces de adherirse al endotelio a través de selectinas E y P. La expresión de ligandos de selectina P por parte de las células tumorales, como PSGL-1,

favorece su interacción con la selectina P de las plaquetas y el endotelio (53). En resumen, se ha demostrado que la activación plaquetaria, la adhesión a través de receptores de superficie y liberación de TGF- β , PDGF y ATP para volver más permeables las paredes capilares, son necesarias para una metástasis eficaz (53,54).

3.3.5 Extravasación

Para que las células tumorales extravasen, estas se adhieren al endotelio y lo atraviesan mediante un proceso que se denomina migración transendotelial (TEM). Este proceso de adherencia y extravasación puede darse gracias a la presencia de inflamación que conduce a la activación del endotelio y las plaquetas, favoreciendo así la detención y adhesión de las células tumorales (55). La activación del endotelio por interleucinas (IL)-1 α , IL-1 β o factor de necrosis tumoral (TNF)- α , conduce a la expresión de selectina E, selectina P, ICAM-1 y la proteína de adhesión celular vascular (VCAM)-1 en las superficies de las células endoteliales. Por lo que, si estas moléculas de adhesión se unen a sus ligandos en las células tumorales, tales como PSGL-1, puede promover el rodamiento y la adhesión de estas (53).

Muchos pares de moléculas ligando-receptor contribuyen al proceso de extravasación, incluidas cadherinas, selectinas, integrinas, CD44 y receptores de la superfamilia de inmunoglobulinas (56). En el CCR, la interacción de la E-selectina en el endotelio con ligandos oligosacáridos sialilados o sulfatados relacionados con los antígenos Lewis a y Lewis x, presentes en la célula tumoral, así como las mucinas tumorales secretadas o de la superficie celular, pueden favorecer la metástasis (57). Además, la adhesión de la E-selectina a su contrarreceptor, DR3, en las células tumorales induce señales inversas que aumentan su movilidad intrínseca, su supervivencia y una señalización directa en el endotelio (58).

Por otra parte, en el CCR se ha propuesto la extravasación como un proceso de permeabilidad, donde CCL2 derivado de células tumorales envía señales a CCR2 en células endoteliales, lo que resulta en un aumento de la permeabilidad vascular y la metástasis subsiguiente (59).

En conclusión, las interacciones ligando- receptor de células tumorales tanto con el endotelio y plaquetas, así como la permeabilización y activación del endotelio a través de la liberación de IL en el proceso de inflamación, hacen que en conjunto se pueda propiciar la adherencia de la célula tumoral al endotelio y con ello, extravasar hacia un tejido distante. Una vez que la célula está en el sitio secundario, se denominan células tumorales diseminadas (DTC) (39).

3.3.6 Colonización y metástasis

Una vez que extravasan, las DTC se encuentran en un microambiente tisular diferente al del sitio primario, donde carecen de los factores de crecimiento, las células estromales familiares y los componentes de la MEC que las mantenían con vida (34). De este modo, las DTC tienen incapacidad para proliferar, adaptarse y colonizar, por lo que suelen ser eliminadas por el sistema inmune o verse obligadas a entrar a un estado de quiescencia o latencia. En esta dormancia, hay una falta de crecimiento tumoral debido al déficit de vascularización, ya que estas células son incapaces de inducir la angiogénesis, además, hay una supresión activa por parte del sistema inmune (60–62). Las DTC quiescentes pueden residir en nichos especializados que ayudan a su supervivencia y restringen su proliferación hasta que estas se activan (34).

Las células quiescentes pueden activarse para formar colonias metastásicas gracias a distintos factores, como los niveles altos de ERK1/2 con respecto a p38 MAPK (63) y la inflamación persistente del órgano huésped junto a la producción de NET por parte de los neutrófilos, lo que puede causar la activación de estas células gracias a la remodelación de la MEC mediada por NET (64). Asimismo,

la remodelación de la MEC, gracias al colágeno tipo I a través de la señalización de las integrinas mediada por FAK, puede liberar a las DTC de su quiescencia (65). Algunos receptores como el receptor de la urokinasa uPAR activa a la integrina $\beta 1$, que, al interactuar con la fibronectina, despierta a la célula tumoral (66). Se ha propuesto que las células tumorales pueden pasar por un proceso inverso al EMT una vez que extravasan, es decir, pasan a través de una transición mesenquimatoso-epitelial (MET) (34,67). Este regreso a su estado epitelial permite que adquieran nuevamente características epiteliales que ayudan a la reconstrucción de organizaciones celulares jerárquicas similares a las del tumor primario, y con ello la formación de un tumor secundario a distancia (67). En resumen, la colonización metastásica sigue siendo la fase más desconcertante y compleja, debido a que es la etapa más difícil de modelar experimentalmente. Por ello, se desconocen en su mayoría los mecanismos que permiten y/o promueven la proliferación de las DTC en tejidos distantes (34).

3.4 Metástasis en CCR

En el CCR, aproximadamente el 83% de los pacientes desarrolla metástasis en los tres primeros años tras el diagnóstico, siendo más propensos aquellos pacientes que se encuentran en estadios avanzados. Sin embargo, aproximadamente el 27% de los pacientes con CCR desarrollan metástasis después de los primeros tres años, por lo que es importante mantener un seguimiento durante al menos cinco años después de la cirugía (68). Los órganos más frecuentes de metástasis son los ganglios linfáticos, el hígado y los pulmones (12,68). Otros sitios metastásicos menos comunes para el CCR incluyen las glándulas suprarrenales, los ovarios y los huesos; las metástasis al sistema nervioso central son raras (12).

3.4.1 Metástasis en ganglios linfáticos

Los ganglios linfáticos son pequeños órganos que forman parte del sistema linfático (69). Aproximadamente, del 40% al 70% de los casos de CCR pueden llegar a presentar una metástasis en ganglios linfáticos después de una resección quirúrgica (12). El riesgo de una metástasis ganglionar en CCR se ha atribuido durante años a la capacidad del carcinoma para invadir la submucosa, sin embargo, se ha informado que el carcinoma intramucoso no tiene potencial para la metástasis en los ganglios linfáticos (70–72).

Un ganglio metastásico en el CCR puede ser detectado mediante procedimientos histopatológicos y el aumento de tamaño del ganglio (> 1 cm). Si existen varios nódulos agrupados y más grandes de 1 cm en el área perirrectal, es considerado patológico (73). Hoy en día, la metástasis ganglionar se considera un componente importante para la estadificación y pronóstico del CCR, pues la presencia de ganglios metastásicos se observa en pacientes con tumores T3 o T4 y se considera como una metástasis sistémica (69).

3.4.2 Metástasis en hígado

La metástasis hepática se define como el desarrollo de un tumor en el hígado que resulta de la diseminación de un tumor primario extrahepático. El 25% de los pacientes con CCR presentan metástasis en hígado una vez que son diagnosticados, los que no, se predice que la presentaran en los siguientes 3 años con una probabilidad del 60%. La supervivencia global de los pacientes con metástasis hepáticas es de 5 años en el 38% y de 10 años en el 26% (68,74).

Este tipo de metástasis es el más común en el CCR debido a que el hígado recibe a través de la vena porta sangre que proviene del intestino y del bazo, además, el hígado presenta fenestraciones en el endotelio sinusoidal, que facilitan la entrada de las células tumorales en el parénquima hepático (68,75,76).

Existen dos tipos de metástasis hepáticas, las metástasis sincrónicas que se diagnostican al mismo tiempo que el CCR y las metástasis metacrónicas que se diagnostican durante el seguimiento del paciente (68). Las metástasis sincrónicas son las que tienen un peor pronóstico pues son biológicamente más agresivas e impredecibles (74).

Como parte del diagnóstico, se encuentran los estudios imagenológicos como la radiografía, ultrasonido, tomografía y resonancia magnética. Tradicionalmente las metástasis hepáticas eran consideradas irresecables, por lo que solo se ofrecía un tratamiento paliativo. Ahora, se han encontrado terapias alternativas que tienen un impacto significativo en la supervivencia, tal como la quimioterapia sistémica, el tratamiento quirúrgico y terapias ablativas locales donde se destruye el tumor hepático sin resecarlo (75,77).

3.4.3 Metástasis en pulmón

La metástasis pulmonar en el CCR suele aparecer en el 10-20% de los pacientes y solo el 10% de estas no presentarán enfermedad en otro órgano, por lo que el 2-4% de las recaídas en el CCR son causadas en el pulmón (78). La diseminación hematogena y embolización tumoral es la causa principal de la metástasis pulmonar ya que el pulmón está vascularizado por un lecho capilar, por lo que es uno de los primeros órganos donde llegan las células tumorales. No obstante, este mecanismo aún no es muy aceptado ya que existen tejidos ricos en lechos capilares que no son susceptibles a metástasis como la piel o músculo, de manera que se concluye que es importante el mecanismo anatómico y tisular específico (79). El tratamiento para este tipo de metástasis es la cirugía, pero solo algunos de los pacientes podrán ser sometidos a la intervención según las características del paciente y la enfermedad (80).

A pesar de que la metástasis en el CCR se encuentra solo en un porcentaje de todos los casos, existe probabilidad de recurrencia una vez que el paciente se ha

sometido a tratamiento. Por esta razón, se ha buscado el desarrollo de mejores instrumentos y pruebas clínicas que permitan detectar la posibilidad de una recurrencia, como es el caso de los biomarcadores tumorales.

3.5 Biomarcadores tumorales en CCR

Un marcador tumoral se define como un componente identificable que se encuentra en el tumor o es secretado por el mismo (81). Los marcadores tumorales brindan información sobre el cáncer, qué tan maligno es o qué tratamientos pueden ser efectivos. En el caso del CCR, el estudio de marcadores tumorales tiene como objetivo el diagnóstico, pronóstico, la predicción de la eficacia del tratamiento y el seguimiento de la enfermedad para evitar la recurrencia postratamiento (82,83). Aunque se tenga conocimiento de múltiples marcadores en el CCR, sólo algunos han sido comprobados y utilizados en la clínica, tal es el caso de los marcadores en heces, el ACE y el antígeno carbohidrato (CA)-19-9 (84,85).

3.5.1 Marcadores en heces

El estudio de los marcadores en heces en el CCR tiene como objetivo la detección de la enfermedad, en especial en personas mayores de 50 años (81). El marcador fecal más común es la sangre oculta en heces mediante una prueba inmunoquímica o la prueba de guayacol (82). La primera detecta la globina humana, mientras que la segunda mide la actividad de pseudoperoxidasa en la hemoglobina (85). La sangre oculta en heces tiene la ventaja de ser un marcador que puede ser detectado de manera no invasiva con solo tres muestras de heces sucesivas, obtenidas después de una dieta preestablecida. Aunque este es un marcador utilizado por bastante tiempo y que está validado por la Red Nacional

Integral del Cáncer (NCCN), tiene como desventaja que su sensibilidad y especificidad es de 40-80% y del 70%, respectivamente (82). Asimismo, si el paciente no ha seguido la dieta prescrita existe la probabilidad de falsos positivos, ya que la actividad de la peroxidasa está presente en ciertas frutas y verduras (85).

Debido a la falta de sensibilidad y especificidad, las investigaciones se han enfocado en buscar más marcadores fecales. Como parte de las alternativas, se ha llevado a cabo la determinación de ADN fecal para investigar genes mutados como *K-ras*, *TP53* y *APC*, los cuales llegan a tener una especificidad y sensibilidad de 95% y 60-90%, respectivamente (81,82,84,85). No obstante, la desventaja de estos ensayos es su costo elevado, además de ser una alternativa nueva que requiere más investigación (85).

3.5.2 Marcadores serológicos

El ACE, es una glicoproteína intracelular que se expresa en el 90% de los tumores colorrectales. Es utilizado en el seguimiento postoperatorio, ya que se ha evidenciado que existe una relación entre concentraciones elevadas de ACE y la recurrencia del cáncer, con una sensibilidad del 80% y especificidad del 70% (84,85). Este es el marcador tumoral más empleado en el CCR ya que tiene la ventaja de estar presente en el colon fetal, así como en el adenocarcinoma de colon, pero no en el colon de adultos sanos. Además, puede ser detectado con una muestra sanguínea del paciente a través de un inmunoensayo cromatográfico. Ahora bien, la desventaja de este marcador es que la concentración de este marcador también puede incrementar en otras patologías como cáncer de páncreas o pulmón (84–87).

Otro marcador serológico utilizado es el CA 19-9, un antígeno asociado al cáncer que desempeña un papel como molécula de adhesión durante la progresión del tumor. Este marcador junto con el ACE tiene un valor pronóstico en el CCR (88).

Sin embargo, presenta una sensibilidad menor al ACE con el 23% y una especificidad del 96%, por lo que no es utilizado constantemente (81,84,89).

Además, la Sociedad Estadounidense de Oncología Clínica (ASCO), el Grupo Europeo sobre Marcadores Tumorales (EGTM) y la Academia Nacional de Bioquímica Clínica (NACB), establecen que no existe evidencia suficiente como para que estos marcadores sean utilizados en el cribaje, diagnóstico o seguimiento del tratamiento en el CCR (81,89). Por lo tanto, se han buscado alternativas que permitan complementar estas pruebas, como es el caso de las células tumorales circulantes.

3.6 Células tumorales circulantes

Las células tumorales circulantes (CTC) son células con un potencial metastásico que han sido liberadas del tumor primario hacia la circulación (90,91). Estas células pueden viajar por sangre o linfa hasta que encuentran los vasos capilares de tejidos distantes para extravasar y formar colonias que podrían generar una metástasis a distancia (12,40). Durante los últimos años las CTC han sido objeto de estudio, ya que su aislamiento y detección en la sangre de pacientes oncológicos puede proporcionar información sobre la respuesta terapéutica y de manera indirecta, predecir la posibilidad de la existencia de una metástasis y, por ende, de recurrencia (12,40,92).

3.6.1 Utilidad clínica en el CCR

Clínicamente, las CTC en sangre periférica son estudiadas como biomarcadores sustitutos para cánceres como el cáncer de mama, próstata y CCR (93). Su detección en la sangre de pacientes con cáncer puede proporcionar información sobre la respuesta terapéutica y determinar si existen residuos metastásicos que puedan llevar a una recurrencia del cáncer. Además, se propone que su

aislamiento y expansión ex vivo, podría ser una oportunidad para perfilar mutaciones genéticas y sensibilidad de las células residuales ante distintas terapias y, en consecuencia, permitir predecir la respuesta al tratamiento de un paciente (34,93). Por otra parte, la Administración Federal de Drogas y Alimentos (FDA) ha aprobado la enumeración de CTC para estratificar pacientes con cáncer de CCR (90).

Cuando una lesión tumoral es detectable con métodos convencionales como tomografías y resonancias, está ya tiene más de 10^9 células tumorales (90). El diagnóstico precoz con las CTC aún es un tema de debate ya que no se sabe con certeza si la diseminación de las CTC ocurre en etapas tempranas durante la formación del tumor, sin embargo, se ha encontrado CTC en el 41% de las pacientes en estadio T1 de cáncer de mama (94).

La detección temprana en el CCR es importante ya que los pacientes con cánceres en etapa temprana tienen una tasa de supervivencia superior al 90% (95). El estudio de Tsai, et al (96) demostró que la detección de CTC tiene un buen potencial para el diagnóstico temprano de CCR. En este estudio se utilizó una plataforma llamada CellMax para aislar y enumerar las CTC de la sangre periférica de 667 adultos con CCR en diferentes estadios para realizar un diagnóstico precoz mediante algoritmos predefinidos. Los resultados mostraron que la plataforma tenía una alta especificidad (86%) y sensibilidad (95%) para distinguir tumores benignos de malignos. Por otra parte, Baek, et al (97) definieron un valor de corte de CTC de 5 células/7,5 ml y lo utilizó como criterio para distinguir pacientes con CCR de sujetos sanos con buena sensibilidad (75%) y especificidad (100%). No obstante, aunque estos estudios muestren que las CTC pueden ser utilizadas para el diagnóstico del CCR como un método no invasivo a través de biopsias líquidas, los métodos de detección tienen una sensibilidad limitada, lo que dificulta su uso como biomarcador para el diagnóstico precoz (34,90). Además, los recuentos de CTC en CCR en etapa temprana eran tan bajos como 9%, lo que dificulta su detección para un diagnóstico precoz (98).

La FDA ha aprobado la enumeración de las CTC como una opción para determinar el pronóstico del paciente, siendo el valor de corte ≥ 1 por mL de sangre para el peor pronóstico, ya que se relaciona el número de CTC con la agresividad del cáncer, la probabilidad de presentar metástasis y la nula o poca respuesta al tratamiento (90). Algunos estudios han demostrado que el número de CTC está estrechamente relacionado con la progresión y el pronóstico del CCR. Por ejemplo, Wang (99) demostró a través de un estudio con 121 pacientes con CCR que la tasa de positividad de CTC estaba altamente correlacionada con la profundidad de la invasión tumoral, el estadio TNM, la metástasis linfática, la metástasis a distancia y el nivel sérico de ACE. Además, la curva de supervivencia de Kaplan-Meier realizada mostró que los pacientes con CTC positivos tenían una supervivencia libre de progresión (SLP) (14 meses frente a 23 meses, $P = 0,001$) y una supervivencia general (SG) (18 meses frente a 25 meses, $P = 0,003$) más cortas que los pacientes negativos. Por otro lado, Groot, et al (100) realizaron un metaanálisis de 1329 pacientes con CCR y metástasis hepática, donde la SG y SLP fueron peores en pacientes positivos para CTC. En el estudio de Cohen, et al (101), se involucró 430 pacientes con CCR. Los pacientes fueron divididos en grupos positivos y negativos según el valor de corte de 3 células/7,5 mL. El resultado mostró que la SLP (4,5 meses frente a 7,9 meses; $P = 0,0002$) y la SG (9,4 meses frente a 18,5 meses; $P = 0,0001$) fue más corto en el grupo positivo que en el grupo negativo. Asimismo, Wu et al (102) clasificaron las CTC en tres subgrupos según la expresión de la molécula de adhesión celular epitelial (EpCAM) y vimentina, siendo así CTC epiteliales con expresión de EpCAM (E-CTC), CTC mesenquimales con expresión de vimentina (M-CTC) y CTC epiteliales/mesenquimales con expresión de EpCAM y vimentina (E/M-CTC). Los resultados mostraron que las proporciones de E-CTC, M-CTC y E/M-CTC en 126 pacientes fueron 76.98, 42.06 y 56.35%, respectivamente. Demostrando que la metástasis tumoral se asocia de manera más significativa a la presencia de M-CTC que con otros subgrupos de CTC. Del mismo modo, Zhong (103) realizó el aislamiento e identificación de CTC en 74 pacientes, demostrando que los M-CTC se correlacionaron con el tamaño del tumor, el

estadio TNM, el estadio T, la invasión vascular y el ACE. Descubrió igualmente, que los M-CTC estaban asociados a una mayor probabilidad de recurrencia y a incrementar la progresión del tumor. Por lo tanto, se considera que las CTC tienen un papel importante en la metástasis del tumor y la recurrencia de la enfermedad en el CCR. Es decir, independientemente de que el CCR sea temprano o avanzado, mayor número de CTC indican peor pronóstico (95).

El CCR es muy agresivo, por lo que existe una necesidad urgente de biomarcadores confiables para monitorear con precisión los efectos del tratamiento. La evaluación de respuesta al tratamiento con CTC ha sido objeto de estudio en muchos ensayos clínicos, donde son utilizadas como biomarcadores junto con otros estudios, sin embargo, se ve potencial en este método ante las otras técnicas, ya que puede contribuir a evitar la exposición frecuente a la radiación (92,93). Se ha demostrado que una disminución o eliminación de las CTC en sangre periférica está asociada a una buena respuesta terapéutica, por el contrario, en aquellos pacientes donde persiste o aumenta el número de CTC se tiene que buscar un nuevo tratamiento (90).

Por ejemplo, en un estudio realizado en 77 pacientes con CCR tratados con FOLFOX y bevacizumab. Las CTC fueron contadas antes del tratamiento y 12 y 24 semanas después del tratamiento. Los resultados indicaron que los números de CTC disminuyeron en aquellos pacientes con buena respuesta al tratamiento (104), lo que sugiere que la detección y la cuantificación de las CTC pueden proporcionar un seguimiento oportuno del tratamiento por parte del médico, permitiéndole modificar el régimen de administración en caso de ser necesario. De forma similar, Shi, et al (105) demostraron que la terapia disminuye el número de CTC en pacientes con metástasis hepáticas por CCR.

Actualmente, se espera que la detección y cuantificación de las CTC se convierta en una herramienta prometedora como marcadores diagnósticos, pronósticos y predictivos para pacientes con CCR. Muchas de las técnicas para detectar y cuantificar las CTC, se basan en las propiedades biológicas de las células como

su tamaño o sus marcadores celulares para diferenciarlas de otros componentes sanguíneos (106,107).

3.6.2 Marcadores celulares de las CTC

Hasta el día de hoy, se han utilizado distintos marcadores celulares de las CTC para cada tipo de cáncer, tal y como se muestra en la **tabla 1**.

Los antígenos de superficie epitelial más utilizados son las citoqueratinas (CK) 18, 19 y 20. Estas son queratinas de filamento intermedio que se encuentran en el citoesqueleto de las células de tipo epitelial (106). Otro marcador es EpCAM, una glicoproteína de superficie involucrada en la adhesión celular, que se sobreexpresa en los cánceres epiteliales (106). EpCAM se ha considerado el marcador universal de tipo epitelial para los cánceres, pero debido a que no todas las células son iguales, la expresión de EpCAM varía entre los diferentes tipos de cáncer, por lo que actualmente se utiliza en cánceres de próstata y mama, ya que expresan fuertemente esta molécula (90). En otros tipos de cáncer también se tienen tasas de detección considerables para EpCAM, como el cáncer hepatocelular y colorrectal (90). No obstante, se han detectado CTC positivas para EpCAM en pacientes con enfermedades benignas del colon, por lo tanto, son fuente de falsos positivos (108). Las desventajas de este marcador es que no se puede utilizar en tumores que son EpCAM negativos como es el caso de los cánceres neurogénicos. Además, si las células tumorales sufren EMT, los marcadores epiteliales como EpCAM se regulan a la baja durante este proceso, por lo que disminuye la tasa de detección de CTC positivas para EpCAM y puede dar lugar a resultados falsos negativos (90,92). Por lo tanto, EpCAM no puede considerarse un marcador universal para la detección de CTC y por esta razón, es importante desarrollar tecnologías no solo basadas en EpCAM para aislar y detectar CTC (108).

Tabla 1. Marcadores celulares utilizados para identificar CTC (90).

Tipos de cáncer	Marcadores epiteliales	Marcadores mesenquimales	Marcadores específicos
Cáncer de próstata	EpCAM/CK8,18,19	Vimentina	PSMA
		Giro	ASP EGFR PIM1
Cáncer de mama	EpCAM/CK8,18,19	Vimentina	HER2
	CK 5/7/8/18/19	Fibronectina	AR
	E-cadherina	N-cadherina β -catenina	PVP
Cáncer colorrectal	EpCAM/CK8,18,19	Vimentina	PI3K α CEA PRL3
		Giro	
		SNAI1	
		AKT2	
		LOXL3	
Cáncer de páncreas	EpCAM/CK8,18,19	Platina3	XAF1 HER2 MT1-MMP
		Vimentina	
		Giro	
Cáncer gástrico	EpCAM/CK	Vimentina	XAF1 HER2 MT1-MMP
	CK19/CK20	N-cadherina	

El problema para detectar las CTC es que suelen ser células heterogéneas, ya que sus marcadores pueden variar entre los diferentes tipos de cáncer. A su vez, estas células pueden ser distintas según el tejido y el microambiente donde estén presentes (90). Como se mencionó anteriormente, las CTC también suelen ser diferentes según la etapa del proceso EMT en el que se encuentren, ya que durante el mismo existe la disminución de la expresión de marcadores epiteliales (E-cadherina, ZO-1, claudinas y ocludinas) y el aumento de la expresión de marcadores mesenquimales (vimentina, N-cadherina, proteína específica de

fibroblastos¹ y fibronectina) (109). Por ende, se considera necesario el uso de cocteles específicos para marcadores de superficie epiteliales y mesenquimales que no estén presentes en otras células sanguíneas (108).

Como parte de la propuesta para desarrollar un coctel de anticuerpos que sea eficaz para aislar y detectar CTC, se han propuesto diferentes marcadores de membrana, como el CD133, conocido como AC133 (110). Esta es una proteína transmembranal que se encuentra en células troncales y progenitoras hematopoyéticas humanas (111). No obstante, recientemente se ha informado que CD133 es un marcador de células tumorales en cáncer de próstata, cáncer de colon y cáncer de pulmón (111,112). En el cáncer de colon, se ha demostrado que el tumor primario presenta una amplia expresión de CD133, lo que puede ser clave para la detección de las CTC en este tipo de cáncer (111). Además, estudios en cáncer de colon, hígado y neuroblastoma indican que la expresión de CD133 se correlaciona con un mal pronóstico, ya que las células CD133 positivas tienen una mayor actividad de la vía NF- κ B, la cual regula la EMT y la invasión, por lo que estas células tienen un mayor potencial para ser metastásicas (6,113)

Por otro lado, CD166 es una glicoproteína de adhesión celular que se ha reportado expresada en la categoría T avanzada y estado N-positivo en CCR, por lo que se ha correlacionado a una escasa supervivencia (110). De modo que, se considera un buen marcador de pronóstico para el CCR.

En el caso de CD44, esta es una molécula de adhesión celular implicada en el crecimiento, la diferenciación y la supervivencia celular. Además, tiene un papel importante en la migración de las células tumorales, el estadio del tumor, la infiltración de los ganglios linfáticos, el pronóstico y la supervivencia (110). Se ha reportado que las CTC en CCR que tienen un fenotipo CD44⁺ tienen una alta tumorigenicidad, especialmente en combinación con células CD133⁺, mientras que las células con un fenotipo CD44⁻ no tienen la capacidad de formar un tumor (114). Además, un estudio realizado en ratones inmunodeficientes mostró que las células de cáncer de colon CD44⁺ CD166⁺ presentan una mayor capacidad

para formar tumores en comparación con las células CD44⁺ CD166⁻, CD44⁻ CD166⁺ o CD44⁻ CD166⁻ (115,116).

Un ejemplo más es el CD29, una integrina que se ha observado en las partes inferiores de las criptas del colon normal y, por lo tanto, se ha considerado como un marcador de células progenitoras de la mucosa (115). Se ha propuesto que este marcador puede promover la metástasis y progresión del cáncer a través de la regulación del microambiente tumoral (117,118). Asimismo, se ha demostrado que las células CD133⁺ CD29⁺ pueden regular al alza la autorrenovación, la proliferación y la diferenciación, por lo que CD29 puede ser un nuevo marcador de células troncales para el cáncer de colon (117).

A pesar de que la identificación de CTC con marcadores específicos de membrana puede funcionar y se puede obtener una alta detección, se debe tener en cuenta la presencia de algunas CTC que no son caracterizadas durante el procedimiento. Esto puede evitarse mediante una eliminación de leucocitos de la muestra de sangre mediante el uso de anticuerpos contra CD45. Sin embargo, se han encontrado poblaciones de subcélulas CK⁺ CD45⁺ que pueden estar relacionadas con uniones no específicas de anticuerpos, dobletes celulares o células circulantes similares a macrófagos (119,120). Además, debe tenerse en cuenta que no todas las células CD45⁻ en la sangre son células tumorales, ya que algunas como las células endoteliales circulantes pueden no tener este marcador (121).

Como podemos observar, es muy complicada la detección de las CTC en sangre debido a su heterogeneidad y la complejidad del coctel de anticuerpos para su identificación. Por esta razón, se ha propuesto la plastina 3, una proteína ligadora de actina que se encuentra en microvellosidades intestinales, como una alternativa para evitar el uso de grandes cócteles de anticuerpos, debido a que este marcador no se ve afectado por la EMT y no se expresa en las células sanguíneas (122). No obstante, aún queda un largo camino por recorrer para obtener un método de detección y aislamiento eficaz en el CCR.

3.6.3 Aislamiento, detección y caracterización de CTC

El aislamiento y detección de las CTC mediante un análisis de sangre ha sido un paso importante para el seguimiento de los pacientes con cáncer. Hace unos años, solo las biopsias de tejido habían sido consideradas apropiadas para el diagnóstico y pronóstico del cáncer. No obstante, la obtención de la biopsia de tejido no siempre es posible debido a la localización crítica del tumor o al mal estado clínico del paciente, por lo que una biopsia líquida no invasiva constituye una alternativa potencial para los clínicos (6).

Las características biológicas y físicas de las CTC son diferentes a otras células de la sangre, por lo que, gracias a ello, se han desarrollado diferentes técnicas de aislamiento y detección (40). Actualmente, se han reconocido algunos métodos que permiten el aislamiento y detección de CTC, como la filtración y las técnicas inmunológicas (**Tabla 2**) (106).

Dentro de las técnicas de aislamiento, existen los ensayos de selección positiva o negativa, que utilizan la inmunoafinidad para lograr el aislamiento de CTC a través una superficie inerte inmovilizada y anticuerpos combinados con perlas magnéticas que se unen a la superficie de la célula; la selección positiva se basa en la unión específica del anticuerpo a los marcadores epiteliales de las CTC (**Figura 4a**), mientras que en la selección negativa los anticuerpos van dirigidos a los antígenos de superficie de las células hematopoyéticas que no se expresan en las CTC, por lo que se eliminan durante el proceso (**Figura 4b**). Por otra parte, la microfiltración de la sangre periférica es un método biofísico que consiste en separar las CTC en función a su tamaño a través de filtros con poros que usualmente tienen 8 μm de diámetro, debido a que tanto el tamaño como la rigidez de estas células es mayor en comparación con otros componentes sanguíneos (**Figura 4c**) (6,106,108). La centrifugación en gradiente de densidad se basa en la separación de las poblaciones celulares en función de sus densidades relativas (**Figura 4d**) (106,123).

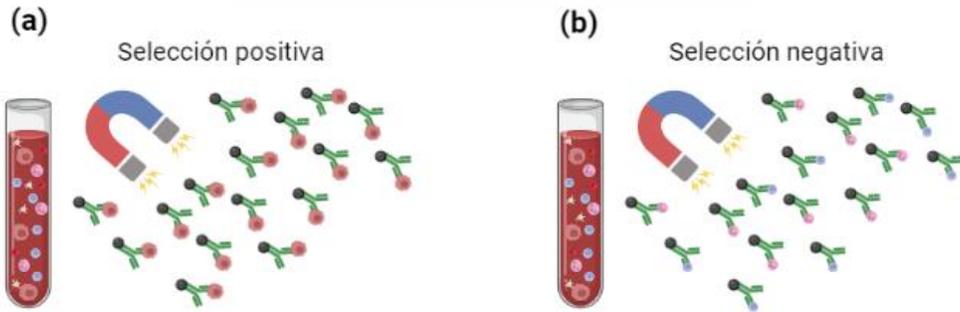
Debido a la expresión de moléculas de membrana por parte de las CTC, se puede llevar a cabo una detección por citometría de flujo por medio de anticuerpos acoplados a fluorocromos que se unen a los marcadores celulares de estas células, por ejemplo, CD133, CD29, CD44, entre otros, lo que permite su identificación, detección y conteo (6,90,110).

Tabla 2. Ventajas y desventajas de las técnicas de aislamiento y detección de CTC (106,108,124)

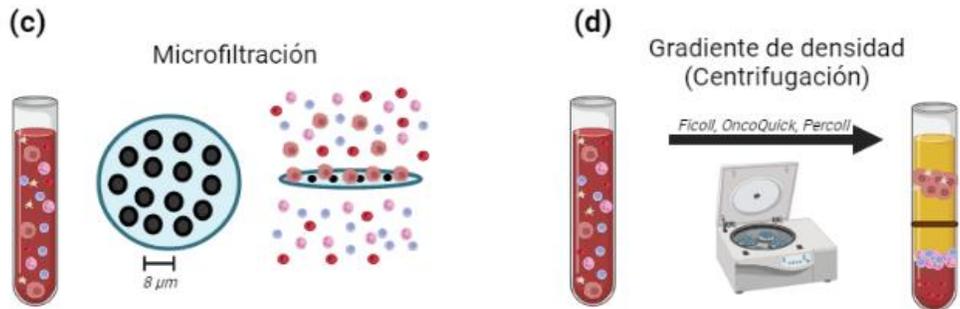
Técnica	Ventajas	Desventajas
Microfiltración	Procesamiento rápido de grandes muestras de sangre.	Baja pureza (eritrocitos y leucocitos retenidos).
	Alta eficiencia.	Acumulación de resistencia a la filtración (capa de células retenida en la membrana).
Inmunológica (Citometría de flujo)	Poca manipulación de las muestras.	Diferentes tamaños de CTC (heterogeneidad). Tiempo de análisis.
	Identificación de elevado número de biomarcadores.	Disponibilidad de equipos.
Inmunológica (CellSearch®)	Alta recuperación.	No existen anticuerpos 100% específicos del tumor; especificidad y sensibilidad baja.
	Detección de células vivas sin necesidad de lisis celular. Alta viabilidad celular usando selección negativa.	Expresión heterogénea de marcadores en células (No captura células en EMT).

TÉCNICAS DE AISLAMIENTO

Basada en propiedades inmunológicas



Basada en propiedades biofísicas



TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

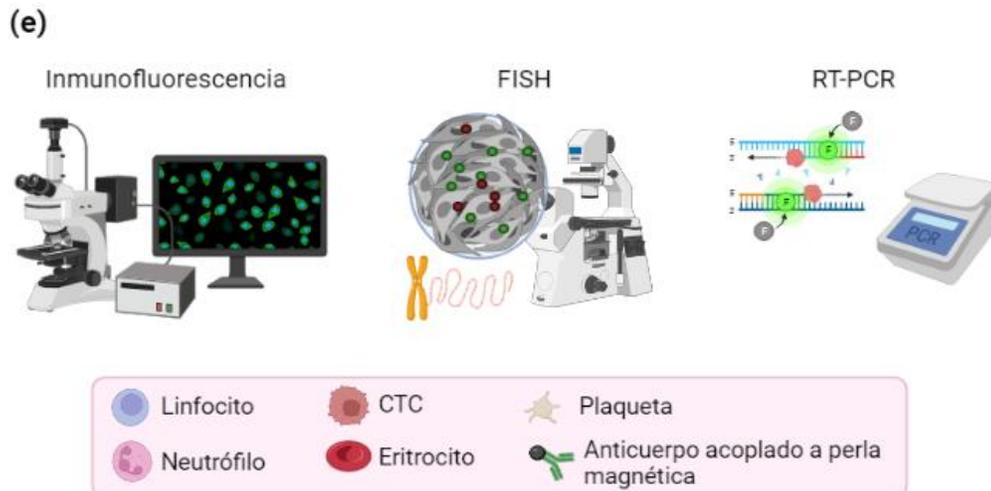


Figura 4. Técnicas de aislamiento y caracterización de CTC. (a) Selección positiva. Unión específica del anticuerpo acoplado a los antígenos de superficie

de las CTC. (b) Selección negativa. Los anticuerpos acoplados van dirigidos a los antígenos de superficie de las células hematopoyéticas que no se expresan en las CTC. (c) Microfiltración. Las CTC se separan de los componentes sanguíneos en función a su tamaño a través de filtros con poros de 8 μm de diámetro. (d) Gradiente de densidad. Las CTC se separan en función de sus densidades relativas. (e) Caracterización de CTC. Se utiliza inmunofluorescencia, FISH y RT-qPCR.

Después del aislamiento, las CTC pueden ser identificadas como CTC verdaderas, para ello, se utilizan ensayos basados en inmunocitoquímica como inmunofluorescencia (IF) e inmunohistoquímica (IHC), y ensayos moleculares como PCR de transcripción inversa cuantitativa (RT-qPCR), hibridación fluorescente *in situ* (FISH) y secuenciación de próxima generación (SNG) (**Figura 4e**) (106).

3.6.4 Expectativas

A pesar de que la detección de CTC tiene un gran potencial como biomarcador no invasivo para el seguimiento, predicción de recurrencia y metástasis del CCR, aún hace falta un método estandarizado para su detección y aislamiento, que permita su uso como biomarcador a nivel clínico (90,92,125,126).

IV PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente, a pesar de que la detección, aislamiento y cuantificación de CTC se ha planteado como una opción de evaluación de la respuesta al tratamiento y la predicción de la recurrencia y metástasis, no existen datos que comparen la eficiencia y sensibilidad de los diferentes métodos de aislamiento y cuantificación para CTC en CCR.

La estandarización de un método de detección, cuantificación y aislamiento de CTC de sangre periférica, puede dar información que permita ser utilizada en investigaciones futuras para evaluar la respuesta al tratamiento, la predicción de la recurrencia y la metástasis, con el objetivo de mejorar considerablemente la supervivencia del paciente.

V PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿La citometría de flujo es una técnica eficaz y sensible para la detección y cuantificación de CTC en el contexto del cáncer de colon?

¿La filtración como método de aislamiento de CTC es una técnica eficaz en el contexto del cáncer de colon?

VI HIPÓTESIS

La citometría de flujo permitirá detectar y cuantificar CTC de cáncer de colon.

La filtración como método de aislamiento permitirá obtener de manera eficaz CTC de cáncer de colon.

VII OBJETIVOS

7.1 Objetivo general

Estandarizar un método de aislamiento, detección y cuantificación de CTC en cáncer de colon como medida de evaluación de la respuesta al tratamiento y la predicción de la recurrencia en el cáncer de colon.

7.2 Objetivos específicos

- Objetivo específico 1: Estandarizar la detección y cuantificación de líneas celulares de cáncer de colon por citometría de flujo espectral.
- Objetivo específico 2: Estandarizar el aislamiento de líneas celulares de cáncer de colon por filtración.

VIII MATERIAL Y MÉTODOS

8.1 Diseño de estudio

Estudio de tipo experimental.

8.2 Universo

Líneas celulares de SW 620 y HCT 116 diluidas a diferentes concentraciones en sangre periférica de donadores aparentemente sanos. Cada una de estas mezclas se sometió para purificación por filtración y detección por citometría de flujo espectral, respectivamente.

8.3 Variables

Independientes:

- Líneas celulares SW 620 y HCT 116 a diferentes concentraciones diluidas en sangre periférica.
- Fenotipo y tamaño de las células provenientes de las diferentes líneas.

Dependientes:

- Número de células SW 620 obtenidas por filtración.
- Células HCT 116 detectadas por citometría de flujo espectral.

8.4 Técnicas o instrumentos

Durante la experimentación se utilizaron líneas celulares SW 620 y HCT 116 provenientes de un adenocarcinoma de colon humano y un carcinoma de colon humano, respectivamente.

Para el proceso de fenotipificación, detección y cuantificación de CTC en sangre periférica, se utilizó el método de citometría de flujo espectral (Cytex® Aurora). Se utilizaron como anticuerpos CD29- FITC, CD133- BV421, CD44- PE, E-Cadherina- AF488, EpCAM- AF488, NOTCH 2- PE y Vimentina- AF488.

En el aislamiento de CTC de cáncer de colon en sangre periférica se utilizó la tecnología de aislamiento por tamaño de células tumorales (ISET) con una bomba IPS-13RS y filtros Whatman de 8.0 μm .

8.5 Procedimiento

8.5.1 Fenotipificación de líneas celulares SW 620 y HCT 116

Las líneas celulares SW 620 y HCT 116 fueron cultivadas en medio DMEM F12 suplementado al 10% con suero fetal bovino (SFB) a 37°C. Una vez que las células alcanzaron el 80-90% de confluencia se extrajeron del cultivo con verseno. Se realizó un lavado de las líneas celulares con PBS 1x estéril y se procedió a contar las células. Para la preparación de la tinción se colocaron 500,000 células de cada línea celular en 8 tubos para citometría. Posteriormente se centrifugaron los tubos 5 minutos a 1500 rpm y se decantaron para eliminar el exceso de PBS dejando aproximadamente 50 μ L. En seguida se resuspendieron las células y se agregó 1 μ L de Fc TrueStain, y se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente. Luego de haber realizado el bloqueo, se realizó la tinción al agregar anticuerpo a cada tubo de cada línea celular como se muestra en la **tabla 3**. Se procedió a incubar 30 minutos a temperatura ambiente. Terminada la tinción, se agregó 1 mL de Buffer FACS y se centrifugó 5 minutos a 1500 rpm, se decantó para eliminar el exceso de anticuerpo y se agregó 200 μ L de Buffer FACS. Inmediatamente se realizó el análisis en el citómetro espectral CYTEK® (**Figura 5**).

Tabla 3. Tinción para los 8 tubos utilizados en la fenotipificación de líneas células SW 620 y HCT 116.

Tubo	Dilución	Anticuerpo acoplado
1	-	-
2	1:50	EpCAM (CD326) <u>AF488</u> anti-humano
3	1:50	E-Cadherina (CD324) <u>AF488</u> anti-humano
4	1:50	CD133 <u>BV</u> anti-humano
5	1:200	CD44 <u>PE</u> anti-humano
6	1:50	CD29 <u>FITC</u> anti-humano
7	1:50	NOTCH 2 <u>PE</u> anti-humano
8	1:100	Vimentina <u>AF488</u> anti-humano

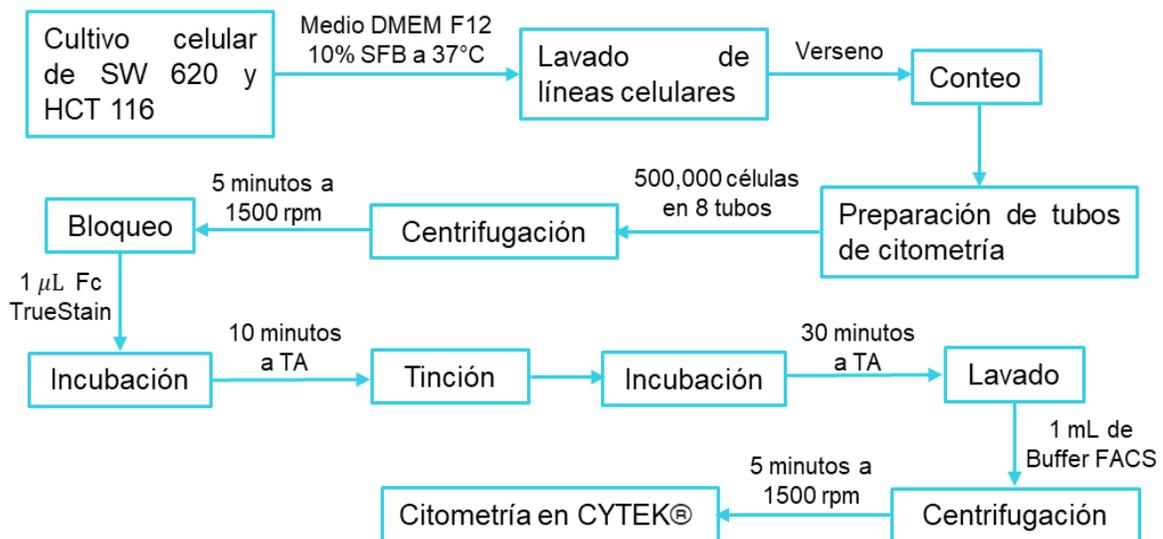


Figura 5. Metodología para la fenotipificación de líneas celulares SW 620 y HCT 116.

8.5.2 Detección de células HCT 116 en sangre periférica

La línea celular HCT 116 fue cultivada en medio DMEM F12 suplementado al 10% con SFB a 37°C. Una vez que las células alcanzaron el 80-90% de confluencia se extrajeron del cultivo con verseno. Se realizó un lavado de la línea celular con PBS 1x estéril y se procedió a contar las células. Para la preparación de las muestras se colocaron 500,000 células HCT 116 en 6 tubos Falcon de 15 mL. Posteriormente se realizó la toma de muestra de sangre periférica de donadores sanos con previo consentimiento informado. Tan pronto como se tuvieron las células y la muestra sanguínea, se precalentó a 37 °C una solución de lisis para eritrocitos. Cuando la solución de lisis llegó a la temperatura deseada, se agregaron a uno de los 6 tubos 100 μ L de sangre periférica e inmediatamente se añadió la solución de lisis con relación 1:20. Se repitió el mismo procedimiento para los 5 tubos restantes. Después de agregar la solución de lisis a todos los tubos, se mezclaron invirtiendo vigorosamente de 8 a 10 veces y se incubaron a 37 °C durante 10 minutos. Al terminar la incubación se centrifugaron los tubos a 800 rpm durante 10 minutos, se aspiró con cuidado el sobrenadante y se lavaron las células con solución de Hank. Una vez que las células se lavaron, se centrifugaron nuevamente los tubos a 800 rpm durante 10 minutos, se aspiró con cuidado el sobrenadante dejando aproximadamente 50 μ L y se pasaron las células a tubos de citometría. Se agregó 1 μ L de Fc TrueStain, dejando incubar 10 minutos a temperatura ambiente. Luego de haber realizado el bloqueo, se realizó la tinción al agregar anticuerpos a cada tubo como se muestra en la **tabla 4**. Se procedió a incubar 30 minutos a temperatura ambiente. Terminada la tinción, se agregó 1 mL de Buffer FACS y se centrifugó 5 minutos a 1500 rpm, se decantó para eliminar el exceso de anticuerpo y se agregó 200 μ L de Buffer FACS. Inmediatamente se realizó el análisis en el citómetro espectral CYTEK® (**Figura 6**).

Tabla 4. Tinción para los 6 tubos utilizados en la detección de células HCT 116 en sangre periférica. AF: Autofluorescencia, R: Referencia.

Tubo	Dilución	Anticuerpo acoplado
AF	-	-
R	1:50	CD45 <u>AF647</u> anti-humano
R	1:50	CD133 <u>BV</u> anti-humano
R	1:200	CD44 <u>PE</u> anti-humano
R	1:50	CD29 <u>FITC</u> anti-humano
Muestra	1:50	CD45 <u>AF647</u> anti-humano
	1:50	CD133 <u>BV</u> anti-humano
	1:200	CD44 <u>PE</u> anti-humano
	1:50	CD29 <u>FITC</u> anti-humano

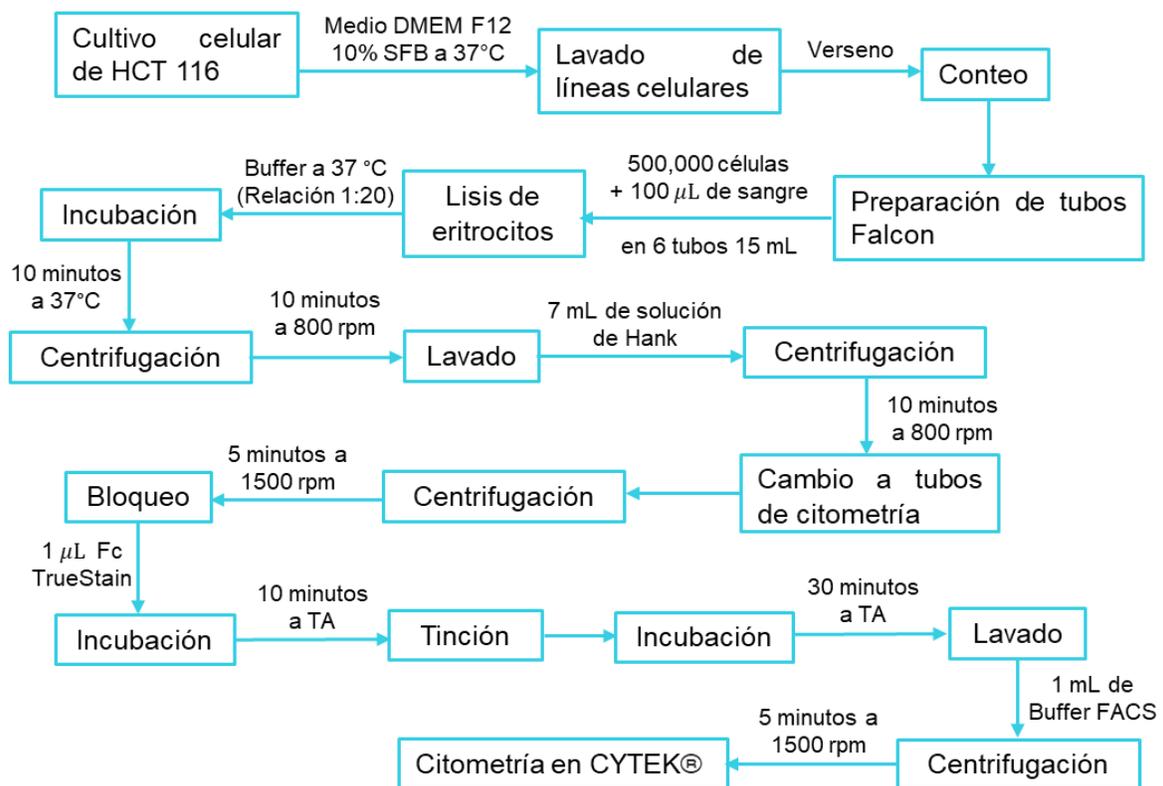


Figura 6. Metodología para la detección de células HCT 116 en sangre periférica.

8.5.3 Cuantificación de células HCT 116 en sangre periférica

La línea celular HCT 116 fue cultivada en medio DMEM F12 suplementado al 10% con SFB a 37°C. Una vez que las células alcanzaron el 80-90% de confluencia se extrajeron del cultivo con verseno. Se realizó un lavado de la línea celular con PBS 1x estéril y se procedió a contar las células para preparar una suspensión de 10 células tumorales/ 10 μ L. En seguida, se llevó a cabo la toma de muestra de sangre periférica de donadores sanos con previo consentimiento informado. A continuación, se preparó 1 tubo Falcon de 15 mL con 500,000 células (Autofluorescencia) y 7 tubos Falcon de 50 mL con 1 mL de sangre periférica (Muestras y control). Tan pronto como se prepararon los 8 tubos, se precalentó a 37 °C una solución de lisis para eritrocitos. Cuando la solución de lisis llegó a la temperatura deseada, se agregó a un tubo de 50 mL con sangre periférica el volumen de suspensión celular necesaria como se muestra en la **tabla 5**. Inmediatamente se añadió la solución de lisis con relación 1:20. Se repitió el mismo procedimiento para los 6 tubos de 50 mL restantes. Posteriormente, al tubo de 15 mL correspondiente a la autofluorescencia se añadió 100 μ L de sangre periférica e inmediatamente se agregó la solución de lisis con relación 1:20. Después de agregar la solución de lisis a todos los tubos, se mezclaron invirtiendo vigorosamente de 8 a 10 veces y se incubaron a 37 °C durante 10 minutos. Al terminar la incubación se centrifugaron los tubos a 800 rpm durante 10 minutos, se aspiró con cuidado el sobrenadante y se lavaron las células con solución de Hank. Una vez que las células se lavaron, se centrifugaron nuevamente los tubos a 800 rpm durante 10 minutos, se aspiró con cuidado el sobrenadante dejando aproximadamente 50 μ L y se pasaron las células a tubos de citometría. Se agregó 1 μ L de Fc TrueStain, dejando incubar 10 minutos a temperatura ambiente. Luego de haber realizado el bloqueo, se realizó la tinción al agregar anticuerpos a cada tubo como se muestra en la **tabla 6**. Se procedió a incubar 30 minutos a temperatura ambiente. Terminada la tinción, se agregó 1 mL de Buffer FACS y se centrifugó 5 minutos a 1500 rpm, se decantó para eliminar el exceso de anticuerpo y se agregó 200 μ L de Buffer FACS. Por último,

la muestra se filtró para evitar agregados e inmediatamente se realizó el análisis en el citómetro espectral CYTEK® (**Figura 7**).

Tabla 5. Preparación de las muestras para los 8 tubos utilizados en la cuantificación de células HCT 116 en sangre periférica. AF: Autofluorescencia.

	AF	Control	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6
Células/mL	-	-	10	25	50	100	300	500
Células/4 mL	-	-	40	100	200	400	1200	2000
Volumen de suspensión 10 células/ 10 µL	-	-	40 µL	100 µL	200 µL	400 µL	1200 µL	2000 µL
Volumen de sangre	100 µL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
Número de células	500,000	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 6. Tinción para los 8 tubos utilizados en la detección de células HCT 116 en sangre periférica. AF: Autofluorescencia

Tubo	Dilución	Anticuerpo acoplado
AF	-	-
Control	3:50	CD45 <u>AF647</u> anti-humano
	2:50	CD133 <u>BV</u> anti-humano
	2:200	CD44 <u>PE</u> anti-humano
	2:50	CD29 <u>FITC</u> anti-humano
Muestra 1,2,3,4,5 y 6	3:50	CD45 <u>AF647</u> anti-humano
	2:50	CD133 <u>BV</u> anti-humano
	2:200	CD44 <u>PE</u> anti-humano
	2:50	CD29 <u>FITC</u> anti-humano

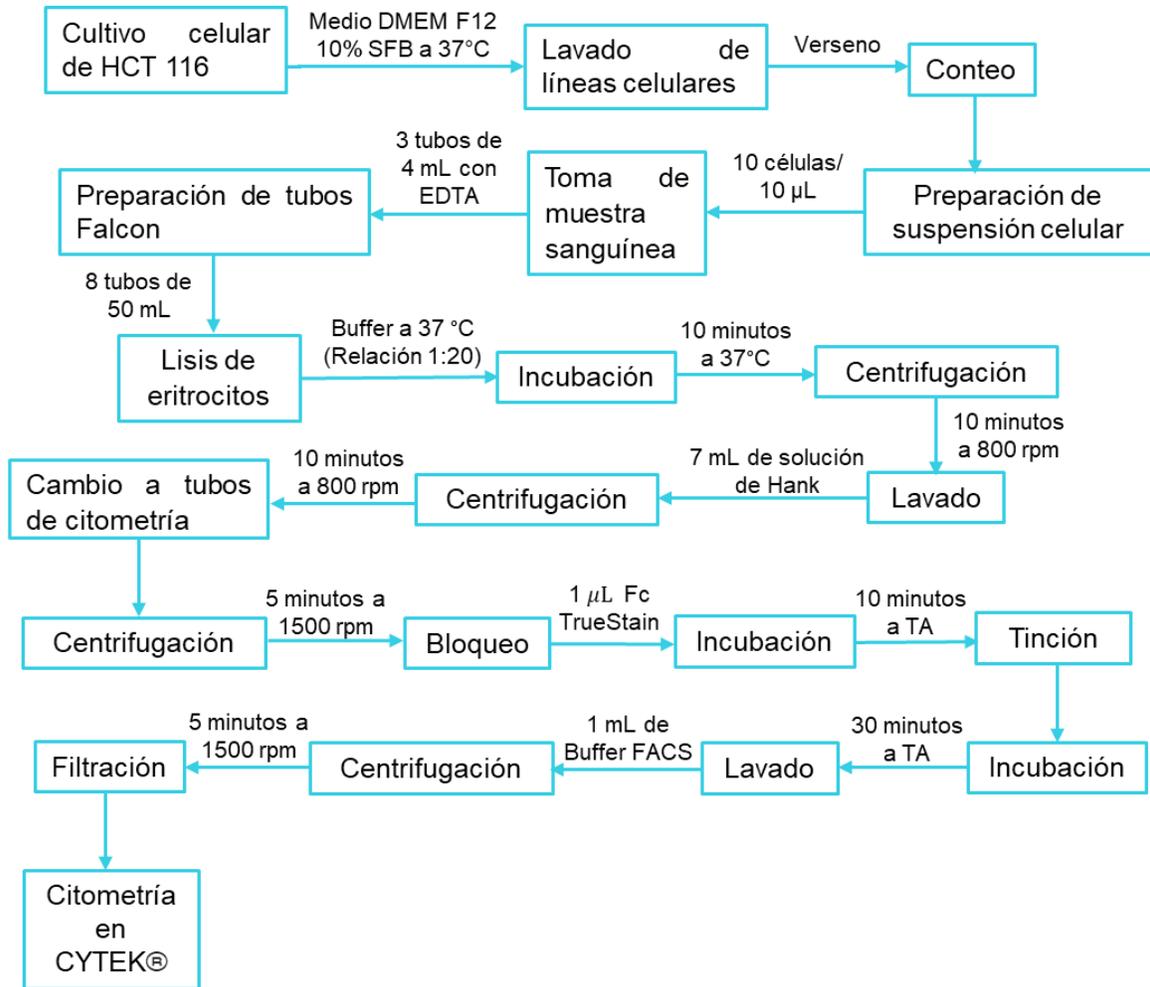


Figura 7. Metodología para la cuantificación de células HCT 116 en sangre periférica.

8.5.4 Aislamiento de CTC de cáncer de colon en sangre periférica

La línea celular SW 620 fue cultivada utilizando medio DMEM F12 suplementado al 10% con SFB a 37°C. Una vez que las células alcanzaron el 80-90% de confluencia se extrajeron del cultivo con verseno. Se realizó un lavado de la línea celular con PBS 1x estéril y se procedió a contar las células para preparar una suspensión de 10 células tumorales/ 10 µL. En seguida, se llevó a cabo la toma de muestra de sangre periférica de donadores sanos con previo consentimiento informado. A continuación, se prepararon las muestras de 20 mL para la filtración en tubos de 50 mL como se muestra en la **tabla 7**. Para la preparación del sistema de filtración, se tomó un filtro Whatman y se colocó en un soporte con la cara brillante hacia arriba, teniendo cuidado de que el filtro cubriera por completo el soporte. Posteriormente, se tomó con una jeringa de 20 mL una de las muestras realizadas y se ensambló el soporte con el filtro en el extremo de la jeringa. En el extremo contrario del soporte se insertó una manguera pequeña para recolectar los desechos. Después, se conectó la bomba IPS-13RS a la corriente y se montó el sistema anteriormente armado. Se revisó que los parámetros estuvieran en: 20 mL, 1 mL/min y se procedió a filtrar. Terminando de filtrar, se abrió el soporte para retirar el filtro y se colocó en una placa de 6 pozos con medio DMEM F12 suplementado al 10% con SFB. Finalmente, se repitió el procedimiento con las 6 muestras restantes y se incubó la placa a 37°C para realizar observación y conteo en los días posteriores (**Figura 8**).

Tabla 7. Preparación de las muestras para los 7 tubos utilizados en el aislamiento de CTC de cáncer de colon en sangre periférica con IPS 13 RS

	Control	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6
Células/mL	0	10	25	50	100	300	500
Células/4 mL	0	40	100	200	400	1200	2000
Volumen de suspensión 10 células/ 10 µL	0	40 µL	100 µL	200 µL	400 µL	1200 µL	2000 µL
Volumen de sangre	4,000 µL						
PBS 1X estéril	16,000 µL	15,960 µL	15,900 µL	15,800 µL	15,600 µL	14,800 µL	14,000 µL
Total	20,000 µL						

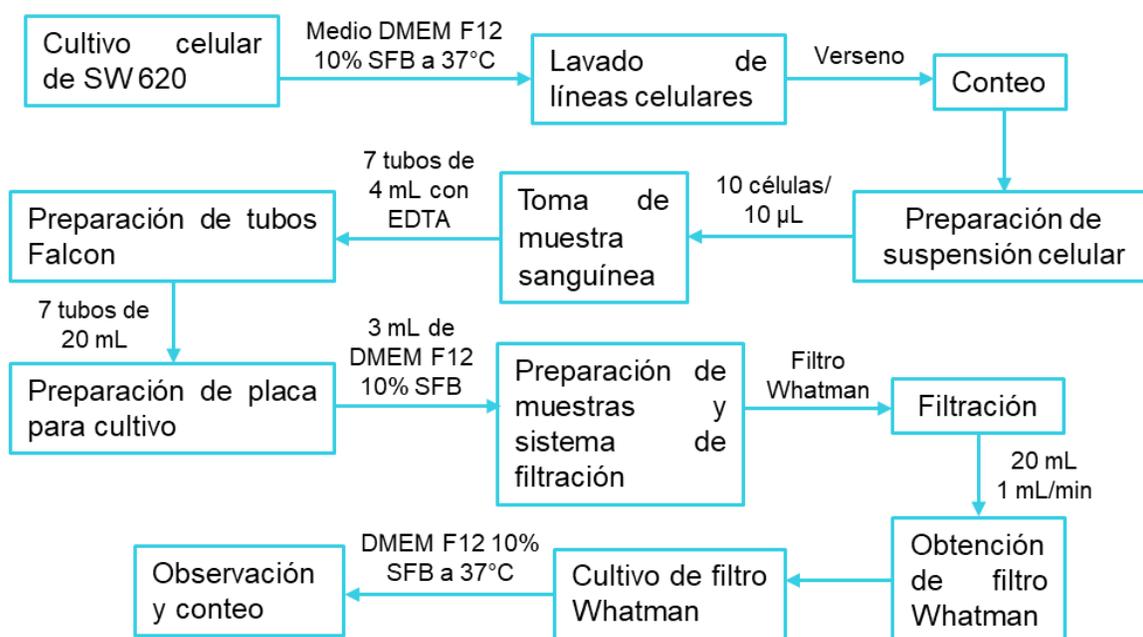


Figura 8. Metodología para el aislamiento de CTC de cáncer de colon en sangre periférica con IPS-13RS.

8.6 Análisis estadísticos

Excel 2021 (Microsoft Corporation) se utilizó para llevar la cuantificación de CTC detectadas en los métodos de cuantificación y aislamiento. Graphpad Prism 8. 0. 2 2019 (Windows) fue utilizado para realizar la prueba T y Pearson r en el método de detección, cuantificación y fenotipificación de líneas celulares por citometría de flujo, así como el aislamiento por filtración. FlowJo X 10.0.7r2 (Windows 8) se utilizó para el análisis de datos en la citometría de flujo, así como llevar la cuantificación de CTC detectadas.

IX RESULTADOS

9.1 Fenotipificación de líneas celulares SW 620 y HCT 116

Se realizó una fenotipificación de las líneas celulares HCT 116 y SW 620 para conocer los marcadores celulares que cada una presentaba y el nivel de expresión de cada uno, esto con el objetivo de elegir una línea celular de cáncer de colon que nos permitiera diseñar un panel para la detección de estas por citometría.

La fenotipificación de las células HCT 116 dio como resultado CD29⁺ CD133⁺ CD44^{neg/low} E-Cadherina^{neg/low} EpCAM⁻ NOTCH 2⁻ Vimentina⁻ (**Figura 9a**) y la fenotipificación de las células SW 620 dio como resultado CD29⁺ CD133⁺ E-Cadherina^{neg/low} CD44⁻ EpCAM⁻ NOTCH 2⁻ Vimentina⁻ (**Figura 9b**). Se valoró de igual forma, el nivel de expresión de cada marcador según la diferencia significativa entre la intensidad media de fluorescencia (IMF) de la autofluorescencia de la célula y la fluorescencia de la célula acoplada al anticuerpo, utilizando prueba T (p value <0.0001). La expresión del marcador se consideró positiva (+) con tres o más asteriscos de significancia, neg/low con dos o un asterisco de significancia, y negativa (-) si no presentaba ningún asterisco.

La elección de la línea celular a utilizar se llevó a cabo por el nivel de expresión de cada marcador, por lo que se utilizó HCT 116, la línea celular de cáncer de colon que presenta una expresión mayor de marcadores para el diseño del panel. El panel seleccionado contempló cuatro anticuerpos; CD45- AF647, CD29- FITC, CD133- BV421 y CD44- PE.

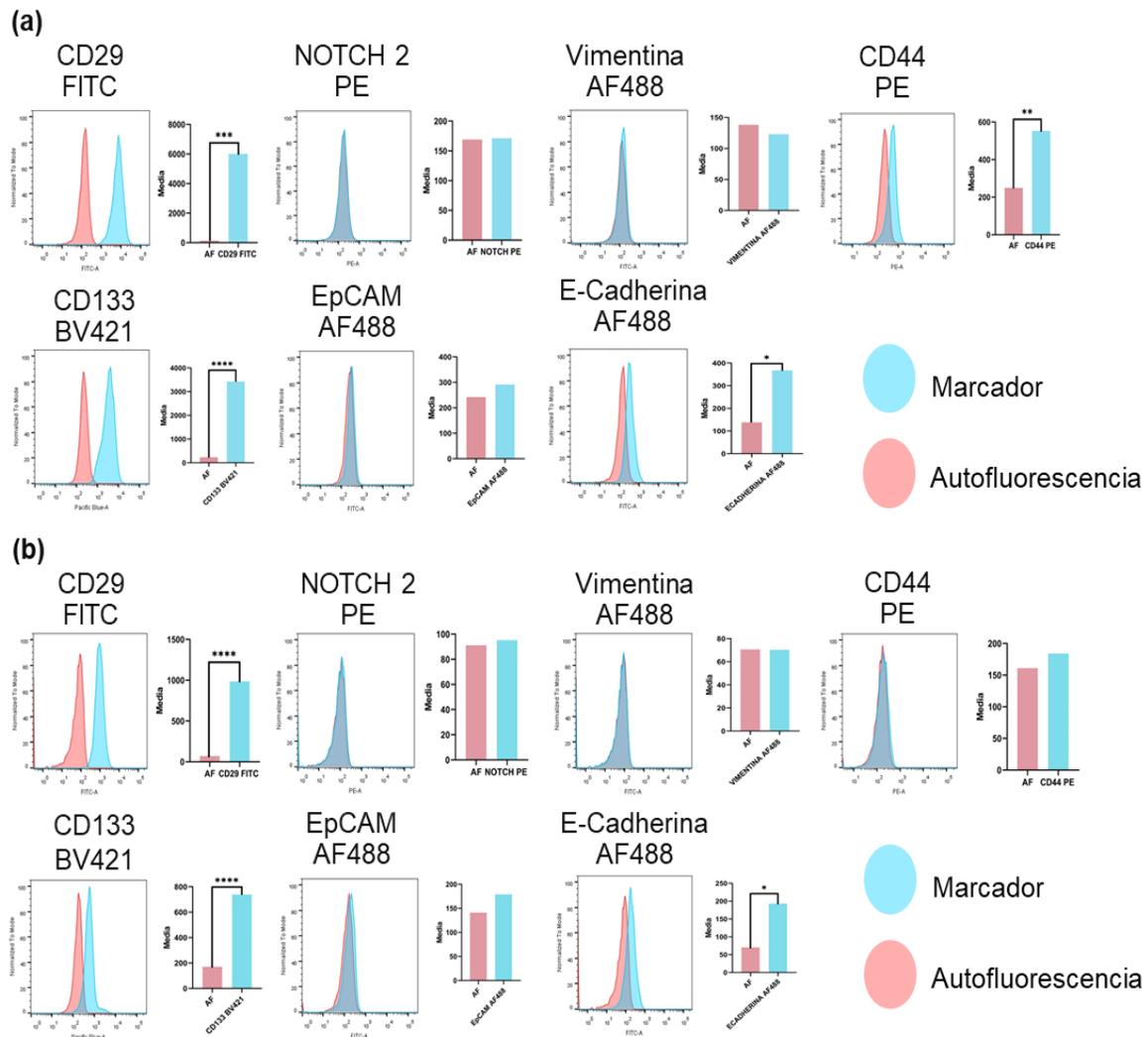


Figura 9. (a) Fenotipificación de células HCT 116: $CD29^+ CD133^+ CD44^{neg/low} E-Cadherina^{neg/low} EpCAM^- NOTCH\ 2^- Vimentina^-$. (b) Fenotipificación de células SW 620: $CD29^+ CD133^+ E-Cadherina^{neg/low} CD44^- EpCAM^- NOTCH\ 2^- Vimentina^-$. Comparación de intensidad media de fluorescencia de la autofluorescencia y anticuerpo, utilizando prueba T (p value < 0.0001). * p 0.0315, ** p 0.0015, *** p 0.0003, **** p < 0.0001.

9.2 Detección de células HCT 116 en sangre periférica

La prueba de detección de las células tumorales HCT 116 en una muestra de sangre periférica, se realizó con el objetivo de comprobar que el panel seleccionado es capaz de discriminar las células tumorales de los demás componentes sanguíneos.

Al realizar la tinción y el análisis de datos determinamos que es posible detectar células tumorales usando el panel de anticuerpos seleccionado. En primera instancia, en el gráfico SSC-A vs FSC-A (**Figura 10a**) se seleccionaron los eventos que no fueran residuos celulares. Posteriormente, en el gráfico FSC-H vs FSC-A (**Figura 10b**) se seleccionaron dos regiones, una para *singletes* y otra para *clusters*, debido a que en una muestra sanguínea las CTC viajan tanto en forma individual como en agrupaciones, siendo incluso estas últimas aún más capaces de llevar a una metástasis. Posteriormente, cada uno de estos grupos, tanto *singletes* (**Figura 10c**) como *clusters* (**Figura 10d**) se diferenciaron con base en su expresión de CD45, siendo las células tumorales aquellas con una expresión negativa. En este caso, en ambos *dot plots* observamos aproximadamente una cantidad de células tumorales similar a la cantidad de células sanguíneas, esto debido a que la muestra se realizó con concentraciones semejantes. Cada uno de estos grupos de células CD45⁻ se seleccionó para obtener la expresión de cada uno de los marcadores por separado y asegurar de este modo, que efectivamente se trata de las células tumorales HCT 116. Como podemos ver en los *dot plots*, la expresión de cada marcador, tanto para *singletes* (**Figura 10e**) como para *clusters* (**Figura 10f**), corresponde a lo observado en la fenotipificación de líneas celulares, donde vemos una expresión alta de CD133 y CD29, con una expresión baja de CD44, lo que comprueba que efectivamente las células detectadas son la línea HCT 116.

Para comprobar que las células CD45⁻ seleccionadas son realmente *singletes* y *clusters*, se realizó una comparación de la IMF de los mismos, utilizando la prueba T de Student (p value <0.0001). En estos gráficos (**Figura 10g**) podemos

observar que la fluorescencia de los marcadores, tanto CD133, CD29 y CD44, aumenta aproximadamente el doble en los *clusters*, por lo que podemos deducir que estos realmente son *clusters* de células tumorales.

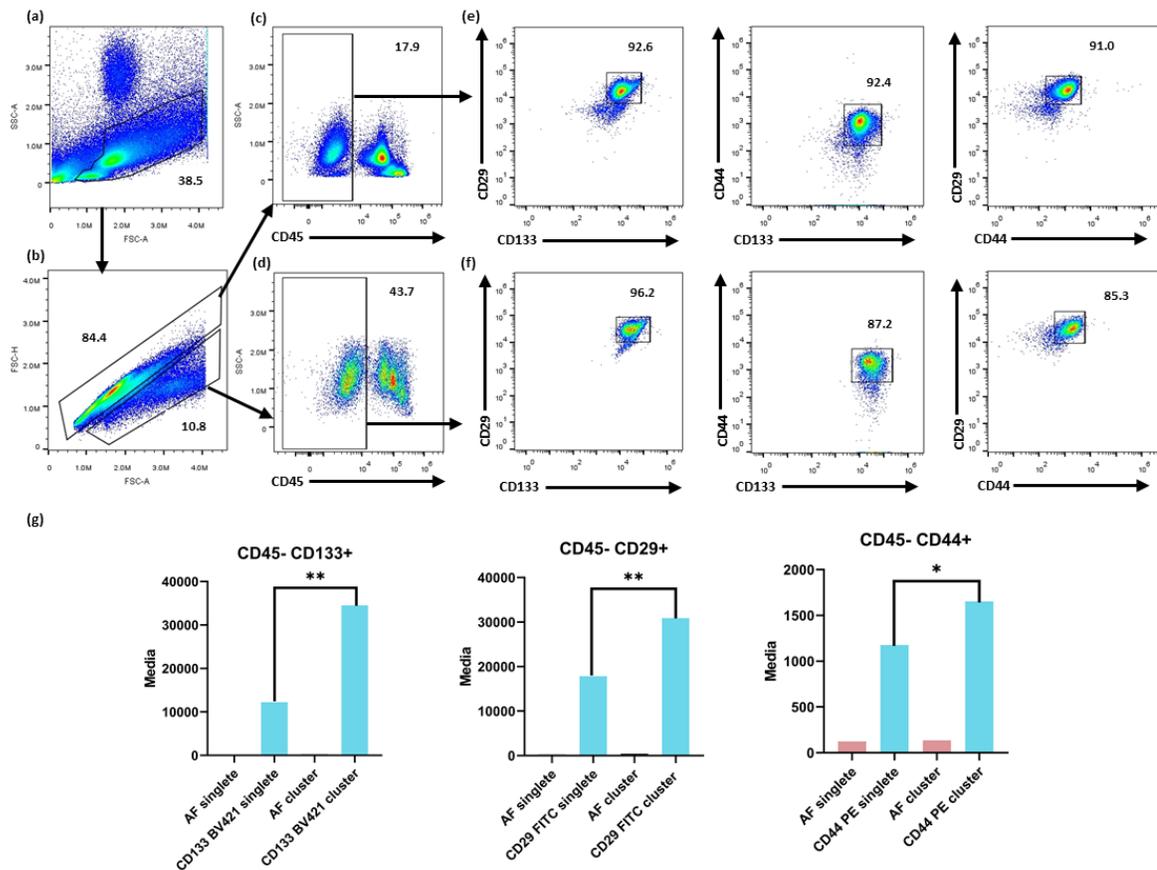


Figura 10. Citometría obtenida del método de detección de CTC. (a) Todas las células (38.5%). (b) Identificación de singletes (84.4%) y clusters (10.8%). (c) Identificación de singletes CD45⁻ (17.9%). (d) Identificación de clusters CD45⁻ (43.7%). (e) Identificación de singletes CD45⁻ CD133⁺ CD29⁺ CD44^{neg/low}. (f) Identificación de clusters CD45⁻ CD133⁺ CD29⁺ CD44^{neg/low}. (g) Comparación de intensidad media de florescencia de singletes y clusters, utilizando prueba T (p value <0.0001). *p 0.021, **p 0.001.

9.3 Cuantificación de células HCT 116 en sangre periférica

Para la estandarización de la cuantificación se mezclaron muestras de sangre periférica y células tumorales HCT 116 anteriormente cultivadas en diferentes concentraciones (500, 300, 100, 50, 25 y 10 células/mL, respectivamente). Se puede observar (**Figura 11**) en los *dot plots* la cantidad de células tumorales CD45⁻ CD133⁺ CD29⁺ captadas en cada muestra a diferente concentración. En estos *dot plots* podemos observar que, para los *singletes* (**Figura 11a**), la cantidad de células tumorales disminuye conforme disminuye la concentración de células que se colocaron al inicio del ensayo, por lo que claramente el citómetro es capaz de captar aquellas células que van desde una concentración de 500 células/mL de sangre a una concentración de 10 células/mL de sangre. En el caso de los *clusters* (**Figura 11b**), sucede lo mismo, pero a una escala menor; no obstante, en aquellas muestras donde se han logrado detectar, vemos que el método es capaz de encontrar aún menos células de las que se han considerado.

Como podemos observar, tanto en los *dot plots* de los *singletes* como el de los *clusters*, existen algunas células que pueden tener un fenotipo semejante a las CTC, ya que por la cantidad de células que se encuentran en la sangre, cabe la posibilidad de que exista un pegado de los anticuerpos a otras células no tumorales. Sin embargo, por el comportamiento de las células tumorales y al considerar los resultados de la detección explicados en el punto anterior, se han limitado ciertas zonas en los gráficos para discriminar las células tumorales reales (tanto por fenotipo y comportamiento en los *dot plots*) de las demás células sanguíneas.

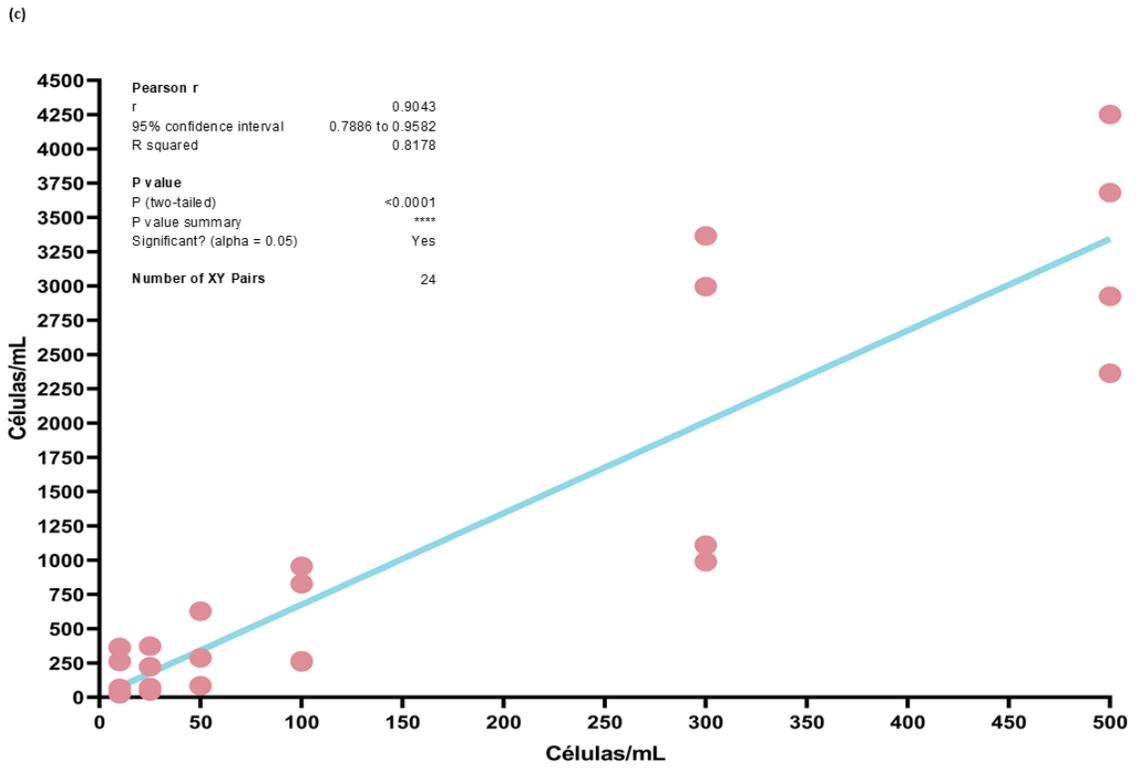
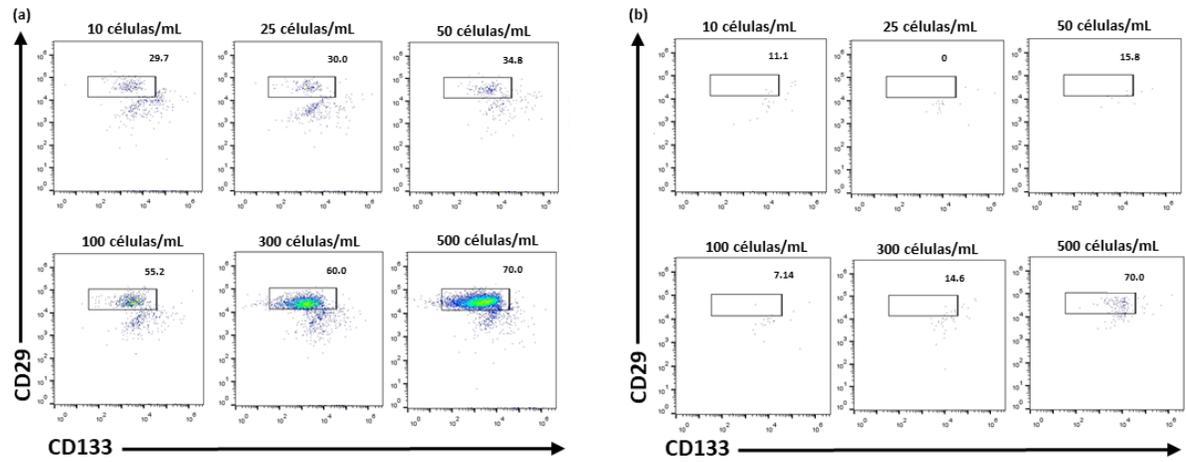


Figura 11. Citometría obtenida del método de cuantificación de CTC. (a) Singletes obtenidos en cada punto de la primera curva. (b) Clusters obtenidos en cada punto de la primera curva. (c) Representación de las células totales (singletes y clusters) obtenidas en las cuatro determinaciones ($r=0.9043$, $p < 0.0001$).

Se realizó una curva de estandarización aplicando la estadística r de Pearson para indicar cuán asociados se encuentran los conteos de células obtenidas (eje y) en el método de citometría de flujo en las seis concentraciones teóricas (eje x). El objetivo fue observar el conteo total de las células detectadas en cada una de las muestras en las cuatro determinaciones y con ello, observar el comportamiento de la curva en cuanto a las diferentes concentraciones y ver si existe una relación semejante entre determinaciones que nos permita concluir si el método es sensible y reproducible. Así mismo, para determinar si el pipeteo del número de células se realizó correctamente. En los resultados (**Figura 11c**), vemos que las cuatro determinaciones en cada concentración de la curva tienen un comportamiento semejante, por lo que se obtuvo una r de 0.9043. Este resultado significa que los puntos de la curva tienen una relación lineal positiva, por lo que estadísticamente el método es sensible y reproducible. Cabe destacar que en algunos puntos el número de células puede ser mayor o menor según el pipeteo de células HCT 116 durante el procedimiento, ya que se utilizaron cantidades muy pequeñas y volúmenes grandes para las diferentes concentraciones, por lo que el pipeteo se consideró un factor importante en relación a la cantidad de células detectadas. A pesar de ello, podemos visualizar que se pueden detectar CTC en sangre periférica a partir incluso de 10 células/mL tanto en células individuales como en *clusters*.

9.4 Aislamiento de CTC de cáncer de colon en sangre periférica

El filtro Whatman, obtenido de la filtración, se colocó en pozos estériles con medio celular DMEM F12, suplementado al 10% con SFB para permitir el crecimiento de cualquier célula tumoral que estuviera retenida en el mismo. Se observó en microscopio a 40x el crecimiento de las células tumorales durante 10 días. Estas células se discriminaron de otras por la morfología, tamaño y la velocidad de proliferación. Se observaron colonias de células tumorales a partir del día 2 (**Figura 12**), lo cual sugiere que el método funciona para aislar las células tumorales circulantes de sangre periférica.

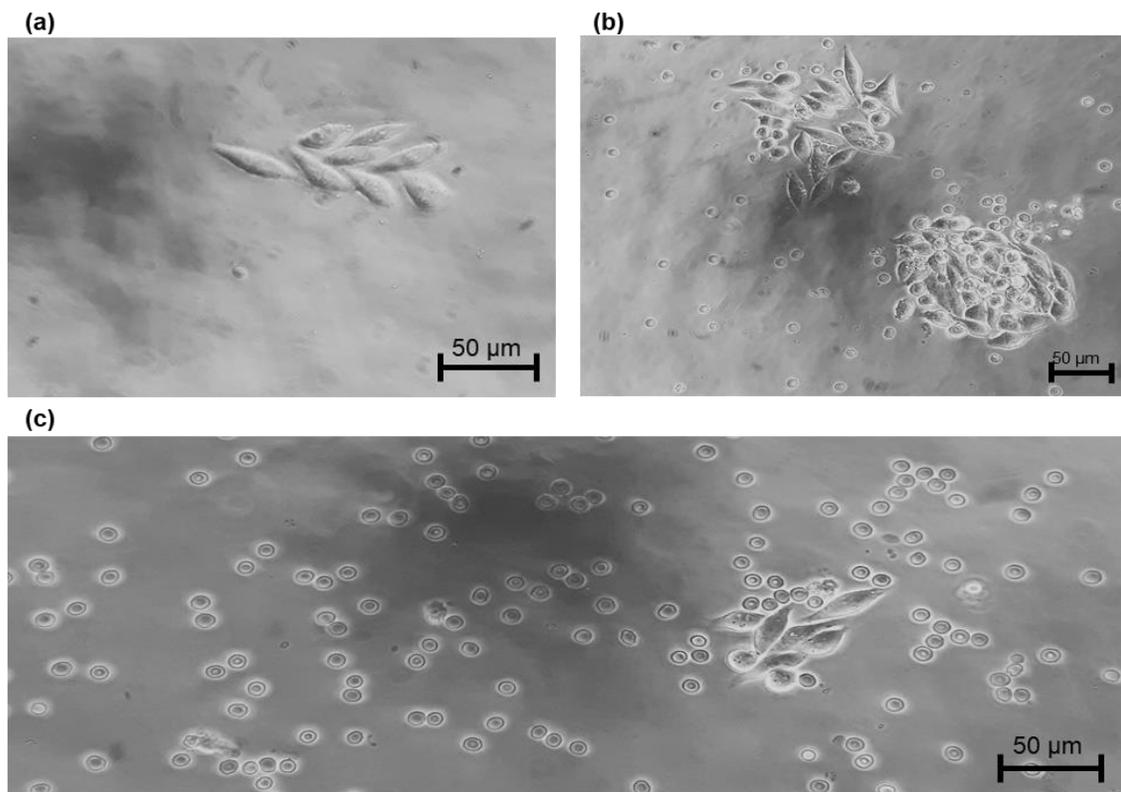


Figura 12. Colonias de células tumorales observadas a 40x obtenidas con el método de filtración. Imágenes representativas de células observadas. (a) Observación de una colonia con 8 células tumorales en un campo. (b) Observación de dos colonias con 27 y 38 células tumorales respectivamente en un campo. (c) Observación de una colonia con 8 células tumorales en un campo.

Además, se llevó a cabo un conteo celular de 100 campos a 10x con microscopio durante estos días para obtener información de cuantas células es capaz de captar el sistema utilizado a partir de la concentración inicial, y con base en ello, que tan sensible es el método y si se podría obtener un método de cuantificación a partir del mismo. Como se puede visualizar en los resultados obtenidos (**Figura 13**), las células tumorales empiezan a crecer a partir del día 2 hasta el día 10, alcanzando una aproximación al número teórico (control) entre los días 5 y 6 del cultivo.

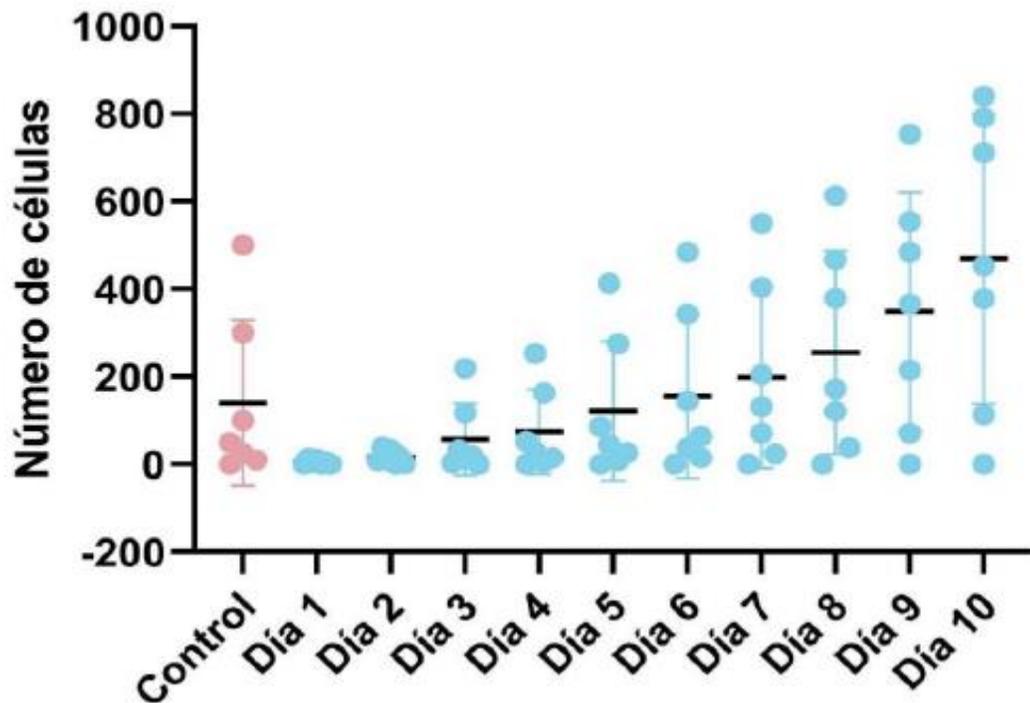


Figura 13. Crecimiento celular observado después de una filtración durante diez días. Conteo de 100 campos a 10x con microscopio, representativo de una repetición independiente. Comparación entre el número teórico (rosa) de células tumorales colocadas en la muestra y el número de células recuperadas después del filtrado (azul). Observamos la curva obtenida donde se puede observar conteos no homogéneos, donde 100 colonias pueden presentar de 750 a 1000 células.

El conteo celular que se realizó durante los 10 días de incubación se tomó como referencia para reunir en una curva (**Figura 14**) la información del número de células tumorales obtenida por número de colonias en 100 campos a 10x de las cuatro determinaciones. Se realizó la prueba r de Pearson para indicar cuán asociados se encuentran los conteos entre células y colonias. El objetivo fue demostrar que se puede obtener un método de cuantificación que permita interpolar el número de colonias de CTC que se han contado con el número de células individuales. El resultado fue una r de 0.8796, lo cual indica que existe relación en los puntos, pero no es estadísticamente significativo, por lo que no es sensible. Además, en la curva obtenida se puede observar conteos no homogéneos, donde 100 colonias pueden presentar de 750 a 1000 células.

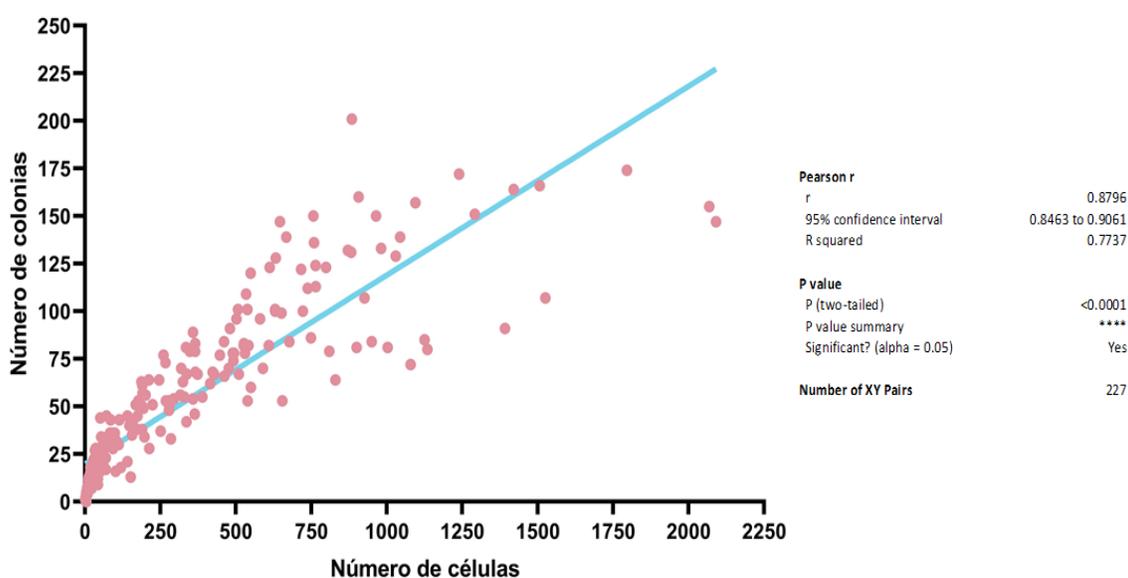


Figura 14. Número de células tumorales obtenida por número de colonias en 100 campos 10x de las cuatro determinaciones. Se realizó la prueba r de Pearson, con una r de 0.8796.

X DISCUSIÓN

Hoy en día, las CTC son consideradas como potencial biomarcador para el diagnóstico y pronóstico del cáncer, así como su uso para monitorear la respuesta al tratamiento y la detección de la enfermedad mínima residual, por lo que ha surgido una necesidad de crear métodos estandarizados que permitan detectar y aislar con eficiencia estas células.

En la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas (UIMEO), se estandarizó un método de aislamiento, cuantificación y detección de CTC en cáncer de colon. Es importante destacar que durante el proceso de cuantificación se consideraron tres puntos críticos que pueden influir en los resultados de la citometría: el primero de ellos es la manipulación de la muestra; si no se tiene el suficiente cuidado en los lavados y pases, se pueden perder las CTC. Por lo tanto, la muestra siempre se maneja con cuidado durante los lavados, éstos no serán por decantación si no con vacío; en caso de realizar un pase de muestra de un tubo a otro, evitar que quede residuo alguno en cualquiera de los tubos donde se manipulan las muestras. El segundo punto crítico es la lisis de eritrocitos, ya que, si no es adecuada, el citómetro es capaz de detectar eritrocitos por su autofluorescencia, por lo que en los gráficos (*dot plots*) no se podrán discriminar las diferentes poblaciones y, por tanto, no se detectarán las CTC. El tercer punto crítico es filtrar las muestras antes de pasarlas por el citómetro espectral, ya que, de no hacerlo, pueden quedar residuos celulares provenientes de la lisis que al pasar por el citómetro interferirán con la adquisición y causarán daño al equipo.

Respecto a la fenotipificación de las líneas celulares, parece que tanto HCT 116 como SW 620 corresponden a un fenotipo epitelial-mesenquimal mixto, ya que expresan CD133 y CD29 con mayor intensidad con respecto a otros marcadores, como CD44 y/o E-cadherina, con baja expresión, además de no expresar EpCAM ni vimentina. La literatura reporta que HCT 116 y SW 620 expresan EpCAM en un 78.3% y un 97.5%, respectivamente (127). Esto sugiere dos posibles

respuestas; la primera de ellas es que el anticuerpo utilizado no se haya acoplado a los antígenos de la célula, por lo que se tendría que probar un anticuerpo diferente. La segunda, es que las células han perdido la expresión de sus marcadores epiteliales para tener un fenotipo mesenquimal (EMT), ya que expresan CD133 y CD29, pero aún no expresan vimentina. Esto es importante porque las células CD133⁺ CD29⁺ tienen características mesenquimales que regulan al alza la autorrenovación, la proliferación y la diferenciación de la célula, siendo así marcadores de células troncales para el cáncer de colon (117). La línea celular HCT 116 suele expresar CD133 y CD44 conjuntamente, esto concuerda con datos que muestran que las células CD44⁺ CD133⁺ tienen una mayor potencia de proliferación por tener genes relacionados con las células troncales, lo que les confiere una mayor capacidad tumorigénica (128,129). Además, se ha confirmado que la expresión de CD133 en células de cáncer de colon promueve la expresión de otros genes críticos que pueden impulsar la tumorigénesis (111). En cuanto a la expresión de E-cadherina, SW 620 y HCT 116 expresan este marcador según la etapa de la EMT en la que se encuentren, debido a que el principal marcador de la EMT es la pérdida de expresión de la E-cadherina de membrana (130,131). Por lo tanto, podemos inferir que las dos líneas celulares utilizadas, tienen un fenotipo epitelial-mesenquimal mixto. Esto confirma lo que reporta Tellez, et al (108) acerca de que la EMT disminuye la expresión de antígenos de membrana, en especial EpCAM, por lo que es importante identificar a las células tumorales con más marcadores.

Para detectar y cuantificar a las CTC de cáncer de colon en sangre periférica se utilizaron los marcadores expresados por las células tumorales y fue posible identificarlas y cuantificarlas por medio de citometría espectral. Para discriminar las células tumorales de otros componentes sanguíneos, no solo se necesita un anticuerpo CD45, ya que no todas las células CD45⁻ en la sangre son células tumorales, pues las células endoteliales circulantes también pueden no expresar este marcador (119,120). Por esta razón, en nuestro laboratorio se ha propuesto un panel de anticuerpos específicos que nos permitan discriminar las células tumorales más allá del CD45.

La técnica que se propone es efectiva ya que se pueden detectar y cuantificar CTC en sangre periférica a partir incluso de 10 células/ mL tanto en células individuales como *clusters*, con una r de 0.9043 obtenida de la aplicación de la estadística r de Pearson. Este resultado nos indica que el método es sensible y reproducible. Muşină, et al (132) realizaron un estudio en 40 pacientes con CCR utilizando citometría de flujo para identificar CTC en muestras de sangre periférica. Encontraron que la citometría es una técnica que se puede utilizar para la identificación de CTC en CCR. En el estudio de Kellergi, et al (133) por otra parte, se realizó una comparación de dos métodos de detección de CTC; la selección negativa de CD45 con citometría de flujo y el sistema CellSearch®. Los resultados revelaron que la mejor tasa de detección para las CTC fue la selección negativa de CD45 con citometría de flujo (97%), mientras que el sistema CellSearch® es efectivo, pero solo para líneas celulares positivas para EpCAM (52%) y no para células con EMT. Por lo tanto, el fenotipo molecular puede influir en la recuperación de CTC según el método, como se mencionó anteriormente. De igual modo, Bahnassy, et al (134) detectó CTC en 63 pacientes con CCR mediante CellSearch® y citometría de flujo con CD44 y CD133. Los resultados muestran que la enumeración de CTC por citometría con marcadores específicos de cáncer de colon es comparable al CellSearch® en cuanto a sensibilidad y especificidad (es decir, 50.8%–90.16% y 77.42%–97%, frente a 54% y 95%, respectivamente). Por consiguiente, podemos decir que el método de citometría de flujo es efectivo para detectar las CTC en CCR.

Con respecto al panel elegido para estandarizar la técnica en este proyecto, la mayoría de los estudios que utilizaron citometría de flujo en la detección de CTC, se realizaron en muestras de sangre de pacientes con CCR con marcadores epiteliales, como EpCAM (135,136), CK20 (132) y CK5/6/8/17 (137). Recientemente, este tipo de análisis también ha mejorado por la incorporación de vimentina (138), CD133, CD54 y CD44 (139). En estos estudios se observó la presencia de CTC en el 71%-91% de los pacientes, y además las CTC identificadas mediante citometría de flujo con estos marcadores son clínicamente

relevantes; esto debido a que tienen una alta tumorigenicidad porque pueden regular al alza la autorrenovación, la proliferación y la diferenciación (135,139).

Una de las desventajas que tiene el método de citometría, de acuerdo a la literatura, es que no garantiza la confirmación de la identidad celular si el panel es muy pequeño, lo que hace que sea técnicamente difícil distinguir las CTC genuinas de los eventos falsos positivos. Wang, et al (140) y Muchlińska, et al (141) reportan los problemas para la aplicación de la citometría de flujo en este campo en particular, debido a la posible sobreestimación del número de CTC, especialmente en pacientes con un bajo número de CTC/mL de sangre. Asimismo, hacen hincapié en que la observación de la morfología celular podría ser un criterio importante para identificar una célula como CTC, y que en general, un número alto de eventos detectados combinado con la falta de verificación visual podría explicar por qué este método nunca se ha utilizado a gran escala para identificar los CTC. Sin embargo, en el presente proyecto, así como en muchos otros mencionados anteriormente, se ha demostrado que se puede identificar y cuantificar CTC con un panel de anticuerpos. Además, al conocer los puntos débiles de esta técnica, en estudios posteriores, se propone ampliar el panel de anticuerpos con CK8 y CD61 para identificar de manera más precisa las CTC en sangre periférica y con ello, llevar a cabo una detección, fenotipificación y cuantificación más sensible y precisa.

En cuanto al aislamiento de CTC en cáncer de colon por filtración, se encontraron dos puntos críticos que pueden influir en el resultado de la misma: el primero es la colocación del filtro Whatman, ya que, si no se coloca de la forma adecuada y quedan espacios vacíos en el soporte, la presión proveniente de la jeringa puede mover el filtro durante el proceso de filtrado y ocasionará que la sangre pase libremente y, por lo tanto, se pierdan las CTC durante el proceso. El segundo punto es la esterilidad del procedimiento, ya que si no se lleva a cabo en condiciones estériles dentro de una campana de flujo laminar cabe la posibilidad de contaminar el medio de cultivo y el sistema, lo que hará que se contaminen

las células recolectadas y, por lo tanto, no se puedan utilizar para expandir la población.

Las ventajas de este método de aislamiento es que es rápido, simple y confiable, sin embargo, las técnicas de filtración podrían pasar por alto células no tumorales mayores de 8 μm , siendo poco específico (142). De acuerdo con esto, en los resultados se obtuvieron no solo células tumorales, sino también cúmulos de eritrocitos que se quedaron en el filtro durante el procedimiento, por lo que el método es eficiente como se menciona, pero se obtiene baja pureza.

En el filtro Whatman obtenido de la filtración se lograron observar colonias de células tumorales, lo que quiere decir que el método funciona para aislar las CTC de sangre periférica. Un estudio realizado por Morita, et al (143) destaca que es posible aislar estas células tumorales a partir de filtros de polietileno de 15 μm de espesor y poros cónicos de 8-10 μm de diámetro, pudiendo extraer CTC con una tasa de aislamiento de hasta el 15%. Por otro lado, Dolfus, et al (142) reportan que los filtros con poros de 7.5 a 8 μm de diámetro pueden retener del 85 al 100% de las células tumorales y solo del 0.1% de las células sanguíneas. Además, Kallergi, et al (133) demostraron que la técnica ISET tiene una tasa de recuperación de 95%. En el método estandarizado, se observa que se puede retener hasta un 50% de las células tumorales después del tercer día de cultivo.

Con relación a la búsqueda de un método de cuantificación a partir del método de filtración, se realizó una curva que permitiera interpolar el número de colonias de CTC que se han contado con el número de células individuales, y de esta manera saber en el futuro cuántas células tumorales tiene el paciente en sangre (umbral de corte). Sin embargo, las células tienen un crecimiento heterogéneo, por lo que el método no es sensible para cuantificar las CTC. Además, se debe considerar que el conteo con microscopio es un método de cuantificación relativo y poco sensible, ya que depende totalmente de la persona y la experiencia que ésta tenga en identificar las células. Por esta razón, se recomienda que, para el aislamiento y cuantificación de CTC en sangre periférica, se lleven a cabo metodologías diferentes (106). Además, la baja frecuencia de CTC aunado a la

heterogeneidad observada en las células tumorales hace que la cuantificación sea muy difícil en métodos de microfiltración, por lo que esto exige una técnica diferente tanto muy sensible como dirigida a una amplia gama y variedad de CTC (124).

XI CONCLUSIONES

El establecimiento de las condiciones experimentales mostró que la citometría de flujo espectral es eficaz y sensible para detectar CTC en números similares a 10 células por mL de sangre periférica.

El método de filtración es eficaz para aislar y cultivar las CTC de sangre periférica, pero no es suficientemente sensible para ser un método de cuantificación.

XII PERSPECTIVAS

La estandarización de un método de cuantificación a partir de citometría de flujo permitirá identificar y estimar el número de CTC en sangre periférica del paciente con el objetivo de evaluar una respuesta al tratamiento y la predicción de la recurrencia y metástasis de este en un futuro cercano. Esta técnica tiene potencial para el pronóstico y monitoreo de la respuesta al tratamiento del cáncer de colon. Se propone ampliar el panel de anticuerpos en investigaciones futuras para la detección de CTC, con el objetivo de no solo detectar las células tumorales en sangre periférica del paciente de forma más sensible y precisa, si no también dar un fenotipo detallado de las células y con ello, determinar si existe una relación del fenotipo con el órgano a ser metastatizado.

La estandarización de un método de aislamiento a partir de la filtración, permitirá en un futuro separar las CTC de sangre periférica del paciente para realizar una expansión de las células aisladas a través de un cultivo y con ello, obtener una línea de células cancerígenas que sirvan para futuras investigaciones en el CCR.

XIII REFERENCIAS

1. Siegel RL, Miller KD, Goding Sauer A, Fedewa SA, Butterly LF, Anderson JC, et al. Colorectal cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2020 May [cited 2023 Feb 18];70(3):145–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32133645/>
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* [Internet]. 2011 Mar 4 [cited 2023 Feb 18];144(5):646–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21376230/>
3. Piña-Sánchez P, Chávez-González A, Ruiz-Tachiquín M, Vadillo E, Monroy-García A, Montesinos JJ, et al. Cancer Biology, Epidemiology, and Treatment in the 21st Century: Current Status and Future Challenges From a Biomedical Perspective. *Cancer Control* [Internet]. 2021 Sep 27 [cited 2023 Feb 18];28. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/10732748211038735>
4. Lee HH, Chen CH, Huang YH, Chiang CH, Huang MY. Biomarkers of Favorable vs. Unfavorable Responses in Locally Advanced Rectal Cancer Patients Receiving Neoadjuvant Concurrent Chemoradiotherapy. *Cells* 2022 [Internet]. 2022 May 11 [cited 2023 Feb 18];11(10):1611. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/11/10/1611/htm>
5. Tsai WS, Hung WS, Wang TM, Liu H, Yang CY, Wu SM, et al. Circulating tumor cell enumeration for improved screening and disease detection of patients with colorectal cancer. *Biomed J* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2023 Feb 18];44(6 Suppl 2):S190–200. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35292267/>
6. Malara N, Trunzo V, Foresta U, Amodio N, De Vitis S, Roveda L, et al. Ex-vivo characterization of circulating colon cancer cells distinguished in stem and differentiated subset provides useful biomarker for personalized metastatic risk assessment. *J Transl Med*. 2016 May 12;14(133):1–14.
7. Sun W, Huang T, Li G, Shen W, Zhu J, Jin Q, et al. The advantage of circulating tumor cells over serum carcinoembryonic antigen for predicting treatment responses in rectal cancer. *Future Oncol* [Internet]. 2013 Oct [cited 2023 Feb 18];9(10):1489–500. Available from: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.pbidi.unam.mx:2443/24106900/>
8. Cancer Today [Internet]. [cited 2022 Jul 23]. Available from: <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi->

bars?v=2020&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmssc=0&include_nmssc_other=1&type_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Atrue%252C%2522prev%2522%253Afalse%257D&orientation=horizontal&type_sort=0&type_nb_items=%257B%2522top%2522%253Atrue%252C%2522bottom%2522%253Afalse%257D#collapse-by_country

9. Burbano Luna DF, Manrique MA, Chávez García MÁ, Pérez Corona T, Hernández Velázquez NN, Escandón Espinoza YM, et al. Epidemiología del cáncer colorrectal en menores de 50 años en el Hospital Juárez de México. *Endoscopia*. 2016 Oct;28(4):160–5.
10. Le Marchand L. Genome-Wide Association Studies and Colorectal cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2009 Oct;18(4):663–8.
11. Al-Sohaily S, Biankin A, Leong R, Kohonen-Corish M, Warusavitarne J. Molecular pathways in colorectal cancer. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*. 2012;27(9):1423–31.
12. Galiano de Sánchez MT. Cáncer colorrectal (CCR). *Rev Col Gastroenterol* [Internet]. 2005 Jul [cited 2022 Jul 23];20(1):43–53. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99572005000100006
13. Wulfson adolfo M, RoJMan J. CARCINOGENESIS COLORRECTAL Nuevas perspectivas e implicancias clínicas para su detección. *Rev Méd RosaRio*. 2014;80:63–74.
14. Sanabria MC, Umaña A, Serrano ML, Sánchez M, Mesa J, Hernández GA. Vías de carcinogénesis colorrectal y sus implicaciones clínicas. *Revista Colombiana de Cancerología* [Internet]. 2012 Jan 1 [cited 2022 Jul 23];16(3):170–81. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-colombiana-cancerologia-361-articulo-vias-carcinogenesis-colorrectal-sus-implicaciones-S0123901512700148>
15. Palacio Rúa KA, Muñetón Peña CM. Bases moleculares del cáncer colorrectal. *Iatreia* [Internet]. 2012 Apr [cited 2022 Jul 23];25(2):137–48. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-07932012000200006

16. Cruz-Bustillo C. Genética molecular del cáncer colorrectal. *Rev esp enferm dig* [Internet]. 2004 Jan [cited 2022 Jul 23];96(1):48–59. Available from: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1130-01082004000100007&lng=es
17. Ibet Juárez-Vázquez C, Mónica Y, Rosales-Reynoso A, Alejandra M, Reynoso R. Cáncer colorrectal (CCR): alteraciones genéticas y moleculares ARTÍCULO DE REVISIÓN Correspondencia. *Gac Med Mex*. 2014;150:154–64.
18. Santos E, Tronick SR, Aaronson SA, Pulciani S, Barbacid M. T24 human bladder carcinoma oncogene is an activated form of the normal human homologue of BALB- and Harvey-MSV transforming genes. *Nature*. 1982 Jul 22;298(5872):343–7.
19. Graziano F, Cascinu S, Staccioli MP, Catalano V, Rossi MC, Baldelli AM, et al. Potential role and chronology of abnormal expression of the Deleted in Colon Cancer (DCC) and the p53 proteins in the development of gastric cancer [Internet]. Vol. 1, *BMC Cancer*. 2001. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/1/9>
20. Arakawa H. Netrin-1 and its receptors in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*. 2004 Dec;4(12):978–87.
21. Forcet C, Ye X, Granger L, Corset V, Shin H, Bredesen DE, et al. The dependence receptor DCC (deleted in colorectal cancer) defines an alternative mechanism for caspase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Mar 13;98(6):3416–21.
22. Fares J, Fares MY, Khachfe HH, Salhab HA, Fares Y. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduction and Targeted Therapy* [Internet]. 2020 Mar 12 [cited 2022 Aug 8];5(1):1–17. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41392-020-0134-x>
23. Zeeshan R, Mutahir Z. Cancer metastasis - tricks of the trade. *Bosn J Basic Med Sci* [Internet]. 2017 Aug 20 [cited 2022 Aug 8];17(3):172–82. Available from: <https://www.bjbms.org/ojs/index.php/bjbms/article/view/1908>
24. Aznavoorian S, Murphy AN, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA. Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis. Vol. 71, *Cancer*. 1993. p. 1368–83.
25. Fidler IJ. Cancer metastasis. *Br Med Bull*. 1991 Jan;47(1):157–77.

26. Roman C. El proceso metastásico. I: invasión local de la matriz extracelular. *Actas Dermosifiliogr.* 1999 Apr;90(4):143–55.
27. Barsky SH, Siegal GP, Jannotta F, Liotta LA. Loss of basement membrane components by invasive tumors but not by their benign counterparts. *Lab Invest.* 1983 Aug;49(2):140–7.
28. Liotta LA, Rao CN, Barsky SH. Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab Invest.* 1983 Dec;49(6):636–49.
29. Jain RK. Transport of molecules across tumor vasculature. *Cancer Metastasis Rev.* 1987;6(4):559–93.
30. Weiss L, Orr FW, Honn K V. Interactions of cancer cells with the microvasculature during metastasis. *FASEB J.* 1988 Jan;2(1):12–21.
31. Roman C. El proceso metastásico. II: diseminación tumoral directa, linfática y hemática (1ª parte). *Actas Dermosifiliogr.* 1999 Jun;90(6):277–90.
32. Rice GE, Bevilacqua MP. An inducible endothelial cell surface glycoprotein mediates melanoma adhesion. *Science.* 1989 Dec 8;246(4935):1303–6.
33. ALEXANDER JW, ALTEMEIER WA. SUSCEPTIBILITY OF INJURED TISSUES TO HEMATOGENOUS METASTASES: AN EXPERIMENTAL STUDY. *Ann Surg.* 1964 Jun;159(6):933–44.
34. Lambert AW, Pattabiraman DR, Weinberg RA. Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell* [Internet]. 2017 Feb 9 [cited 2022 Aug 8];168(4):670–91. Available from: <http://www.cell.com/article/S0092867416316099/fulltext>
35. Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, et al. The transcription factor Snail controls epithelial–mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol.* 2000 Feb 13;2(2):76–83.
36. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. Vol. 119, *Journal of Clinical Investigation.* 2009. p. 1420–8.
37. Zhang L, Huang G, Li X, Zhang Y, Jiang Y, Shen J, et al. Hypoxia induces epithelial-mesenchymal transition via activation of SNAI1 by hypoxia-inducible factor -1 α in hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer.* 2013 Mar 9;13.
38. Lundgren K, Nordenskjöld B, Landberg G. Hypoxia, Snail and incomplete epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *Br J Cancer.* 2009 Nov;101(10):1769–81.

39. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* [Internet]. 2011 Mar 4 [cited 2022 Aug 8];144(5):646–74. Available from: <http://www.cell.com/article/S0092867411001279/fulltext>
40. Aceto N, Toner M, Maheswaran S, Haber DA. En Route to Metastasis: Circulating Tumor Cell Clusters and Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Trends Cancer* [Internet]. 2015 Sep 1 [cited 2022 Aug 24];1(1):44–52. Available from: <http://www.cell.com/article/S2405803315000072/fulltext>
41. Aceto N, Bardia A, Miyamoto DT, Donaldson MC, Wittner BS, Spencer JA, et al. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell*. 2014 Aug 28;158(5):1110–22.
42. Liu X, Taftaf R, Kawaguchi M, Chang YF, Chen W, Entenberg D, et al. Homophilic CD44 interactions mediate tumor cell aggregation and polyclonal metastasis in patient-derived breast cancer models. *Cancer Discov*. 2019 Jan 1;9(1):96–113.
43. Leach J, Morton JP, Sansom OJ. Neutrophils: Homing in on the myeloid mechanisms of metastasis. *Mol Immunol*. 2019 Jun;110:69–76.
44. Coffelt SB, Kersten K, Doornebal CW, Weiden J, Vrijland K, Hau CS, et al. IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature* 2015 522:7556 [Internet]. 2015 Mar 30 [cited 2022 Aug 9];522(7556):345–8. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature14282>
45. Dumitru CA, Lang S, Brandau S. Modulation of neutrophil granulocytes in the tumor microenvironment: Mechanisms and consequences for tumor progression. *Semin Cancer Biol*. 2013 Jun;23(3):141–8.
46. Hu P, Shen M, Zhang P, Zheng C, Pang Z, Zhu L, et al. Intratumoral neutrophil granulocytes contribute to epithelial-mesenchymal transition in lung adenocarcinoma cells. *Tumor Biology*. 2015 Oct 6;36(10):7789–96.
47. Reticker-Flynn NE, Bhatia SN. Aberrant Glycosylation Promotes Lung Cancer Metastasis through Adhesion to Galectins in the Metastatic Niche. *Cancer Discov*. 2015 Feb 1;5(2):168–81.
48. Liang S, Dong C. Integrin VLA-4 enhances sialyl-Lewis^{x/a}-negative melanoma adhesion to and extravasation through the endothelium under low flow conditions. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2008 Sep;295(3):C701–7.

49. Huh SJ, Liang S, Sharma A, Dong C, Robertson GP. Transiently Entrapped Circulating Tumor Cells Interact with Neutrophils to Facilitate Lung Metastasis Development. *Cancer Res.* 2010 Jul 15;70(14):6071–82.
50. Park J, Wysocki RW, Amoozgar Z, Maiorino L, Fein MR, Jorns J, et al. Cancer cells induce metastasis-supporting neutrophil extracellular DNA traps. *Sci Transl Med.* 2016 Oct 19;8(361).
51. Tohme S, Yazdani HO, Al-Khafaji AB, Chidi AP, Loughran P, Mowen K, et al. Neutrophil Extracellular Traps Promote the Development and Progression of Liver Metastases after Surgical Stress. *Cancer Res.* 2016 Mar 15;76(6):1367–80.
52. Placke T, Örgel M, Schaller M, Jung G, Rammensee HG, Kopp HG, et al. Platelet-Derived MHC Class I Confers a Pseudonormal Phenotype to Cancer Cells That Subverts the Antitumor Reactivity of Natural Killer Immune Cells. *Cancer Res.* 2012 Jan 15;72(2):440–8.
53. Labelle M, Hynes RO. The Initial Hours of Metastasis: The Importance of Cooperative Host–Tumor Cell Interactions during Hematogenous Dissemination. *Cancer Discov.* 2012 Dec 1;2(12):1091–9.
54. Köhler S, Ullrich S, Richter U, Schumacher U. E-/P-selectins and colon carcinoma metastasis: first in vivo evidence for their crucial role in a clinically relevant model of spontaneous metastasis formation in the lung. *British Journal of Cancer* 2010 102:3 [Internet]. 2009 Dec 15 [cited 2022 Aug 9];102(3):602–9. Available from: <https://www.nature.com/articles/6605492>
55. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature.* 2008 Jul 24;454(7203):436–44.
56. Reymond N, d'Água BB, Ridley AJ. Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2013 Dec 22;13(12):858–70.
57. Kim YJ, Borsig L, Han HL, Varki NM, Varki A. Distinct selectin ligands on colon carcinoma mucins can mediate pathological interactions among platelets, leukocytes, and endothelium. *Am J Pathol.* 1999 Aug;155(2):461–72.
58. Tremblay PL, Huot J, Auger FA. Mechanisms by which E-Selectin Regulates Diapedesis of Colon Cancer Cells under Flow Conditions. *Cancer Res.* 2008 Jul 1;68(13):5167–76.
59. Wolf MJ, Hoos A, Bauer J, Boettcher S, Knust M, Weber A, et al. Endothelial CCR2 signaling induced by colon carcinoma cells enables extravasation via

- the JAK2-Stat5 and p38MAPK pathway. *Cancer Cell*. 2012 Jul 10;22(1):91–105.
60. Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, Kerkvliet N, Morris VL, Chambers AF, et al. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol* [Internet]. 1998 [cited 2022 Aug 9];153(3):865–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9736035/>
 61. Aguirre-Ghiso JA. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nature Reviews Cancer* 2007 7:11 [Internet]. 2007 Nov [cited 2022 Aug 9];7(11):834–46. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrc2256>
 62. Román C. El proceso metastásico. III: Extravasación y proliferación en el órgano diana. *Actas Dermosifiliogr*. 1999;90:343–7.
 63. Gay LJ, Malanchi I. The sleeping ugly: Tumour microenvironment's act to make or break the spell of dormancy. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2017 Aug;1868(1):231–8.
 64. Albregues J, Shields MA, Ng D, Park CG, Ambrico A, Poindexter ME, et al. Neutrophil extracellular traps produced during inflammation awaken dormant cancer cells in mice. *Science* (1979). 2018 Sep 28;361(6409).
 65. Tran DD, Corsa CAS, Biswas H, Aft RL, Longmore GD. Temporal and spatial cooperation of Snail1 and Twist1 during epithelial-mesenchymal transition predicts for human breast cancer recurrence. *Mol Cancer Res*. 2011 Dec;9(12):1644–57.
 66. Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med*. 1995 Feb;1(2):149–53.
 67. Brabletz T. To differentiate or not--routes towards metastasis. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2012 Jun [cited 2022 Aug 9];12(6):425–36. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22576165/>
 68. Picaporte-Fuentes P, Baquedano-Rodríguez J, Fernández-Bueno F. Metástasis hepáticas en cáncer colorrectal: Situación en el Hospital Central de la Defensa "Gómez Ulla" entre los años 2012 y 2017. *Sanid mil* [Internet]. 2019 [cited 2022 Aug 15];75(2):80–6. Available from: <https://scielo.isciii.es/pdf/sm/v75n2/1887-8571-sm-75-02-80.pdf>

69. Misa R, Almada M, Brito N, Martínez J, Pouy A, Haro C. Cosecha ganglionar en cáncer de colon. Mitos y magia. Rev Méd Urug [Internet]. 2020 [cited 2022 Aug 15];36(2):177–85. Available from: <http://www.scielo.edu.uy/pdf/rmu/v36n2/1688-0390-rmu-36-02-159.pdf>
70. Naito A, Iwamoto K, Ohtsuka M, Imasato M, Nakahara Y, Mikamori M, et al. Risk factors for lymph node metastasis in pathological t1b colorectal cancer. In Vivo (Brooklyn). 2021 Mar 1;35(2):987–91.
71. Ichimasa K, Kudo SE, Miyachi H, Kouyama Y, Misawa M, Mori Y. Risk stratification of T1 colorectal cancer metastasis to Lymph nodes: Current status and perspective. Vol. 15, Gut and Liver. Editorial Office of Gut and Liver; 2021. p. 818–26.
72. Cracco N, Todaro V, Pedrazzi G, Del Rio P, Haboubi N, Zinicola R. The risk of lymph node metastasis in T1 colorectal cancer: new parameters to assess the degree of submucosal invasion. Int J Colorectal Dis. 2021 Jan 8;36(1):41–5.
73. Ayuso M, Grávalos C. DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO Carcinoma Colorrectal [Internet]. Madrid: OncoSur; 2007 [cited 2022 Aug 15]. 1–82 p. Available from: https://seom.org/seomcms/images/stories/recursos/sociosyprofs/colectivos/grupocooperativo/2006/oncosur/guia_clinica_oncosur_carcinoma_colorrectal.pdf
74. Dávila D, Palacios Ó, Naranjo C. Metástasis hepáticas en el cáncer colorrectal: estrategias terapéuticas y recomendaciones actuales. Rev Colomb Cir. 2017;32:304–22.
75. de Wayne Brown M, Rodríguez Fernández Z, María Cisneros Domínguez C, Ibrahim Romero García L, Manuel Ricardo Ramírez J. Cáncer de colon con metástasis hepáticas sincrónicas. Revista Cubana de Cirugía [Internet]. 2021 Apr [cited 2022 Aug 15];60(2):970–89. Available from: <https://orcid.org/0000-0002-7021-0666>
76. Paschos KA, Majeed AW, Bird NC. Natural history of hepatic metastases from colorectal cancer--pathobiological pathways with clinical significance. World J Gastroenterol [Internet]. 2014 [cited 2022 Aug 15];20(14):3719–37. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24744570/>
77. Alhayek M. REVISIÓN SISTEMÁTICA Y META-ANÁLISIS DE LAS ESTRATEGIAS DE SEGUIMIENTO EN PACIENTES OPERADOS DE CÁNCER COLORRECTAL. [Coruña]: Univerdidade Da Coruña; 2015.

78. Brister SJ, de Varennes B, Gordon PH, Sheiner NM, Pym J. Contemporary operative management of pulmonary metastases of colorectal origin. *Dis Colon Rectum* [Internet]. 1988 Oct [cited 2022 Aug 16];31(10):786–92. Available from: https://journals.lww.com/dcrjournal/Fulltext/1988/31100/Contemporary_operative_management_of_pulmonary.9.aspx
79. Fernández Cantón I, Herrero Burgos J, Jiménez Orozco E. Manejo del pulmón metastático. In: ERGON, editor. *Manual de diagnóstico y terapéutica en neumología* [Internet]. 3rd ed. Sevilla: NEUMOSUR; 2016 [cited 2022 Aug 16]. p. 651–7. Available from: https://www.neumosur.net/files/publicaciones/ebook/55-METASTATICO-Neumologia-3_ed.pdf
80. Sardón Ramos JD, Errasti Alustiza J, Reka Mediavilla L, Cermeño Toral B, Campo Cigarras E, Sáenz de Ugarte Sobrón J, et al. Pronóstico de las metástasis pulmonares en el cáncer colorrectal. *Gaceta Médica de Bilbao* [Internet]. 2010 Jan 1 [cited 2022 Aug 16];107(1):3–7. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-gaceta-medica-bilbao-316-articulo-pronostico-metastasis-pulmonares-el-cancer-S0304485810700020>
81. Menéndez-Sánchez P, Villarejo-Campos P, Padilla-Valverde D, Menéndez-Rubio J, Rodríguez-Montes J. Marcadores tumorales en el cáncer colorrectal. *Cir Cir* [Internet]. 2013 Mar [cited 2022 Aug 20];81(2):169–75. Available from: <https://www.medigraphic.com/pdfs/circir/cc-2013/cc132p.pdf>
82. Yamashita K, Watanabe M. Clinical significance of tumor markers and an emerging perspective on colorectal cancer. *Cancer Sci* [Internet]. 2009 Feb 1 [cited 2022 Aug 20];100(2):195–9. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1349-7006.2008.01022.x>
83. Duffy MJ. Role of tumor markers in patients with solid cancers: A critical review. *Eur J Intern Med* [Internet]. 2007 May [cited 2022 Aug 20];18(3):175–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17449388/>
84. Sturgeon CM, Duffy MJ, Stenman UH, Lilja H, Brünner N, Chan DW, et al. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines for Use of Tumor Markers in Testicular, Prostate, Colorectal, Breast, and Ovarian Cancers. *Clin Chem* [Internet]. 2008 Dec 1 [cited 2022 Aug 20];54(12):e11–79. Available from: <https://academic.oup.com/clinchem/article/54/12/e11/5628632>

85. Duffy M, Van Dalen A, Haglund C, Hansson L, Holinski-Feder E, Klapdor R, et al. Tumour markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines for clinical use. *Eur J Cancer* [Internet]. 2007 Jun [cited 2022 Aug 20];43(9):1348–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17512720/>
86. Duffy M. Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: is it clinically useful? . *Clin Chem* [Internet]. 2001 Apr [cited 2022 Aug 20];47(4):624–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11274010/>
87. Lim Y, Kam M. Cribado de antígeno carcinoembrionario: ¿hasta dónde debemos llegar? . *Singapur Med* [Internet]. 2009 Sep [cited 2022 Aug 20];9:862–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19787171/>
88. Nakayama T, Watanabe M, Teramoto T, Kitajima M. CA19-9 as a predictor of recurrence in patients with colorectal cancer. *J Surg Oncol*. 1997 Dec;66(4):238–43.
89. Locker G, Hamilton S, Harris J, Jessup J, Kemeny N, Macdonald J, et al. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2006 Nov 20;24(33):5313–27.
90. Lin D, Shen L, Luo M, Zhang K, Li J, Yang Q, et al. Circulating tumor cells: biology and clinical significance. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2021 6:1 [Internet]. 2021 Nov 22 [cited 2022 Aug 22];6(1):1–24. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41392-021-00817-8>
91. Milla L. Determinación de células tumorales circulantes como factor pronóstico y detector de recidiva en carcinoma broncogénico no microcítico. [Tesis Doctoral]. [Madrid]: Universidad Complutense de Madrid; 2019.
92. Olivier Gómez C, Carballido Rodríguez J. Células tumorales circulantes: aislamiento, cuantificación y relevancia de su traslación a la práctica asistencial. *Actas Urol Esp* [Internet]. 2010 [cited 2022 Aug 22];34(1):3–5. Available from: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0210-48062010000100002&lng=es&nrm=iso&tlng=es
93. Vasseur A, Kiavue N, Bidard FC, Pierga JY, Cabel L. Clinical utility of circulating tumor cells: an update. *Mol Oncol* [Internet]. 2021 Jun 1 [cited 2022 Aug 22];15(6):1647–66. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/1878-0261.12869>

94. Barrière G, Riouallon A, Renaudie J, Tartary M, Rigaud M. Mesenchymal and stemness circulating tumor cells in early breast cancer diagnosis. *BMC Cancer*. 2012 Mar 23;12.
95. Zhou H, Zhu L, Song J, Wang G, Li P, Li W, et al. Liquid biopsy at the frontier of detection, prognosis and progression monitoring in colorectal cancer. Vol. 21, *Molecular Cancer*. BioMed Central Ltd; 2022.
96. Tsai WS, You JF, Hung HY, Hsieh PS, Hsieh B, Lenz HJ, et al. Novel Circulating Tumor Cell Assay for Detection of Colorectal Adenomas and Cancer. *Clin Transl Gastroenterol*. 2019 Oct 1;10(10):e00088.
97. Baek DH, Kim GH, Song GA, Han IS, Park EY, Kim HS, et al. Clinical potential of circulating tumor cells in colorectal cancer: A prospective study. *Clin Transl Gastroenterol*. 2019;10(7).
98. Bork U, Rahbari NN, Schölch S, Reissfelder C, Kahlert C, Büchler MW, et al. Circulating tumour cells and outcome in non-metastatic colorectal cancer: A prospective study. *Br J Cancer*. 2015 Apr 14;112(8):1306–13.
99. Wang L, Zhou S, Zhang W, Wang J, Wang M, Hu X, et al. Circulating tumor cells as an independent prognostic factor in advanced colorectal cancer: a retrospective study in 121 patients. *Int J Colorectal Dis*. 2019 Apr 1;34(4):589–97.
100. Groot Koerkamp B, Rahbari NN, Büchler MW, Koch M, Weitz J. Circulating tumor cells and prognosis of patients with resectable colorectal liver metastases or widespread metastatic colorectal cancer: a meta-analysis. *Ann Surg Oncol*. 2013 Jul;20(7):2156–65.
101. Cohen SJ, Punt CJA, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2008;26(19):3213–21.
102. Wu F, Zhu J, Mao Y, Li X, Hu B, Zhang D. Associations between the Epithelial-Mesenchymal Transition Phenotypes of Circulating Tumor Cells and the Clinicopathological Features of Patients with Colorectal Cancer. *Dis Markers*. 2017;2017.
103. Zhong Y, Ma T, Qiao T, Hu H, Li Z, Luo K, et al. Role of Phenotypes of Circulating Tumor Cells in the Diagnosis and Treatment of Colorectal Cancer. *Cancer Manag Res [Internet]*. 2021 Sep [cited 2022 Aug 23];13:7077–85. Available from: <https://doi.org/10.2147/CMAR.S316544>

104. Delgado-Ureña M, Ortega FG, Miguel-Pérez D, Rodríguez-Martínez A, García-Puche JL, Ilyine H, et al. Circulating tumor cells criteria (CyCAR) versus standard RECIST criteria for treatment response assessment in metastatic colorectal cancer patients. *J Transl Med*. 2018 Sep 6;16(1).
105. Shi J, Li Y, Liang S, Zeng J, Liu G, Mu F, et al. Analysis of circulating tumor cells in colorectal cancer liver metastasis patients before and after cryosurgery. *Cancer Biol Ther*. 2016 Sep 14;17(9):935–42.
106. Yang C, Chen F, Wang S, Xiong B. Circulating Tumor Cells in Gastrointestinal Cancers: Current Status and Future Perspectives. *Front Oncol*. 2019 Dec 13;9(1427):1–12.
107. Hu M, Wang Z, Wu Z, Ding P, Pei R, Wang Q, et al. Circulating tumor cells in colorectal cancer in the era of precision medicine. Vol. 100, *Journal of Molecular Medicine*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2022. p. 197–213.
108. Tellez- Gabriel M, Rodríguez- Calleja L, Chalopin A, Ory B, Heymann D. Circulating Tumor Cells: A Review of Non–EpCAM-Based Approaches for Cell Enrichment and Isolation. *Clin Chem [Internet]*. 2016 Apr 1 [cited 2022 Aug 24];62(4):571–81. Available from: <https://academic.oup.com/clinchem/article/62/4/571/5611746>
109. Mittal V. Epithelial Mesenchymal Transition in Tumor Metastasis. *Annu Rev Pathol*. 2018 Jan 24;13:395–412.
110. Cherciu I BAPDSA. Stem Cells, Colorectal Cancer and Cancer Stem Cell Markers Correlations. *Current Health Sciences Journal* . 2014 Aug 4;40(3):153–61.
111. Yang ZL, Zheng Q, Yan J, Pan Y, Wang ZG. Upregulated CD133 expression in tumorigenesis of colon cancer cells. *World Journal of Gastroenterology: WJG [Internet]*. 2011 Feb 2 [cited 2022 Aug 23];17(7):932. Available from: </pmc/articles/PMC3051144/>
112. Reyes EE, Gillard M, Duggan R, Wroblewski K, Kregel S, Isikbay M, et al. Molecular analysis of CD133-positive circulating tumor cells from patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *J Transl Sci [Internet]*. 2015 Jul [cited 2022 Aug 23];1(1):1–19. Available from: </pmc/articles/PMC4704802/>
113. Nomura A, Banerjee S, Chugh R, Dudeja V, Yamamoto M, Vickers SM, et al. CD133 initiates tumors, induces epithelial-mesenchymal transition and increases metastasis in pancreatic cancer. *Oncotarget [Internet]*. 2015 Apr

- 4 [cited 2022 Aug 23];6(10):8322. Available from: /pmc/articles/PMC4480754/
114. Vaiopoulos AG, Kostakis ID, Koutsilieris M, Papavassiliou AG. Colorectal Cancer Stem Cells. *Stem Cells*. 2012 Mar 14;30(3):363–71.
 115. Langan RC, Mullinax JE, Raiji MT, Upham T, Summers T, Stojadinovic A, et al. Colorectal cancer biomarkers and the potential role of cancer stem cells. *J Cancer*. 2013;4(3):241–50.
 116. Wang C, Xie J, Guo J, Manning HC, Gore JC, Guo N. Evaluation of CD44 and CD133 as cancer stem cell markers for colorectal cancer. *Oncol Rep*. 2012 Oct;28(4):1301–8.
 117. Zou J, Yu XF, Bao ZJ, Dong J. Proteome of human colon cancer stem cells: a comparative analysis. *World J Gastroenterol*. 2011 Mar 14;17(10):1276–85.
 118. Kemper K, Grandela C, Medema JP. Molecular identification and targeting of colorectal cancer stem cells. *Oncotarget*. 2010 Oct;1(6):387–95.
 119. Lustberg MB, Balasubramanian P, Miller B, Garcia-Villa A, Deighan C, Wu Y, et al. Heterogeneous atypical cell populations are present in blood of metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res*. 2014 Mar 6;16(2):R23.
 120. Adams DL, Martin SS, Alpaugh RK, Charpentier M, Tsai S, Bergan RC, et al. Circulating giant macrophages as a potential biomarker of solid tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Mar 4;111(9):3514–9.
 121. Alix-Panabières C, Pantel K. Challenges in circulating tumour cell research. *Nat Rev Cancer*. 2014 Sep;14(9):623–31.
 122. Yokobori T, Iinuma H, Shimamura T, Imoto S, Sugimachi K, Ishii H, et al. Platin3 is a novel marker for circulating tumor cells undergoing the epithelial-mesenchymal transition and is associated with colorectal cancer prognosis. *Cancer Res*. 2013 Apr 1;73(7):2059–69.
 123. Petrik J, Verbanac D, Fabijanec M, Hulina-Tomašković A, Čeri A, Somborac-Baćura A, et al. Circulating Tumor Cells in Colorectal Cancer: Detection Systems and Clinical Utility. Vol. 23, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2022.
 124. Andree KC, van Dalum G, Terstappen LWMM. Challenges in circulating tumor cell detection by the CellSearch system. *Mol Oncol [Internet]*. 2016

- Mar 1 [cited 2022 Aug 24];10(3):395–407. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1016/j.molonc.2015.12.002>
125. Campos-Segura M. Utilidad pronóstica de la detección de células tumorales circulantes (CTCS) en pacientes con tumores sólidos de origen epitelial [Internet]. [Jaén]: Universidad de Jaén; 2012 [cited 2022 Aug 24]. Available from: <https://drive.google.com/drive/folders/135CngMf4BXECGI9tottnfRU-GKLfdNVf>
 126. Castro-Giner F, Aceto N. Tracking cancer progression: from circulating tumor cells to metastasis. *Genome Medicine* [Internet]. 2020 Mar 19 [cited 2022 Aug 22];12(1):1–12. Available from: <https://genomemedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13073-020-00728-3>
 127. Zhou Y, Wen P, Li M, Li Y, Li XA. Construction of chimeric antigen receptor-modified T cells targeting EpCAM and assessment of their anti-tumor effect on cancer cells. *Mol Med Rep*. 2019;20(3):2355–64.
 128. Zhou JY, Chen M, Ma L, Wang X, Chen YG, Liu SL. Role of CD44(high)/CD133(high) HCT-116 cells in the tumorigenesis of colon cancer. *Oncotarget*. 2016 Feb 16;7(7):7657–66.
 129. Dinger TF, Chen O, Dittfeld C, Hetze L, Hüther M, Wondrak M, et al. Microenvironmentally-driven plasticity of CD44 isoform expression determines engraftment and stem-like phenotype in CRC cell lines. *Theranostics*. 2020;10(17):7599–621.
 130. Ducarouge B, Pelissier-Rota M, Lainé M, Cristina N, Vachez Y, Scoazec JY, et al. CRF2 signaling is a novel regulator of cellular adhesion and migration in colorectal cancer cells. *PLoS One*. 2013 Nov 18;8(11).
 131. Druzhkova I, Ignatova N, Prodanets N, Kiselev N, Zhukov I, Shirmanova M, et al. E-Cadherin in Colorectal Cancer: Relation to Chemosensitivity. *Clin Colorectal Cancer*. 2019 Mar;18(1):e74–86.
 132. Mușină AM, Zlei M, Mentel M, Scripcariu DV, Ștefan M, Aniței MG, et al. Evaluation of circulating tumor cells in colorectal cancer using flow cytometry. *Journal of International Medical Research* [Internet]. 2021 Nov 17 [cited 2022 Aug 23];49(9):1–13. Available from: https://drive.google.com/file/d/18iNlxqR017mlzBGdWVqpJ0r09bHJsK9L/view?usp=drive_open&usp=embed_facebook

133. Kallergi G, Politaki E, Alkahtani S, Stournaras C, Georgoulas V. Evaluation of Isolation Methods for Circulating Tumor Cells (CTCs). *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2016;40(3–4):411–9.
134. Bahnassy AA, Salem SE, Mohanad M, Abulezz NZ, Abdellateif MS, Hussein M, et al. Prognostic significance of circulating tumor cells (CTCs) in Egyptian non-metastatic colorectal cancer patients: A comparative study for four different techniques of detection (Flowcytometry, CellSearch, Quantitative Real-time PCR and Cytomorphology). *Exp Mol Pathol*. 2019 Feb;106:90–101.
135. Galizia G, Gemei M, Orditura M, Romano C, Zamboli A, Castellano P, et al. Postoperative detection of circulating tumor cells predicts tumor recurrence in colorectal cancer patients. *J Gastrointest Surg*. 2013 Oct;17(10):1809–18.
136. Tseng JY, Yang CY, Liang SC, Liu RS, Yang SH, Lin JK, et al. Interleukin-17A Modulates Circulating Tumor Cells in Tumor Draining Vein of Colorectal Cancers and Affects Metastases. *Clinical Cancer Research*. 2014 Jun 1;20(11):2885–97.
137. Tralhão JG, Hoti E, Serôdio M, Laranjeiro P, Paiva A, Abrantes AM, et al. Perioperative tumor cell dissemination in patients with primary or metastatic colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2010 Feb;36(2):125–9.
138. Lopresti A, Malergue F, Bertucci F, Liberatoscioli ML, Garnier S, DaCosta Q, et al. Sensitive and easy screening for circulating tumor cells by flow cytometry. *JCI Insight*. 2019 Jul 25;4(14).
139. Fang C, Fan C, Wang C, Huang Q, Meng W, Yu Y, et al. Prognostic value of CD133+ CD54+ CD44+ circulating tumor cells in colorectal cancer with liver metastasis. *Cancer Med*. 2017 Dec;6(12):2850–7.
140. Wang N, Shi L, Li H, Hu Y, Du W, Liu W, et al. Detection of circulating tumor cells and tumor stem cells in patients with breast cancer by using flow cytometry: a valuable tool for diagnosis and prognosis evaluation. *Tumour Biol*. 2012 Apr;33(2):561–9.
141. Muchlińska A, Smentoch J, Żaczek AJ, Bednarz-Knoll N. Detection and Characterization of Circulating Tumor Cells Using Imaging Flow Cytometry—A Perspective Study. *Cancers (Basel)*. 2022 Aug 29;14(17):4178.

142. Dolfus C, Piton N, Toure E, Sabourin JC. Circulating tumor cell isolation: the assets of filtration methods with polycarbonate track-etched filters. *Chin J Cancer Res.* 2015 Oct;27(5):479–87.
143. MORITA K, SAWABATA N, TATSUMI S, FUJII T, NISHIKAWA T, KAWAGUCHI T, et al. Verification of A New Filter for Isolation of Circulating Tumor Cells by Only Blood Filtration. *Anticancer Res.* 2022 Sep 23;42(9):4305–10.

XIV ANEXOS

14.1 ANEXO 1. Constancia de participación en el XXV Congreso Nacional de Inmunología, Querétaro, 2023



OTORGAN LA PRESENTE

CONSTANCIA

Reyna Teresa Oregon Jiménez

Por su participación como **ponente modalidad CARTEL** con el trabajo titulado:

Establishment of the quantification and purification of circulating colorectal cancer tumor cells.

**XXV Congreso Nacional de Inmunología
Querétaro 2023**

Querétaro, Qro., México, del 4 al 8 de junio del 2023


DR. JOSÉ ANTONIO ENCISO MORENO
PRESIDENTE
SOCIEDAD MEXICANA DE INMUNOLOGÍA


DR. JULIO ENRIQUE CASTAÑEDA DELGADO
SECRETARIO
SOCIEDAD MEXICANA DE INMUNOLOGÍA

14.2 ANEXO 2. Resumen del trabajo presentado en el XXV Congreso Nacional de Inmunología, Querétaro, 2023

Establishment of the quantification and purification of circulating colorectal cancer tumor cells.

Oregon Reyna^{*1,2}, Montesinos Juan José¹, Mayani Héctor¹ y Vadillo Eduardo¹

¹Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, Ciudad de México, CDMX, México. ²Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, México. reynaoregon.qfb@gmail.com

In colorectal cancer (CRC) almost 90% of mortality is currently associated with metastasis. From a clinical point of view, it is essential to develop and establish techniques that help predicting the outcome of patients with CRC and other neoplasms. The quantification of circulating tumor cells (CTC) is a test that helps in the early detection and evaluation of the response to treatment in CRC. In this project, CTC quantification and purification methods were standardized for application in CRC. Quantification of CRC cells in peripheral blood was performed by spectral flow cytometry. Purification of CTC was carried out by the pressurized peripheral blood filtration technique. Establishment of the methods indicated that spectral flow cytometry is effective and sensitive for detecting CTC in numbers less than 10 cells per mL of peripheral blood; the filtration technique is not sensitive enough for CTC quantification, but it is efficient for their isolation and culture.

14.3 ANEXO 3. Constancia de participación en el 6° Foro Estudiantil Universitario: Buenas prácticas del Servicio Social, Voluntariado Universitario y Prácticas Profesionales



Secretaría General

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
SECRETARÍA GENERAL
DIRECCIÓN GENERAL DE ORIENTACIÓN Y ATENCIÓN EDUCATIVA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



F E S
ZARAGOZA

otorga la presente

CONSTANCIA

a

REYNA TERESA OREGÓN JIMÉNEZ

Química Farmacéutico Biológica - Facultad de Estudios Superiores Zaragoza
Por su valiosa participación como
"Ponente"
Estandarización de método para el aislamiento de células
tumorales circulantes de cáncer de colon
Servicio social



6° Foro
Estudiantil Universitario
Buenas Prácticas del
Servicio Social,
Voluntariado Universitario y
Prácticas Profesionales

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd.Mx., 9 de noviembre de 2023

Dr. Vicente Jesús Hernández Abad
Director de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Dr. Germán Álvarez Díaz de León
Director General de Orientación y Atención Educativa



DIRECCIÓN GENERAL DE ORIENTACIÓN
Y ATENCIÓN EDUCATIVA



14.4 ANEXO 4. Artículo de divulgación publicado en la revista “El Infocito” de la Sociedad Mexicana de Inmunología A.C (SMI)

NO. 2



Células tumorales circulantes: Las responsables de la diseminación del cáncer.

REYNA OREGON Y EDUARDO VADILLO

El sistema inmune no solamente está encargado de combatir potenciales agentes patógenos, también se ocupa de combatir células propias que pueden generar tumores. Nuestros sistemas de defensa no siempre ganan la batalla contra el cáncer ya que los tumores tienen la capacidad de evolucionar y adaptarse a su ambiente, lo que implica la disminución de su reconocimiento por parte del sistema inmune. En consecuencia, el tumor crece y evoluciona con la posibilidad de diseminar sus células a un órgano distinto para generar un nuevo tumor. A este proceso se le conoce como metástasis, que es una complicación no siempre tardía en la evolución tumoral. Lamentablemente, la metástasis es la responsable del 90% de la mortalidad en cáncer. Los agentes responsables de la metástasis son las células tumorales circulantes (CTC). En la actualidad, su detección y conocimiento acerca de cómo diseminan los tumores a otros órganos es objeto de intensa investigación.

La cultura de la prevención:

Un enfoque clínico

Aunque nuestro sistema inmune en la mayoría de los casos es muy eficiente en el combate de tumores, es verdad que no toda nuestra salud se la debemos delegar al mismo. De manera cotidiana, estamos expuestos a distintos agentes que pueden causar cáncer; el alcohol, tabaco y la exposición prolongada a la radiación ultravioleta son algunos ejemplos. Aunado a estos agentes, uno de los grandes problemas en la sociedad actual es el sedentarismo, que promueve el aumento de peso y la inflamación, ambos

promotores del cáncer. Es importante resaltar que no por estar expuesto a estos agentes o a tener hábitos sedentarios padeceremos un cáncer, sin embargo, hay que tener en mente que algunos de nosotros podríamos tener una predisposición genética que podría activar la generación de células malignas tras exponerlas a los detonantes adecuados.

En la actualidad, la medicina está enfocada en la prevención de las enfermedades, es decir, en evitar en la medida de lo posible los factores que nos hacen más propensos a padecerlas. Otra de las estrategias en el ámbito clínico es hacer la detección oportuna de tumores, teniendo en mente que mientras más temprano se detecte un padecimiento oncológico, mayor es la probabilidad de curarse. Lamentablemente, muchos de los padecimientos en oncología se detectan en etapas tardías o no pueden detectarse con chequeos de rutina. En general, los chequeos de rutina para detectar cáncer deben ser comenzados alrededor de los 45 años de edad. Esto es fundamental puesto que las estadísticas actuales indican que algunos padecimientos oncológicos como el cáncer colorectal están siendo cada vez más frecuentes en individuos menores a 50 años.

Cada tipo de tumor es muy distinto en cuanto a su agresividad. Por ejemplo, no es lo mismo cuando se padece un cáncer de tiroides, que por lo general son poco agresivos en cuanto a la invasión y la metástasis a otros tejidos, a lidiar con tumores en el páncreas, que son invasivos, además de que las posibilidades para su

Oregon R, El Infocito No.2, 2023

03

14.5 ANEXO 5. Premio al Servicio Social “Dr. Gustavo Baz Prada”, 2023 por la participación en un programa de impacto social en la carrera de QFB

