



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**“Evaluación de la expresión de genes asociados a resistencia al 5-
Fluorouracilo en cáncer de colon y su regulación por el uso de
Trimetilglicina”**

T E S I S

Que presenta

QBP. KAREN VANESSA FERNÁNDEZ MUÑOZ

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOMEDICINA MOLECULAR

Directores de la tesis:

Dr. Marco Antonio Meraz Ríos

Dra. Mónica Graciela Mendoza Rodríguez

Ciudad de México

Agosto, 2021.

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Marco Antonio Meraz Ríos

Investigador Titular

Departamento de Biomedicina Molecular, Cinvestav-IPN.

CO-DIRECTOR DE TESIS

Dra. Mónica Graciela Mendoza Rodríguez.

Profesor del Posgrado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Estudios Superiores. Iztacala.

ASESORES.

Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda

Investigador Titular

Departamento de Biomedicina Molecular, Cinvestav-IPN.

Dra. María Carmen Sánchez Torres

Investigadora Titular

Departamento de Biomedicina Molecular, Cinvestav-IPN.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado a la C. Karen Vanessa Fernández Muñoz con número de CVU 1008708.

Adicionalmente, agradezco al Proyecto PAPIIT No. IA206421 por su apoyo brindado durante la realización de este proyecto.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Mónica Mendoza por haberme permitido trabajar en su laboratorio, por hacer que fuera posible la realización de este proyecto a pesar de la situación de la pandemia y por haberme enseñado y apoyado durante la realización de este proyecto.

Al Dr. Marco Meraz por haberme aceptado como parte de su equipo de laboratorio, por su tiempo, apoyo y consejos brindados a lo largo de la realización de este trabajo y por su preocupación hacia mi persona.

A mis asesores, el Dr. Nicolás Villegas y la Dra. Carmen Sánchez por el tiempo y apoyo brindado para la revisión de esta tesis.

A mis compañeros de laboratorio Dany y Ángel, por apoyarme con su experiencia y consejos para la realización de los experimentos.

A mis amigos de maestría Diana, Talía y Uriel por hacer más amenos los momentos de estrés durante la maestría y durante las crisis personales.

A mi hermana Vale por hacerme reír con sus locuras en los momentos de estrés.

A mi padre, por siempre motivarme a ser mejor, a luchar por lo que quiero y hacerme ver todo lo que puedo ser capaz de lograr y por siempre estar pendiente de mí.

A mi madre, por alentarme en los momentos en que me sentía triste y decaída, por motivarme a seguir cumpliendo mis sueños y por los apapachos y consideraciones cuando ya no podía del cansancio.

GRACIAS

*Dedicada a mis padres,
por su amor y apoyo incondicional*

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	- 10 -
ÍNDICE DE TABLAS	- 12 -
RESUMEN.....	- 13 -
ABSTRACT.....	- 14 -
1. INTRODUCCIÓN.....	- 15 -
1.1 Epidemiología.....	- 15 -
1.2 Factores de riesgo asociados al desarrollo del cáncer colorrectal ...	- 15 -
1.2.1 Enfermedad inflamatoria intestinal y cáncer de colon asociado a colitis.....	- 16 -
1.3 Patogénesis del cáncer colorrectal.....	- 18 -
1.4 Estadios del cáncer colorrectal.....	- 21 -
1.5 Diagnóstico del cáncer colorrectal.....	- 24 -
1.6 Tratamiento	- 26 -
1.6.1 Cirugía	- 26 -
1.6.2 Terapia sistémica	- 27 -
1.7 Resistencia a la quimioterapia.....	- 31 -
1.8 Nuevas terapias contra el cáncer colorrectal.....	- 34 -
1.9 Trimetilglicina	- 35 -
1.9.1 TMG y su potencial quimiopreventivo	- 37 -
1.9.2 TMG como posible tratamiento contra el cáncer	- 37 -
1.9.3 TMG como potencial adyuvante en la terapia contra el CCR ..	- 38 -
2. JUSTIFICACIÓN.....	- 40 -
3. HIPÓTESIS.....	- 41 -
4. OBJETIVOS.....	- 41 -

4.1 Objetivo general.....	- 41 -
4.2 Objetivos particulares	- 41 -
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	- 42 -
5.1 Búsqueda de bases de datos	- 42 -
5.1.1 Características de la base de datos seleccionada.....	- 42 -
5.2 Software utilizado para el análisis de los microarreglos	- 45 -
5.3 Plataformas utilizadas para la determinación de los procesos biológicos asociados a los GDE	- 45 -
5.4 Selección de los GDE a evaluar en un modelo de CAC.....	- 46 -
5.5 Extracción de RNA de tejidos de cáncer asociado a colitis	- 46 -
5.6 Síntesis de cDNA	- 47 -
5.7 Selección de oligonucleótidos	- 48 -
5.8 qPCR.....	- 50 -
5.9 Ensayos de viabilidad celular	- 51 -
5.10 Análisis estadístico	- 52 -
6. RESULTADOS.....	- 53 -
6.1 Expresión diferencial de acuerdo con la respuesta de los pacientes a la terapia con FOLFOX4	- 53 -
6.2 Procesos biológicos en los que se encuentran involucrados los GDE en los pacientes que NRFX4.....	- 56 -
6.3 Selección de los GDE a evaluar en el modelo de CAC.....	- 57 -
6.4 Evaluación de los genes sobreexpresados seleccionados en el modelo de CAC.....	- 58 -
6.5 Evaluación de los genes subexpresados seleccionados en el modelo CAC-	64 -
6.6 Efecto de la TMG sobre la viabilidad celular	- 67 -

7. DISCUSIÓN	- 68 -
8. CONCLUSIONES	- 79 -
9. PERSPECTIVAS	- 79 -
10. REFERENCIAS.....	- 79 -

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Alteraciones en las CEI que favorecen la oncogénesis en el CAC.....	- 18 -
Figura 2. Tipos de pólipos.....	- 19 -
Figura 3. Vías para el desarrollo del CCR.....	- 20 -
Figura 4. Estadios del CCR.....	- 21 -
Figura 5. Mecanismo de acción del 5-FU.....	- 29 -
Figura 6. Principales mecanismos de resistencia a la quimioterapia.....	- 34 -
Figura 7. Estructura molecular de la TMG.....	- 36 -
Figura 8. TMG como adyuvante al 5-FU en un modelo murino de CAC.....	- 39 -
Figura 9. Diseño experimental de la inducción de CAC y los diferentes tratamientos en un modelo murino.	- 47 -
Figura 10. PCA de los pacientes con CCR de acuerdo con su respuesta a FOLFOX4.....	- 53 -
Figura 11. Agrupación de los pacientes de acuerdo con su expresión génica diferencial conforme a su respuesta a FOLFOX4.....	- 54 -
Figura 12. GDE en los pacientes que NRFX4 con respecto a los pacientes que RFX4.....	- 55 -
Figura 13. PB en los que están involucrados los GDE en los pacientes que NRFX4 utilizando la plataforma WEBGESTALT.....	- 56 -
Figura 14. Niveles de expresión relativa del gen Hmga2 en los diferentes tejidos de ratones.....	- 59 -
Figura 15. Niveles de expresión relativa del gen Slc7a11 en los diferentes tejidos de ratones.....	- 60 -
Figura 16. Niveles de expresión relativa del gen Gjb2 en los diferentes tejidos de ratones.....	- 61 -
Figura 17. Niveles de expresión relativa del gen Eif3h en los diferentes tejidos de ratones.....	- 62 -
Figura 18. Niveles de expresión relativa del gen Trim31 en los diferentes tejidos de ratones.....	- 63 -

Figura 19. Niveles de expresión relativa del gen Filip11 en los diferentes tejidos de ratones.....	- 65 -
Figura 20. Niveles de expresión relativa del gen Gbp1 en los diferentes tejidos de ratones.....	- 66 -
Figura 21. Efecto de la TMG sobre la viabilidad celular en la línea de CCR HCT-116.....	- 67 -

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estadios del CCR.....	- 22 -
Tabla 2. Régimen de la terapia con FOLFOX4.....	- 43 -
Tabla 3. Criterios para la selección de los pacientes.....	- 43 -
Tabla 4. Características de los pacientes.....	- 44 -
Tabla 5. Mezcla de reacción para la síntesis de cDNA.....	- 48 -
Tabla 6. Condiciones de reacción para la síntesis de cDNA.....	- 48 -
Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados para la qPCR.....	- 48 -
Tabla 8. Mezcla de reacción para qPCR.....	- 50 -
Tabla 9. Protocolo para equipo BioRad CFX1000.....	- 50 -
Tabla 10. Temperaturas de alineamiento para la qPCR de cada gen a evaluar.....	- 51 -
Tabla 11. Genes seleccionados para evaluar en un modelo murino de CAC.....	- 57 -

RESUMEN

El cáncer colorrectal (CCR) es una enfermedad con elevadas tasas de incidencia y mortalidad, por lo que representa un grave problema de salud. Actualmente, los tratamientos disponibles presentan bajas tasas de efectividad debido a la quimio-resistencia que pueden presentar las células cancerosas, por lo que surge la necesidad de encontrar nuevos compuestos que sean utilizados como adyuvantes a la terapia principal y que ayuden a aumentar la eficacia de los tratamientos. La trimetilglicina (TMG) es un compuesto natural con propiedades antiinflamatorias que ha demostrado potenciar el efecto del quimioterapéutico 5-fluorouracilo (5-FU) cuando se utiliza en terapia combinada en un modelo in vivo de cáncer de colon asociado a colitis (CAC). Este hecho sugiere que la TMG pudiera actuar mediante la regulación de genes que podrían estar asociados a quimio-resistencia. En el presente trabajo se realizó un análisis bioinformático a partir de microarreglos provenientes de tumores de pacientes con CCR, que fueron sometidos a quimioterapia que tenía como base al 5-FU. Los pacientes se clasificaron de acuerdo con su respuesta al tratamiento con la finalidad de seleccionar genes que pudieran estar involucrados con la falta de respuesta de los pacientes a la terapia, para después validar su expresión en tejidos provenientes de ratones con CAC y su posible regulación mediante el uso de TMG en combinación con el 5-FU. En el presente trabajo se demostró que la TMG es capaz de regular la expresión de genes asociados a quimio-resistencia como lo son HMGA2, SLC7A11, GJB2 y GBP1, cuando es utilizada en combinación con el 5-FU en el modelo de CAC, además de inhibir la proliferación celular in vitro.

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is a disease with high incidence and mortality rates, which represents a serious health problem. Currently, the available treatments have low rates of effectiveness due to the chemoresistance that cancer cells can present, thereby, it is necessary to find new compounds that can be used as adjuvants to the main therapy and that help to increase the effectiveness of the treatments. Trimethylglycine (TMG) is a natural compound with anti-inflammatory properties that has been shown to enhance the effect of the chemotherapeutic 5-fluorouracil (5-FU) when is used in combination therapy in an *in vivo* model of colitis-associated colon cancer (CAC). This fact suggests that TMG could act by regulating genes that could be associated with chemoresistance. In the present work, a bioinformatic analysis was carried out from microarrays from tumors of patients with CRC, who underwent chemotherapy based on 5-FU. The patients were classified according to their response to treatment in order to select genes that could be involved with the lack of response of patients to therapy, to later validate their expression in tissues from mice with CAC and its possible regulation through the use of TMG in combination with 5-FU. In the present work it was demonstrated that TMG can regulate the expression of genes associated with chemoresistance such as HMGA2, SLC7A11, GJB2 and GBP1, when it is used in combination with 5-FU in the CAC model, in addition to inhibiting cell proliferation *in vitro*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Epidemiología

El cáncer colorrectal (CCR) representa un grave problema de salud a nivel mundial. En el año 2020 fue reportado como el segundo tipo de cáncer con mayor porcentaje de mortalidad e incidencia, tanto en hombres como mujeres, tan solo por debajo de los datos reportados en cáncer de pulmón (Sung et al., 2021); en México, los datos reportados para el CCR, no son tan diferentes ya que se encuentra entre los primeros 3 tipos de cáncer más frecuentes en nuestra población, con tasas de mortalidad de 9 y 6.9 por cada 100,000 individuos en hombres y mujeres, respectivamente (*Global Cancer Observatory* [GLOBOCAN], 2020). En México se ha reportado un incremento de incidencia de más del 70% del año 2000 al año 2015, siendo los estados de Chiapas, Chihuahua, CDMX, Sonora y Baja California los que tenían mayor incidencia de CCR y mayor mortalidad a causa de esta neoplasia (Aldaco-Sarvide et al., 2018)

1.1 Factores de riesgo asociados al desarrollo del cáncer colorrectal

El CCR es una enfermedad que puede afectar a cualquier persona a lo largo de su vida, sin embargo, existen factores de riesgo modificables y no modificables que predisponen a la población a padecer este tipo de cáncer (Thanikachalam & Khan, 2019). Dentro de los factores de riesgo modificables se encuentran: fumar, alto consumo de carnes rojas y carnes procesadas, consumo de alcohol, baja ingesta de frutas y verduras, sedentarismo y obesidad (Kuipers et al., 2015; Dekker et al., 2019). Algunos alimentos como la carne, las grasas y el alcohol aumentan la formación de radicales libres en el intestino, generando especies reactivas de oxígeno (ROS), además de producirse otros metabolitos, por ejemplo, productos obtenidos de la degradación de lípidos que tienen actividad genotóxica, favoreciendo el desarrollo de cáncer, al generar mutaciones (Berlau et al., 2004).

En lo que corresponde a los factores de riesgo no modificables, dentro de estos se encuentran el género, estadísticamente el hombre tiene una mayor

predisposición al desarrollo del CCR. El tipo de raza es otro factor que se asocia, siendo la población afroamericana la más susceptible. Adicionalmente, el padecer diabetes mellitus tipo 2 o alguna enfermedad inflamatoria intestinal (IBD, de sus siglas en inglés, *Inflammatory Bowel Diseases*), la colitis ulcerativa (CU) o enfermedad de Crohn (EC) también predispone a los individuos a padecer CCR (Dekker et al., 2019; Thanikachalam & Khan, 2019). Otro factor de riesgo asociado a este tipo de neoplasia son infecciones previas con *Fusobacterium nucleatum* y *Bacteroides fragilis*, ya que se sabe favorecen el desequilibrio de la biota intestinal aumentando el riesgo de padecer CCR (Gao et al., 2017). Los factores de tipo hereditarios para padecer CCR, representan alrededor del 10-20% de los casos, o padecer síndromes hereditarios como el síndrome de Lynch (SL) y el síndrome de la poliposis familiar adenomatosa (PFA), que representan entre 5-7% de los casos, siendo estos los de menor incidencia (Dekker et al., 2019).

1.1.1 Enfermedad inflamatoria intestinal y cáncer de colon asociado a colitis

Las IBD, que comprenden a la CU y a la EC, son un factor de riesgo importante que predispone a quienes las padecen a desarrollar una forma de CCR conocida como cáncer de colon asociado a colitis (CAC) (Francescone, et al., 2015). Estas 2 enfermedades se caracterizan por una inflamación crónica recurrente con episodios de remisión y reincidencia (Y. Z. Zhang & Li, 2014), y aunque, la patogénesis de ambas enfermedades aún no está del todo clara, parece estar relacionada principalmente con una desregulación del sistema inmunológico en respuesta a cambios en la microbiota comensal del intestino y a alteraciones en la permeabilidad de la barrera intestinal, que permiten el paso de bacterias y sus metabolitos hacia la mucosa, causando la activación del sistema inmunológico (Sairenji et al., 2017; Yao et al., 2019).

El padecer una IBD aumenta entre 2-6 veces la probabilidad de desarrollar CCR. (Keller et al., 2019). Existen diversos factores que influyen para que un paciente con IBD desarrolle CAC, como es la edad del diagnóstico de la

enfermedad y duración de la misma, así como la extensión de la inflamación en la mucosa intestinal y la porción del intestino que se vea afectada (Shawki et al., 2018). El CAC solo corresponde alrededor del 2% de las muertes totales por CCR, sin embargo, representa del 10-15% de las muertes en los pacientes con IBD, además, a diferencia del CCR esporádico no asociado a colitis, su tasa de incidencia tiende a ir incrementando (Keller et al., 2019).

Lo mencionado con anterioridad, permite establecer que existe un vínculo entre la inflamación y el desarrollo de cáncer. Durante la inflamación crónica, hay una cantidad considerable de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS/RNI) debido a que son generadas por las células del sistema inmune innato (figura 1). Estos ROS/RNI tienen la capacidad de interactuar con el DNA de las CEI, causándoles daños como rupturas, ya sea en una o en ambas cadenas, generación de sitios abásicos y modificación de nucleótidos, que pueden generar mutaciones o rupturas del DNA, por lo que si estas alteraciones se producen en oncogenes o en genes supresores de tumores, se favorecerá la generación del cáncer (Luo & Zhang, 2017; Waldner & Neurath, 2015).

Adicionalmente, las citocinas producidas por el sistema inmunológico activan moléculas involucradas en inhibición de apoptosis como lo es NF- κ B y STAT3, así como vías de señalización involucradas en proliferación y supervivencia como lo es la vía PI3K/AKT, la vía de las MAP cinasas y la vía Wnt/ β -catenina (figura 1) (Kang & Martin, 2017; Waldner & Neurath, 2015). Algunos ejemplos de las citocinas que tienen una mayor participación en el desarrollo de CAC son TNF- α , IL-6, IL-1, IL-17, IL-23 e IL-22 (Francescone et al., 2015). Debido al papel que desempeña la inflamación en el desarrollo del CCR, los compuestos con propiedades antiinflamatorias podrían representar una buena estrategia para la prevención y tratamiento del CCR (Zappavigna et al., 2020).

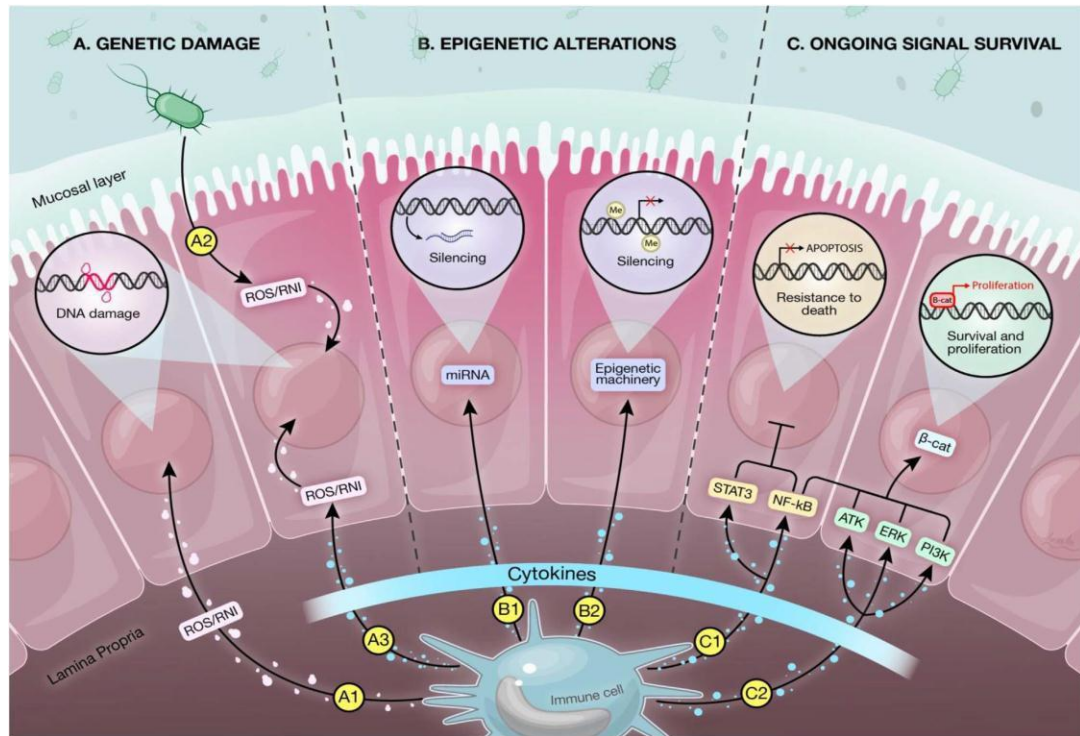


Figura 1. Alteraciones en las CEI que favorecen la oncogénesis en el CAC. Las células del sistema inmune favorecen el desarrollo del cáncer gracias a varios mecanismos como lo es la producción de ROS/RNI causando daño en el DNA y la aparición de mutaciones. Por otro lado, las citocinas que se producen generan cambios a nivel epigenético que incluye el silenciamiento de la expresión génica, así como la activación de vías de señalización que inhiben la apoptosis y favorecen la supervivencia y proliferación (Kang & Martin, 2017).

1.2 Patogénesis del cáncer colorrectal

Los diversos factores de riesgo genéticos y ambientales, favorecen el desarrollo de cáncer debido a que contribuyen a la adquisición de mutaciones genéticas y alteraciones epigenéticas que se van acumulando de manera progresiva y que conllevan a la activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumores (Kuipers et al., 2015). El CCR de tipo esporádico, se desarrolla generalmente a partir de pólipos, que son crecimientos localizados o agregaciones de células anormales dentro de la mucosa, que sobresalen hacia la luz intestinal (Simon, 2016). Estas lesiones

se consideran precursores neoplásicos, que de manera eventual pueden progresar a CCR, lo cual sucede en un periodo de tiempo largo, entre 10-15 años y solo un pequeño porcentaje de los pólipos tiene la capacidad de desarrollar una malignidad (Dekker et al., 2019).

Existen dos tipos principales de pólipos que tienen potencial maligno: los pólipos adenomatosos y pólipos sésiles serrados. Los adenomas se caracterizan por presentar displasia, son grandes y tienen un alto potencial de albergar células cancerosas (figura 2B), mientras que los pólipos serrados son planos, con bordes dentados (Simon, 2016) (figura 2A).

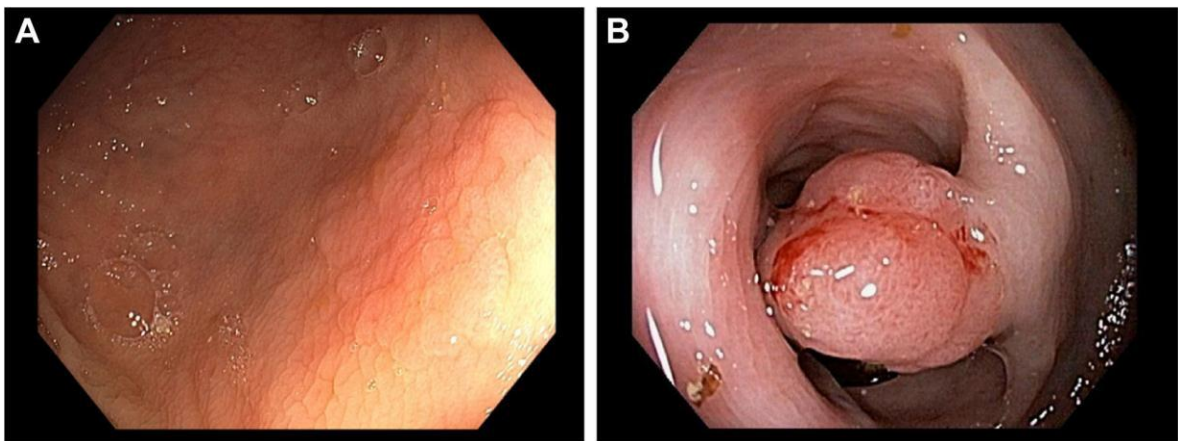


Figura 2. Tipos de pólipos. A) Pólipos serrados planos. B) Pólipos adenomatosos (Simon, 2016).

De acuerdo al tipo de pólipo que se presenta, se puede desarrollar CCR a través de la vía clásica o tradicional adenoma-carcinoma que corresponde alrededor del 70-90% de todos los casos y la vía de la neoplasia serrada que se presenta en el 10-20% (Dekker et al., 2019) (figura 3).

En la vía adenoma-carcinoma, también conocida como la vía de la inestabilidad cromosómica (CIN), generalmente la primera mutación que se presenta es en el gen supresor de tumores *APC*. Posteriormente, se adquieren mutaciones en el oncogén *KRAS*, cuyos efectos se manifiestan en procesos como el crecimiento celular, diferenciación, movilidad y supervivencia. A lo largo del tiempo, estas mutaciones pueden causar la pérdida de *TP53*,

considerado un regulador maestro de la transcripción y apoptosis, derivando así en un cáncer (Weitz et al., 2005).

En la vía de la neoplasia serrada, una de las primeras mutaciones que se presenta es en el gen que codifica para β -catenina, seguida por alteraciones en *BRAF*, modificando el crecimiento celular e inhibiendo apoptosis. Pueden presentarse mutaciones en *KRAS*, pero son menos frecuentes en comparación con la vía adenoma-carcinoma. Adicionalmente, esta vía se caracteriza por presentar alteraciones epigenéticas que involucran la hipermetilación aberrante en las islas CpG (CIMP) de la región promotora de ciertos genes, inhibiendo así su transcripción (Domenica et al., 2019).

Otra de las alteraciones que pueden presentarse en el CCR es la inestabilidad de microsatélites (MSI), causada por alteraciones en genes implicados en la reparación del DNA, específicamente en el mecanismo de reparación del mal apareamiento de bases o “mismatch repair” (MMR) y puede presentarse tanto en los pólipos adenomatosos como en los serrados (figura 3) (Beaugerie & Itzkowitz, 2015; Kuipers et al., 2015). La MSI puede presentarse debido a mutaciones en los genes que participan en el MMR (en el caso del SL), o por hipermetilación de la región promotora del gen *MLH1* que participa en el MMR (en el caso de CCR esporádico) (Kuipers et al., 2015; Simon, 2016).

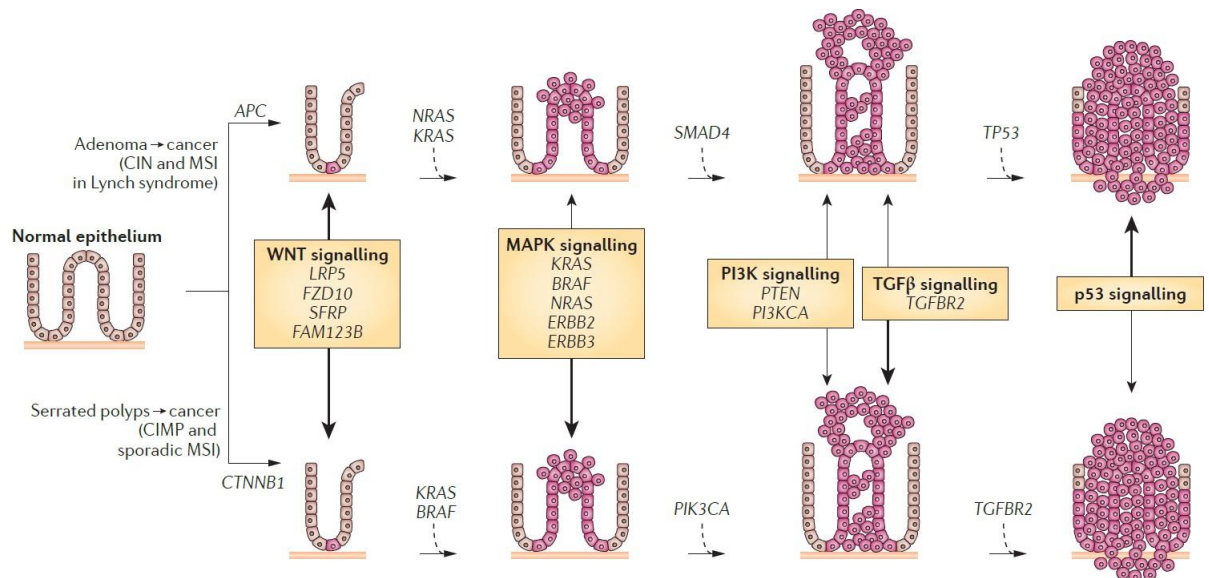


Figura 3. Vías para el desarrollo del CCR. Se muestran las dos vías

principales mediante las cuales las células epiteliales intestinales (CEI) normales se convierten en cancerosas. En la parte superior se observa la vía adenoma-carcinoma que se caracteriza por presentar CIN. La primera mutación que se presenta en esta vía es en el gen *APC*, posteriormente en *KRAS*, seguida de *SMAD4* y finalmente en *TP53*. En la parte inferior se muestra la vía pólipos serrados-carcinoma que se caracteriza por CIMP, así como de mutaciones en *BRAF*. En ambas vías se puede presentar MSI. Las vías de señalización que se ven desreguladas durante el proceso de carcinogénesis se muestran en recuadros amarillos y el grosor de la línea indica la importancia de la vía de señalización durante este proceso (Kuipers et al., 2015).

1.3 Estadios del cáncer colorrectal

La estadificación del CCR permite a los médicos describir donde está ubicado el tumor, si se ha diseminado y si está afectando otras partes del cuerpo. Los estadios de CCR se enumeran del 0 al 4 (figura 4) (American Society of Clinical Oncology [ASCO], 2021).

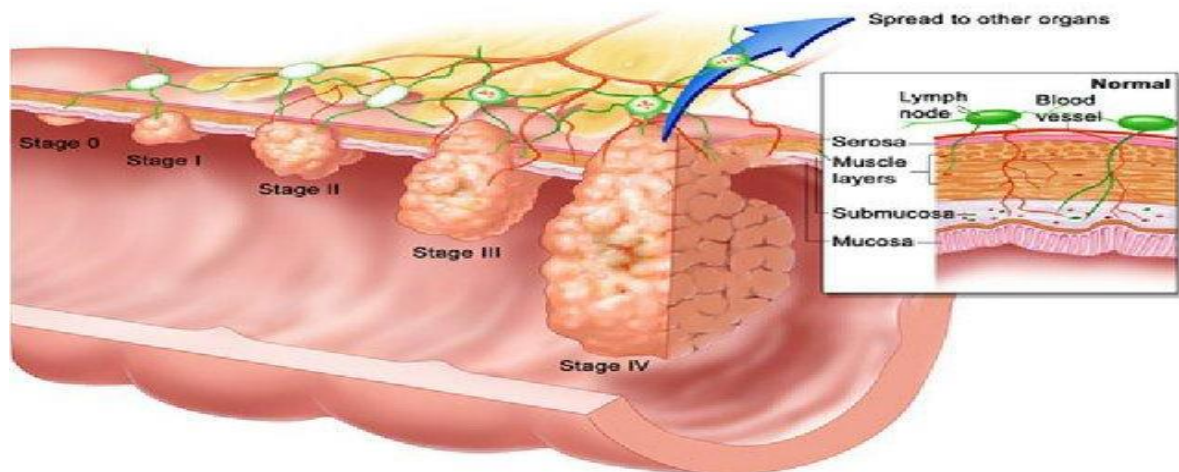


Figura 4. Estadios del CCR. Se muestran los diferentes estadios de CCR que abarcan del 0 al 4, entre más alto sea el número, mayor será la propagación del cáncer. En la figura se señala, dependiendo el estadio, las capas del revestimiento del intestino que se ven afectadas, así como si se han afectados

ganglios linfáticos o si se ha diseminado a otros órganos. (Nation Cancer Institute Website, 2009).

El sistema de estadificación que se emplea con más frecuencia para el CCR es el sistema TNM del *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) que se basa en tres piezas clave de información: el tamaño del tumor (T), la propagación a ganglios linfáticos (N) y la propagación a sitios distantes o metástasis (M) (American Cancer Society [ACS], febrero de 2018). A continuación, se muestra la tabla 1 que resume los diferentes estadios del CCR:

Tabla 1. Estadios del CCR.

Etapa	Agrupamiento para establecer la etapa	Descripción de la etapa
0	Tis N0 M0	El cáncer se encuentra en su etapa más temprana. Esta etapa también se conoce como carcinoma in situ. No ha crecido más allá de la capa interna (mucosa) del colon o del recto.
I	T1 o T2 N0 M0	El cáncer ha crecido a través de la capa muscular de la mucosa (muscularis mucosae) hasta la submucosa (T1), y también es posible que haya crecido hasta la muscular propia (T2). No se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (N0), ni a sitios distantes (M0).
IIA	T3 N0 M0	El cáncer ha crecido hacia las capas más externas del colon o del recto, pero no ha atravesado estas capas (T3). No ha alcanzado órganos adyacentes. No se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (N0), ni a sitios distantes (M0).
IIB	T4a N0 M0	El cáncer ha crecido a través de la pared del colon o del recto, pero no ha crecido hacia otros tejidos u órganos adyacentes (T4a). El cáncer aún no se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (N0) ni a sitios distantes (M0).
IIC	T4b N0 M0	El cáncer ha crecido a través de la pared del colon o del recto y está unido o crece hacia otros tejidos u órganos adyacentes (T4b). El cáncer aún no se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (N0) ni a sitios distantes (M0).
IIIA	T1 o T2 N1/N1c M0	El cáncer ha crecido a través de la mucosa hasta la submucosa (T1) y también es posible que haya crecido hasta la muscular propia (T2). Se propagó a entre 1 y 3 ganglios linfáticos adyacentes (N1) o hacia áreas de grasa cercanas a los ganglios linfáticos, pero no a los ganglios en sí (N1c). No se ha propagado a sitios distantes (M0).
	0	
	T1 N2a M0	El cáncer ha atravesado la mucosa hasta la submucosa (T1). De 4 a 6 ganglios linfáticos cercanos están afectados por la propagación del cáncer (N2a). No se ha propagado a sitios distantes (M0).

IIIB	T3 o T4a, N1/N1c M0	El cáncer ha crecido hacia las capas más externas del colon o del recto (T3), o a través del peritoneo visceral (T4a), pero no ha alcanzado los órganos adyacentes. Se propagó a entre 1 y 3 ganglios linfáticos adyacentes (N1a o N1b) o hacia áreas de grasa cercanas a los ganglios linfáticos, pero no a los ganglios en sí (N1c). No se ha propagado a sitios distantes (M0).
	o	
	T2 o T3 N2a M0	El cáncer ha crecido hacia la muscular propia (T2) o hacia las capas más externas del colon o del recto (T3). De 4 a 6 ganglios linfáticos cercanos están afectados por la propagación del cáncer (N2a). No se ha propagado a sitios distantes (M0).
o		
	T1 o T2, N2b M0	El cáncer ha crecido a través de la mucosa hasta la submucosa (T1) y también es posible que haya crecido hasta la muscular propia (T2). Se propagó a siete o más ganglios linfáticos adyacentes (N2b). No se ha propagado a sitios distantes (M0).
IIIC	T4a N2a M0	El cáncer ha crecido a través de la pared del colon o del recto (incluyendo el peritoneo visceral), pero no ha alcanzado los órganos adyacentes (T4a). De 4 a 6 ganglios linfáticos cercanos están afectados por la propagación del cáncer (N2a). No se ha propagado a sitios distantes (M0).
	o	
	T3 o T4a N2b M0	El cáncer ha crecido hacia las capas más externas del colon o del recto (T3), o a través del peritoneo visceral (T4a), pero no ha alcanzado los órganos adyacentes. Se propagó a siete o más ganglios linfáticos adyacentes (N2b). No se ha propagado a sitios distantes (M0).
	o	
	T4b N1 o N2 M0	El cáncer ha crecido a través de la pared del colon o del recto y está unido o crece hacia otros tejidos u órganos adyacentes (T4b). Se propagó por lo menos a un ganglio linfático cercano o hacia áreas de grasa cercanas a los ganglios linfáticos (N1 o N2). No se ha propagado a sitios distantes (M0).
IVA	Cualquier T Cualquier N M1a	El cáncer pudo o no haber crecido a través de la pared del colon o del recto (Cualquier T). Podría o no haberse propagado a los ganglios linfáticos adyacentes. (Cualquier N). El cáncer se propagó a un órgano distante (tal como el hígado o el pulmón) o a un grupo de ganglios linfáticos distantes, pero no se ha propagado a partes distantes del peritoneo (M1a).
IVB	Cualquier T Cualquier N M1b	El cáncer pudo o no haber crecido a través de la pared del colon o del recto (Cualquier T). Podría o no haberse propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (Cualquier N). El cáncer se propagó a más de un órgano distante (tal como el hígado o el pulmón) o a un grupo de ganglios linfáticos distantes, pero no se ha propagado a partes distantes del peritoneo (M1b).
IVC	Cualquier T Cualquier N M1c	El cáncer pudo o no haber crecido a través de la pared del colon o del recto (Cualquier T). Podría o no haberse propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (Cualquier N). Se ha propagado a partes distantes del peritoneo y puede o

		no haberse propagado a órganos o a ganglios linfáticos distantes (M1c).
--	--	---

ACS (febrero de 2018)

Alrededor del 20% de los pacientes con CCR son diagnosticados en etapa metastásica o estadio IV. Además, alrededor del 35-45% de los pacientes que fueron diagnosticados en estadios II y III presentarán recurrencia dentro de los primeros 5 años después de haber sido intervenidos mediante cirugía, de los cuales, la mayoría presentará recurrencia metastásica (Tauriello et al., 2017). Las tasas de supervivencia a 5 años de acuerdo con el estadio en que se encuentre el CCR son: 100% en estadio 0, entre 90-100% en estadio I, entre 30-75% en estadio II, entre 30-60% en estadio III y solo alrededor del 3% en estadio IV (Ahmed, 2020).

1.4 Diagnóstico del cáncer colorrectal

El método de elección para el diagnóstico de CCR es la colonoscopia, no obstante, existen algunos otros menos invasivos. A continuación, se enlistan algunos de los métodos que permiten el diagnóstico del CCR de manera integral:

- Síntomas clínicos

Dentro de los síntomas clínicos se encuentran sangrado rectal, cambios en los hábitos intestinales, anemia y dolor abdominal, sin embargo, una gran mayoría de los pacientes permanecen asintomáticos hasta que el cáncer se encuentra ya en una etapa avanzada (Cappell, 2008). Por otro lado, el sangrado rectal puede deberse a otras afecciones no necesariamente malignas, por lo que se deben investigar otros factores de riesgo asociados con CCR y determinar si es necesaria una colonoscopia (Dekker et al., 2019).

- Colonoscopia:

Es el estándar de oro para el diagnóstico de CCR, además de que es la única técnica de detección que tiene un efecto diagnóstico y terapéutico, aunado a que permite la toma de biopsias que ayudan a la confirmación histológica del

diagnóstico y proporciona el material para establecer el perfil molecular del tumor (Kuipers et al., 2015). Esta metodología es capaz de detectar lesiones cancerosas y precancerosas, así como de removerlas al momento de la detección, además, permite evaluar tanto las porciones proximales y distales del colon (Ahmed, 2020). Dentro de sus limitaciones se encuentran el hecho de que es un procedimiento invasivo, que requiere una previa preparación del intestino, el uso de anestesia y la presencia de un acompañante al momento de hacer el procedimiento. Aunado a esto, existe el riesgo de que ocurra una perforación del intestino durante el procedimiento y riesgo de sangrado. Sin embargo, la colonoscopia sigue siendo el mejor método para la detección de CCR (Simon, 2016).

- Colonografía por tomografía computarizada

Esta metodología se utiliza solamente en pacientes que no son buenos candidatos para una colonoscopia debido a comorbilidades o algunos problemas estructurales en el intestino que impidan una óptima examinación del colon. Este método se basa en la utilización de un software para crear una imagen tridimensional del colon que ayude a identificar las lesiones (Kuipers et al., 2015). Como ventajas permite la visualización de todo el colon, al igual que la colonoscopia, pero sin necesidad de sedación y de una manera semi invasiva, no obstante, entre las limitaciones se encuentran el hecho de que requiere de igual modo preparación del intestino, además de que se utiliza radiación ionizante (Simon, 2016).

- Pruebas de sangre oculta en heces

Existen dos pruebas para detectar a la hemoglobina como un marcador de sangre oculta en heces: FOBT (test de sangre oculta en heces) y FIT (test inmunohistoquímico fecal). El FOBT se basa en la detección de la actividad peroxidasa del grupo hemo presente en la hemoglobina, en contraste con FIT, donde se utiliza un anticuerpo específico contra la hemoglobina humana, lo que lo hace más específico que el FOBT (Ahmed, 2020; Kuipers et al., 2015). Ambas pruebas tienen la ventaja de que pueden realizarse en casa, no son

invasivas y no requieren preparación previa del intestino. Dentro de las limitaciones se encuentran el hecho de que hay lesiones que sangran solamente de manera esporádica, lo que podría dar resultados falsos negativos, ya que algunas lesiones que se generan en etapas tempranas sangran de manera menos frecuente, por lo que es más probable que estos test detecten un sangrado en etapas más avanzadas del cáncer (Simon, 2016).

- Estudios de laboratorio

Se determina la concentración del antígeno carcinoembrionario, cuya concentración se asocia con un peor pronóstico (Dekker et al., 2019), aunque no es un marcador específico.

1.5 Tratamiento

El tratamiento del CCR va a depender del estadio en el que se haga el diagnóstico. A continuación, se enlistan los diferentes tratamientos, en qué consisten y en qué casos suelen emplearse.

1.5.1 Cirugía

La cirugía es el tratamiento curativo principal para pacientes con CCR no metastásico (Kuipers et al., 2015). Si el cáncer es diagnosticado en una etapa inicial, es decir, en un estadio 0 o inclusive algunos en estadio I, los pólipos o tumores pueden extirparse durante una colonoscopia. Se puede realizar una polipectomía donde el cáncer se extirpa como parte del pólipo o también se puede realizar una escisión local donde se retira tejido canceroso del revestimiento del colon, así como un poco de tejido sano circundante. Si el estadio del cáncer no permite este tipo de procedimientos, entonces se realiza una colectomía que puede ser parcial o completa. En la colectomía parcial se extrae la porción de colon que tiene el cáncer junto con una porción pequeña de tejido sano. De manera general, se extirpa alrededor de un cuarto a un tercio de colon y, también en algunos casos dependiendo del estadio, se extirpan alrededor de 12 ganglios linfáticos cercanos. La colectomía total no

se realiza de manera rutinaria para tratar el CCR, solo suele hacerse si existen algunas otras afecciones en donde el colon se vea afectado en su totalidad, no necesariamente por cáncer, como lo pueden ser la presencia de cientos de pólipos en el caso de alguien que padezca PFA o en algunos casos si el paciente padece de una IBD. La colectomía puede ser mediante una cirugía abierta o mediante cirugía laparoscópica (ACS, febrero 2018). Actualmente, la cirugía laparoscópica se ha convertido en la técnica estándar para tratar el CCR en muchos países a nivel mundial (Dekker et al., 2019).

La cirugía aplica para pacientes con CCR en estadios del 0 al III. En el caso del CCR metastásico (CCRm) o en estadio IV, puede realizarse cirugía si el cáncer lo permite y extirparse parte del colon y de los tejidos a donde haya migrado, por ejemplo, del hígado, sin embargo, en muchos de los casos la cirugía solo se realiza principalmente con fines de aliviar algunos de los síntomas (ACS, febrero 2018).

1.5.2 Terapia sistémica

Existen diferentes tipos de terapia sistémica, la cual involucra agentes quimioterapéuticos, terapia dirigida y terapia inmunológica. De estas tres, la que se utiliza principalmente es la quimioterapia, mientras que las dos restantes suelen utilizarse en CCRm, ya sea en conjunto con algún quimioterapéutico, o por sí solos si el cáncer se ha vuelto resistente a la quimioterapia (Dekker et al., 2019; Kuipers et al., 2015; ACS, octubre 2018).

A continuación, se describen los diferentes tipos de terapias sistémicas que se utilizan para tratar el CCR.

1.5.2.1 Quimioterapia

Este tipo de terapia se puede utilizar a partir de un estadio II, pero solamente en algunos casos donde pueda existir riesgo de que el cáncer regrese. En un estadio III la quimioterapia se utiliza de manera estándar como adyuvante a la cirugía y en el estadio IV la quimioterapia es la principal vía terapéutica que se utiliza cuando no es posible realizar cirugía, aunque también puede emplearse

como paliativo para ayudar a los pacientes a aliviar ciertas molestias y mejorar su calidad de vida (Dekker et al., 2019; Kuipers et al., 2015; ACS, febrero 2018). La quimioterapia puede administrarse como neoadyuvante, es decir, antes de realizar la cirugía, con la finalidad de reducir el tamaño del tumor y de este modo facilitar la extirpación, o se puede administrar como adyuvante, es decir, posterior a la cirugía, para eliminar cualquier célula cancerosa que pudiera haber quedado remanente (ACS, febrero 2018). A continuación, se enlistan los principales quimioterapéuticos utilizados y su mecanismo de acción:

- 5-fluorouracilo (5-FU)

Este fármaco es el que se utiliza como tratamiento principal contra el CCR, ya sea solo o acompañado de otros quimioterapéuticos. El 5-FU es un antimetabolito análogo al uracilo, por lo que actúa de dos maneras principales. La primera es mediante la inhibición de la enzima timidato sintasa (TS) que cataliza la metilación reductiva de la desoxiuridina monofosfato (dUMP) a desoxitimidina monofosfato (dTMP), necesaria para la replicación y reparación del DNA. El 5-FU en forma de FdUMP (fluoro desoxiuridina monofosfato) se une a la enzima TS como inhibidor competitivo de su sustrato natural, el dUMP, lo que afecta la concentración de dTTP (desoxitimidina trifosfato) presente, causando un desbalance con respecto a los otros desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), impidiendo la síntesis y reparación del DNA y causando un daño letal a las células. El segundo mecanismo es gracias a que otro derivado del 5-FU, el FUTP (fluoro uridina trifosfato), se incorpora al RNA causando una disrupción en su función y procesamiento normal (figura 5) (Longley et al., 2003).

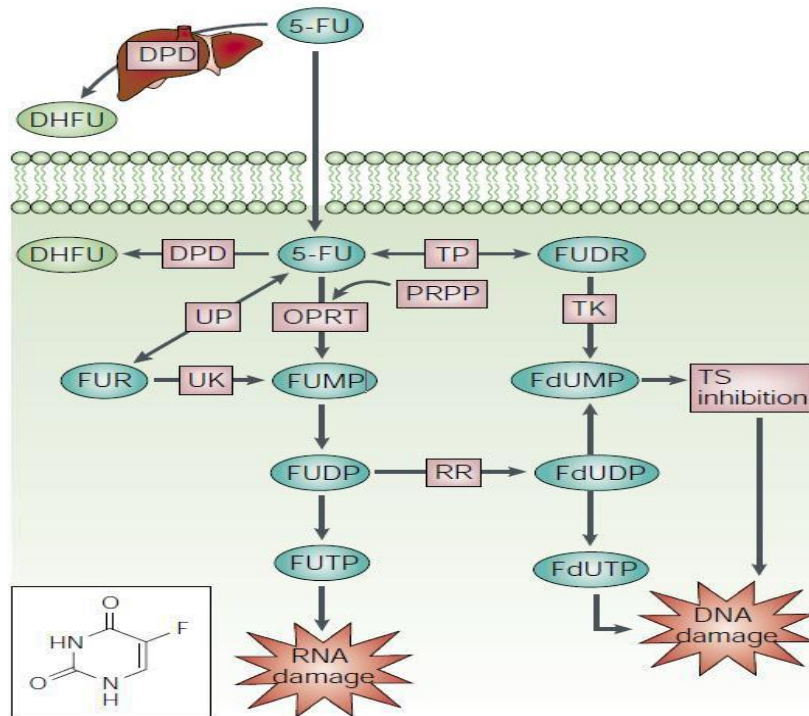


Figura 5. Mecanismo de acción del 5-FU. Se muestra la estructura del 5-FU en el recuadro blanco inferior, así como el mecanismo de acción por el cual ejerce su efecto anticancerígeno. Este consiste en que, mediante una serie de reacciones enzimáticas, el 5-FU es convertido a FdUMP, quien actúa inhibiendo a la enzima TS, causando daño al DNA. Por otro lado, el 5-FU al ser transformado mediante otra vía a FUTP, es capaz de incorporarse al RNA e impedir de este modo su procesamiento y función (Longley et al., 2003).

- Oxaliplatino (OX)

Este fármaco suele utilizarse en conjunto con el 5-FU para tratar el CCR en estadios III y IV (Dekker et al., 2019). El OX es un agente alquilante que interactúa con el DNA formando “*crosslinks*” o entrecruzamientos ya sea intra o intercatenarios ocasionando afectaciones en el apareamiento de bases, la replicación y la transcripción, lo que finalmente conlleva a la muerte celular (Rogers et al., 2019).

- Irinotecán (IRI)

Este fármaco se utiliza para tratar el CCRm en monoterapia o combinado. Actúa inhibiendo a la topoisomerasa I que participa en la replicación del DNA (de Man et al., 2018).

- Terapia combinada

El 5-FU es el quimioterapéutico principalmente utilizado para tratar el CCR, no obstante, cuando es administrado como tratamiento único, la tasa de respuesta es solo de alrededor del 10-15%, mientras que, si este se combina con otros quimioterapéuticos como lo es el OX o el IRI, la tasa de respuesta puede aumentar hasta un 40-50%, sin embargo, a pesar de este aumento en la respuesta, es urgente la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas (Longley et al., 2003).

El 5-FU puede utilizarse en combinación con ácido folínico o leucovorina (FOL), quien estabiliza la interacción entre el 5-FU y la enzima TS, potenciando el efecto del 5-FU y favoreciendo las tasas de respuesta y supervivencia. La administración de 5-FU, ácido folínico y oxaliplatino en conjunto se denomina FOLFOX, siendo esta combinación un nuevo estándar a utilizar como tratamiento contra el CCR, al igual que el tratamiento FOLFIRI que consiste en la administración de ácido folínico, 5-FU e irinotecán. Se ha observado que ambos tratamientos combinados tienen respuestas similares, pero efectos adversos diferentes (Marin et al., 2012).

1.5.2.2 Terapia dirigida

Este tipo de terapia se utiliza en casos de CCR avanzado, ya sea en conjunto con algún quimioterapéutico, o por sí solos si el cáncer se ha vuelto resistente a la quimioterapia. Principalmente se utilizan dos estrategias que constan de anticuerpos monoclonales contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y anticuerpos monoclonales contra el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Bevacizumab es un anti-VEGF que actúa interfiriendo en el proceso de angiogénesis. Por otro lado, los anti-EGFR, como lo son cetuximab y panitumumab, solo pueden ser utilizados si el perfil genético del CCR no tiene mutaciones en RAS o RAF, ya que, si están

presentes, estos fármacos no funcionarán debido a que estas alteraciones mantienen activada de manera constitutiva la vía de Ras (Dekker et al., 2019; Kuipers et al., 2015).

Adicionalmente, hay nuevos fármacos como el regorafenib que es un inhibidor tirosina cinasa y el fármaco TAS-102 que al igual que el 5-FU, es un antimetabolito. Estos fármacos solo se utilizan en caso de que el paciente no haya respondido a los otros tratamientos (Dekker et al., 2019).

1.5.2.3 Inmunoterapia

Este tipo de terapia se utiliza solamente en los en pacientes que tienen mutaciones o defectos en el sistema MMR o alta MSI (Dekker et al., 2019; ACS, julio 2018). La terapia se basa en la inhibición con anticuerpos de los puntos de control o “checkpoints” inmunológicos como lo son PD-1 (proteína de muerte celular programada 1) y CTLA-4 (antígeno 4 del linfocito T citotóxico). CTLA-4 inhibe la activación de los linfocitos T citotóxicos al competir con CD28 por la unión a CD80/CD86 en las células presentadoras de antígeno, evitando así la segunda señal requerida para la activación de las células T, por lo que al inhibir esta molécula con el fármaco ipilimumab, CD28 se une preferencialmente a CD80/CD86 causando que las células T se activen y puedan responder contra el tumor. Por otro lado, PD-1 se expresa en las células T y en otras células inmunes y se une a su ligando PD-L1 que puede estar expresado en células tumorales, células epiteliales, células dendríticas, macrófagos, fibroblastos o células T exhaustas. Esta unión causa una señal inhibitoria en las células T, por lo que al inhibir a PD-1 con fármacos como nivolumab o pembrolizumab permite la activación de las células T y la amplificación de la respuesta inmune (Wilky, 2019).

1.6 Resistencia a la quimioterapia

La efectividad de la quimioterapia combinada puede alcanzar hasta un 50%, sin embargo, este porcentaje de efectividad sigue siendo bajo (Longley et al., 2003). La falta de respuesta a la quimioterapia en los pacientes con CCR se

debe en parte a la dosis limitada que se puede administrar debido a su alta toxicidad, sin embargo, la principal causa es la adquisición de quimio-resistencia por parte de las células cancerosas (T. Hu et al., 2016; Wei et al., 2018). Los mecanismos de quimio-resistencia se pueden clasificar en no celulares y celulares, o extrínsecos e intrínsecos, respectivamente. Los factores extrínsecos involucran factores extracelulares como la inaccesibilidad al tumor debido a la vasculatura, o el microambiente tumoral, mientras que, en los mecanismos intrínsecos están implicados los blancos moleculares de los fármacos, las enzimas o los sistemas de transporte, entre otros. Los mecanismos de quimio-resistencia intrínsecos, a su vez se dividen en dos categorías: clásicos o basados en mecanismos de transporte y no clásicos o no basados en mecanismos de transporte (T. Hu et al., 2016).

A continuación, se enlistan algunos de los principales mecanismos de quimio-resistencia intrínsecos por parte de las células cancerosas:

- Mecanismos basados en transporte:

Este mecanismo se basa en el hecho de que el fármaco es expulsado de la célula a través de transportadores de membrana, lo cual disminuye la concentración intracelular del fármaco, evitando que pueda ejercer su efecto. Los principales transportadores de membrana involucrados en quimio-resistencia son los transportadores ABC (ATP-binding cassette) (figura 6). Algunos ejemplos de ellos son la glicoproteína P (P-gp), la proteína de resistencia al cáncer de mama (BCRP) y proteínas asociadas a multi drogo resistencia (MRPs) (T. Hu et al., 2016).

- Alteración de enzimas

Un aumento en la expresión de la enzima TS, blanco molecular del 5-FU, está asociado a resistencia al 5-FU, debido a que la actividad catalítica de la TS se ve potenciada. Este aumento puede deberse a la presencia de polimorfismos, a un aumento en el número de copias o a mutaciones (Blondy et al., 2020).

La enzima dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD) es la encargada de catabolizar más del 80% del 5-FU y se expresa de manera predominante en

el hígado. La sobreexpresión de esta enzima está asociada a resistencia al 5-FU (Longley et al., 2006).

La sobreexpresión de la enzima Glutación S-transferasa, está involucrada en la formación de conjugados entre el grupo tiol del glutati6n (GSH) y fármacos derivados de platino, como lo es el OX, favoreciendo su eflujo a través de transportadores de membrana (T. Hu et al., 2016; Longley et al., 2006; Martinez-Balibrea et al., 2015).

- Inhibici6n de la apoptosis

Las células cancerosas son capaces de evadir la apoptosis principalmente por la sobreexpresión de genes antiapopt6ticos como lo son: *BCL-2*, *BCL-X_L*, *MCL-1* y *XIAP*, y la subexpresión de genes pro apopt6ticos como *P53*, *BAX*, *BIM* y *PUMA* (figura 6) (T. Hu et al., 2016).

- Moléculas involucradas en la reparaci6n del daño al DNA

Los quimioterapéuticos como el 5-FU y el OX causan daño al DNA (indirecta o directamente, respectivamente). Un aumento en la expresi6n de genes involucrados en los diferentes mecanismos de reparaci6n de DNA favorece la quimio-resistencia en las células tumorales. Genes involucrados en el mecanismo de reparaci6n por escisi6n de nucle6tidos (NER), como lo es *ERCC1*, están relacionados principalmente con la resistencia al cisplatino (Longley et al., 2006).

- EMT

La EMT favorece que las células epiteliales adquirieran cambios que les permiten perder la adherencia célula-célula, así como la polaridad apical-basal, sufrir cambios en el citoesqueleto y adquirir características de células mesenquimales tales como mayor capacidad migratoria, mayor invasividad, un aumento en la resistencia a apoptosis y un aumento en la producci6n de componentes de ECM (Cao et al., 2015). TGF- β desempeña un papel importante en la EMT y suele estar sobre expresado en las células resistentes al 5-FU. Algunas integrinas y conexinas también están involucradas en quimio-resistencia, así como la disminuci6n de E-cadherina (E-cad) (Blondy et al., 2020).

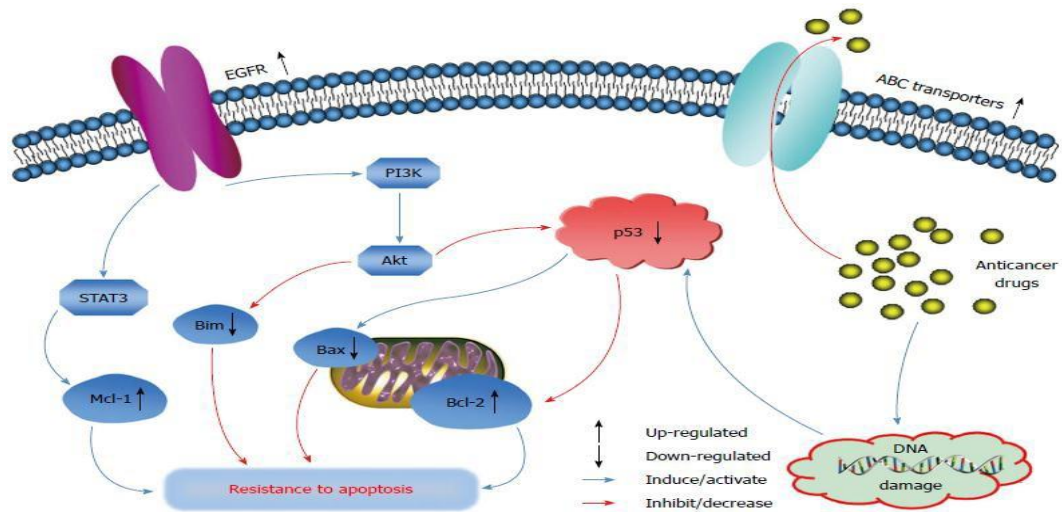


Figura 6. Principales mecanismos de resistencia a la quimioterapia. Se muestran los mecanismos celulares intrínsecos de quimio-resistencia clásicos y no clásicos, que involucran principalmente el eflujo de los quimioterapéuticos mediante transportadores de tipo ABC y la inhibición de apoptosis, respectivamente (T. Hu et al., 2016).

1.7 Nuevas terapias contra el cáncer colorrectal

La tasa de respuesta a la quimioterapia basada en la administración de 5-FU en combinación con otros quimioterapéuticos es alrededor del 50%, sin embargo, el 90% de los pacientes con CCRm, no responderá al tratamiento, debido a la adquisición de quimio-resistencia por parte de las células tumorales (Longley et al., 2006). Por esta razón, es urgente la búsqueda de nuevas moléculas, ya sea sintéticas o naturales, que puedan servir como adyuvantes a la terapia convencional, permitiendo y potenciando el efecto de los quimioterapéuticos sobre las células cancerosas. Actualmente, ha tomado mucha relevancia la búsqueda de moléculas de origen natural, debido a que se ha observado que algunos de estos compuestos pueden sensibilizar a las células cancerosas a la quimioterapia, también pueden llegar a potenciar el efecto de los fármacos y hacerlos más específicos al actuar solamente sobre las células cancerosas. Además, los compuestos naturales suelen ser multi blanco, por lo que pueden interferir con diferentes vías de señalización y de esta manera evitar la aparición de quimio-resistencia (Rejhová et al., 2018).

Con respecto a los adyuvantes sintéticos, se ha observado que los AINEs, como el celecoxib, en combinación con el 5-FU en modelos in vitro e in vivo, han logrado restaurar la sensibilidad de las células cancerosas al quimioterapéutico (Fong & To, 2019), sin embargo, existe la desventaja acerca de los efectos secundarios que puedan tener sobre los pacientes, que incluye toxicidad gastrointestinal y renal, así como efectos en el sistema cardiovascular, sistema nervioso central y en la función de las plaquetas, al utilizarlos por tiempo prolongado (Rigas & Tsioulis, 2015). Aunque, se han obtenido resultados alentadores al utilizar aspirina como adyuvante al 5-FU, quien forma parte de los AINEs, en pacientes con CCRm que no habían tenido éxito con los otros tratamientos (Giampieri et al., 2017)

Con respecto a los adyuvantes naturales, el compuesto más estudiado es la curcumina, la cual es un pigmento fenólico amarillo, componente activo de la planta *Curcuma longa*, que posee cualidades antiinflamatorias, antioxidantes y antitumorales, y su combinación con el 5-FU incrementa la susceptibilidad de las células cancerosas al quimioterapéutico (Tan & Norhaizan, 2019). Adicionalmente, se han realizado ensayos clínicos en pacientes con CCRm, utilizando curcumina como adyuvante a la terapia con FOLFOX, observándose que la terapia combinada es segura y el compuesto es bien tolerado (Howells et al., 2019). Así como la curcumina, hay diversos compuestos naturales con propiedades similares, es decir, antiinflamatorias, antioxidantes y anticancerígenas, que pudieran ser evaluados como posibles adyuvantes a las terapias convencionales. Como se mencionó, la inflamación está relacionada con el desarrollo de CCR, por lo que las moléculas que tienen propiedades antiinflamatorias pudieran considerarse como buenos candidatos para la prevención y el tratamiento de esta neoplasia (Zappavigna et al., 2020).

1.8 Trimetilglicina

La trimetilglicina (TMG), también conocida como betaína, es un compuesto natural que fue primeramente identificado en la planta *Beta vulgaris* (betabel), y posteriormente se encontró en altas concentraciones en otros alimentos

como salvado de trigo, germen de trigo y espinaca, así como en algunos microorganismos e invertebrados acuáticos. Esta molécula consta de un esqueleto de glicina con tres grupos metilo y se comporta como zwitterión (figura 7). La TMG puede obtenerse mediante la dieta, sin embargo, el cuerpo puede sintetizarla a partir de colina.

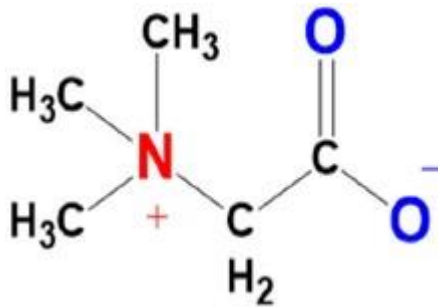


Figura 7. Estructura molecular de la TMG. La TMG está formada por un esqueleto de glicina y tres grupos metilo, con una carga neutra (Zhao et al., 2018a).

Las principales funciones que cumple la TMG en el cuerpo es primeramente como donador de grupos metilo, participando en el proceso de transmetilación catalizado por la enzima betaína-homocisteína metiltransferasa (BHMT) quien convierte la homocisteína en metionina. Por otro lado, la TMG funge como un osmoprotector, acumulándose en las células sin alterar su función, protegiéndolas del estrés osmótico. Además, disminuye la actividad del agua en las proteínas, manteniendo su estructura nativa. Aunado a esto, se le han encontrado propiedades antiinflamatorias y antioxidantes, por lo que resulta una molécula con un potencial interesante para ser utilizada como tratamiento de enfermedades, en donde está involucrada la inflamación, incluyendo al cáncer (Zhao et al., 2018). Debido a todas estas propiedades, se ha puesto un especial interés en este compuesto y en la relación beneficiosa que puede tener como preventivo y como tratamiento contra el cáncer.

1.8.1 TMG y su potencial quimiopreventivo

La TMG participa en el metabolismo de un carbono, fungiendo como un donador de grupos metilo. Por otro lado, se sabe que la metilación del DNA se ve alterada durante el proceso de carcinogénesis, por lo que podría existir una relación entre los niveles de TMG y la incidencia de cáncer. Debido a esto, en el 2019 Youn y colaboradores realizaron un meta-análisis de estudios observacionales donde se analizaron 28 estudios, de los cuales 9 eran casos y controles, 18 estudios de cohorte y 1 transversal, donde se evaluaban ya sea los niveles de TMG que se consumían en la dieta o la concentración en el plasma sanguíneo de los individuos y si existía una relación con la incidencia de diferentes tipos de cáncer. De estos estudios se extrajeron los datos del riesgo relativo (RR) y los intervalos con 95% de confianza (IC), para poder calcular el RR combinado y determinar si existe alguna asociación. El estudio concluye que altos niveles de TMG están asociados con un bajo riesgo de incidencia de cáncer, especialmente de CCR (Youn et al., 2019).

Por otro lado, Kim y colaboradores en 2014, determinaron que la administración de TMG en la dieta a ratones tratados con AOM/DSS para inducir CAC tenía un efecto antiinflamatorio y a su vez prevenía la formación de tumores en los ratones. Debido a que la administración de la TMG se realizó en etapas tempranas posterior a la inducción de CAC con AOM/DSS, la TMG podría ser un buen candidato para actuar como quimiopreventivo. Además, se observó que uno de los mecanismos por los cuales posiblemente tiene este efecto pudiera ser debido a sus propiedades antiinflamatorias (Kim et al., 2014).

1.8.2 TMG como posible tratamiento contra el cáncer

Actualmente, la búsqueda de compuestos naturales como potenciales fármacos contra el cáncer está cobrando relevancia debido a que los posibles efectos secundarios derivados de este tipo de tratamientos pudieran ser menores que los que se presentan con la quimioterapia.

En el 2015 Guo y cols., determinaron que la TMG tiene la capacidad de inhibir la proliferación de las células HeLa, cuando se tratan con altas concentraciones de TMG (20 mg/mL), además de aumentar el proceso de apoptosis al disminuir la expresión del gen antiapoptótico *BCL-2* y de inducir la expresión de genes proapoptóticos como *BAX*, *P53* y caspasa 3. Adicionalmente, observaron que la TMG inhibe la migración celular de las células HeLa (Guo et al., 2015).

Por otra parte, en el 2019 Kar y colaboradores evaluaron los efectos de la TMG en la línea celular DU-145 de cáncer de próstata, observando que a partir de una concentración de 50 mg/mL, se genera un decremento en la viabilidad celular. Estos efectos parecen ser mediados por un aumento en los niveles de moléculas oxidantes como malondialdehído y el estatus oxidante total, una disminución en los niveles de antioxidantes como GSH, superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y el estatus antioxidante total, además de inducir la fragmentación del DNA y la inducción de proteínas proapoptóticas como caspasa 3 y BAX, así como la disminución de BCL-2. Por lo tanto, en este modelo, la TMG causa estrés oxidativo en las células cancerosas, inhibición del crecimiento celular y apoptosis de una manera dosis dependiente, mecanismos diferentes a los que se le han atribuido con anterioridad, donde fungía como un antioxidante y antiinflamatorio, pero que es capaz de tener un efecto anticancerígeno (Kar et al., 2019). Este tipo de estudios demuestran que la TMG en las concentraciones adecuadas tiene efectos citotóxicos sobre las células cancerosas mediados por diferentes mecanismos, por lo que es una propuesta interesante a seguir estudiando para el tratamiento contra el cáncer.

1.8.3 TMG como potencial adyuvante en la terapia contra el CCR

Como ya se ha mencionado, hasta la fecha, la principal terapia contra el CCR es el quimioterapéutico 5-FU con una baja tasa de respuesta (10-15%), (Longley et al., 2003) la cual se debe en gran parte a la adquisición de quimio-resistencia por parte de las células cancerosas, lo que conlleva a una urgente

búsqueda de nuevas moléculas que actúen como adyuvantes a la quimioterapia, potenciando el efecto de esta y contrarrestando la aparición de quimio-resistencia.

En el 2020, nuestro grupo de trabajo utilizó diferentes combinaciones terapéuticas que involucran tratamiento en monoterapia con 5-FU y TMG, y tratamiento combinado de TMG+5-FU, las cuales fueron administradas a ratones a los que se les indujo CAC mediante el protocolo AOM/DSS. Posteriormente, se evaluó el número y el tamaño de los tumores presentes en cada grupo, observando que cuando los ratones eran tratados en monoterapia con 5-FU no existe una diferencia significativa en la reducción del número de tumores; sin embargo, al administrar TMG en monoterapia, por si sola es capaz de disminuir el número de tumores en los ratones en un 45% con respecto al grupo de ratones con CAC sin tratar, pero, cuando se utilizaba como adyuvante al 5-FU, los ratones que antes parecían ser refractarios al tratamiento en monoterapia con 5-FU, ahora se volvían sensibles, disminuyendo la cantidad de tumores en un 80%, así como el tamaño de estos (figura 8).

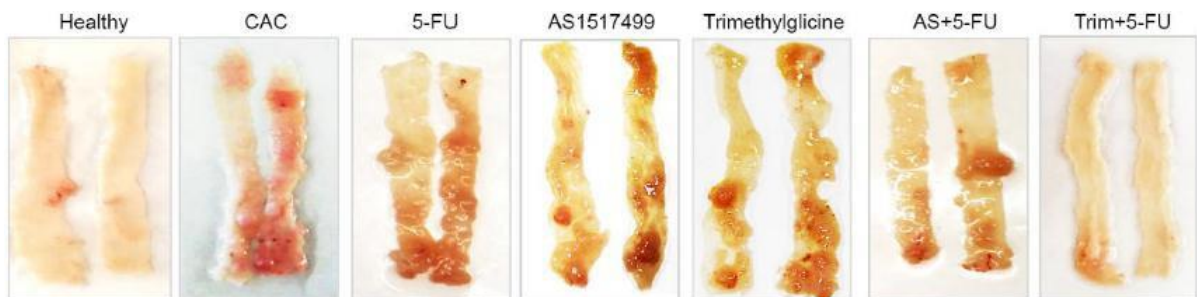


Figura 8. TMG como adyuvante al 5-FU en un modelo murino de CAC.

Se observa el efecto que tiene la terapia combinada del quimioterapéutico 5-FU con el compuesto natural TMG en el colon de ratones con CAC, en comparación cuando se utiliza el 5-FU en monoterapia.

En este estudio, además se observó que la TMG como adyuvante al 5-FU incrementa los niveles de apoptosis y de marcadores de adhesión celular como E-cad, disminuye los marcadores de la EMT que se asocian a fenotipos

más agresivos y resistencia a fármacos, como lo son la translocación nuclear de β -catenina y la expresión de SNAI1, además de disminuir la expresión de citocinas protumorales como IL-10, TGF- β e IL-17a, todo esto como consecuencia de que la TMG es capaz de inhibir a STAT6. Adicionalmente, en la línea celular epitelial de CCR HCT-116, la TMG aumentó los niveles de P53, que es un marcador de apoptosis. Los resultados obtenidos a partir de este estudio son muy alentadores, ya que es el primer estudio que demuestra los efectos de la TMG como adyuvante al 5-FU en un modelo de CAC con resultados tanto in vivo como in vitro (Mendoza-Rodríguez et al., 2020).

Con este antecedente directo, surge la necesidad de evaluar los posibles mecanismos moleculares involucrados en la respuesta a la TMG, ya que el hecho de observar que la TMG potencia el efecto del 5-FU, sugiere la idea de que pudiera estar participando en la modificación de genes asociados a quimio-resistencia. De este modo se pueden proponer nuevos blancos terapéuticos y brindar nuevas opciones de tratamiento para futuros ensayos clínicos, al conocer los mecanismos moleculares mediante los cuales actúa este compuesto.

2. JUSTIFICACIÓN

El CCR es una de las neoplasias con más altas tasas de incidencia y mortalidad en México y a nivel mundial. El 5-FU es a la fecha el principal quimioterapéutico utilizado, aun cuando tiene una eficacia limitada (10-15%) en terapia única, sin embargo, su combinación con otros agentes terapéuticos, como el oxaliplatino, pueden aumentar hasta un 50% su efectividad.

Recientemente, nuestro grupo de trabajo reportó que la TMG (un potente antiinflamatorio), favorece la disminución del número y tamaño de los tumores en el colon de ratones con CAC, en etapas avanzadas de la enfermedad, si este se utiliza como adyuvante al tratamiento con 5-FU. Este hecho sugiere que la TMG tendría la capacidad de modificar la expresión de genes involucrados en mecanismos que favorecen la progresión del cáncer y que, a su vez, estén relacionados con la respuesta a los tratamientos convencionales.

A la fecha, los mecanismos moleculares asociados al efecto de la TMG como adyuvante a la terapia al 5-FU no han sido establecidos. Por esta razón, es importante evaluar la expresión de genes asociados a quimio-resistencia al 5-FU y su posible modificación por el uso de la TMG, y de esta manera establecer las posibles vías de señalización y mecanismos involucrados en este proceso.

3. HIPÓTESIS

La administración de TMG mejora el tratamiento del CCR con 5-FU, mediante la modificación de la expresión de genes involucrados en el proceso de carcinogénesis y resistencia a quimioterapéuticos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar la expresión de genes asociados a resistencia al 5-FU, en un modelo murino de CAC tratados con TMG, utilizando bases de datos reportadas de CCR, y validar su expresión y modificación in vivo.

4.2 Objetivos particulares

1. Determinar genes diferencialmente expresados en muestras de pacientes con CCR que no respondieron al tratamiento en donde se incluyó al 5-FU, en comparación con pacientes que sí respondieron a la quimioterapia, utilizando bases de datos generadas por microarreglos.
2. Determinar los procesos biológicos asociados a los genes diferencialmente expresados en los pacientes que no responden a la quimioterapia y seleccionar los genes a evaluar en el modelo murino de CAC.
3. Evaluar el efecto de la TMG en la modificación de genes asociados a quimio-resistencia al 5-FU en un modelo murino de CAC.
4. Evaluar el efecto de la TMG sobre la viabilidad celular en una línea celular de CCR.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Búsqueda de bases de datos

Se realizó una búsqueda en la base de datos *Gene Expression Omnibus* (GEO, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), gestionada por el *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), con la finalidad de encontrar perfiles de expresión génica obtenidos mediante el uso de microarreglos, provenientes de tumores de pacientes con CCRm tratados con 5-FU. Las palabras clave utilizadas para dicha búsqueda fueron “*colorectal cancer*” y “*5-fluorouracil*”. No se logró encontrar bases de datos con muestras de pacientes que hayan sido tratados en monoterapia con 5-FU, por lo que se decidió seleccionar bases de datos que utilizaran como base al 5-FU en combinación con otros quimioterapéuticos. En total se encontraron 4 bases de datos, sin embargo, tres de ellas fueron descartadas, ya sea porque no proporcionaban suficiente información acerca de los pacientes, o porque no eran compatibles con el software a utilizar para el análisis. La clave de acceso de la base de datos seleccionada es GSE69657.

5.1.1 Características de la base de datos seleccionada

La base de datos seleccionada cuenta con los perfiles de expresión génica provenientes de muestras de tumores de pacientes con CCRm que fueron sometidos a 4 ciclos de quimioterapia con FOLFOX4, administrada como neoadyuvante, es decir, previo a la cirugía. Las dosis que corresponden a un ciclo de este régimen de terapia se resumen en la tabla 2. Cada ciclo se repite a las 2 semanas hasta cumplir con 4 ciclos. Los pacientes sometidos a este tratamiento fueron clasificados de acuerdo con su respuesta a la quimioterapia.

Tabla 2. Régimen de la terapia con FOLFOX4

Medicamento	Dosis	Días	Administración
Oxaliplatino	85 mg/m ² /día	Día 1	IV diluido en 250-500 mL de G 5%, en perfusión de 2h. Se administra en "Y" con ácido folínico.
Ácido folínico	200 mg/m ² /día	Días 1 y 2	IV diluido en G 5%, en perfusión de 2 h. El día 1 se administra en "Y" simultáneamente con oxaliplatino.
5-FU	400 mg/m ² /día	Días 1 y 2	Bolo IV, después del ácido folínico.
5-FU	600 mg/m ² /día	Días 1 y 2	Perfusión IV de 22 h.

IV: intravenoso, G 5%: Suero glucosado al 5%

En el estudio se evaluaron un total de 30 muestras de pacientes, sin embargo, solo se encontraban disponibles 16 archivos en formato .CEL, ya que los demás habían sido extraviados, por lo que solo se cuenta con los datos provenientes de 16 pacientes. Los criterios de inclusión, exclusión y eliminación de los pacientes se muestran en la tabla 3, mientras que las características de los 16 pacientes se resumen en la tabla 4. De los 16 pacientes, 9 no respondieron a la quimioterapia con FOLFOX4 (NRFX4) y 7 si respondieron (RFX4).

Tabla 3. Criterios para la selección de los pacientes

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión	Criterios de eliminación
<ul style="list-style-type: none"> • Metástasis histológicamente confirmada • 18-80 años 	<ul style="list-style-type: none"> • Padecer enfermedades del sistema nervioso y/o mentales • Insuficiencia renal 	<ul style="list-style-type: none"> • No haber terminado los ciclos de quimioterapia

<ul style="list-style-type: none"> No haber recibido radiación, quimioterapia o cirugía paliativa antes del estudio ECOG < 0 = 1 	<ul style="list-style-type: none"> Embarazadas y lactantes Otras enfermedades que no les permitan administrarle FOLFOX4 	
---	---	--

Tabla 4. Características de los pacientes

Número de acceso	Nombre de la muestra	Género	Edad	Estadio del tumor	Respuesta a la quimioterapia	Tejido
GSM1705389	Paciente 1	Masculino	36	T3N1M1,IV	No responde	Tumor colorrectal
GSM1705390	Paciente 2	Masculino	50	T3N1M1,IV	No responde	Tumor colorrectal
GSM1705391	Paciente 3	Masculino	64	T3N2M1,IV	No responde	Tumor colorrectal
GSM1705392	Paciente 4	Masculino	65	T3N1M1,IV	Responde	Tumor colorrectal
GSM1705393	Paciente 5	Femenino	69	T4N1M1,IV	No responde	Tumor colorrectal
GSM1705394	Paciente 6	Masculino	53	T3N0M1,IV	No responde	Tumor colorrectal
GSM1705395	Paciente 7	Masculino	57	T3N1M1,IV	No responde	Tumor colorrectal
GSM1705396	Paciente 8	Masculino	66	T2N2M1,IV	Responde	Tumor colorrectal
GSM1705397	Paciente 9	Masculino	37	T4N1M1,IV	Responde	Tumor colorrectal
GSM1705398	Paciente 10	Femenino	66	T3N2M1,IV	Responde	Tumor colorrectal
GSM1705399	Paciente 11	Femenino	55	T3N1M1,IV	Responde	Tumor colorrectal
GSM1705400	Paciente 12	Masculino	28	T3N2M1,IV	Responde	Tumor colorrectal
GSM1705401	Paciente 13	Femenino	38	T3N2M1,IV	Responde	Tumor colorrectal

GSM1705402	Paciente 14	Femenino	48	T4N2M1,IV	No responde	Tumor colorrectal
GSM1705403	Paciente 15	Masculino	61	T3N2M1,IV	No responde	Tumor colorrectal
GSM1705404	Paciente 16	Masculino	64	T3N0M1,IV	No responde	Tumor colorrectal

El microarreglo que se utilizó para el análisis de las muestras de los pacientes es el [HG-U133_Plus_2] *Affymetrix Human Genome* U133 Plus 2.0 Array, el cual analiza el nivel de expresión relativo de más de 47,000 transcritos y variantes, incluidos más de 38,500 genes bien caracterizados.

5.2 Software utilizado para el análisis de los microarreglos

El software que se utilizó para analizar los microarreglos provenientes de la base de datos es *AltAnalyze* (v.2.1.4.3). Este programa permitió procesar los archivos en formato .CEL proporcionados por la base de datos GSE69657. Los archivos provenientes de cada uno de los pacientes se clasificaron con respecto a su respuesta a FOLFOX4. Posteriormente, se procedió a realizar el análisis de expresión diferencial de los pacientes que NRFX4 con respecto a los que RFX4, utilizando como criterios de selección para los genes diferencialmente expresados (GDE), aquellos que tuvieran un valor de cambio mayor o igual a 2 (≥ 2) o menor o igual a -2 (≤ -2) y un valor $p < 0.05$.

5.3 Plataformas utilizadas para la determinación de los procesos biológicos asociados a los GDE

La plataforma utilizada para realizar la evaluación de los posibles procesos biológicos (PB) en los que pudieran estar involucrados los GDE en los pacientes que NRFX4 fue *WEBGESTALT* (*WEB-based GENE SeT Analysis Toolkit*, <http://www.webgestalt.org>). Esta plataforma permitió obtener un “*Over-Representation Analysis*” (ORA) de los GDE.

5.4 Selección de los GDE a evaluar en un modelo de CAC.

De los GDE, se seleccionaron 7 para ser evaluados en tejidos provenientes de ratones a los que se les indujo CAC y que fueron sometidos a diferentes tratamientos (sección 5.5). Los criterios de selección de los GDE fueron los siguientes: un valor de cambio ≥ 2 o ≤ -2 , un valor $p < 0.05$ y que, al realizar una búsqueda bibliográfica acerca de los genes, exista evidencia de que desempeñan un papel importante en el proceso de carcinogénesis en CCR o que estén directamente asociados a quimio-resistencia.

5.5 Extracción de RNA de tejidos de cáncer asociado a colitis

Se contaba con muestras de tejidos provenientes de ratones a los que se les indujo CAC utilizando AOM/DSS, los cuales recibieron diferentes tratamientos con TMG y 5-FU en monoterapia y en terapia combinada (Mendoza-Rodríguez et al., 2020). En resumen, en el día 40 posterior a la inducción del CAC, a un grupo de ratones se les administró TMG mediante una sonda oral a una concentración de 50 mg/kg, 3 veces por semana, hasta el día de su sacrificio. A otro grupo de ratones, en el día 54 se les administró 30 mg/kg de 5-FU vía intraperitoneal, 3 veces por semana hasta el día del sacrificio. La terapia combinada con TMG y 5-FU es el resultado de la combinación de los dos esquemas de tratamiento mencionados anteriormente. El sacrificio de los ratones se realizó en el día 90. El resumen del esquema de tratamientos se muestra en la figura 9.

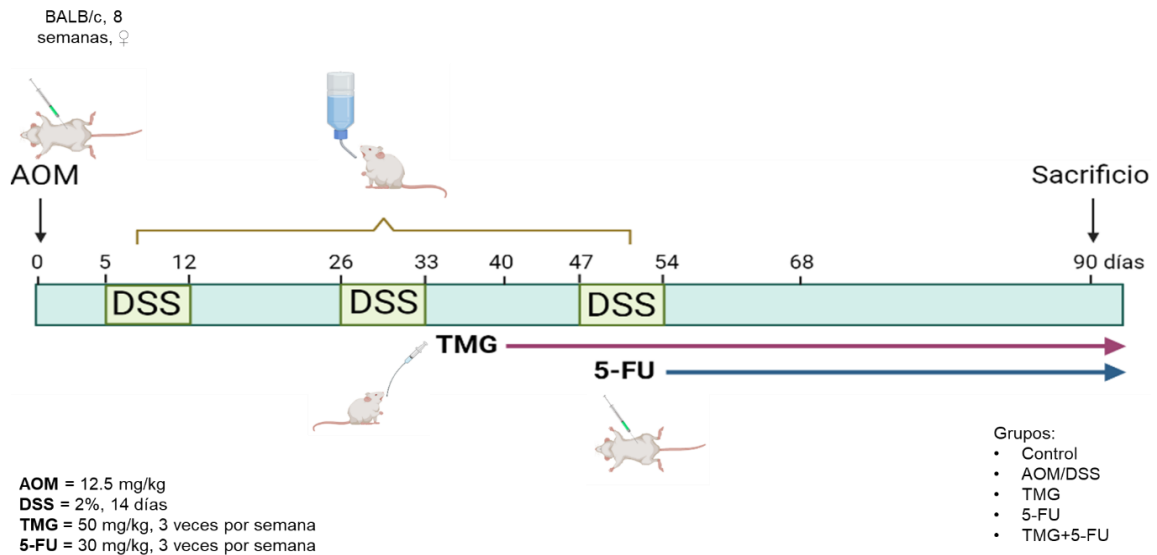


Figura 9. Diseño experimental de la inducción de CAC y los diferentes tratamientos en un modelo murino. Se muestran los tiempos y las dosis utilizadas para la inducción de CAC, así como de los diferentes tratamientos a los que fueron sometidos los ratones.

En total se contaba con tejidos provenientes de 5 grupos de ratones: ratones sanos o control, ratones con CAC sin recibir tratamiento, ratones tratados con 5-FU, ratones tratados con TMG y ratones tratados con la terapia combinada de TMG+5-FU. Cada grupo contaba con una “n” de entre 4-5 ratones.

La extracción de RNA a partir de los tejidos provenientes de los ratones se realizó mediante el kit comercial *RNeasy Mini Kit* de QIAGEN, de acuerdo con las especificaciones del fabricante. La cantidad y calidad del RNA extraído se determinó mediante un espectrofotómetro NanoDrop.

5.6 Síntesis de cDNA

A partir del RNA extraído de los diferentes tejidos, se utilizó 1 ug de RNA para realizar la síntesis de cDNA mediante transcripción reversa, utilizando el kit comercial “*RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit*” de *Thermo Scientific*. Las condiciones de reacción se muestran en las tablas 5 y 6.

Tabla 5. Mezcla de reacción para la síntesis de cDNA

Reactivo	Volumen
RNA (100 ng/ μ L)	11 μ L
Oligo-dT (100 μ M)	1 μ L
Buffer de reacción 5x	4 μ L
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/ μ L)	1 μ L
dNTPs (10 mM)	2 μ L
RevertAid RT (200 U/ μ L)	1 μ L

Tabla 6. Condiciones de reacción para la síntesis de cDNA

Temperatura	Tiempo
42°C	60 min
70°C	5 min

La concentración del cDNA obtenido se evaluó en un espectrofotómetro NanoDrop.

5.7 Selección de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados para la evaluación de los genes seleccionados mediante PCR tiempo real (qPCR) fueron obtenidos de la base de datos *Primer Bank* (<https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>). Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados para la qPCR

EIF3H				
Tamaño del amplicón	215			
	Secuencia (5' -> 3')	Longitud	Tm	Localización
Forward Primer	ACAAGGCACTGAGGTTGTTCA	21	61.8	171-191
Reverse Primer	CGAAGGAGCCGTAATATGTGGA	22	61.6	385-364

SLC7A11				
Tamaño del amplicón	160			
	Secuencia (5' -> 3')	Longitud	Tm	Localización
Forward Primer	AGGGCATACTCCAGAACACG	20	61.3	200-219
Reverse Primer	GGACCAAAGACCTCCAGAATG	21	60.0	359-339
GBP1				
Tamaño del amplicón	183			
	Secuencia (5' -> 3')	Longitud	Tm	Localización
Forward Primer	ACAACTCAGCTAACTTTGTGGG	22	60.4	491-512
Reverse Primer	TGATACACAGGCGAGGCATATTA	23	61.0	673-651
FILIP1L				
Tamaño del amplicón	225			
	Secuencia (5' -> 3')	Longitud	Tm	Localización
Forward Primer	AGCACTCAGTCGGCAAATTGA	21	62.3	264-284
Reverse Primer	AGCCTCTTATTGAGGTCTCTGC	22	61.2	488-467
TRIM31				
Tamaño del amplicón	174			
	Secuencia (5' -> 3')	Longitud	Tm	Localización
Forward Primer	AATACGTTTCAGGCCCAATAAGC	22	60.7	184-205
Reverse Primer	GGAGTCACGACACACCACA	19	61.5	357-339
GJB2				
Tamaño del amplicón	133			
	Secuencia (5' -> 3')	Longitud	Tm	Localización
Forward Primer	CCCAGAAGGTCCGTATCGAAG	21	61.7	368-388
Reverse Primer	ACCAGACGTTGCATGAAGAAG	21	60.6	500-548
HMGA2				
Tamaño del amplicón	106			
	Secuencia (5' -> 3')	Longitud	Tm	Localización
Forward Primer	GAGCCCTCTCCTAAGAGACCC	21	62.5	124-144

Reverse Primer	TTGGCCGTTTTCTCCAATGG	21	61.4	229-209
-----------------------	----------------------	----	------	---------

5.8 qPCR

Se realizó qPCR para determinar los niveles de expresión de los genes seleccionados en los diferentes tejidos. La qPCR se realizó mediante el uso de *SYBR Green* de *Applied Biosystems*, de acuerdo con las especificaciones del fabricante, tablas 8 y 9.

Tabla 8. Mezcla de reacción para qPCR

Reactivo	Volumen
cDNA (100 ng/ μ L)	2 μ L
Primer Mix (5 μ M)	1 μ L
SYBR Green PCR Master Mix	5 μ L
Agua	2 μ L

Tabla 9. Protocolo para equipo BioRad CFX1000

Temperatura	Tiempo	Ciclos
50 °C	2 min	-
95 °C	10 min	-
95 °C	15 seg	40
Variable	1 min	

La temperatura de alineamiento de cada secuencia de primers, correspondientes a los diversos genes evaluados, se determinó de acuerdo con lo establecido en el análisis de *Primer Blast*, los cuales se describen en la tabla 10.

Tabla 10. Temperaturas de alineamiento para la qPCR de cada gen a evaluar

Gen	Temperatura
EIF3H	61°C
FILIP1L	61°C
TRIM31	61°C
HMGA2	61°C
SLC7A11	60°C
GBP1	63°C
GJB2	60°C
β-actina	60°C

La amplificación de los diversos genes evaluados en las muestras se realizó por triplicado. El análisis de la cuantificación relativa de la expresión de cada gen se realizó mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

5.9 Ensayos de viabilidad celular

Con el objetivo de evaluar el efecto citotóxico de la TMG in vitro, se utilizó la línea celular HCT-116 derivada de CCR, la cual se sometió a diferentes concentraciones de TMG que son 0.1, 1, 5, 20 y 100 mg/mL (Guo et al., 2015; Kar et al., 2019). Para ello, las células se cultivaron en una placa de 96 pozos, con una densidad de 2×10^4 células con medio de cultivo completo (RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de antibiótico Penicilina/Estreptomicina) en un volumen final de 100 μ L/pozo, durante 24 h a 37°C y 5% de CO₂, para permitir su adherencia. Posteriormente, se cambió el medio de cultivo completo por medio de cultivo de ayuno (RPMI-1640 suplementado con 1% de SFB y 1% de antibiótico Penicilina/Estreptomicina). Las células se mantuvieron en ayuno durante 4 h en incubación a 37°C y 5%

de CO₂. Terminado el tiempo de incubación, se adicionaron las diferentes concentraciones de TMG, las cuales se prepararon a partir de una solución stock, la cual utilizaba agua inyectable como vehículo, mientras que las soluciones de trabajo se prepararon con medio de cultivo completo como diluyente. Las células se incubaron con la TMG durante 48 h. A las 48 h, se cambió el medio de cultivo y se reemplazó por medio completo. Posteriormente, se determinó la viabilidad celular, adicionando 10 µL del reactivo WST-1 a cada pozo, y se procedió a incubar la placa durante 2 h a 37°C y 5% de CO₂. Seguidamente se realizaron las lecturas de absorbancia en un lector de ELISA en una longitud de onda de 440 nm. La viabilidad celular se determinó de la siguiente manera:

Viabilidad celular (%) =

$$\frac{\text{absorbancia de las células tratadas} - \text{absorbancia del blanco}}{\text{absorbancia de las células sin tratar} - \text{absorbancia del blanco}} \times 100$$

5.10 Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) unidireccional, seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Sidak, mediante el software GraphPad Prism v. 8.0.1. Los datos se expresaron como la media ± DE, con un intervalo de confianza del 95%. Un valor estadísticamente significativo se consideró aquel con un valor p <0.05.

6. RESULTADOS

6.1 Expresión diferencial de acuerdo con la respuesta de los pacientes a la terapia con FOLFOX4

De acuerdo con los parámetros establecidos y con el uso del software *AltAnalyze*, se analizaron los datos de microarreglos proporcionados por la base de datos GSE69657, provenientes de los tumores de 16 pacientes con CCRm, que fueron sometidos a 4 ciclos de terapia con FOLFOX4 y clasificados conforme su respuesta a la quimioterapia. Este software permitió obtener un análisis de componentes principales (PCA) (figura 10), donde se puede observar la agrupación de los 16 pacientes de acuerdo con su respuesta a la quimioterapia. En color rojo se muestran a los pacientes que NRFX4, mientras que en azul se muestran aquellos pacientes que RFX4. En el PCA se puede observar, que existe cierta heterogeneidad en la expresión génica entre los pacientes, los cuales tienden a agruparse conforme a su respuesta (positiva o negativa).

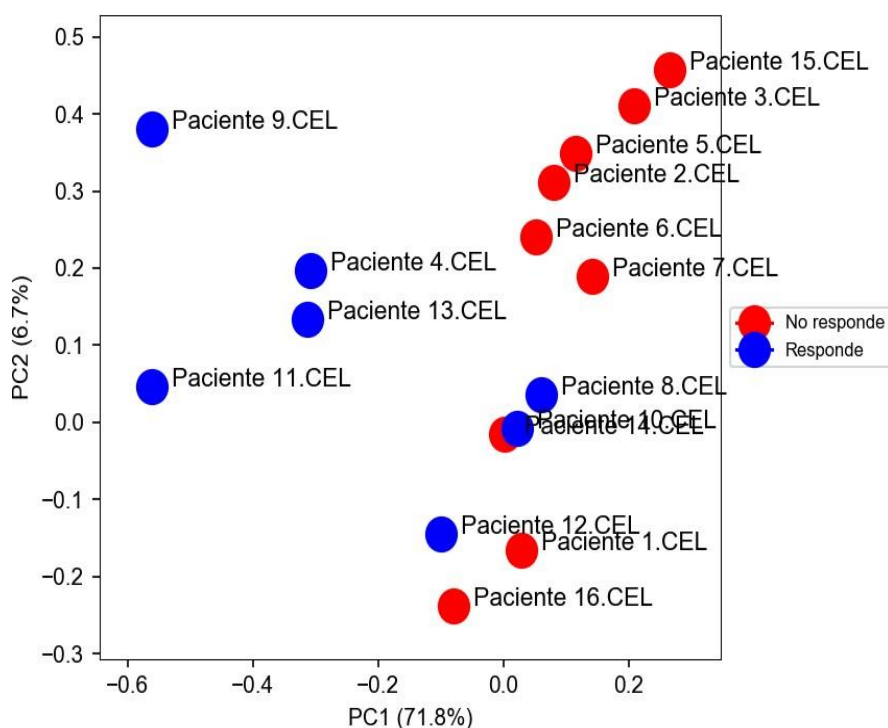


Figura 10. PCA de los pacientes con CCR de acuerdo con su respuesta a FOLFOX4. Se muestra un PCA donde se agrupan los pacientes conforme a su respuesta a FOLFOX4. Los pacientes que NRFX4 se muestran en color rojo, mientras que los que RFX4 se muestran en color azul.

Adicionalmente, con los datos obtenidos, se realizó un mapa de calor (figura 11), en el cual se muestra la formación de dos grupos o “clusters” de acuerdo con la expresión génica. El grupo 1 engloba a los pacientes que RFX4, con excepción de 3 pacientes (pacientes 8, 10 y 12) que tienen un perfil de expresión génica más parecido a aquellos pacientes que NRFX4, lo cual concuerda con lo observado en la figura 10. Por otro lado, en el grupo 2 se agrupan los pacientes que NRFX4. Estos resultados muestran que existe una diferencia en la expresión génica de los pacientes, conforme a su respuesta a la terapia, lo que a su vez sugiere que estos GDE en los pacientes que NRFX4, pudieran estar implicados en quimio-resistencia.

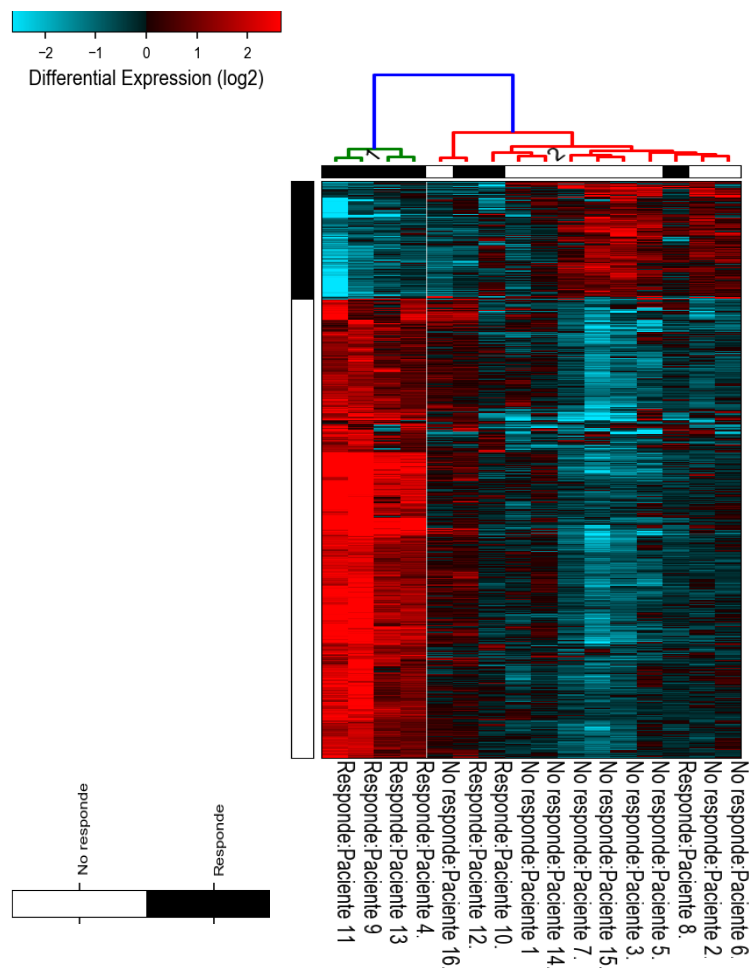


Figura 11. Agrupación de los pacientes de acuerdo con su expresión génica diferencial conforme a su respuesta a FOLFOX4. Se muestra un mapa de calor en donde se forman 2 grupos, el grupo 1 que abarca en su mayoría a los pacientes que RFX4, mientras que el grupo 2 abarca a los pacientes que NRFX4. El color rojo representa a los genes que se encuentran sobreexpresados y el azul indica los genes subexpresados. La escala muestra el log2 del valor de cambio.

Los GDE en los pacientes quimio-resistentes a FOLFOX4 fueron en total 598 genes, de los cuales 118 se encontraban sobreexpresados y 480 subexpresados. Los criterios para determinar los GDE fueron aquellos que tuvieran un valor de cambio ≥ 2 o ≤ -2 y un valor $p < 0.05$ (figura 12).

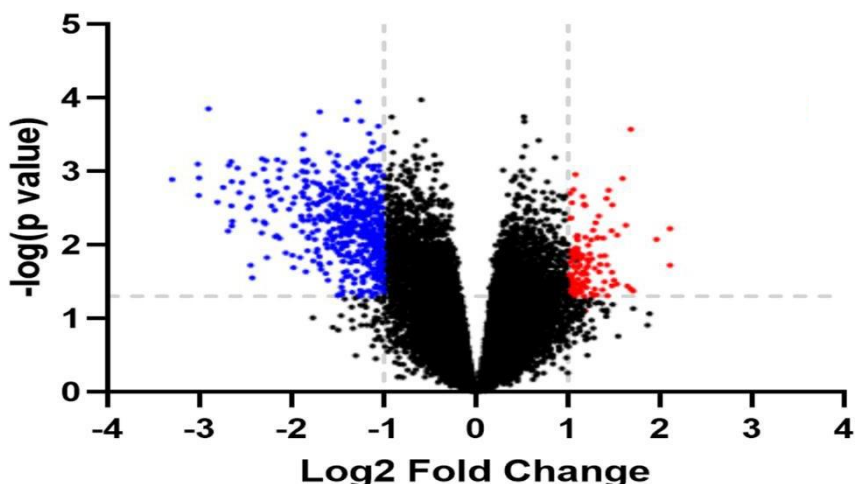


Figura 12. GDE en los pacientes que NRFX4 con respecto a los pacientes que RFX4. Gráfica de volcán que representa los GDE en los pacientes que no respondieron a la terapia. El valor de cambio se muestra en Log2, mientras que el valor p se representa en -log. Las líneas grises punteadas representan los límites que establecen la expresión diferencial. En color rojo se muestran los 118 genes sobreexpresados y en azul los 480 genes subexpresados. El color negro representa los genes que, de acuerdo con los criterios establecidos, no tienen una diferencia significativa en los niveles de expresión.

6.2 Procesos biológicos en los que se encuentran involucrados los GDE en los pacientes que NRFX4

Para conocer los posibles PB en los que pudieran estar implicados los GDE en los pacientes que NRFX4, se utilizó la plataforma *WEBGESTALT*. Esta herramienta muestra el top 10 de los diferentes PB con mayor radio de enriquecimiento. Con respecto a los genes sobreexpresados destacan PB como desregulación transcripcional en cáncer, ciclo celular, la vía de señalización P53, metabolismo de drogas y ferroptosis, por mencionar algunos (figura 13A). Por otro lado, en cuanto a los genes subexpresados resaltan procesos como adhesiones focales, activación del complemento y contracción de las células del musculo liso vascular (figura 13B).

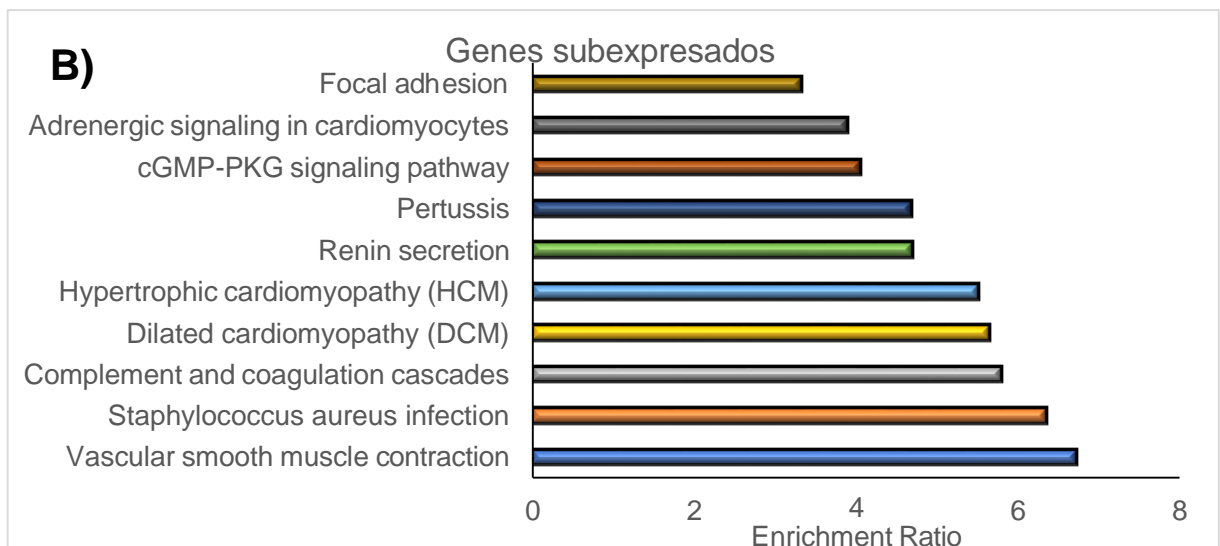
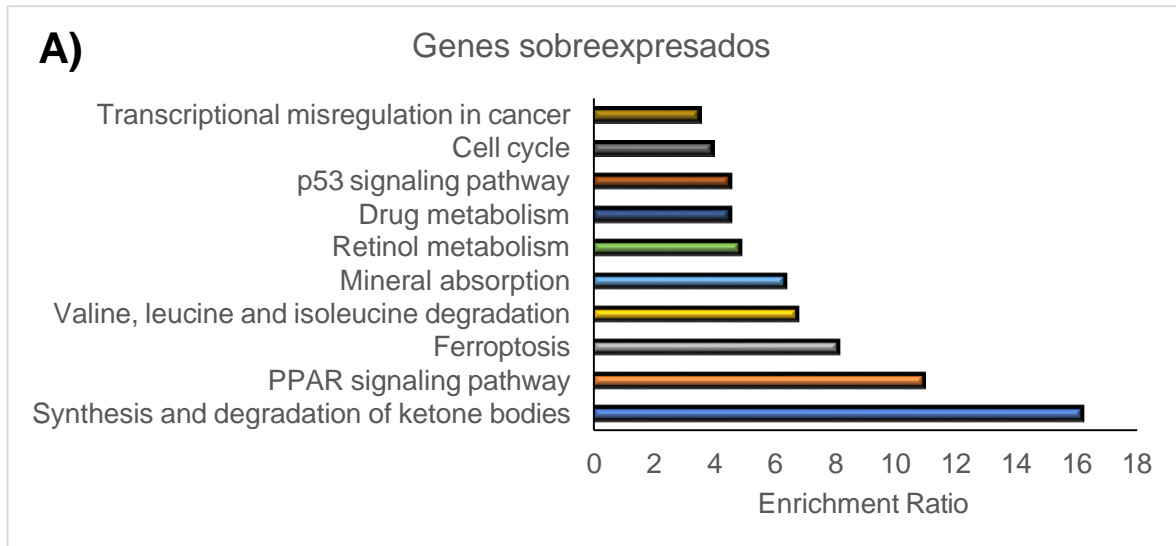


Figura 13. PB en los que están involucrados los GDE en los pacientes que NRFX4 utilizando la plataforma WEBGESTALT. Se muestra el top 10 de los posibles PB involucrados de acuerdo con su radio de enriquecimiento. A) PB donde participan los genes sobreexpresados. B) PB donde participan los genes subexpresados.

6.3 Selección de los GDE a evaluar en el modelo de CAC

Una vez obtenido el análisis de expresión diferencial y los posibles PB en los que pudieran estar involucrados estos genes, se procedió a seleccionar aquellos genes candidatos a evaluar en tejidos provenientes de ratones con CAC, los cuales fueron sometidos a diferentes tratamientos con TMG y con 5-FU, con la finalidad de evaluar si estos genes que se encontraron alterados en los pacientes que NRFX4 de acuerdo con el análisis de microarreglos, pudieran estar asociados a la falta de respuesta al 5-FU en los ratones con CAC tratados en monoterapia con este fármaco (sección 1.9.3), además de evaluar su posible modificación por el uso de TMG. Los genes seleccionados, así como los datos obtenidos de valor de cambio y valor p a partir de los microarreglos fueron los siguiente (tabla 11).

Tabla 11. Genes seleccionados para evaluar en un modelo murino de CAC

Genes	ID del probeset del gen	Símbolo del gen	Nombre del gen	log ₂ FC	FC	Valor p
SOBRE EXPRESADOS	230570_at	<i>EIF3H</i>	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H	1.05	2.08	0.0148
	209921_at	<i>SLC7A11</i>	solute carrier family 7 member 11	1.41	2.67	0.0023
	223278_at	<i>GJB2</i>	gap junction protein beta 2	1.15	2.21	0.0245

	208025_s_at	<i>HMGA2</i>	high mobility group AT-hook 2	1.17	2.25	0.0488
	208170_s_at	<i>TRIM31</i>	tripartite motif containing 31	1.68	3.22	0.0393
SUB EXPRESADOS	231577_s_at	<i>GBP1</i>	guanylate binding protein 1	-1.19	-2.28	0.0063
	1554966_a_at	<i>FILIP1L</i>	filamin A interacting protein 1 like	-1.04	-2.06	0.0004

FC= valor de cambio

6.4 Evaluación de los genes sobreexpresados seleccionados en el modelo de CAC.

El gen *HMGA2* es un factor de transcripción arquitectónico que en CCR se ha visto involucrado en favorecer la quimio-resistencia al 5-FU, promover EMT, migración, invasión, además de estar asociado con metástasis y tasas de supervivencia reducidas (Xiaochen Wang et al., 2011; Xin Wang et al., 2021; Xi Xu et al., 2018). En la figura 14 se muestran los niveles de expresión relativa del gen *Hmga2* en los tejidos provenientes de los diferentes grupos de ratones. Se puede observar que en el grupo CAC los niveles de expresión de este gen aumentaron alrededor de 7.5 veces más con respecto a los ratones sanos, y que el tratamiento con 5-FU no revierte este hecho. Sin embargo, se observa que el tratamiento en monoterapia con TMG por si solo es capaz de disminuir los niveles de expresión y que la terapia combinada de TMG+5-FU, lleva a la reducción en la expresión de manera significativa de *Hmga2*, en comparación con grupo CAC y 5-FU.

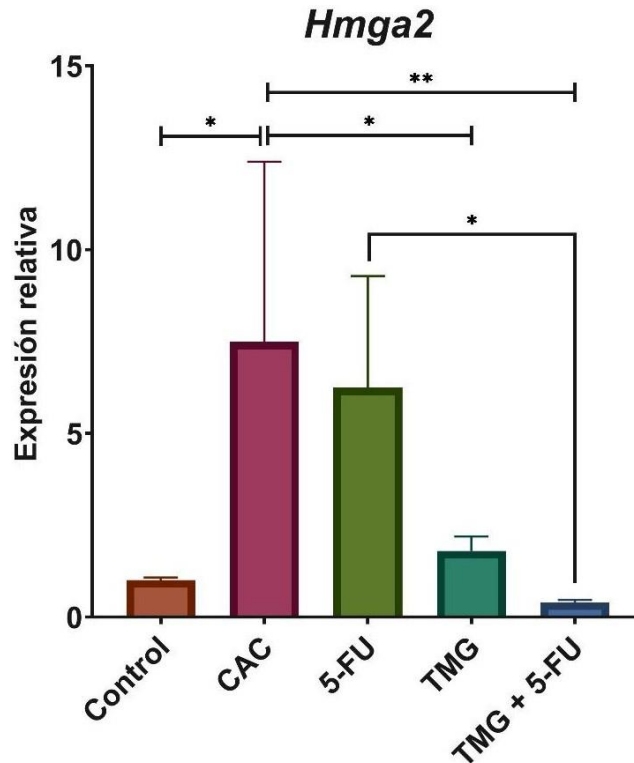


Figura 14. Niveles de expresión relativa del gen *Hmga2* en los diferentes tejidos de ratones. Los niveles de expresión del gen *Hmga2* son relativos con respecto al grupo Control. Cada grupo significa lo siguiente: Control (ratones sanos), CAC (ratones con CAC sin tratar), 5-FU (ratones con CAC tratados con 5-FU), TMG (ratones con CAC tratados con TMG) y TMG+5-FU (ratones con CAC tratados con TMG y 5-FU). Los resultados corresponden a 2 experimentos independientes. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

El gen *SLC7A11* participa como miembro de un sistema de transporte específico para la cistina y el glutamato. En CCR este gen se ha visto involucrado en procesos como invasión, metástasis, predicción de recurrencia, inhibición de ferroptosis y resistencia a quimioterapia (Koppula et al., 2020; Lin et al., 2020; Xiaotian Xu et al., 2020; L. Zhang et al., 2020). En la figura 15 se puede observar que este gen tiene una tendencia a aumentar su expresión en ratones con CAC y que en los tratamientos en monoterapia con 5-FU y TMG no se disminuyen los niveles de expresión de manera significativa, mientras

que la terapia combinada de TMG+5-FU sí lo hace con respecto a los ratones con CAC sin tratar y también con respecto a los que fueron tratados con 5-FU y TMG en monoterapia.

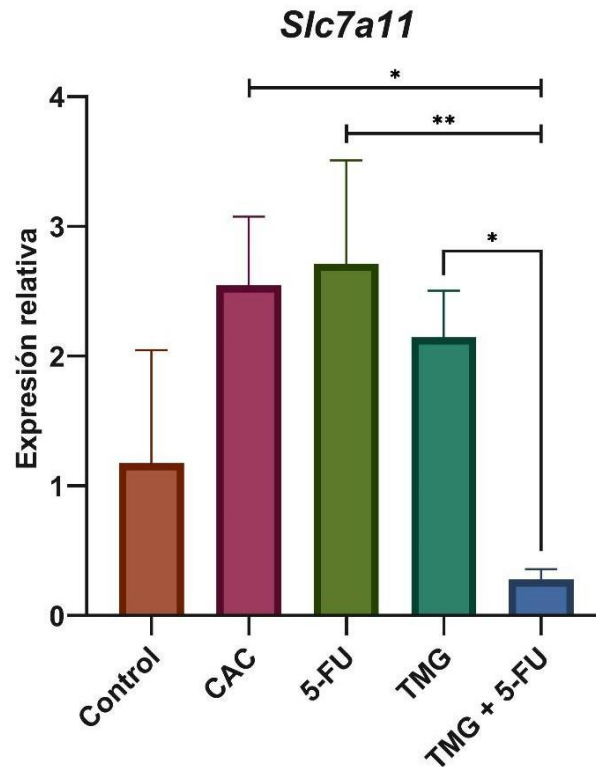


Figura 15. Niveles de expresión relativa del gen *Slc7a11* en los diferentes tejidos de ratones. Los niveles de expresión del gen *Slc7a11* son relativos con respecto al grupo Control. Cada grupo significa lo siguiente: Control (ratones sanos), CAC (ratones con CAC sin tratar), 5-FU (ratones con CAC tratados con 5-FU), TMG (ratones con CAC tratados con TMG) y TMG+5-FU (ratones con CAC tratados con TMG y 5-FU). Los resultados corresponden a 2 experimentos independientes. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

El gen *GJB2* está reportado como una conexina (Conexina 26). En CCR se ha visto involucrado en crecimiento del tumor, EMT, migración, invasión, metástasis a pulmón y bajas tasas de supervivencia libre de la enfermedad (Ezumi et al., 2008; Sirnes et al., 2015; Wu & Wang, 2019). En la figura 16 se puede observar que en los tejidos de ratones con CAC hay una tendencia a

que este gen se encuentre sobreexpresado con respecto a los ratones sanos, y que el tratamiento en monoterapia con 5-FU incluso lo aumenta aún más. El tratamiento en monoterapia con TMG no afectó los niveles de expresión de este gen con respecto a los ratones con CAC sin tratar, ya que la expresión relativa es muy similar en ambos grupos, sin embargo, la terapia combinada es capaz de disminuir los niveles de GJB2 de manera significativa con respecto al grupo de ratones tratados con 5-FU.

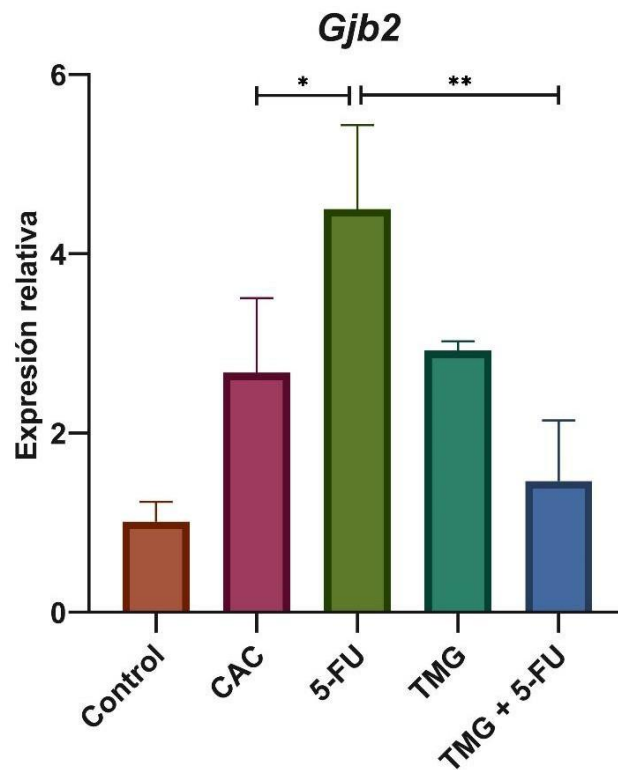


Figura 16. Niveles de expresión relativa del gen *Gjb2* en los diferentes tejidos de ratones. Los niveles de expresión del gen *Gjb2* son relativos con respecto al grupo Control. Cada grupo significa lo siguiente: Control (ratones sanos), CAC (ratones con CAC sin tratar), 5-FU (ratones con CAC tratados con 5-FU), TMG (ratones con CAC tratados con TMG) y TMG+5-FU (ratones con CAC tratados con TMG y 5-FU). Los resultados corresponden a 2 experimentos independientes. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

El gen *EIF3H* codifica para la subunidad del factor de inicio de la traducción EIF3, cuyo silenciamiento en CCR inhibe la proliferación celular (Yu et al., 2018). En la figura 17 se observa que este gen se encuentra sobreexpresado en los tejidos de ratones con CAC. Por otro lado, se muestra que la TMG por si sola fue capaz de inhibir la expresión de *Eif3h*, y aunque la terapia combinada es capaz de disminuir aún más estos niveles de expresión, el comportamiento es similar a la expresión génica obtenida en los ratones tratados solamente con 5-FU, por lo que este no parece ser un mecanismo mediante el cual se esté llevando a cabo el efecto sinérgico de la TMG+5-FU.

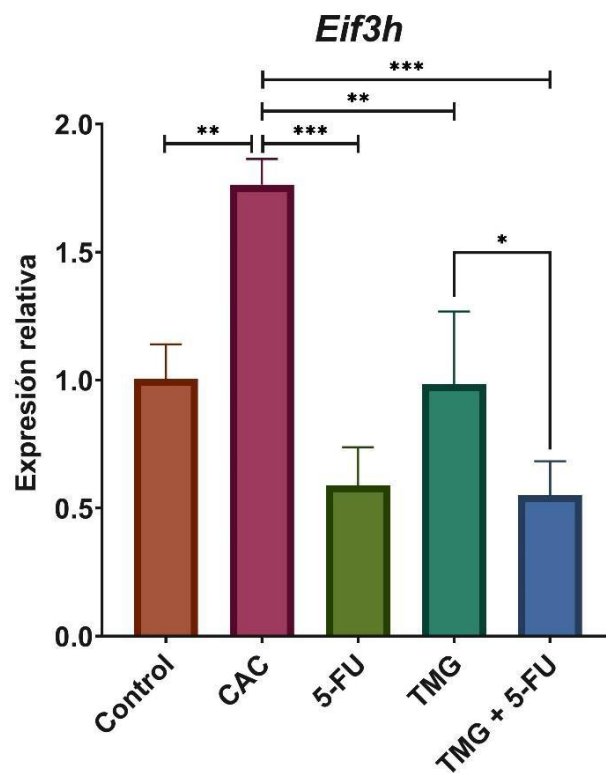


Figura 17. Niveles de expresión relativa del gen *Eif3h* en los diferentes tejidos de ratones. Los niveles de expresión del gen *Eif3h* son relativos con respecto al grupo Control. Cada grupo significa lo siguiente: Control (ratones sanos), CAC (ratones con CAC sin tratar), 5-FU (ratones con CAC tratados con 5-FU), TMG (ratones con CAC tratados con TMG) y TMG+5-FU (ratones con CAC tratados con TMG y 5-FU). Los resultados corresponden a 2 experimentos independientes. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Un fenómeno similar ocurre con la expresión del gen *TRIM31*, que codifica para una E3-ubiquitin ligasa, que en CCR se ha visto involucrada en inflamación crónica y radioquímico-resistencia (Eberhardt et al., 2020; H. Wang et al., 2018; Hui Zhang et al., 2019). En la figura 18 se puede observar que este gen se encuentra sobreexpresado en CAC, y que la TMG en monoterapia disminuyó los niveles de expresión a valores cercanos a los ratones sanos. Sin embargo, aunque *Trim31* fue regulado por la terapia combinada, el efecto es similar al observado en los ratones tratados con 5-FU en monoterapia.

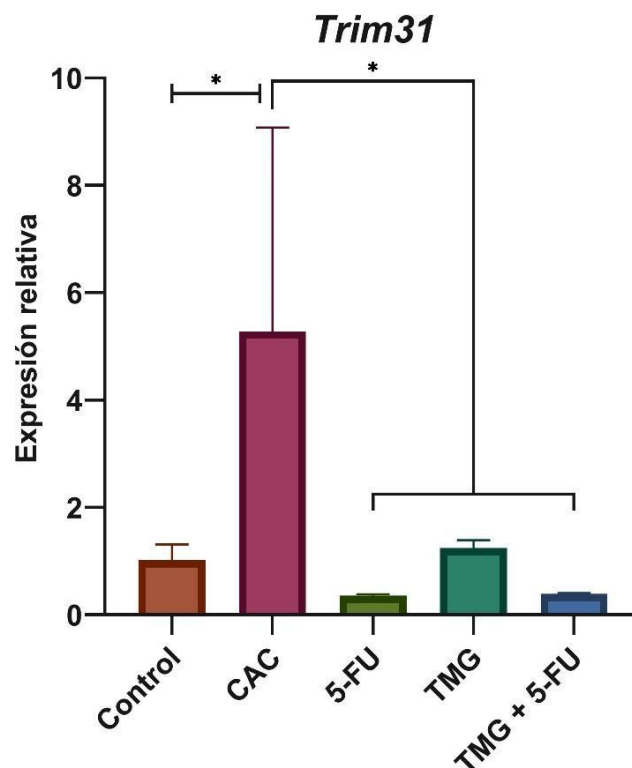


Figura 18. Niveles de expresión relativa del gen *Trim31* en los diferentes tejidos de ratones. Los niveles de expresión del gen *Trim31* son relativos con respecto al grupo Control. Cada grupo significa lo siguiente: Control (ratones sanos), CAC (ratones con CAC sin tratar), 5-FU (ratones con CAC tratados con 5-FU), TMG (ratones con CAC tratados con TMG) y TMG+5-FU (ratones con CAC tratados con TMG y 5-FU). Los resultados corresponden a 2 experimentos independientes. (* $p < 0.05$).

Los resultados mostraron que, con respecto a los genes sobreexpresados seleccionados, estos se encuentran aumentados en los ratones con CAC, coincidiendo con los datos obtenidos mediante el análisis de los microarreglos. Por otro lado, estos resultados sugieren que algunos de los mecanismos moleculares mediante los cuales la TMG junto con el 5-FU ejercen su efecto sinérgico, es mediante la modificación de la expresión de los genes *Hmga2*, *Slc7a11* y *Gjb2*.

6.5 Evaluación de los genes subexpresados seleccionados en el modelo CAC

El gen *FILIP1L* es un regulador de actividad angiogénica, el cual se ha reportado en CCR como un inhibidor de migración, invasividad y angiogénesis, además de favorecer apoptosis (Kwon et al., 2008, 2013; Kwon & Libutti, 2014; Park et al., 2016). En la figura 19 se observa que los datos obtenidos de las muestras de ratones con CAC tienen disminuida la expresión de este gen con respecto a los ratones sanos. Los tratamientos con TMG y 5-FU por separado son capaces de aumentar la expresión de este gen, sin embargo, la terapia combinada TMG+5-FU no la modifica, ya que la expresión permanece igual que en los ratones con CAC sin tratar, por lo que la regulación de este gen no parece ser uno de los mecanismos por los que actúa la terapia en conjunto.

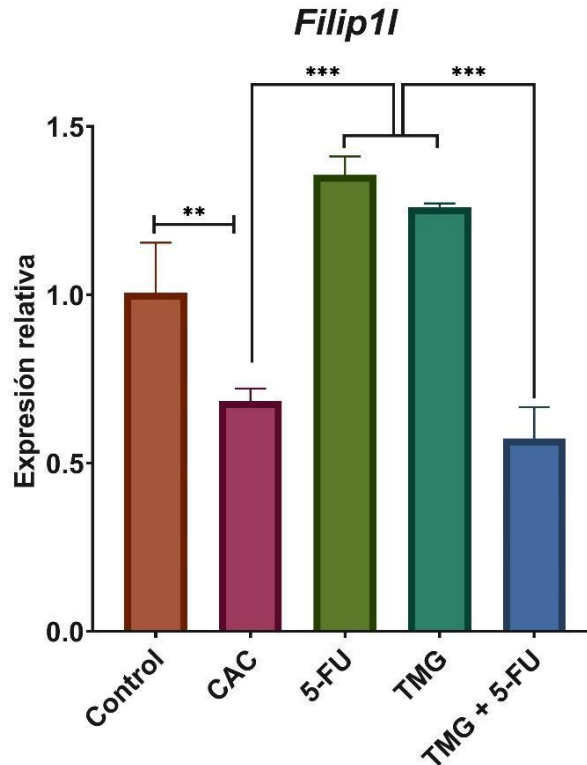


Figura 19. Niveles de expresión relativa del gen *Filip1* en los diferentes tejidos de ratones. Los niveles de expresión del gen *Filip1* son relativos con respecto al grupo Control. Cada grupo significa lo siguiente: Control (ratones sanos), CAC (ratones con CAC sin tratar), 5-FU (ratones con CAC tratados con 5-FU), TMG (ratones con CAC tratados con TMG) y TMG+5-FU (ratones con CAC tratados con TMG y 5-FU). Los resultados corresponden a 2 experimentos independientes. (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

GBP1 codifica para una GTPasa, y en CCR se ha visto que actúa como un supresor de tumores, además de estar asociado con una supervivencia a 5 años prolongada (Britzen-Laurent et al., 2013; Naschberger et al., 2008). En la figura 20 se puede observar que a pesar de que este gen tiende a estar disminuido en CCR, en el modelo de CAC este está aumentado y que todos los tratamientos tienden a disminuir su expresión, sin embargo, la terapia combinada es quien lo hace de manera significativa con respecto a los ratones con CAC sin tratar.

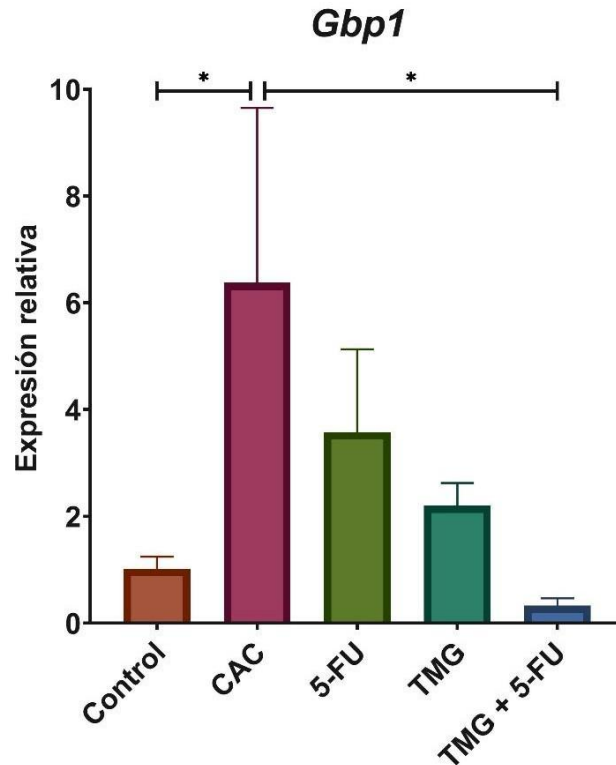


Figura 20. Niveles de expresión relativa del gen *Gbp1* en los diferentes tejidos de ratones. Los niveles de expresión del gen *Gbp1* son relativos con respecto al grupo Control. Cada grupo significa lo siguiente: Control (ratones sanos), CAC (ratones con CAC sin tratar), 5-FU (ratones con CAC tratados con 5-FU), TMG (ratones con CAC tratados con TMG) y TMG+5-FU (ratones con CAC tratados con TMG y 5-FU). Los resultados corresponden a 2 experimentos independientes. (* $p < 0.05$).

Estos resultados sugieren que, a pesar de que los datos obtenidos de los tejidos de ratones para el gen *Gbp1*, no coincidan con lo obtenido a partir de los microarreglos, la modificación de la expresión de este gen pudiera ser uno de los mecanismos mediante los cuales la TMG+5-FU ejerzan su efecto terapéutico en el modelo de CAC.

6.6 Efecto de la TMG sobre la viabilidad celular

Con la finalidad de evaluar si la TMG era capaz de inhibir la proliferación de células derivadas de cáncer de colon, se decidió utilizar un modelo in vitro que permitiera realizar los ensayos de proliferación, para lo cual se eligió la línea celular HCT-116. Brevemente, las células fueron sembradas en placas de 96 pozos y a las 24 h, estas fueron tratadas con diferentes concentraciones de TMG. Los resultados que se obtuvieron del experimento indican que a bajas concentraciones (0.1-1 mg/mL) la TMG no ejerce ningún efecto citotóxico. A partir de la concentración de 5 mg/mL la viabilidad celular presentó una disminución, siendo más evidente partir de una concentración de 20 mg/mL, mientras que en una concentración de 100 mg/mL es inhibida por completo (figura 21). Por lo cual, los resultados indican que la TMG tiene la capacidad de inhibir la proliferación de células cancerosas derivadas de CCR.

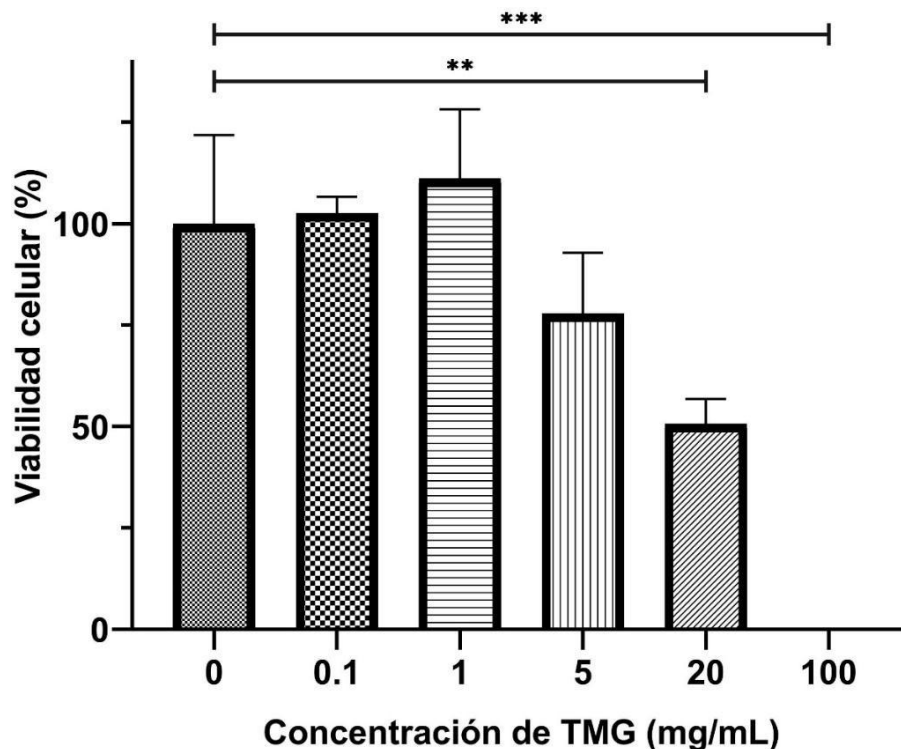


Figura 21. Efecto de la TMG sobre la viabilidad celular en la línea de CCR HCT-116. Las células HCT-116 fueron tratadas con las dosis de TMG señaladas mediante el método WST-1. (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

7. DISCUSIÓN

El CCR es una de las neoplasias con mayores tasas de incidencia y mortalidad a nivel mundial. Alrededor del 50% de los pacientes con CCR tienden a desarrollar metástasis y un alto porcentaje es diagnosticado en esta etapa (21%) (Chakedis & Schmidt, 2018; Nappi et al., 2018), lo cual vuelve más complicado y disminuye la eficacia de los tratamientos en los pacientes (ACS, octubre 2018).

El uso del 5-FU se ha convertido en el pilar del tratamiento sistémico para el CCR (Vodenkova et al., 2020). Sin embargo, su tasa de respuesta es solamente de alrededor del 10-15%, por lo que se ha optado por combinar este fármaco con otros quimioterapéuticos como el IRI y el OX, lo cual ha llevado a aumentar las tasas de respuesta a 40-50%, pero, desafortunadamente, estos porcentajes siguen siendo poco efectivos, por lo que surge la necesidad de buscar nuevas estrategias terapéuticas (Longley et al., 2003).

Los mecanismos que confieren quimio-resistencia se pueden clasificar en extrínsecos e intrínsecos (T. Hu et al., 2016). Este último involucra alteraciones a nivel genético y epigenético que se traducen en cambios en la expresión de oncogenes y genes supresores de tumores que pueden estar involucrados en procesos como inhibición de apoptosis, EMT, reparación del DNA, autofagia, etc., por mencionar algunos (Skarkova et al., 2019; Zheng, 2017). En consecuencia, ha tomado gran relevancia la identificación de genes que estén involucrados en quimio-resistencia y su regulación mediante diferentes estrategias terapéuticas.

Hoy en día, el análisis del perfil de expresión génica de los tumores mediante el uso de microarreglos ha demostrado tener un gran potencial en el área de investigación del cáncer. Este tipo de análisis permite identificar patrones de expresión de acuerdo con la respuesta que tienen los pacientes a los diferentes tratamientos, con la finalidad de poder predecir algunos marcadores

moleculares asociados a respuesta a tratamientos y con base en ello, seleccionar el tratamiento más adecuado (Tao et al., 2017). Adicionalmente, permite descubrir nuevos blancos terapéuticos y por ende, nuevas opciones de tratamientos que sean capaces de modular a estos genes involucrados (Nannini et al., 2009).

Los compuestos provenientes de fuentes naturales han tomado gran relevancia como posibles tratamientos contra el cáncer, ya que algunos pueden ser capaces de suprimir la proliferación celular mediante el arresto del ciclo celular o induciendo apoptosis, lo que a su vez resulta en la inhibición del crecimiento del tumor (Sauter, 2020). Con el uso de estos compuestos naturales, generalmente no se busca reemplazar a la terapia convencional, sino utilizarlos de manera combinada como adyuvantes, lo que ayudaría a sensibilizar a las células cancerosas a la quimioterapia, potenciar el efecto de los fármacos, darles mayor especificidad y disminuir los efectos secundarios. Adicionalmente, los compuestos naturales tienen la ventaja de tener como diana múltiples vías de señalización, lo que puede reducir el desarrollo de quimio-resistencia. (Rejhová et al., 2018).

La TMG es un compuesto de origen natural que se encuentra principalmente en el betabel, aunque el cuerpo también es capaz de sintetizarla. Dentro del organismo, la TMG participa como donador de grupos metilo y como osmoprotector. Además de sus propiedades fisiológicas, se le han atribuido propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (Zhao et al., 2018), por lo que este compuesto tiene gran potencial para ser utilizado como adyuvante a la quimioterapia para el tratamiento del CCR.

Nuestro grupo de trabajo previamente demostró que la TMG es capaz de mejorar la respuesta del 5-FU, cuando fue administrado en terapia combinada a ratones con CAC, disminuyendo el número y tamaño de los tumores, a diferencia de lo observado en los grupos tratados con 5-FU en monoterapia (Mendoza-Rodríguez et al., 2020), lo cual sugiere que la TMG pudiera

modificar la expresión de genes involucrados en la quimio-resistencia al 5-FU y de esta manera ejercer su efecto benéfico en este tipo de neoplasia, desafortunadamente, al momento esto no ha quedado del todo establecido, motivo por el cual, en el presente trabajo se realizó la validación de genes asociados a falta de respuesta a la quimioterapia en un modelo in vivo y se evaluó su modificación por el uso de TMG.

Aquí, nosotros demostramos que la TMG en combinación con el 5-FU es capaz de modular genes que pudieran estar asociados a quimio-resistencia de acuerdo con los datos obtenidos a partir del análisis de microarreglos provenientes de pacientes que son refractarios a la quimioterapia con FOLFOX4.

En el análisis bioinformático realizado en este trabajo se observó que existen patrones de expresión diferentes en los pacientes que NRFX4 con respecto a los que RFX4 y que, a pesar de que existe heterogeneidad entre los pacientes, lo cual es característico del CCR (Molinari et al., 2018), estos tienden a agruparse de acuerdo con su respuesta a la terapia. En total, se encontraron 598 GDE. Los genes sobreexpresados, que en total fueron 118, han sido reportados en diferentes procesos biológicos y en el desarrollo y progresión de CCR, así como a resistencia a la quimioterapia, entre ellos destacan procesos tales como desregulación transcripcional en cáncer, el cual involucra la alteración en genes que codifican para factores de transcripción, cofactores y reguladores de cromatina (Lee & Young, 2013); ciclo celular; vía de señalización p53, quien es un importante supresor de tumores que participa arrojando el ciclo celular, e induciendo apoptosis y senescencia, y que suele estar alterado en muchos tipos de cáncer (Hong et al., 2014); y ferroptosis, la cual es un tipo de muerte celular, cuya inducción tiene un gran potencial terapéutico en cáncer (Mou et al., 2019).

Con respecto a los genes subexpresados, estos fueron un total de 480, de los cuales, dentro de sus principales características destacan, adhesiones focales, las cuales están asociadas a resistencia a la terapia contra el cáncer (Eke & Cordes, 2015); y activación del complemento, cuya activación en el microambiente tumoral favorece el crecimiento de los tumores y la metástasis (Afshar-Kharghan, 2017), por mencionar algunos.

Posterior a este análisis in silico, se seleccionaron los genes a evaluar en el modelo de CAC. De acuerdo con los resultados obtenidos, hay un mayor número de GDE que se encuentran subexpresados en los pacientes que NRFX4, sin embargo, de la gran mayoría se desconoce o no se ha reportado el posible papel que desempeñan en CCR, por lo que, por esa razón, el trabajo se enfocó principalmente en los genes que se encontraban sobreexpresados, pues se contaba con más información bibliográfica. Esto no quiere decir que los genes que no se seleccionaron no sean importantes o que no pudieran estar favoreciendo la quimio-resistencia a FOLFOX4, sin embargo, al tener como objetivo evaluar un posible tratamiento, es necesario conocer la repercusión que tendrá la regulación de la expresión de dichos genes.

Con respecto a los genes seleccionados a evaluar en el modelo murino de CAC, el gen *HMGA2* es un factor de transcripción arquitectónico, cuya expresión es mínima o ausente en tejidos y células de adultos en condiciones fisiológicas normales, mientras que en cáncer su expresión suele estar aumentada, lo cual sugiere que desempeña un papel esencial en el proceso de carcinogénesis, además de que su sobreexpresión está relacionada con un mal pronóstico para los pacientes con CCR (Xiaochen Wang et al., 2011; Xin Wang et al., 2021). Nosotros pudimos observar, que la expresión de este gen en los tejidos proveniente de ratones con CAC (sin ningún tratamiento) presentaron una expresión aumentada. Estudios anteriores han reportado un vínculo directo entre la resistencia al 5-FU con este gen. Se sabe que uno de los mecanismos es debido a que *HMGA2* se une directamente a la región

promotora del gen *Dvl2*, que a su vez favorece la sobre activación de la vía Wnt/ β -catenina (Xi Xu et al., 2018), lo que podría explicar la baja tasa de respuesta que tienen los ratones al ser tratados con 5-FU (Mendoza-Rodríguez et al., 2020). Esto concuerda con lo observado en el grupo de ratones tratados con 5-FU, en el cual no hubo una disminución en los niveles de expresión de este gen, siendo muy similar a lo observado en CAC. Por otro lado, el uso de TMG sola o combinada con 5-FU disminuyó de manera significativa la expresión de *Hmga2*. Previamente, nuestro grupo de trabajo demostró que el tratamiento con TMG+5-FU es capaz de disminuir la expresión de β -catenina en el núcleo de las CEI, mientras que en los tejidos de los ratones tratados con 5-FU esto no sucedía (Mendoza-Rodríguez et al., 2020), lo cual podría explicar un posible mecanismo mediante el cual la TMG pudiera estar afectando la expresión de β -catenina, siendo esto a través de la alteración de *Hmga2*.

El gen *SLC7A11* forma parte del sistema Xc-, que es un transportador antiporte de L-cistina/L-glutamato, independiente de Na^+ y dependiente de Cl^- . Este sistema se encuentra en la superficie celular y regula la entrada de cistina (precursor de la cisteína) intercambiando glutamato en una relación 1:1. Se ha observado que la expresión de este gen es esencial para la formación y mantenimiento del tumor debido a que ayuda a evitar el estrés oxidativo en las células cancerosas (Koppula et al., 2020). Además, es un predictor de recurrencia de la enfermedad, invasión profunda del tumor, metástasis a ganglios linfáticos e invasión venosa (Lin et al., 2020). En el presente trabajo se observó que en los tejidos de ratones con CAC sin tratar este gen se encuentra sobreexpresado con respecto a los de ratones sanos. Además, se mostró que el tratamiento con 5-FU y TMG en monoterapia no modifican estos niveles de expresión. Sin embargo, la terapia combinada TMG+5-FU sí fue capaz de disminuirlos de manera significativa. La sobreexpresión de *SLC7A11* está involucrada en la inhibición de ferroptosis y estudios previos han demostrado que la supresión de este gen es capaz de favorecer la muerte de

las células cancerosas vía ferroptosis en modelos de CCR (Yong Xia et al., 2020; Xiaotian Xu et al., 2020; L. Zhang et al., 2020). Por otra parte, la TMG participa como donador de grupos metilo en la conversión de homocisteína a metionina, la cual a su vez promueve la síntesis de cisteína, aminoácido importante para la síntesis de GSH, lo que le confiere propiedades antioxidantes (Zhao et al., 2018), que podrían poner en ventaja a las células cancerosas para mitigar el estrés oxidativo, sin embargo, los resultados sugieren que la terapia combinada al disminuir los niveles de *Slc7a11*, pudiera disminuir los niveles de moléculas antioxidantes y de este modo inducir ferroptosis. A la fecha, no se ha reportado si la TMG tiene alguna participación en la promoción de ferroptosis, sin embargo, se ha demostrado que, bajo ciertas condiciones, la TMG puede actuar como un compuesto pro-oxidante, ya que se ha observado que en células cancerosas derivadas de cáncer de próstata, la TMG aumenta los niveles de moléculas oxidantes como malondialdehído y el estado oxidante total, y disminuye la cantidad de moléculas antioxidantes como GSH, SOD y CAT, así como el estado antioxidante total (Kar et al., 2019). La disminución de estas moléculas oxidantes como lo es el GSH, genera un exceso de ROS e impide que la enzima glutatión peroxidasa 4 utilice al GSH para reducir los lípidos hidroperóxidos de la membrana, lo que a su vez causa inducción de ferroptosis (Koppula et al., 2020). En el modelo de CCR evaluado en este trabajo, no se observó que la TMG por si sola modifique la expresión de este gen, mientras que en la terapia combinada de TMG+5-FU sí se observó, sugiriendo con base a estudios previos (Guo et al., 2015; Kar et al., 2019; Mendoza-Rodríguez et al., 2020) que otro posible mecanismo de acción de la terapia combinada podría ser la inducción de ferroptosis, dando un panorama más amplio, del cual falta mucho por evaluar para poder asentar estos posibles mecanismos.,

El gen *GJB2* o conexina 26, es una proteína que participa en las uniones gap, favoreciendo el intercambio de pequeñas moléculas como iones y metabolitos (Sirnes et al., 2015). Generalmente, las conexinas eran consideradas como

supresores de tumores, sin embargo, se ha observado que la conexina 26 se encuentra sobreexpresada en pacientes con cáncer metastásico (Wu & Wang, 2019). En el caso del CCR, se ha asociado principalmente con metástasis a pulmón y su sobreexpresión está relacionada con bajas tasas de supervivencia libres de la enfermedad (Ezumi et al., 2008). En este trabajo, los resultados demuestran que en el grupo CAC hay una tendencia a aumentar la expresión de *Gjb2* con respecto al grupo control y que el tratamiento con 5-FU incluso eleva de manera significativa la expresión de este gen con respecto al grupo CAC. El tratamiento combinado de TMG+5-FU es capaz de suprimir de manera significativa la expresión de GJB2 con respecto al grupo 5-FU y esta tiende a ser menor que en el grupo CAC.

Hasta este momento, los resultados obtenidos no permiten establecer una conexión directa de este gen ni su posible efecto en CCR mediante la TMG, siendo necesario evaluar a mayor detalle características como su localización intracelular y de esta manera dilucidar las posibles funciones. Esto es debido a que se ha reportado que la conexina 26 en cáncer, tiende a estar localizada en el citoplasma, activando la vía de señalización PI3K, favoreciendo el crecimiento del tumor, EMT, migración e invasión (Wu & Wang, 2019). Por otro lado, su sobreexpresión y localización en membrana, está asociada a disminución de la adhesividad e incremento de la migración (Polusani et al., 2016; Wu & Wang, 2019). Al momento, se desconoce el papel que tenga el 5-FU y la TMG sobre la alteración de este gen. Sin embargo, sí se conoce el efecto que tiene el 5-FU y la TMG sobre moléculas que participan señalización río abajo de GJB2, como lo es PI3K. Con respecto al 5-FU, se ha observado que células derivadas de CCR al ser tratadas con 5-FU incrementan los niveles de PI3K y la fosforilación de AKT, mientras que el uso de compuestos adyuvantes con propiedades anticancerígenas contrarresta este efecto (Li et al., 2019), hecho que pudiera estar sucediendo con la combinación de TMG, ya que se ha demostrado que esta es capaz de inhibir la vía PI3K/AKT en células de cáncer de próstata, lo que a su vez favorece el proceso de apoptosis

(Hang Zhang et al., 2021). Aunque en los resultados de este trabajo no se observa que la TMG por si sola altere la expresión de este gen, en la terapia combinada la modificación de *Gjb2* pudiera ser importante para poder potenciar el efecto del 5-FU, sin embargo, hace falta corroborar si lo que se ha observado en otros modelos, como lo es la modulación de la vía PI3K/AKT, también se cumple en este modelo de CCR.

Por otro lado, el gen *EIF3H* codifica para una subunidad del factor de inicio de la traducción EIF3, que está implicado en el inicio de síntesis de proteínas . Se ha observado que se encuentra altamente expresado en tejidos de pacientes con CCR con respecto a tejidos de colon sano (Yu et al., 2018). Este hecho correlaciona con los datos obtenidos en este trabajo, donde se observó que este gen se sobreexpresa en los tejidos de los ratones con CAC. Los 3 tratamientos son capaces de reducir la expresión de *Eif3h*, sin embargo, los niveles de expresión obtenidos en el grupo 5-FU y en el de TMG+5-FU son los mismos, indicando que la terapia combinada no parece ejercer su mecanismo de acción a través de la afectación de la expresión de este gen. Sin embargo, debe destacarse el hecho de que la TMG por si sola es capaz de disminuir los niveles de expresión de *Eif3h* a valores similares a los de los tejidos de ratones sanos.

A pesar de que el 5-FU por si solo sea capaz de modificar la expresión de este gen, su eficacia en la reducción del número de tumores es baja, esto pudiera deberse a que, a pesar de la inhibición de *Eif3h*, el 5-FU es capaz de inducir moléculas que son activadas por *EIF3H* como lo son Snail1 y YAP1, quienes están asociados a resistencia al 5-FU, probablemente a través de otros genes. Por otro lado, el tratamiento combinado de TMG+5-FU sí disminuye la expresión de Snail1 (Mendoza-Rodríguez et al., 2020; Xueni Xu et al., 2019), lo que podría estar relacionado con su mayor eficacia terapéutica.

Otro de los genes evaluados fue *TRIM31*, que codifica para una E3 Ubiquitin ligasa, y suele estar sobreexpresado en CCR, desempeñando un papel

oncogénico. Este gen está asociado a resistencia a la radioterapia y su expresión correlaciona con el estadio clínico de CCR de los pacientes, además de ser un indicador de baja supervivencia (Eberhardt et al., 2020; H. Wang et al., 2018; Hui Zhang et al., 2019). En el presente trabajo nosotros pudimos observar que en CAC aumenta su expresión de manera significativa. Por otro lado, los 3 tratamientos son capaces de disminuir la expresión de *Trim31*, sin embargo, la TMG no parece potenciar el efecto del 5-FU mediante la alteración de este gen, ya que los niveles de expresión obtenidos en la terapia combinada son iguales a los obtenidos en el grupo del tratamiento con 5-FU. Es importante destacar que tanto el 5-FU y la TMG en monoterapia son capaces de inhibir la expresión de este gen, debido a que en CCR *TRIM31* participa activando la vía de señalización NF- κ B, y esto a su vez promueve la expresión de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IL-6, además de promover invasión y metástasis mediante la inducción de EMT (H. Wang et al., 2018). Existe evidencia de que la TMG por si sola es capaz de inhibir a NF- κ B (Go et al., 2005; Yi & Kim, 2012) y la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α (Detopoulou et al., 2008; Kim et al., 2014) e IL-1 β (Yaoyao Xia et al., 2018). Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que uno de los mecanismos por los que la TMG pudiera tener los efectos mencionados, es a través de *Trim31*. En cuanto al 5-FU, a pesar de que es capaz de inhibir a *Trim31*, se ha observado en otros modelos que este fármaco es capaz de inducir la expresión de NF- κ B (Chang et al., 2012), lo que pudiera explicar en parte la falta de respuesta de los ratones al 5-FU.

El gen *FILIP1L* es un regulador de actividad angiogénica. Se ha observado que en CCR actúa como un supresor de tumores y suele estar subexpresado en esta neoplasia, principalmente a causa de la metilación de su promotor (Kwon et al., 2013). En el modelo evaluado en este trabajo, se confirma que *Filip1l* está subexpresado en los tejidos de los ratones con CAC. Los tratamientos en monoterapia con 5-FU y TMG fueron capaces de aumentar la expresión de este gen, lo que es benéfico ya que *FILIP1L* está asociado con

inhibición de proliferación, migración, invasión, metástasis y angiogénesis, además de favorecer apoptosis (Kwon et al., 2013; Kwon & Libutti, 2014; Park et al., 2016). Sin embargo, la terapia combinada no modificó el patrón de expresión con respecto al grupo CAC, a pesar de ello, la disminución en el número de tumores de los ratones tratados con la terapia combinada es mayor que en los tratamientos con los compuestos en monoterapia. Con respecto a los resultados obtenidos en el grupo de los ratones tratados con TMG, estos son de gran relevancia ya que la alteración de *Filip1l* podría ser uno de los mecanismos por los cuales se ha observado que la TMG es capaz de inhibir angiogénesis y la expresión de metaloproteinasas de matriz (MMP) (Yi & Kim, 2012).

El gen *GBP1* codifica para una GTPasa que se induce en respuesta a IFN- γ , la cual se sabe que en CCR actúa como un supresor de tumores, inhibiendo la proliferación celular, migración e invasión (Britzen-Laurent et al., 2013). En CCR este gen suele estar disminuido en su expresión, hecho que está asociado a un peor pronóstico y una baja tasa de supervivencia a 5 años en los pacientes (Naschberger et al., 2008). Contrario a lo obtenido en el análisis de microarreglos, *Gbp1* se encuentra sobreexpresado en los ratones con CAC. Sin embargo, cabe destacar que el CAC es una neoplasia donde existe una inflamación exacerbada a causa de la presencia de colitis, mientras que en el CCR no asociado a colitis, el proceso inflamatorio no es de tal magnitud (Terzić et al., 2010). *GBP1* es un gen inducido por IFN- γ , una citocina proinflamatoria que, junto con TNF- α , se ha visto relacionada con crecimiento, progresión y metástasis del CAC (S. Hu et al., 2019; Kobelt et al., 2020; Talero et al., 2011). Por el contrario, se ha descrito que en CCR no asociado a colitis, la presencia de células Th1, productoras de IFN- γ , favorece el pronóstico y supervivencia libre de la enfermedad de los pacientes (Tosolini et al., 2011).

En el presente trabajo, el tratamiento en terapia combinada es capaz de inhibir de manera significativa la expresión de *Gbp1*. A pesar de lo que se ha descrito

en CCR, donde la expresión de *GBP1* es favorable debido a su papel como supresor de tumores (Britzen-Laurent et al., 2013; Naschberger et al., 2008), en este modelo *Gbp1* pudiera ser un indicador de inflamación.

Los resultados del presente estudio sugieren que la TMG en combinación con el 5-FU pudieran estar regulando la inflamación a través de la modulación de IFN- γ , lo que a su vez favorece su efecto anticancerígeno, ya que diversos estudios avalan que la regulación del proceso inflamatorio es importante para el tratamiento del CCR (Zappavigna et al., 2020). No obstante, se debe investigar más a fondo el papel que desempeña *Gbp1* en CAC y las consecuencias de su regulación, debido a que INF- γ , quien actúa a través de *GBP1*, puede tener cualidades pro y antitumorales (Castro et al., 2018).

Finalmente y de acuerdo con los resultados obtenidos, se observó que la TMG es capaz de modificar la expresión de genes involucrados en proliferación, lo cual se pudo corroborar mediante uso del modelo in vitro con HCT-116, en el cual se determinó que la TMG inhibe la proliferación celular cuando se utiliza en altas concentraciones, lo que coincide con lo que se ha observado en otros modelos de cáncer (Guo et al., 2015; Kar et al., 2019).

A pesar de que el efecto sobre la viabilidad celular se observa a concentraciones muy elevadas (alrededor de 100 mg/mL) en el modelo in vitro, en el modelo in vivo se ha demostrado que a una concentración de 50 mg/kg administrada a ratones con CAC en conjunto con el 5-FU es suficiente para reducir el número de tumores en alrededor de un 80% (Mendoza-Rodríguez et al., 2020), por lo que es necesario evaluar a futuro el efecto de la terapia combinada TMG+5-FU en el modelo in vitro, para determinar si bajas concentraciones de la TMG son capaces de sensibilizar a las células cancerosas al 5-FU, como se observa en el modelo in vivo.

Este trabajo sugiere algunos de los mecanismos de acción mediante los cuales la terapia combinada TMG+5-FU ejerce su efecto anticancerígeno, a través de la modificación de genes que pudieran estar asociados a quimio-resistencia en pacientes que NRFX4. Además, los resultados obtenidos resaltan el potencial de la TMG para seguir siendo estudiada como un posible adyuvante a la quimioterapia convencional con el 5-FU en CCR, e inclusive en otros tipos de cáncer.

8. CONCLUSIONES

- La TMG es capaz de mejorar la respuesta al tratamiento con 5-FU en un modelo murino de CCR mediante la modificación de genes involucrados en el proceso de carcinogénesis y quimio-resistencia como lo son *Hmga2*, *Slc7a11*, *Gjb2* y *Gbp1*.
- La TMG inhibe la proliferación celular en un modelo in vitro de CCR.

9. PERSPECTIVAS

- Determinar los niveles de las proteínas codificadas por los genes que son regulados por la terapia combinada TMG+5-FU, así como su localización celular.
- Evaluar las posibles vías de señalización involucradas para esclarecer el mecanismo de acción de la terapia combinada.
- Evaluar el efecto de la terapia combinada TMG+5-FU en un modelo in vitro.
- Corroborar la modificación de la expresión de los genes evaluados por la terapia combinada en un modelo in vitro.

10. REFERENCIAS

Afshar-Kharghan, V. (2017). The role of the complement system in hemostasis.

- The Journal of Clinical Investigation*, 127(3), 780–789.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1172/JCI90962>
- Ahmed, M. (2020). Colon Cancer: A Clinician's Perspective in 2019. *Gastroenterology Research*, 13(1), 1–10. <https://doi.org/10.14740/gr1239>
- Aldaco-Sarvide, F., Pérez-Pérez, P., Cervantes-Sánchez, G., Torrecillas-Torres, L., Erazo-Valle-Solís, A. A., Cabrera-Galeana, P., Motola-Kuba, D., Anaya, P., Rivera-Rivera, S., & Cárdenas-Cárdenas, E. (2018). Mortality from cancer in Mexico: 2015 update. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 17(1), 28–34. <https://doi.org/10.24875/j.gamo.M18000105>
- AltAnalyze (2.1.4.3) [Software] (2021). Recuperado de <http://www.altanalyze.org/>
- American Cancer Society (21 de febrero de 2018). Etapas del cáncer colorrectal. <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-colon-o-recto/deteccion-diagnostico-clasificacion-por-etapas/clasificacion-de-la-etapa.html>
- American Cancer Society (21 de febrero 2018). *Cirugía para el cáncer de colon*. <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-colon-o-recto/tratamiento/cirugia-del-colon.html>
- American Cancer Society. (21 de febrero 2018). *Quimioterapia para el cáncer colorrectal*. <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-colon-o-recto/tratamiento/quimioterapia.html>
- American Cancer Society. (13 de julio 2018). *Inmunoterapia para el cáncer colorrectal*. <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-colon-o-recto/tratamiento/inmunoterapia.html>
- American Cancer Society. (20 de octubre 2018). *Tratamiento del cáncer de colon según la etapa*. <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-colon-o-recto/tratamiento/por-etapas-colon.html>
- American Society of Clinical Oncology (enero de 2021). Cáncer colorrectal: Estadios. <https://www.cancer.net/es/tipos-de-c%C3%A1ncer/c%C3%A1ncer-colorrectal/estadios>
- Beaugerie, L., & Itzkowitz, S. H. (2015). Cancers complicating inflammatory

- bowel disease. *New England Journal of Medicine*, 372(15), 1441–1452.
<https://doi.org/10.1056/NEJMra1403718>
- Berlau, J., Gleib, M., & Pool-Zobel, B. L. (2004). Colon cancer risk factors from nutrition. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378(3), 737–743.
<https://doi.org/10.1007/s00216-003-2284-4>
- Blondy, S., David, V., Verdier, M., Mathonnet, M., Perraud, A., & Christou, N. (2020). 5-Fluorouracil resistance mechanisms in colorectal cancer: From classical pathways to promising processes. *Cancer Science*, 111(9), 3142–3154. <https://doi.org/10.1111/cas.14532>
- Britzen-Laurent, N., Lipnik, K., Ocker, M., Naschberger, E., Schellerer, V. S., Croner, R. S., Vieth, M., Waldner, M., Steinberg, P., Hohenadl, C., & Stürzl, M. (2013). GBP-1 acts as a tumor suppressor in colorectal cancer cells. *Carcinogenesis*, 34(1), 153–162.
<https://doi.org/10.1093/carcin/bgs310>
- Cao, H., Xu, E., Liu, H., Wan, L., & Lai, M. (2015). Epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer metastasis: A system review. *Pathology Research and Practice*, 211(8), 557–569.
<https://doi.org/10.1016/j.prp.2015.05.010>
- Cappell, M. S. (2008). Pathophysiology, Clinical Presentation, and Management of Colon Cancer. *Gastroenterology Clinics of North America*, 37(1), 1–24. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2007.12.002>
- Castro, F., Cardoso, A. P., Gonçalves, R. M., Serre, K., & Oliveira, M. J. (2018). Interferon-gamma at the crossroads of tumor immune surveillance or evasion. *Frontiers in Immunology*, 9(MAY), 1–19.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00847>
- Chakedis, J., & Schmidt, C. R. (2018). Surgical Treatment of Metastatic Colorectal Cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 27(2), 377–399. <https://doi.org/10.1016/j.soc.2017.11.010>
- Chang, C. T., Ho, T. Y., Lin, H., Liang, J. A., Huang, H. C., Li, C. C., Lo, H. Y., Wu, S. L., Huang, Y. F., & Hsiang, C. Y. (2012). 5-fluorouracil induced intestinal mucositis via nuclear factor-κB activation by transcriptomic

- analysis and in vivo bioluminescence imaging. *PLoS ONE*, 7(3), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031808>
- de Man, F. M., Goey, A. K. L., van Schaik, R. H. N., Mathijssen, R. H. J., & Bins, S. (2018). Individualization of Irinotecan Treatment: A Review of Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Pharmacogenetics. *Clinical Pharmacokinetics*, 57(10), 1229–1254. <https://doi.org/10.1007/s40262-018-0644-7>
- Dekker, E., Tanis, P. J., Vleugels, J. L. A., Kasi, P. M., & Wallace, M. B. (2019). Colorectal cancer. *The Lancet*, 394(10207), 1467–1480. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32319-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32319-0)
- Detopoulou, P., Panagiotakos, D. B., Antonopoulou, S., Pitsavos, C., & Stefanadis, C. (2008). Dietary choline and betaine intakes in relation to concentrations of inflammatory markers in healthy adults: The ATTICA study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 87(2), 424–430. <https://doi.org/10.1093/ajcn/87.2.424>
- Domenica, F., Palma, E. De, Argenio, V. D., Pol, J., Kroemer, G., Maiuri, M. C., & Salvatore, F. (2019). The Molecular Hallmarks of the Serrated Pathway in Colorectal Cancer. *Cancers*, 11(1017), 3–5.
- Eberhardt, W., Haeussler, K., Nasrullah, U., & Pfeilschifter, J. (2020). Multifaceted roles of TRIM proteins in colorectal carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20), 1–29. <https://doi.org/10.3390/ijms21207532>
- Eke, I., & Cordes, N. (2015). Focal adhesion signaling and therapy resistance in cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 31, 65–75. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2014.07.009>
- Ezumi, K., Yamamoto, H., Murata, K., Higashiyama, M., Damdinsuren, B., Nakamura, Y., Kyo, N., Okami, J., Chew, Y. N., Takemasa, I., Ikeda, M., Sekimoto, M., Matsuura, N., Nojima, H., & Monden, M. (2008). Aberrant expression of connexin 26 is associated with lung metastasis of colorectal cancer. *Clinical Cancer Research*, 14(3), 677–684. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1184>

- Fong, W., & To, K. K. W. (2019). Drug repurposing to overcome resistance to various therapies for colorectal cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(17), 3383–3406. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03134-0>
- Francescone, R., Hou, V., & Grivennikov, S. (2015). Cytokines, IBD and colitis-associated cancer. *Inflammatory Bowel Diseases*, 21(2), 409–418. <https://doi.org/https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000236>
- Gao, R., Gao, Z., Huang, L., & Qin, H. (2017). Gut microbiota and colorectal cancer. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 36(5), 757–769. <https://doi.org/10.1007/s10096-016-2881-8>
- Giampieri, R., Restivo, A., Pusceddu, V., Del Prete, M., Maccaroni, E., Bittoni, A., Faloppi, L., Andrikou, K., Bianconi, M., Cabras, F., Berardi, R., Zorcolo, L., Scintu, F., Cascinu, S., & Scartozzi, M. (2017). The Role of Aspirin as Antitumoral Agent for Heavily Pretreated Patients With Metastatic Colorectal Cancer Receiving Capecitabine Monotherapy. *Clinical Colorectal Cancer*, 16(1), 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2016.07.011>
- Global Cancer Observatory, (2020). Cancer Today. <https://gco.iarc.fr/today/home>
- Go, E. K., Jung, K. J., Kim, J. Y., Yu, B. P., & Chung, H. Y. (2005). Betaine suppresses proinflammatory signaling during aging: The involvement of nuclear factor- κ B via nuclear factor-inducing kinase/I κ B kinase and mitogen-activated protein kinases. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 60(10), 1252–1264. <https://doi.org/10.1093/gerona/60.10.1252>
- Guo, Y., Xu, L. S., Zhang, D., Liao, Y. P., Wang, H. P., Lan, Z. H., Guan, W. J., & Liu, C. Q. (2015). Betaine effects on morphology, proliferation, and p53-induced apoptosis of hela cervical carcinoma cells in vitro. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16(8), 3195–3201. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.8.3195>
- Hong, B., Heuvel, A., Prabhu, V., Zhang, S., & El-Deiry, W. (2014). Targeting

- Tumor Suppressor p53 for Cancer Therapy: Strategies, Challenges and Opportunities. *Current Drug Targets*, 15(1), 80–89. <https://doi.org/10.2174/1389450114666140106101412>
- Howells, L. M., Iwuji, C. O. O., Irving, G. R. B., Barber, S., Walter, H., Sidat, Z., Griffin-Teall, N., Singh, R., Foreman, N., Patel, S. R., Morgan, B., Steward, W. P., Gescher, A., Thomas, A. L., & Brown, K. (2019). Curcumin combined with FOLFOX chemotherapy is safe and tolerable in patients with metastatic colorectal cancer in a randomized phase IIa trial. *Journal of Nutrition*, 149(7), 1133–1139. <https://doi.org/10.1093/jn/nxz029>
- Hu, S., Yuan, J., Xu, J., Li, X., Zhang, G., Ma, Q., Zhang, B., Hu, T., & Song, G. (2019). TNF- α and IFN- γ synergistically inhibit the repairing ability of mesenchymal stem cells on mice colitis and colon cancer. *American Journal of Translational Research*, 11(9), 6207–6220.
- Hu, T., Li, Z., Gao, C. Y., & Cho, C. H. (2016). Mechanisms of drug resistance in colon cancer and its therapeutic strategies. *World Journal of Gastroenterology*, 22(30), 6876–6889. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i30.6876>
- Kang, M., & Martin, A. (2017). Microbiome and colorectal cancer: Unraveling host-microbiota interactions in colitis-associated colorectal cancer development. *Seminars in Immunology*, 32(February), 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2017.04.003>
- Kar, F., Hacıoglu, C., Kacar, S., Sahinturk, V., & Kanbak, G. (2019). Betaine suppresses cell proliferation by increasing oxidative stress-mediated apoptosis and inflammation in DU-145 human prostate cancer cell line. *Cell Stress and Chaperones*, 24(5), 871–881. <https://doi.org/10.1007/s12192-019-01022-x>
- Keller, D. S., Windsor, A., Cohen, R., & Chand, M. (2019). Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: review of the evidence. *Techniques in Coloproctology*, 23(1), 3–13. <https://doi.org/10.1007/s10151-019-1926-2>
- Kim, D. H., Sung, B., Kang, Y. J., Jang, J. Y., Hwang, S. Y., Lee, Y., Kim, M., Im, E., Yoon, J.-H., Kim, C. M., Chung, H. Y., & Kim, N. D. (2014). Anti-

- inflammatory effects of betaine on AOM/DSS-induced colon tumorigenesis in ICR male mice. *International Journal of Oncology*, 45(3), 1250–1256. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2515>
- Kobelt, D., Zhang, C., Clayton-Lucey, I. A., Glaubien, R., Voss, C., Siegmund, B., & Stein, U. (2020). Pro-inflammatory TNF- α and IFN- γ Promote Tumor Growth and Metastasis via Induction of MACC1. *Frontiers in Immunology*, 11(May), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00980>
- Koppula, P., Zhuang, L., & Gan, B. (2020). Cystine transporter SLC7A11/xCT in cancer: ferroptosis, nutrient dependency, and cancer therapy. *Protein and Cell*. <https://doi.org/10.1007/s13238-020-00789-5>
- Kuipers, E. J., Grady, W. M., Lieberman, D., Seufferlein, T., Sung, J. J., Boelens, P. G., Van De Velde, C. J. H., & Watanabe, T. (2015). Colorectal cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 1, 1–25. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.65>
- Kwon, M., Hanna, E., Lorang, D., He, M., Quick, J. S., Adem, A., Stevenson, C., Chung, J., Hewitt, S. M., Zudaire, E., Cuttitta, F., & Libutti, S. K. (2008). Functional Characterization of Filamin A Interacting Protein 1-Like, a Novel Candidate for Antivascular Cancer Therapy. *Cancer Research*, 68(18), 7332–7341. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1087>. Functional
- Kwon, M., Lee, S. J., Reddy, S., Rybak, Y., Adem, A., & Libutti, S. K. (2013). Down-regulation of Filamin A interacting protein 1-like is associated with promoter methylation and an invasive phenotype in breast, colon, lung and pancreatic cancers. *PLoS ONE*, 8(12), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082620>
- Kwon, M., & Libutti, S. K. (2014). Filamin A interacting protein 1-like as a therapeutic target in cancer. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 18(12), 1435–1447. <https://doi.org/10.1517/14728222.2014.957181>
- Lee, T. I., & Young, R. A. (2013). Transcriptional regulation and its misregulation in disease. *Cell*, 152(6), 1237–1251. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.014>

- Li, Q., Wei, L., Lin, S., Chen, Y., Lin, J., & Peng, J. (2019). Synergistic effect of kaempferol and 5-fluorouracil on the growth of colorectal cancer cells by regulating the PI3K/Akt signaling pathway. *Molecular Medicine Reports*, 20(1), 728–734. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10296>
- Lin, W., Wang, C., Liu, G., Bi, C., Wang, X., Zhou, Q., & Jin, H. (2020). SLC7A11/xCT in cancer: biological functions and therapeutic implications. *American Journal of Cancer Research*, 10(10), 3106–3126. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33163260><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC7642655>
- Longley, D. B., Allen, W. L., & Johnston, P. G. (2006). Drug resistance, predictive markers and pharmacogenomics in colorectal cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1766(2), 184–196. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2006.08.001>
- Longley, D. B., Harkin, D. P., & Johnston, P. G. (2003). 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer*, 3(5), 330–338. <https://doi.org/10.1038/nrc1074>
- Luo, C., & Zhang, H. (2017). The Role of Proinflammatory Pathways in the Pathogenesis of Colitis-Associated Colorectal Cancer. *Mediators of Inflammation*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/5126048>
- Marin, J. J. G., Sanchez De Medina, F., Castão, B., Bujanda, L., Romero, M. R., Martinez-Augustin, O., Del Moral-Avila, R., & Briz, O. (2012). Chemoprevention, chemotherapy, and chemoresistance in colorectal cancer. *Drug Metabolism Reviews*, 44(2), 148–172. <https://doi.org/10.3109/03602532.2011.638303>
- Martinez-Balibrea, E., Martínez-Cardus, A., Gines, A., Ruiz De Porras, V., Moutinho, C., Layos, L., Manzano, J. L., Buges, C., Bystrup, S., Esteller, M., & Abad, A. (2015). Tumor-related molecular mechanisms of oxaliplatin resistance. *Molecular Cancer Therapeutics*, 14(8), 1767–1776. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0636>
- Mendoza-Rodríguez, M. G., Sánchez-Barrera, C. Á., Callejas, B. E., García-Castillo, V., Beristain-Terrazas, D. L., Delgado-Buenrostro, N. L., Chirino,

- Y. I., León-Cabrera, S. A., Rodríguez-Sosa, M., Gutierrez-Cirlos, E. B., Pérez-Plasencia, C., Vaca-Paniagua, F., Meraz-Ríos, M. A., & Terrazas, L. I. (2020). Use of STAT6 phosphorylation inhibitor and trimethylglycine as new adjuvant therapies for 5-fluorouracil in colitis-associated tumorigenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6). <https://doi.org/10.3390/ijms21062130>
- Molinari, C., Marisi, G., Passardi, A., Matteucci, L., De Maio, G., & Ulivi, P. (2018). Heterogeneity in colorectal cancer: A challenge for personalized medicine? *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12). <https://doi.org/10.3390/ijms19123733>
- Mou, Y., Wang, J., Wu, J., He, D., Zhang, C., Duan, C., & Li, B. (2019). Ferroptosis, a new form of cell death: Opportunities and challenges in cancer. *Journal of Hematology and Oncology*, 12(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0720-y>
- Nannini, M., Pantaleo, M. A., Maleddu, A., Astolfi, A., Formica, S., & Biasco, G. (2009). Gene expression profiling in colorectal cancer using microarray technologies: Results and perspectives. *Cancer Treatment Reviews*, 35(3), 201–209. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2008.10.006>
- Nappi, A., Berretta, M., Romano, C., Tafuto, S., Cassata, A., Casaretti, R., Silvestro, L., Divitiis, C. De, Alessandrini, L., Fiorica, F., Ottaiano, A., & Nasti, G. (2018). Metastatic Colorectal Cancer: Role of Target Therapies and Future Perspectives. *Current Cancer Drug Targets*, 18(5), 421–429. <https://doi.org/10.2174/1568009617666170209095143>
- Naschberger, E., Croner, R. S., Merkel, S., Dimmler, A., Tripal, P., Amann, K. U., Kremmer, E., Brueckl, W. M., Papadopoulos, T., Hohenadl, C., Hohenberger, W., & Stürzl, M. (2008). Angiostatic immune reaction in colorectal carcinoma: Impact on survival and perspectives for antiangiogenic therapy. *International Journal of Cancer*, 123(9), 2120–2129. <https://doi.org/10.1002/ijc.23764>
- Park, Y. L., Park, S. Y., Lee, S. H., Kim, R. Bin, Kim, J. K., Rew, S. Y., Myung, D. S., Cho, S. B., Lee, W. S., Kim, H. S., & Joo, Y. E. (2016). Filamin A

- interacting protein 1-like expression inhibits progression in colorectal cancer. *Oncotarget*, 7(44), 72229–72241. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12664>
- Polusani, S. R., Kalmykov, E. A., Chandrasekhar, A., Zucker, S. N., & Nicholson, B. J. (2016). Cell coupling mediated by connexin 26 selectively contributes to reduced adhesivity and increased migration. *Journal of Cell Science*, 129(23), 4399–4410. <https://doi.org/10.1242/jcs.185017>
- Rejhová, A., Opattová, A., Čumová, A., Slíva, D., & Vodička, P. (2018). Natural compounds and combination therapy in colorectal cancer treatment. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 144, 582–594. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.12.039>
- Rigas, B., & Tsioulis, G. J. (2015). The evolving role of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in colon cancer prevention: A cause for optimism. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 353(1), 1–8. <https://doi.org/10.1124/jpet.114.220806>
- Rogers, B. B., Cuddahy, T., Briscella, C., Ross, N., Olszanski, A. J., & Denlinger, C. S. (2019). Oxaliplatin: Detection and management of hypersensitivity reactions. *Clinical Journal of Oncology Nursing*, 23(1), 68–75. <https://doi.org/10.1188/19.CJON.68-75>
- Sairenji, T., Collins, K. L., & Evans, D. V. (2017). An Update on Inflammatory Bowel Disease. *Primary Care - Clinics in Office Practice*, 44(4), 673–692. <https://doi.org/10.1016/j.pop.2017.07.010>
- Sauter, E. R. (2020). Cancer prevention and treatment using combination therapy with natural compounds. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 13(3), 265–285. <https://doi.org/10.1080/17512433.2020.1738218>
- Shawki, S., Ashburn, J., Signs, S. A., & Huang, E. (2019). *Colon Cancer: Inflammation Associated Cancer*. 27(2), 269–287. <https://doi.org/10.1016/j.soc.2017.11.003.Colon>
- Simon, K. (2016). Colorectal cancer development and advances in screening. *Clinical Interventions in Aging*, 11, 967–976. <https://doi.org/10.2147/CIA.S109285>

- Sirnes, S., Lind, G. E., Bruun, J., Fykerud, T. A., Mesnil, M., Lothe, R. A., Rivedal, E., Kolberg, M., & Leithe, E. (2015). Connexins in colorectal cancer pathogenesis. *International Journal of Cancer*, *137*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1002/ijc.28911>
- Skarkova, V., Kralova, V., Vitovcova, B., & Rudolf, E. (2019). Selected Aspects of Chemoresistance Mechanisms in Colorectal Carcinoma—A Focus on Epithelial-to-Mesenchymal Transition, Autophagy, and Apoptosis. *Cells*, *8*(3), 234. <https://doi.org/10.3390/cells8030234>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *71*(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Talero, E., Sánchez-Fidalgo, S., Villegas, I., De La Lastra, C. A., Illanes, M., & Motilva, V. (2011). Role of different inflammatory and tumor biomarkers in the development of ulcerative colitis-associated carcinogenesis. *Inflammatory Bowel Diseases*, *17*(3), 696–710. <https://doi.org/10.1002/ibd.21420>
- Tan, B. L., & Norhaizan, M. E. (2019). Curcumin combination chemotherapy: The implication and efficacy in cancer. *Molecules*, *24*(14), 1–21. <https://doi.org/10.3390/molecules24142527>
- Tao, Z., Shi, A., Li, R., Wang, Y., Wang, X., & Zhao, J. (2017). Microarray bioinformatics in cancer- A review. *Journal of B.U.ON.*, *22*(4), 838–843.
- Tauriello, D. V. F., Calon, A., Lonardo, E., & Batlle, E. (2017). Determinants of metastatic competency in colorectal cancer. *Molecular Oncology*, *11*(1), 97–119. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12018>
- Terzić, J., Grivennikov, S., Karin, E., & Karin, M. (2010). Inflammation and Colon Cancer. *Gastroenterology*, *138*(6), 2101–2114. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.01.058>
- Thanikachalam, K., & Khan, G. (2019). Colorectal cancer and nutrition. *Nutrients*, *11*(1). <https://doi.org/10.3390/nu11010164>

- Tosolini, M., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Fredriksen, T., Mauger, S., Bindea, G., Berger, A., Bruneval, P., Fridman, W. H., Pagès, F., & Galon, J. (2011). Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, Th2, Treg, Th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer Research*, *71*(4), 1263–1271. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2907>
- Vodenkova, S., Buchler, T., Cervena, K., Veskrnova, V., Vodicka, P., & Vymetalkova, V. (2020). 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future. *Pharmacology and Therapeutics*, *206*, 107447. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.107447>
- Waldner, M. J., & Neurath, M. F. (2015). Mechanisms of Immune Signaling in Colitis-Associated Cancer. *Cmgh*, *1*(1), 6–16. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2014.11.006>
- Wang, H., Yao, L., Gong, Y., & Zhang, B. (2018). Trim31 regulates chronic inflammation via nf-kb signal pathway to promote invasion and metastasis in colorectal cancer. *American Journal of Translational Research*, *10*(4), 1247–1259.
- Wang, Xiaochen, Liu, X., Li, A. Y., Chen, L., Lai, L., Lin, H., Hu, S., Yao, L., Peng, J., Loera, S., Xue, L., Zhou, L., Zheng, S., Chu, P., Zhang, S., & Ann, D. K. (2011). Overexpression of HMGA2 Promotes Metastasis and Impacts Survival of Colorectal Cancers. *Clinical Cancer Research*, *17*(8), 2570–2580. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2542>. Overexpression
- Wang, Xin, Wang, J., & Wu, J. (2021). Emerging roles for HMGA2 in colorectal cancer. *Translational Oncology*, *14*(1), 100894. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2020.100894>
- Wei, Y., Yang, P., Cao, S., & Zhao, L. (2018). The combination of curcumin and 5-fluorouracil in cancer therapy. *Archives of Pharmacal Research*, *41*(1). <https://doi.org/10.1007/s12272-017-0979-x>
- Weitz, J., Koch, M., Debus, J., Höhler, T., Galle, P. R., & Büchler, M. W. (2005).

- Colorectal cancer. *Lancet*, 365(9454), 153–165.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)17706-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)17706-X)
- Wilky, B. A. (2019). Immune checkpoint inhibitors: The linchpins of modern immunotherapy. *Immunological Reviews*, 290(1), 6–23.
<https://doi.org/10.1111/imr.12766>
- Wu, J. I., & Wang, L. H. (2019). Emerging roles of gap junction proteins connexins in cancer metastasis, chemoresistance and clinical application 06 Biological Sciences 0601 Biochemistry and Cell Biology 11 Medical and Health Sciences 1112 Oncology and Carcinogenesis. *Journal of Biomedical Science*, 26(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0497-x>
- Xia, Yaoyao, Chen, S., Zhu, G., Huang, R., Yin, Y., & Ren, W. (2018). Betaine inhibits interleukin-1 β production and release: Potential mechanisms. *Frontiers in Immunology*, 9(NOV), 1–12.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02670>
- Xia, Yong, Liu, S., Li, C., Ai, Z., Shen, W., Ren, W., & Yang, X. (2020). Discovery of a novel ferroptosis inducer-talaroconvolutin A—killing colorectal cancer cells in vitro and in vivo. *Cell Death and Disease*, 11(11).
<https://doi.org/10.1038/s41419-020-03194-2>
- Xu, Xi, Wang, Y., Deng, H., Liu, C., Wu, J., & Lai, M. (2018). HMGA2 enhances 5-fluorouracil chemoresistance in colorectal cancer via the Dvl2/Wnt pathway. *Oncotarget*, 9(11), 9963–9974.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.24133>
- Xu, Xiaotian, Zhang, X., Wei, C., Zheng, D., Lu, X., Yang, Y., Luo, A., Zhang, K., Duan, X., & Wang, Y. (2020). Targeting SLC7A11 specifically suppresses the progression of colorectal cancer stem cells via inducing ferroptosis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 152(June).
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105450>
- Xu, Xueni, Chen, X., Xu, M., Liu, X., Pan, B., Qin, J., Xu, T., Zeng, K., Pan, Y., He, B., Sun, H., Sun, L., & Wang, S. (2019). miR-375-3p suppresses tumorigenesis and partially reverses chemoresistance by targeting YAP1

- and SP1 in colorectal cancer cells. *Aging*, 11(18), 7357–7385. <https://doi.org/10.18632/aging.102214>
- Yao, D., Dong, M., Dai, C., & Wu, S. (2019). Inflammation and Inflammatory Cytokine Contribute to the Initiation and Development of Ulcerative Colitis and Its Associated Cancer. *Inflammatory Bowel Diseases*, 25(10), 1595–1602. <https://doi.org/10.1093/ibd/izz149>
- Yi, E. Y., & Kim, Y. J. (2012). Betaine inhibits in vitro and in vivo angiogenesis through suppression of the NF-κB and Akt signaling pathways. *International Journal of Oncology*, 41(5), 1879–1885. <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1616>
- Youn, J., Cho, E., & Lee, J. E. (2019). Association of choline and betaine levels with cancer incidence and survival: A meta-analysis. *Clinical Nutrition*, 38(1), 100–109. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2018.01.042>
- Yu, G., Liao, J., Wu, J., Ding, J., & Zhang, L. (2018). The proliferation of colorectal cancer cells is suppressed by silencing of EIF3H. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 82(10), 1694–1701. <https://doi.org/10.1080/09168451.2018.1484271>
- Zappavigna, S., Cossu, A. M., Grimaldi, A., Bocchetti, M., Ferraro, G. A., Nicoletti, G. F., Filosa, R., & Caraglia, M. (2020). Anti-inflammatory drugs as anticancer agents. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), 1–29. <https://doi.org/10.3390/ijms21072605>
- Zhang, Hang, Nie, L., Qin, K., Wang, Z., Yang, B., Luo, Y., & Zhao, R. (2021). [Betaine induces apoptosis of C4-2B prostate cancer cells via inhibiting PI3K/AKT/NF-κB signaling pathway]. *Xi bao yu fen zi mian yi xue za zhi = Chinese journal of cellular and molecular immunology*, 37(6), 513–519.
- Zhang, Hui, Deng, Y., Liang, L., Shen, L., Zhu, J., Wang, Y., Zhang, J., & Zhang, Z. (2019). Knockdown of TRIM31 enhances colorectal cancer radiosensitivity by inducing DNA damage and activating apoptosis. *OncoTargets and Therapy*, 12, 8179–8188. <https://doi.org/10.2147/OTT.S215769>
- Zhang, L., Liu, W., Liu, F., Wang, Q., Song, M., Yu, Q., Tang, K., Teng, T., Wu,

- D., Wang, X., Han, W., & Li, Y. (2020). IMCA Induces Ferroptosis Mediated by SLC7A11 through the AMPK/mTOR Pathway in Colorectal Cancer. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/1675613>
- Zhang, Y. Z., & Li, Y. Y. (2014). Inflammatory bowel disease: Pathogenesis. *World Journal of Gastroenterology*, 20(1), 91–99. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i1.91>
- Zhao, G., He, F., Wu, C., Li, P., Li, N., Deng, J., Zhu, G., Ren, W., & Peng, Y. (2018). Betaine in inflammation: Mechanistic aspects and applications. *Frontiers in Immunology*, 9(MAY), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01070>
- Zheng, H. C. (2017). The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers. *Oncotarget*, 8(35), 59950–59964. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19048>



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL I.P.N.

Departamento de Biomedicina Molecular

Ciudad de México a 28 de Julio del 2021.

Dr. Miguel Ángel Vargas Mejía,
Coordinador Académico
Presente.

Por medio de la presente, nos permitimos informar a usted que hemos revisado la tesis Titulada:

Evaluación de la expresión de genes asociados a resistencia al 5-Fluorouracilo en cáncer de colon y su modificación por el uso de Trimetilglicina

del C. **Karen Vanessa Fernández Muñoz**

Estudiante del programa de Maestría del departamento de Biomedicina Molecular y el material reunido es suficiente para que se proceda a la realización de examen de grado correspondiente.

Atentamente

Marco Antonio Meraz Ríos
Tutor

Dra. Mónica Graciela Mendoza Rodríguez
Co-Tutor

Dra. María Carmen Sánchez Torres
Asesor

Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda
Asesor

Nota: Todo el comité deberá incluir correo electrónico y No. de CVU.