

**NORMALIZACIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN MEDIANTE qPCR DE LOS GENES *ID1*
E *ID3* A PARTIR DE BIOPSIAS DE ADENOCARCINOMA GÁSTRICO EMBEBIDAS
EN PARAFINA Y LÍNEA CELULAR AGS**

JAIME ALEXANDER CHIVATÁ ÁVILA

**UNIVERSIDAD DISTRITAL FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS
FACULTAD DE CIENCIAS Y EDUCACIÓN
PROYECTO CURRICULAR DE LICENCIATURA EN BIOLOGÍA
BOGOTÁ D.C**

2020

**NORMALIZACIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN MEDIANTE qPCR DE LOS GENES *ID1*
E *ID3* A PARTIR DE BIOPSIAS DE ADENOCARCINOMA GÁSTRICO EMBEBIDAS
EN PARAFINA Y LÍNEA CELULAR AGS**

Trabajo de grado bajo la modalidad de Investigación-Innovación para optar por el título de
Licenciado en Biología

AUTOR:

JAIME ALEXANDER CHIVATÁ ÁVILA

DIRECTOR:

Ph.D. LUIS FRANCISCO BECERRA GALINDO

CO-DIRECTORA:

M.Sc. JOSEFA ANTONIA RODRIGUEZ GARCÍA

**GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN BIOLOGÍA DEL CÁNCER
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA**

**UNIVERSIDAD DISTRITAL FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS
FACULTAD DE CIENCIAS Y EDUCACIÓN
PROYECTO CURRICULAR DE LICENCIATURA EN BIOLOGÍA
BOGOTÁ D.C**

2020

Nota de Aceptación:

Luis Francisco Becerra
Director

Josefa Antonia Rodríguez
Co-directora

Jehison Alirio Herrera Pulido
Jurado

Bogotá, D.C. Febrero 2020

Nota aclaratoria

“La universidad no se hace responsable de las ideas, ni del contenido del presente trabajo, debido a que estas hacen parte única y exclusivamente de los autores”. Capitulo XV, Artículo

117, Acuerdo NÚMERO 029 DE 1988 del Consejo Superior de la Universidad Distrital

Francisco José de Caldas.

A las personas que siempre me guían y me impulsan a cumplir mis sueños:

Jaime, Veronica, Yulieth, Yesid.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Jaime y Veronica, porque gracias a su esfuerzo, dedicación y apoyo he alcanzado este logro. A mis hermanos Yesid y Yulieth por su constante motivación y compañía.

A mis directores de investigación Msc. Josefa Antonia Rodríguez y Msc. Luis Francisco Becerra por su colaboración y acompañamiento. A la profesora Josefa Rodríguez, también por permitirme iniciar mi proceso de formación como investigador en el Instituto Nacional de Cancerología.

A Olga Cristina Lozano por su asesoría, paciencia y apoyo en el desarrollo de este trabajo, por enseñarme tantas cosas del laboratorio, ayudarme a crecer tanto profesional como personalmente y brindarme su amistad.

A Ph.D Alba Lucia Combita por sus sugerencias y apoyo en el desarrollo del trabajo.

A Esperanza Trujillo Gama “Panchita” por la donación de la línea celular AGS y por todos sus consejos.

Al Instituto Nacional de Cancerología, especialmente al Grupo de Investigación en Biología del Cáncer por permite realizar esta investigación en sus instalaciones, por el conocimiento allí adquirido y las experiencias vividas.

A Jehison Alirio Herrera por la evaluación de este trabajo.

Al Dr. Juan Carlos Mejia por la lectura de los cortes histológicos.

A Yeimmy Prada, Wendy Montero, Carlos Huertas, Nataly Poveda y Laura Rey por su compañerismo y amistad.

A Alejandra Herrán, por su amistad y compañía durante la carrera, por el aprendizaje y los momentos vividos.

A la Universidad Distrital Francisco José de Caldas por los años de formación académica.

RESUMEN

En Colombia, para el año 2018 el cáncer gástrico (CG) presentó una elevada tasa de incidencia y mortalidad, siendo el cuarto cáncer más frecuente en ambos sexos. La sobre expresión de *ID1* e *ID3* en diversos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer gástrico da cuenta de su papel en la tumorigénesis en diversos tejidos. Estudios demuestran que la sobreexpresión en CG de estos genes está relacionada con el potencial carcinogénico de las células tumorales gástricas, la pobre diferenciación, etapas avanzadas de la enfermedad y mayor agresividad tumoral de modo que estos genes podrían ser considerados como marcadores moleculares para el tratamiento, el pronóstico, y la prevención de la enfermedad. Los departamentos de patología archivan un gran número de muestras embebidas en parafina fijadas con formalina (FFPE), material que representa un recurso disponible y poco empleado en el estudio de biomarcadores, debido a que las propiedades químicas del ARN y el ADN cambian en el proceso de fijación con formalina. El objetivo de este trabajo fue normalizar una metodología para la amplificación de los genes *ID1* e *ID3* a partir de ARN obtenido de biopsias FFPE de cáncer gástrico y de la línea celular AGS. En este estudio se incluyeron biopsias embebidas en parafina de algunos pacientes con CG tratados en el Instituto Nacional de Cancerología (INC), el ARN fue extraído de secciones de FFPE, posteriormente fue sometido a PreAmp y amplificado mediante qPCR, encontrando que sin el uso del PreAmp, la estabilidad del gen constitutivo *GAPDH* fue mejor que cuando este se utilizó, pero el ciclo umbral se da más tardíamente sin ese tratamiento para los genes *ID1* e *ID3*. Adicionalmente de manera tentativa se realizaron ensayos de citotoxicidad con Cannabidiol en la línea celular AGS debido a que este compuesto tiene propiedades antitumorales y de regulación negativa para el gen *ID1*.

Palabras clave: FFPE, qPCR, línea celular AGS, amplificación, cáncer gástrico, biomarcadores.

CONTENIDO

DEDICATORIA.....	V
AGRADECIMIENTOS.....	VI
RESUMEN.....	VII
CONTENIDO.....	VIII
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	XI
LISTA DE FIGURAS.....	XIII
LISTA DE TABLAS.....	XV
INTRODUCCIÓN.....	16
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	19
1.1 Descripción del problema.....	19
1.2 Pregunta problema.....	21
1.3 Justificación.....	21
2. OBJETIVOS.....	25
2.1 Objetivo general.....	25
2.2 Objetivos específicos.....	25
3. MARCO TEORICO.....	26
3.1 Cáncer gástrico: Generalidades.....	26
3.1.1 Epidemiología.....	26
3.1.2 Cáncer gástrico en Colombia.....	27
3.1.3 Factores de riesgo.....	29
3.1.4 Diagnóstico y clasificación de la patología.....	30
3.1.4.1 La enfermedad incipiente y avanzada.....	31

3.1.4.2	Tipos de tumores.....	32
3.1.4.3	Clasificación del estadiaje patológico.....	33
3.1.4.4	Clasificación TNM.....	36
3.1.5	Tratamiento.....	38
3.1.6	Biomarcadores y aspectos moleculares.....	40
3.2	Genes <i>ID</i>	41
3.2.1	Genes <i>ID</i> en cáncer gástrico.....	45
3.3	Efectos del Cannabidiol (CBD) en cáncer gástrico y en los genes <i>ID</i>	46
3.4	Tejido embebido en parafina fijado con formalina (FFPE).....	47
4.	METODOLOGÍA.....	49
4.1	Diseño del estudio	49
4.2	Población y muestra.....	50
4.2.1	Criterios de inclusión/exclusión de la población participante.....	50
4.3	Controles.....	50
4.4	Selección de áreas histológicas, confirmación patológica y realización punch.....	51
4.5	Desparafinación y extracción de ARN.....	52
4.6	Cuantificación de muestras.....	52
4.7	Retrotranscripción.....	53
4.8	Pre-Amplificación.....	53
4.9	Reacción de qPCR.....	54
4.10	Gen de referencia.....	56
4.11	Cultivo celular.....	56
4.11.1	Descongelación.....	57

4.11.2	Tripsinización.....	59
4.11.3	Recuento celular.....	60
4.11.4	Curva de crecimiento y confluencia celular.....	61
4.12	Ensayo colorimétrico de proliferación MTT.....	62
4.12.1	Siembra de placas para MTT.....	63
4.12.2	Concentraciones CBD	63
5.	RESULTADOS.....	66
5.1	Bloques FFPE.....	66
5.2	Normalización de las condiciones para la amplificación de <i>IDI</i> e <i>ID3</i>	66
5.2.1	Desparafinación y extracción y ARN.....	66
5.2.2	Retrotranscripción y Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.....	67
5.2.3	Preamplificación (PreAmp).....	70
5.3	CBD y línea celular AGS.....	74
5.3.1	Ensayo de crecimiento celular	74
5.3.2	Ensayo colorimétrico de proliferación MTT.....	75
6.	ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	78
6.1	Normalización de las condiciones para la amplificación de <i>IDI</i> e <i>ID3</i>	78
6.2	CBD y línea celular AGS.....	81
7.	CONCLUSIONES.....	85
8.	RECOMENDACIONES.....	86
9.	PERSPECTIVAS.....	87
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	88

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario.

AGS: Línea celular de adenocarcinoma gástrico.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

ARNt: Ácido ribonucleico de transferencia.

bHLH: Hélice-bucle-hélice básico.

CBD: Cannabidiol.

CG: Cáncer gástrico.

C_t: Ciclo umbral (del inglés *threshold cycle*).

DMSO: Dimetil sulfóxido.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

FFPE: Fijado con formalina embebido en parafina (por sus siglas en inglés *formalin fixation paraffin embeddin*).

GAPDH: Gliceraldehido-3 fosfato deshidrogenasa.

GIBC: Grupo de investigación en biología del cáncer.

HLH: Hélice-bucle-hélice (por sus siglas en inglés *Helix-loop-helix*).

Id: Inhibidor de diferenciación (Gen múrido).

ID1: Inhibidor de diferenciación-1 (Gen humano).

ID2: Inhibidor de diferenciación -2 (Gen humano).

ID3: Inhibidor de diferenciación -3 (Gen humano).

ID4: Inhibidor de diferenciación -4 (Gen humano).

INC: Instituto Nacional de Cancerología.

JGCA: Japanese Gastric Cancer Association.

LLA-B: Leucemia linfocítica aguda tipo B.

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol.

pb: Pares de bases nitrogenadas.

PBS: Amortiguador fosfato-salino.

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (tiempo real).

RPMI: Medio Roswell Park Memorial Institute.

RT PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa.

SFB: Suero fetal bovino.

TNM: Sistema de clasificación del cáncer por las siglas de Tamaño, Nódulos, Metástasis.

ΔR_n : Magnitud de fluorescencia ($\Delta R_n = R_n - \text{Línea de base}$).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Gráfico de barras incidencia de CG por región, estandarizadas por edad y sexo para el 2018.

Figura 2. Tasas de incidencia y mortalidad de cáncer estandarizadas por edad en 2018 ambos sexos y todas las edades para Colombia.

Figura 3. Dibujo esquemático que muestra las características histológicas de la pared del estómago.

Figura 4. Diagrama de la clasificación macroscópica de cáncer gástrico incipiente y avanzado.

Figura 5. Hipótesis de la génesis del cáncer gástrico de forma intestinal.

Figura 6. Algoritmo general para el manejo del cáncer gástrico.

Figura 7. Esquema del control de la transcripción efectuado por reguladores positivos y negativos.

Figura 8. Obtención del punch.

Figura 9. Fundamento PCR en tiempo real (qPCR).

Figura 10. Monitoreo del cultivo celular.

Figura 11. Proceso de descongelación línea celular.

Figura 12. Proceso de descongelación línea celular en cabina de flujo laminar.

Figura 13. Esquema de la cámara de Neubauer sobre una microfotografía de una de las gradillas de recuento.

Figura 14. Placa de 6 pozos utilizada en el ensayo de densidad celular.

Figura 15. Siembra de células AGS en la placa multipozo.

Figura 16. Espectrofotómetro accionado mediante el software SkanIt 5.0 (Thermo Scientific).

Figura 17. Gráfica de amplificación (ΔR_n vs. ciclos de la PCR) de un bloque FFPE a 36 ng/ μ l.

Figura 18. Gráfica de amplificación (ΔR_n vs. ciclos de la PCR) de la línea AGS a 36 ng/ μ l.

Figura 19. Gráfica de amplificación (ΔR_n vs. ciclos de la PCR) mediante qPCR para una muestra FFPE tratada con PreAmp.

Figura 20. Gráfica de amplificación (ΔR_n vs. ciclos de la PCR) de muestras FFPE a 36 ng/ μ l.

Figura 21. Gráfica de amplificación (ΔR_n vs. ciclos de la PCR) de las muestras FFPE a 36 ng/ μ l.

Figura 22. Amplificación de los genes ID1, ID3 y GAPDH para la línea celular AGS y una de las muestras FFPE, en gel de agarosa al 2%.

Figura 23. Curva de crecimiento celular para la línea AGS (Número de células vs. Días).

Figura 24. Microfotografías del crecimiento celular de la línea AGS.

Figura 25. Resultado macroscópico del ensayo colorimétrico de proliferación MTT.

Figura 26. Cristales de Formazan obtenidos a partir del ensayo de MTT.

Figura 27. Microfotografías del resultado del ensayo MTT.

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.** Descripción de las características morfológicas de los subtipos de cáncer incipiente.
- Tabla 2.** Descripción de las características morfológicas de los tipos de tumores avanzados.
- Tabla 3.** Descripción de la clasificación TNM donde se muestran las características de cada uno de los criterios del sistema.
- Tabla 4.** Estadios de clasificación para cáncer gástrico en el sistema TNM 2010.
- Tabla 5.** Cantidad de reactivos utilizados en la mezcla del mix para cada muestra en la preparación de la retrotranscripción.
- Tabla 6.** Volumen de reactivos utilizados para la preparación de la preamplificación.
- Tabla 7.** Numero de pares de bases y fluoróforos con las que se diseñaron las sondas para cada uno de los genes de interés.
- Tabla 8.** Concentraciones finales de las soluciones de trabajo de CBD para ser utilizado en el ensayo de MTT.
- Tabla 9.** Diferentes concentraciones de ARN para la misma muestra al modificar el tiempo de incubación a 56°C de la Proteinasa k y Buffer PKD, de 15 minutos a 1 hora y 30 minutos.
- Tabla 10.** Concentraciones de ARN de la totalidad de bloques FFPE de adenocarcinoma gástrico utilizados en el estudio, obtenidos mediante el fluorómetro Qubit.
- Tabla 11.** Valores de los C_t para los genes ID1, ID3 y GAPDH, utilizando dos concentraciones de RNA diferentes para cada una de las muestras.
- Tabla 12.** Valor de C_t resultantes de qPCR en bloques FFPE para el gen constitutivo, posterior a pre-amplificación.
- Tabla 13.** Valor de C_t resultantes de qPCR en la totalidad de bloques FFPE para los genes ID1 e ID3.

INTRODUCCIÓN

Aunque la incidencia y mortalidad de cáncer aumenta de forma acelerada alrededor del mundo, sus causas no han sido dilucidadas. Sin embargo existe evidencia de su asociación con el desarrollo poblacional así como con los cambios en la prevalencia y distribución de los principales factores de riesgo asociados con el desarrollo socioeconómico (Bray et al., 2018).

El cáncer gástrico (CG) es el quinto cáncer más diagnosticado y la tercera causa de muerte por cáncer tanto en hombres como en mujeres en el mundo (Bray et al., 2018). Las tasas de incidencia son mayores en países en vía de desarrollo en comparación con países desarrollados (Csendes y Figueroa, 2017). Su etiología es multifactorial, en ella pueden influir múltiples factores de riesgo tales como la genética y la epigenética del individuo, las alteraciones moleculares adquiridas con el tiempo, los antecedentes familiares, los hábitos alimenticios, la exposición a patógenos como *Helicobacter pylori*, entre otros (Otero, 2008).

La alta mortalidad por CG se asocia principalmente al diagnóstico y tratamiento tardío, debido a que esta es una enfermedad que no posee una sintomatología específica, de modo que sus signos y síntomas pueden parecer otras patologías gastrointestinales benignas como la gastritis o la úlcera gástrica, lo cual puede conducir a que se enmascare el tumor maligno y en consecuencia tarde el inicio del manejo terapéutico (Lv, Wang y Liang, 2012) de manera que el estudio y desarrollo de biomarcadores que puedan ser fácilmente detectables y usados en el pronóstico, diagnóstico o seguimiento de la enfermedad es de suma importancia clínica (Campuzano, 2010) pues con la oncología basada en genética, las decisiones médicas se pueden vincular más con las características genómicas y proteicas de los tumores (Verdaguer et al . 2017).

Existe un gran interés en el desarrollo y validación de biomarcadores específicos para los diferentes tipos de cáncer. En cáncer gastrointestinal se emplean actualmente varios biomarcadores tales como: las mutaciones en los protooncogenes RAS (H-RAS, N-RAS y K-RAS) útiles para identificar pacientes con cáncer colorrectal (CCR) que no responderán a los agentes dirigidos contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR); la sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2), útil para determinar el tratamiento del cáncer gástrico, ya que se ha demostrado que los tumores HER2 positivos responden a la terapia con anticuerpos anti HER2; o las mutaciones en BRCA utilizadas para diferenciar pacientes con cáncer de páncreas, que respondan a terapias combinadas basadas en platino y se beneficien de los inhibidores de la poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP) (Verdaguer et al . 2017). Adicionalmente en CG se ha encontrado que el nivel de expresión de los genes *ID1* e *ID3* se asocia con el potencial maligno de la enfermedad (Yang et al., 2011).

Los genes *ID1* e *ID3*, pertenecientes a la familia de los genes inhibidores de la unión al ADN, involucrados en la regulación negativa de la expresión génica, la diferenciación embrionaria, el control del ciclo celular y la apoptosis, han sido reportados en sobreexpresión en varios modelos tumorales incluido el cáncer gástrico como promotores de supervivencia tumoral, neoangiogenesis, y crecimiento de las células cancerosas, relacionándose así con la agresividad de la enfermedad, del mismo modo, la sobre expresión de estas proteínas se asocia con una pobre diferenciación histológica y en consecuencia un mal pronóstico clínico. Características que convierten estos genes en potenciales objetivos para el tratamiento y seguimiento del CG (Yang et al., 2011)

En la actualidad los bancos tejidos embebidos en bloques de parafina fijados con formalina (FFPE) representan un gran depósito de muestras clínicas patológicas, que pueden ser

aprovechadas en la investigación para el desarrollo de nuevos biomarcadores útiles en el diagnóstico, la elección del mejor tratamiento, el pronóstico o incluso para el desarrollo de nuevos objetivos terapéuticos como la inmunoterapia y las terapias dirigidas contra el cáncer gástrico (Kokkat, Patel, McGarvey, Livolsi, y Baloch, 2013), sin embargo su uso en estudios de expresión génica es limitado debido a la degradación y modificación que sufre el ARN durante el proceso de fijación con formalina (Li et al., 2008) por lo cual el presente trabajo tiene como objetivo normalizar una metodología para la detección de los genes *ID1* e *ID3* a partir de biopsias de cáncer gástrico embebidas en parafina y de la línea celular de adenocarcinoma gástrico AGS, utilizando técnicas de PCR en tiempo real.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Descripción del problema

El cáncer es un problema de salud pública cuya incidencia y mortalidad han incrementado durante las últimas décadas (Ferlay et al., 2010). Para el 2018 se diagnosticaron 18.1 millones de casos de esta enfermedad en el mundo, con una mortalidad de 9.6 millones de personas (Ferlay et al., 2019). Del total de estos casos registrados, 101.893 ocurrieron en Colombia (GLOBOCAN, 2018) y se estima que en los próximos 20 años su incidencia incrementará considerablemente a nivel mundial (Pardo y Cendales, 2015). Adicionalmente existe un riesgo de contraer cáncer antes de los 75 años de edad de aproximadamente un 20% y un 10% de morir por esta causa (Ferlay et al., 2019).

El cáncer gástrico, es el quinto cáncer más diagnosticado en el mundo con más de un millón de nuevos casos en 2018 y un estimado 783.000 muertes, lo que equivale a 1 de cada 12 muertes globales, ocupando así el tercer lugar en mortalidad por esta enfermedad (Bray et al., 2018). Para Colombia, durante el periodo 2007 – 2013 fue la primera causa de muerte por cáncer en hombres y la tercera en mujeres, con aproximadamente 2.767 y 1.770 muertes anuales respectivamente (Pardo y Cendales, 2015; Pardo, De Vries, Buitrago, y Gamboa, 2017).

Debido a que el Cáncer gástrico no posee síntomas específicos (García, 2013), la mayoría de los casos son detectados en una etapa avanzada, cuando el tumor ha invadido la capa muscular del estómago, lo cual contribuye a un peor pronóstico, siendo la tasa de supervivencia en estos casos menor al 10% (Gomez et al., 2015; Otero, 2008; Tsuchiya et al., 2005). Por lo anterior, el uso de biomarcadores específicos que puedan ser fácilmente usados para el pronóstico y el seguimiento de la enfermedad son de gran importancia clínica (Campuzano, 2010). Sin embargo, a la fecha no existen biomarcadores específicos para el cáncer gástrico que sean útiles en el diagnóstico,

pronóstico y seguimiento de la enfermedad (Corvalán, 2013) ya que la mayoría de moléculas identificadas han fallado en los estudios de validación (Matsuoka y Yashiro, 2018). Se han descrito genes asociados con vías de señalización implicadas en el desarrollo del cáncer, tales como las mutaciones en E-cadherina, EGFR, ERBB2, PIK3CA, KRAS, BRAF (Carneiro, Oliveira, Leite, & Seruca, 2008) pero la frecuencia de alteraciones genéticas en los genes ya mencionados es muy baja y no permite desarrollar un modelo molecular para el diagnóstico o pronóstico del cáncer gástrico (Corvalán R, 2013). Debido a esto, en los últimos años se ha prestado particular interés en la búsqueda de nuevos genes que puedan ser útiles e informativos. Particularmente los genes, *ID1* e *ID3* han sido reportados en sobre-expresión en varios modelos tumorales, incluyendo cáncer gástrico, correlacionándose con fenotipos tumorales poco diferenciados, alto potencial maligno y agresividad tumoral, de modo que se asocian con una respuesta clínica deficiente (Tsuchiya et al., 2005). Un ejemplo de esto, es el estudio realizado por Yang et al. (2011), con una corte de pacientes atendidos en The first Affiliated Hospital of Harbin Medical University (China) donde se observó que las muestras con una pobre o moderada diferenciación histológica tuvieron una expresión de *ID1* e *ID3* significativamente más elevada que las muestras con alta diferenciación histológica. Así mismo, se mostró una expresión diferencial de estos dos genes en tejidos con cáncer gástrico respecto a tejidos sanos adyacentes al tumor, de modo que la fuerte o moderada expresión de *ID3* pero no de *ID1* fue predictora de supervivencia en pacientes con cáncer gástrico. Adicionalmente, un estudio publicado por Tsuchiya et al. (2005) sugiere que el knockdown de *ID1* e *ID3* disminuye significativamente la capacidad de las células tumorales para formar metástasis peritoneales en cáncer gástrico, no obstante, aun se conocen a cabalidad las funciones de estos genes por lo cual existe un gran

interés en su estudio debido a que pueden convertirse en posibles marcadores moleculares para el tratamiento de la enfermedad.

Alrededor del mundo, los departamentos de patología habitualmente archivan una mayor cantidad de muestras embebidas en parafina fijadas con formalina (FFPE) en comparación con tejidos congelados. Estos bloques FFPE representan un recurso disponible y poco utilizado en la investigación de nuevos biomarcadores o seguimiento clínico a largo plazo donde los datos retrospectivos del paciente tales como respuesta al tratamiento e historial de supervivencia se encuentran disponibles, hecho que les confiere un gran valor en la investigación traslacional. No obstante, se ha reportado que la calidad de los ácidos nucleicos varía de acuerdo a su forma de preparación y preservación de los bloques de parafina de modo que su uso es limitado en estudios que implican expresión génica debido a la degradación y modificación del ARN durante la fijación. (Kokkat, Patel, McGarvey, Livolsi, y Baloch, 2013; Nagahashi et al., 2017).

1.2 Pregunta problema

¿Cómo mejorar la detección de los genes *ID1* e *ID3* a partir de tejidos de adenocarcinoma gástrico embebidos en parafina y de la línea celular AGS mediante qPCR?

1.3 Justificación

Los adenocarcinomas gástricos representan del 90 al 95% aproximadamente de todas las neoplasias en el estómago, identificándose que más del 70% de los casos ocurren en países en vía de desarrollo (Blanco, Cantillo, y Rivera, 2013). En Colombia, el cáncer gástrico es una enfermedad con unas altas tasas de prevalencia, morbilidad e incidencia, siendo esta última de 17,4 a 48,2 por cada 100000 habitantes, similar a la de Chile, Costa Rica, Japón, Corea y China, de modo que se configura como una de las principales causas de muerte por cáncer tanto en

hombres como en mujeres, donde predomina en ambos casos el adenocarcinoma de tipo intestinal (Otero, 2008). Alrededor del 80% de los pacientes con CG son diagnosticados en etapas avanzadas debido en parte a que esta es una enfermedad que no posee sintomatologías típicas o características sumado a la ausencia de programas de detección precoz (Gomez et al., 2015). Por lo cual resulta necesario el desarrollo de herramientas de tamizaje que permitan discriminar entre pacientes con patologías gástricas benignas y pacientes susceptibles a desarrollar la enfermedad, así como que posibiliten diagnosticarla en etapas iniciales o realizar seguimiento y pronóstico, de modo que sea posible abordar de forma adecuada esta patología, y aumentar las tasas de supervivencia.

Publicaciones realizadas en el grupo de investigación Biología del Cáncer (GIBC) del Instituto Nacional de Cancerología en Colombia, reportaron la expresión diferencial de los genes *ID1* e *ID3*, utilizando muestras frescas de médula ósea y sangre periférica tomadas de pacientes con leucemia linfoblástica aguda B (LLA-B). La sobre expresión de estos genes se encontró fuertemente asociada con el fracaso del tratamiento de inducción y con el mal pronóstico de la enfermedad en adultos, pues se evidenció una relación inversa entre la supervivencia, el aumento significativo de la expresión de *ID1* y la expresión diferencial de *ID3*. En este sentido estos genes fueron postulados como posibles marcadores de pronóstico de la enfermedad. (Cruz-Rodriguez et al., 2016, 2017).

Dado que se ha demostrado que las proteínas ID tienen funciones reguladoras en el desarrollo y destino celular (determinación de su linaje, proliferación, diferenciación, angiogénesis, invasión y migración), y teniendo en cuenta que la expresión de estas proteínas se ha correlacionado con la progresión del cáncer y su pronóstico general (Fong, Debs, y Desprez, 2004), es importante su estudio para comprender la relación existente entre su expresión y la progresión tumoral, con el

fin de determinar si estas proteínas pueden utilizarse en el desarrollo de estrategias terapéuticas para tratar los cánceres metastásicos.

Sin embargo estudios que se encuentran en curso en el GIBC han hallado que las extracciones de ARN a partir de bloques FFPE no son eficientes en cuanto a concentración final del ácido nucleico, lo que conlleva dificultades en la amplificación, esto es debido a que a pesar de que la inclusión en parafina y fijación con formalina de tejidos es una técnica que preserva las condiciones celulares y morfológicas de los mismos (Kokkat et al., 2013), la calidad de los ácidos nucleicos provenientes de los bloques de parafina varía de acuerdo a su forma de preparación y preservación pues en este proceso el ARN es degradado, de modo que limita su uso en aplicaciones relacionadas con expresión génica (Li et al., 2008).

Por otro parte, se ha reportado que el fitocannabinoide Canabidiol (CBD), el cual posee un perfil de baja toxicidad, tiene propiedades antitumorales en cáncer gástrico para la detención del ciclo celular, la inhibición de la proliferación celular y la inducción de apoptosis (Zhang et al., 2019) y en cáncer de mama se demostró que puede disminuir la expresión de *ID1* (McAllister, Christian, Horowitz, Garcia, y Desprez, 2007; McAllister et al., 2011). Esto le otorga un gran valor en el tratamiento de la enfermedad en comparación con los tratamientos para CG actuales los cuales tienen efectos desfavorables a largo plazo, por lo que es necesario estudiar y desarrollar fármacos antitumorales más efectivos (Liu et al., 2019).

Teniendo en cuenta que el nivel de expresión de proteínas ID1 e ID3 se asoció con el potencial maligno de los tumores gástricos (Yang et al., 2011), que el doble knockdown de ID1, e ID3 inhibe la capacidad de las células de cáncer gástrico para formar metástasis peritoneales (Tsuchiya et al., 2005), y la dificultad para amplificar estos genes a partir de ARN extraído de

tejidos FFPE, en este trabajo se plantea normalizar una metodología que permita resolver las dificultades técnicas de la amplificación de ARN a partir de FFPE empleado para ello qPCR. Adicionalmente, dado el efecto del CBD en la expresión de estos genes, se realizarán algunos ensayos de citotoxicidad utilizando este cannabinoide sobre la línea celular AGS para, en un estudio posterior determinar su efecto en la expresión de estos genes y de otros relacionados con apoptosis, proliferación y metástasis.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Normalizar una metodología para la detección de los genes *ID1* e *ID3* a partir de biopsias de adenocarcinoma gástrico embebidas en parafina y línea celular AGS.

2.2 Objetivos específicos

Analizar los C_t de los genes *ID1* e *ID3* a partir de biopsias de adenocarcinoma gástrico embebidas en bloques de parafina fijadas con formalina así como en la línea celular de adenocarcinoma gástrico AGS.

Determinar si el uso de preamplificadores mejora la detección de la expresión de los genes *ID1* e *ID3* utilizando el ADNc obtenido a partir del ARN extraído de biopsias embebidas en parafina fijadas con formalina.

Explorar el efecto citotóxico del Cannabidiol (CBD) sobre la línea celular de adenocarcinoma gástrico AGS.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Cáncer gástrico: Generalidades

3.1.1 Epidemiología

El cáncer gástrico fue responsable de 783.000 muertes y más de un millón de nuevos casos en el 2018, convirtiéndose en el quinto cáncer más diagnosticado y la tercera causa de muerte en ambos sexos alrededor del mundo (Bray et al., 2018) siendo estas tasas de 1.5 a 3 veces más altas en hombres que en mujeres (Luo et al., 2017) (Figura 1). A pesar de que en la actualidad solo tres países (China, Japón y Corea) concentran 60% del total de esta patología de estómago en el mundo, se sabe que las incidencias ajustadas por edad y sexo son significativamente mayores en países en vía de desarrollo en comparación con los países desarrollados (Csendes y Figueroa, 2017).

No obstante desde 1970 se ha observado un aumento paulatino en las tasas relativas de supervivencia a 5 años para esta enfermedad, aunque en términos generales su supervivencia sigue siendo pésima (Karimi, Islami, Anandasabapathy, Freedman, y Kamangar, 2014). La tasa de incidencia también ha disminuido notablemente en gran parte del mundo, las razones de este fenómeno no se han dilucidado completamente pero se cree que están relacionadas con las condiciones de almacenaje de los alimentos como la refrigeración, la disminución en el consumo de comida salada y preservada, y la mejora de las condiciones sanitarias de los alimentos lo cual contribuye a la reducción de infección por *Helicobacter pylori* (Csendes y Figueroa, 2017). Sin embargo aún representa un problema de salud pública por su elevada tasa de incidencia y mortalidad (Bray et al., 2018) pues se estima que, en el mundo, 1 de cada 36 hombres y 1 de

cada 84 mujeres desarrollará cáncer gástrico antes de los 79 años de edad (Csendes y Figueroa, 2017).

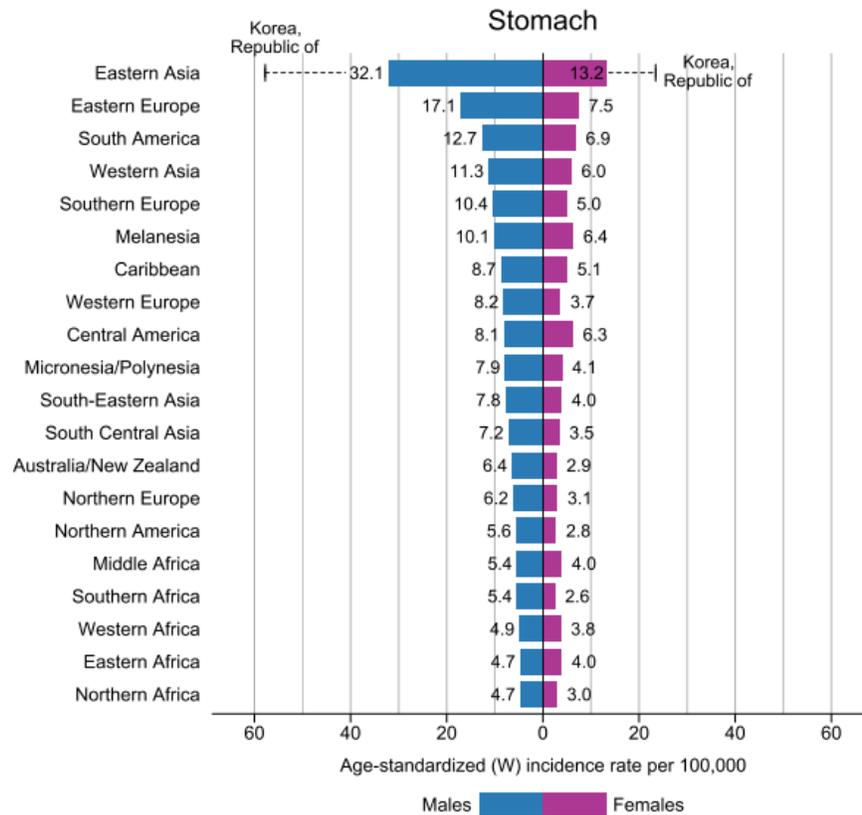


Figura 1. Gráfico de barras de incidencia de CG por región, estandarizadas por edad y sexo para el 2018. Las tasas se muestran en orden descendente del mundo. *Tomado de:* Bray et al., (2018)

3.1.2 Cáncer gástrico en Colombia

Pese a que el cáncer gástrico ha disminuido significativamente durante los últimos 30 años en Colombia, aún posee una elevada tasa de incidencia (12.8) y mortalidad (9.4) siendo el cuarto cáncer más frecuente en ambos sexos (Figura 2). Prevalece como la primera causa de muerte por cáncer y es el segundo más frecuente en hombres y la tercera causa de muerte por cáncer y quinto más frecuente en mujeres, con un total de 7419 nuevos casos en 2018 y un estimado de 9544 casos para el 2025 (Pardo et al., 2017; GLOBOCAN, 2018).

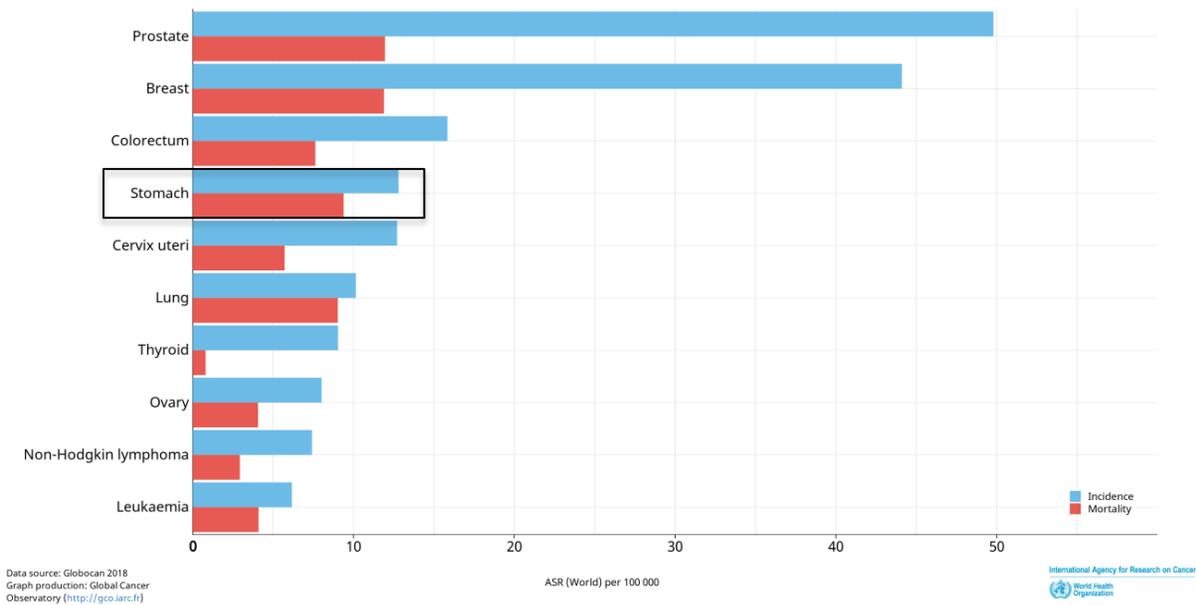


Figura 2. Tasas de incidencia (azul) y mortalidad (rojo) de cáncer estandarizadas por edad en 2018 (ambos sexos y todas las edades) para Colombia. Se destaca el cáncer gástrico en la cuarta posición. *Tomado de:* GLOBOCAN (2018).

Para el periodo 2007 – 2013 el CG representó el 13.7% del total de las muertes por cáncer en el país, la tasa de supervivencia fue baja teniendo un 11% de supervivencia global y 16,6% de supervivencia neta, ambas a 5 años, pero con grandes variaciones dependiendo del tipo de afiliación al sistema de seguridad social de nuestro país, la mayor parte de dicha cohorte de pacientes murieron 6 meses después de la fecha de diagnóstico indicando la agresividad de la enfermedad y el estadio elevado al momento del diagnóstico (de Vries et al., 2015; Pardo et al., 2017).

Se ha demostrado que en Colombia, tanto en las mujeres como en los hombres la edad de diagnóstico de esta patología se encuentra por encima de los 30 años, generalmente entre los 70 y 80 años, con un promedio de 65 años, razón por la que todo paciente con dispepsia debería remitirse para la realización de endoscopia independientemente de la existencia de síntomas de alarma (Otero, 2008).

Se ha observado que el patrón de riesgo de mortalidad por este tipo de cáncer tiene una estrecha relación con la altitud, la distribución de mortalidad es mayor en las regiones montañosas, mientras que en regiones costeras y planas del territorio nacional las tasas son menores, este patrón es similar en algunos países de la región Andina (Pardo et al, 2017) y ha sido descrito por Haenszel, Correa, y Cuello (1976) desde los años setenta.

3.1.3 Factores de riesgo

Esta enfermedad, como la mayoría de los cánceres, es multifactorial y no se ha identificado ningún factor imprescindible para su desarrollo (Pardo, De Vries, Buitrago, y Gamboa, 2017), sin embargo, la infección por *Helicobacter pylori*, es considerada como el agente de riesgo más importante para su génesis. Se estima que aproximadamente la mitad de la población mundial está infectada con esta bacteria, no obstante su etiología no puede explicarse únicamente por esta infección, ya que solamente entre el 2% y el 5% de las personas contagiadas desarrollan la patología. No obstante se estima que 89% de los casos de CG que se presentaron en regiones diferentes al cardias ocurridos en el 2008 fueron debidos a esta infección y que es responsable del 75% del total de los casos (Luo et al., 2017). Esto se explica por la capacidad infecciosa de la cepa bacteriana que está estrechamente relacionada con la secreción de toxinas citotóxicas (Daza, 2012) como la proteína CagA, la cual, tiene la capacidad de alterar directamente la manera en que las células del estómago crecen y se dividen (Min Chung et al., 2019).

Otros factores de riesgo asociados al desarrollo de CG son: la distribución geográfica de su incidencia, el consumo de alcohol, cigarrillo, carnes procesadas, alimentos ricos en sales, nitratos o ahumados, obesidad, raza, bajo nivel socio-económico, infección por el virus de Epstein-Barr,

anemia perniciosa, además de factores genéticos, epigenéticos y alteraciones moleculares adquiridas con el tiempo (Pardo et al., 2017; Resende, Thiel, Machado, y Ristimäki, 2011).

Geográficamente casi dos tercios del total de los casos ocurren en Japón y china, mientras que Sur América es la tercera región con mayor tasa de incidencia en el mundo, solamente superada por Asia y Europa oriental (Bray et al., 2018). Adicionalmente se ha evidenciado un importante factor de riesgo ambiental. Luo et al. (2017) reportó que las poblaciones migrantes de áreas de alto riesgo mostraban una marcada disminución en el riesgo cuando se mudan a un área de menor riesgo, aunque el cambio era gradual y parecía depender de la edad de migración. En ciudadanos japoneses que migraron a los Estados Unidos el riesgo disminuyó ampliamente entre la generación de migrantes y los japoneses nacidos en América. La disminución sustancial de CG en las últimas décadas sugiere que los factores ambientales están ampliamente relacionados con su etiología (Luo et al. 2017).

3.1.4 Diagnóstico y clasificación de la patología

En la actualidad el test de referencia para el diagnóstico es la endoscopia-biopsia de vías digestivas, que permite la visualización de la lesión, la identificación de características tales como tamaño, ubicación, confirmación histológica y estadificación de la enfermedad de acuerdo a su progreso que puede ser incipiente o avanzado (Siewert y Sendler, 2001), sin embargo existen otros métodos de estudio y clasificación como el pepsinógeno sérico, gastrina-17, anticuerpos anti células parietales entre otros (Karimi et al., 2014). La falta de síntomas específicos y la ausencia de programas de detección precoz llevan a un retraso en el diagnóstico, aproximadamente el 80% de los pacientes son diagnosticados en etapas avanzadas en la mayor

parte del mundo, exceptuando Japón y Corea donde se realiza tamización desde 1962 logrando diagnósticos en estadios tempranos (Daza, 2012; Gomez et al., 2015).

3.1.4.1 La enfermedad incipiente y avanzada

La enfermedad temprana o incipiente es una lesión que compromete tanto la mucosa como la submucosa, sin llegar a la lámina propia (Figura 3), es asintomática en el 80% de los casos y en el 20% restante se manifiesta con síntomas inespecíficos similares a un síndrome ulceroso, ocasionalmente presenta náuseas, anorexia y saciedad rápida, distensión abdominal, pirosis o vómitos (Blanco et al., 2013; García, 2013). Estos casos tienen buen pronóstico, con una tasa de supervivencia a los cinco años del 95% (Association Japanese Gastric Cancer, 2011). También pueden presentar síntomas más graves como hemorragia digestiva alta o pérdida significativa de peso, pero estos aparecen solamente en el 2% de los casos en estadios iniciales (García, 2013).

Por su parte, la enfermedad avanzada compromete más allá de la submucosa (Figura 3), puede presentar dolor abdominal frecuente, anemia, pérdida de peso, vómitos, anorexia, disfagia o síndrome pilórico y es de mal pronóstico (Association Japanese Gastric Cancer, 2011; Blanco et al., 2013) aunque algunos estados avanzados pueden permanecer asintomáticos (Gomez et al., 2015).

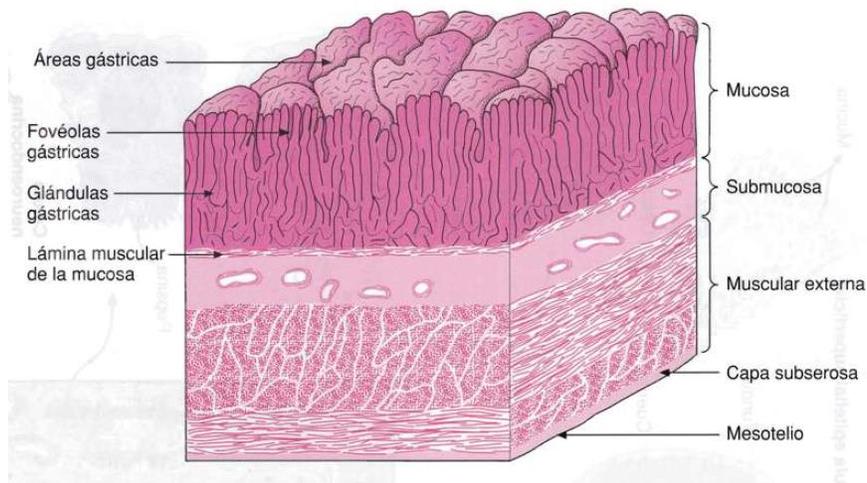


Figura 3. Dibujo esquemático que muestra las características histológicas de la pared del estómago. Se pueden apreciar las regiones de la mucosa, submucosa y capa muscular. *Tomado de:* Brüel., et al. (2014)

3.1.4.2 Tipos de tumores

Entre los tumores malignos de estómago, se encuentran los carcinomas, linfomas, carcinoides y leiomiomas, (estos últimos originados en el tejido estromal gastrointestinal). Los carcinomas a su vez se dividen en adenocarcinomas los cuales se presentan en más del 90% de las neoplasias gástricas y adenoescamosos que son muy poco frecuentes (Brenner, Rothenbacher, y Arndt, 2009; Espejo y Navarrete, 2003).

Los adenocarcinomas, objeto de estudio de este trabajo, surgen en las glándulas de la capa más superficial o de la mucosa del estómago (Karimi, Islami, Anandasabapathy, Freedman, y Kamangar, 2014). Se ha identificado que más del 70% de los casos ocurren en países en vía de desarrollo y que los signos y síntomas de esta enfermedad dependen del estadio clínico y la localización del cáncer (Blanco et al., 2013), ya que este puede ser cardial o antral según se encuentre más cercano al esófago o al píloro duodenal respectivamente (Fuentes-Pananá, Camorlinga-Ponce, y Maldonado-Bernal, 2009).

3.1.4.3 Clasificación del estadiaje patológico

La estadificación precisa es de suma importancia para acceder a una información pronóstica confiable, de modo que sea posible generar las mejores recomendaciones terapéuticas de acuerdo a cada caso. Es por ello que en la actualidad existen numerosos sistemas de clasificación para el cáncer gástrico (Rodríguez, Sasako, y Osorio, 2011). Es por esto que esta enfermedad se clasifica de acuerdo a sus características macroscópicas, histológicas, celulares, de localización y de grado de invasión las cuales además de definir el estadio tumoral, también poseen un valor pronóstico de importancia para la selección del tratamiento (Ministerio de salud Chile, 2014; Siewert y Sendler, 2001).

La categorización macroscópica de las lesiones incipientes se realiza mediante la clasificación de la Japanese Gastric Cancer Association (1962) (Tabla1, Figura 4A.), los tumores avanzados se describen según la clasificación Bormann (Tabla 2, Figura 4B), desde el punto de vista microscópico el informe histológico se realiza según los criterios de la Organización Mundial de la Salud OMS (Espejo y Navarrete, 2003; García, 2013; Ministerio de salud Chile, 2014) y en cuanto a las características anátomo-patológicas se categorizan con el sistema propuesto por Lauren (1965).

Subclasificación del Tipo 0	
Tipo 0-1(sobresaliente)	Tumores polipoides
Tipo 0-II (superficial)	Tumores con o sin elevación o depresión mínima en relación con la mucosa circundante.
Tipo 0-IIa (Superficial elevado)	Tumores ligeramente elevados
Tipo 0-IIb (Superficial plano)	Tumores sin elevación o depresión
Tipo 0-IIc (Superficial deprimido)	Tumores ligeramente deprimidos
Tipo 0-III (Excavado)	Tumores con depresión profunda.

Tabla 1. Descripción de las características morfológicas de los subtipos de cáncer incipiente tipo 0.

Modificado de: JGCA (2011).

Tumores Avanzados	
Tipo 1 (Masa)	Tumores polipoides, claramente delimitados con la mucosa circundante.
Tipo 2 (Ulcerativo)	Tumores ulcerados con márgenes elevadas, rodeados por una pared engrosada con márgenes definidas.
Tipo 3 (Infiltrativo ulcerativo)	Tumores ulcerados con márgenes elevadas, rodeados por una pared gástrica engrosada sin márgenes definidas.
Tipo 4 (Difuso infiltrativo)	Tumores sin ulceración marcada o márgenes elevadas, la pared gástrica engrosada e indurada, margen no definido.
Tipo 5 (No clasificable)	Tumores que no pueden ser clasificados en los tipos anteriores

Tabla 2. Descripción de las características morfológicas de los tipos de tumores avanzados. *Modificado de: JGCA (2011).*

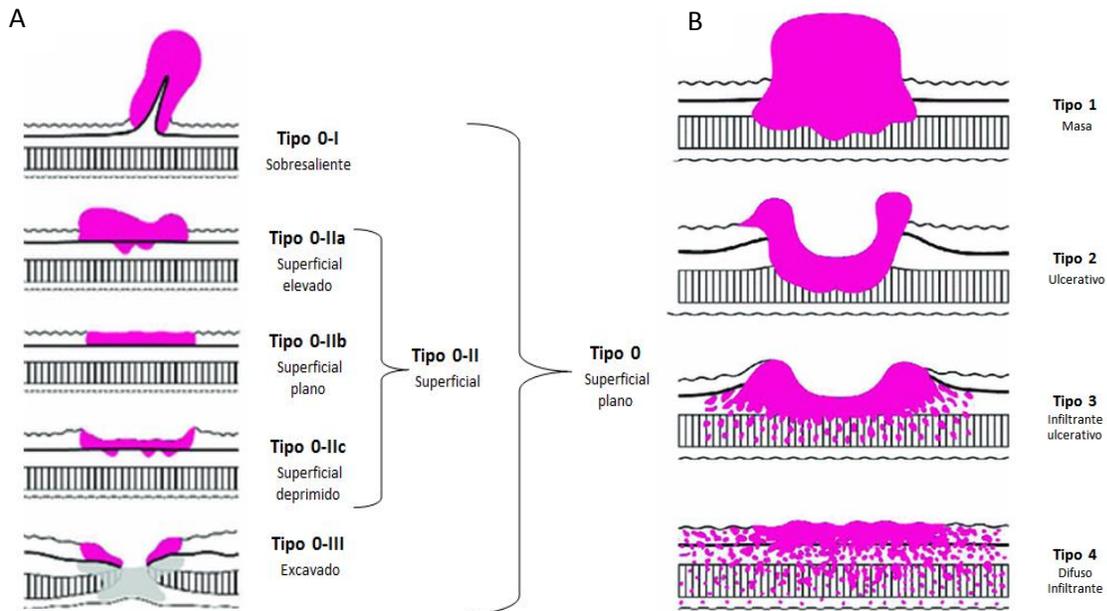


Figura 4. A. Diagrama de la clasificación macroscópica de cáncer gástrico incipiente (tipo 0). B. Diagrama de la clasificación de cáncer gástrico avanzado, clasificación Bormann (tipos 1-4). *Modificado de: Japanese Gastric Cancer Association (2011).*

En lo que se refiere a la anátomo-patología, existen dos tipos histológicos principales distinguibles con características epidemiológicas, clínicas, anatómicas y pronósticas distintas. La primera es la forma intestinal la cual se desarrolla en la mucosa con metaplasia en el intestino, habitualmente en el antro, este tipo está asociado con factores de riesgo ambientales y dietéticos, las células toman morfologías similares a las glándulas gástricas y tienden a formar nódulos con amplios frentes cohesivos, predomina en personas de edad avanzada, mayoritariamente en hombres. La segunda es la forma difusa que se origina en la mucosa gástrica propiamente dicha, es más indiferenciada e infiltrante con aparición en pacientes más jóvenes y se asocia a un peor pronóstico (Espejo y Navarrete, 2003; García, 2013).

En la actualidad se cree que el cáncer gástrico de forma intestinal tiene un desarrollo gradual desde un epitelio normal, pasando por adenoma y llegando a carcinoma, con cada una de estas fases asociadas a mutaciones genéticas específicas. Las etapas que se dan en esta transformación son mucosa normal, inflamación crónica, gastritis atrófica, metaplasia intestinal, displasia y finalmente cáncer. Se considera la infección crónica por *Helicobacter pylori* un desencadenante inicial para la inflamación crónica (Figura 5). Para la forma difusa no se conoce una progresión histopatológica similar (García, 2013).

Este largo periodo de inflamación crónica precede la aparición del tumor, por lo cual es un momento clave para intervenir tempranamente al paciente otorgándole un tratamiento endoscópico o quirúrgico oportuno. En países desarrollados como estados unidos o Japón las altas tasas de supervivencia se deben a la eficacia en los programas de tamización. (Gómez et al., 2015)

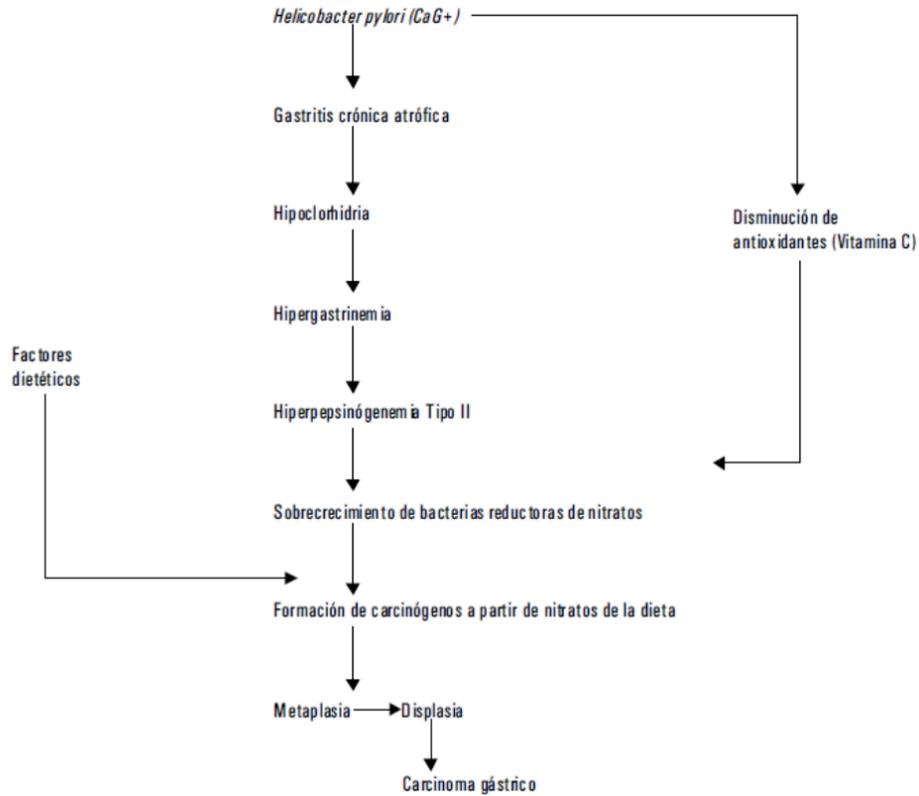


Figura 5. Hipótesis de la génesis del cáncer gástrico de forma intestinal. Tomado de: Duque (2012)

3.1.4.4 Clasificación TMN

Otro de los sistemas más utilizados en occidente es el TNM, propuesto inicialmente por la Union Internatioale Contre le Cancer (UICC) y el American Joint Commitee on Cancer (AJCC), pero modificada por la Japanese Gastric Cancer Association (JGCA), este sistema permite agrupar, facilitar y definir los posibles tratamientos para los tumores de acuerdo a características comunes, además de facilitar el método de estadificación que no solo permite evaluar el pronóstico y los resultados de los tratamientos sino también intercambiar información entre diferentes centros hospitalarios y países (Rodríguez et al., 2011). Los criterios de clasificación para el sistema TNM son explicados en la Tabla 3 y los estadijes de clasificación para el sistema son expuestos en la Tabla 4.

T = Extensión del tumor primario	N= Nódulos linfáticos comprometidos	M= Presencia o ausencia de metástasis en órganos distantes	G = Grado histológico
T1 Tumor en mucosa y submucosa	N0 0 Nódulos	M0 Sin metástasis a distancia	GX No puede determinarse el grado
T2 Tumor que se extiende a muscular propia	N1 1-2 Nódulos		G1 Bien diferenciado
T3 Tumor que alcanza la subserosa	N2 3-6 Nódulos		G2 Moderadamente diferenciado
T4a compromete la serosa	N3a 7-15 Nódulos	M1 Con metástasis a distancia	G3 Poco diferenciado
T4b Compromete estructuras vecinas	N3b >16 Nódulos		G4 Indiferenciado

Tabla 3. Descripción de la clasificación TNM donde se muestran las características de cada uno de los criterios del sistema. *Modificado de:* García (2013) y Consejo de salubridad general Mexico, (s.f.).

			N0	N1	N2	N3a	N3b	M1
			0	1-2	3-6	7-15	>16	
M0	T1	Mucosa, submucosa	IA	IB	IIA	IIB	IIB	IV
	T2	Muscular propia	IB	IIA	IIB	IIIA	IIIA	IV
	T3	Subserosa	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IIIB	IV
	T4a	Serosa	IIB	IIIA	IIIB	IIIC	IIIC	IV
	T4b	Estructuras adyacentes	IIIB	IIIB	IIIC	IIIC	IIIC	IV
M1			IV	IV	IV	IV	IV	IV

Tabla 4. Estadios de clasificación para cáncer gástrico en el sistema TNM 2010. *Modificado de:* García (2013).

3.1.5 Tratamiento

Actualmente los tratamientos para el CG dependen de múltiples factores propios de la enfermedad, pues gracias al estudio de la biología tumoral los procedimientos son cada vez más individualizados. Sin embargo, en términos generales se puede decir que estos obedecen al estadio de la patología, siendo la resección quirúrgica un elemento fundamental para su tratamiento (Blanco et al., 2013; García, 2013). De acuerdo a esto se utilizan diversas técnicas quirúrgicas que pueden ser mínimamente invasivas como mucosectomía endoscópica, la cual es usada en patologías en estado incipiente que solo han afectado la mucosa, o como las derivaciones gastroyeyunales usadas en enfermos avanzados en los que la quimioterapia y la radioterapia no mejoran significativamente el progreso de la enfermedad (Blanco et al., 2013).

Las resecciones gástricas se clasifican de acuerdo a la magnitud de la resección tumoral y al tipo de cirugía. En cuanto a la magnitud esta puede ser curativa R0 o no curativa R1 y R2. La resección R0 hace referencia a cuando se ha resecado la totalidad del tumor y no queda lesión tumoral en el organismo, esta categoría tiene una elevada probabilidad de curación y debe cumplir siempre condiciones como márgenes tumorales negativos para células malignas, linfadenectomía en un nivel superior a los ganglios positivos, ausencia de metástasis y resultado de lavado peritoneal negativo. R1 es cuando no hay presencia de tumor residual macroscópico pero tampoco reúne las condiciones para ser R0 y R2 cuando queda enfermedad neoplásica residual (Galindo, 2009).

En pacientes con estadios menores a T3 N0, la primer y más importante acción terapéutica es la cirugía radical con fin curativo. Para la enfermedad incipiente que solo compromete la mucosa suelen seguirse técnicas de endoscopia y laparoscopia, no obstante para las lesiones de este tipo que comprometen la submucosa se sigue el mismo tipo de cirugía que para las lesiones en estado

avanzado, debido a la probabilidad de metástasis linfáticas locales que se presenta en un 20% del total de estos casos. Tras esta cirugía se realiza un diagnóstico anatomopatológico y un estadio TNM el cual determina el tratamiento a seguir, donde sí se obtiene un estadio IA se envían controles periódicos, IB – IIC tratamiento adyuvante mediante radio-quimioterapia según esquema McDonald, (García, 2013; CTGE, 2013). Para la enfermedad avanzada que aún es resecable el tratamiento estándar que se sigue, es la cirugía radical de resección del tumor con disección linfática, pero si la enfermedad es avanzada y no resecable se prosigue con protocolos de quimio-radioterapia paliativos. En la Figura 6 se muestra un algoritmo para el tratamiento del CG.

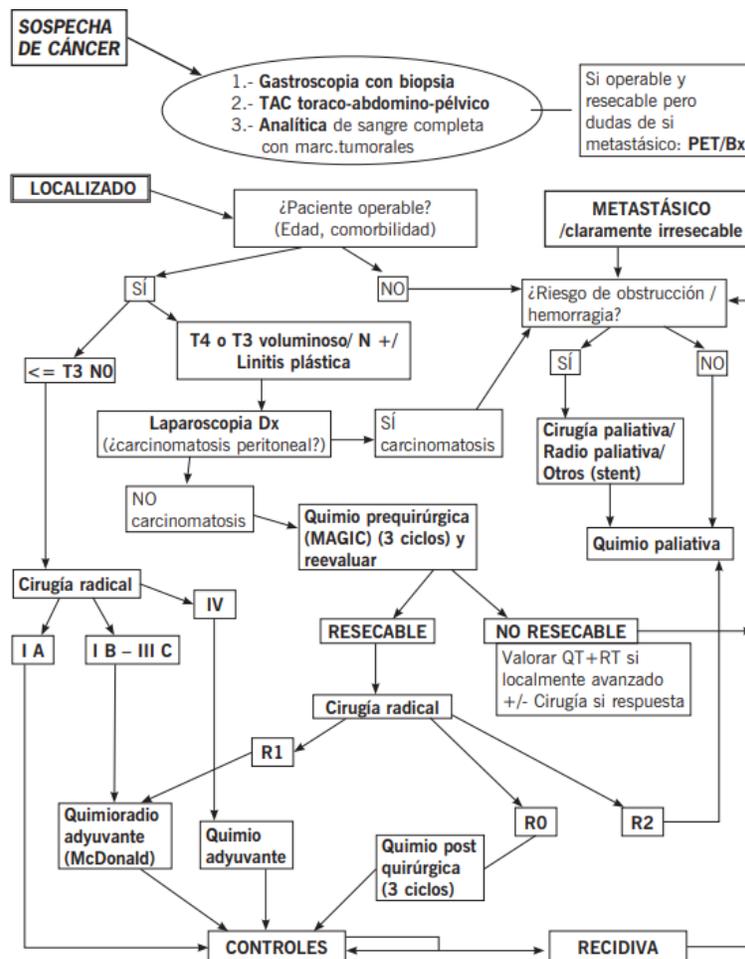


Figura 6. Algoritmo general para el manejo del cáncer gástrico propuesto por el comité de tumores gastroesofágicos del Hospital Universitario de Donostia. Tomado de: CTGE (2013).

3.1.6 Biomarcadores y aspectos moleculares

Los biomarcadores son moléculas biológicas que se encuentran en los tejidos sangre o fluidos corporales y tienen un papel esencial en la detección y manejo del cáncer gástrico, por lo que actualmente existe un interés cada vez más grande en su estudio, desarrollo y validación. De acuerdo a su utilidad en el cáncer gástrico estas moléculas se clasifican en biomarcadores de predicción y de pronóstico. Los predictivos permiten la identificación de los pacientes que tienen una mayor probabilidad de responder o no a un tratamiento específico, de modo que se encuentran estrechamente relacionados con los resultados clínicos y los pronósticos permiten la identificación de la evolución tumoral del paciente más que nada cuando esta es agresiva (Verdaguer, Saurí, y Macarulla, 2017).

Hasta el momento *HER2* también conocido como *ERBB2* perteneciente a la familia *EGRF* de proteínas transmembrana con actividad tirosina quinasa, es el único biomarcador que ha sido validado para ser usado en la respuesta al tratamiento de CG (Gravalos y Jimeno, 2008), dado que la sobre expresión o amplificación de este gen se ha informado frecuentemente en carcinomas de la unión gastroesofágica proximal, cáncer gástrico de tipo intestinal y funciona como marcador predictivo en respuesta al Trastuzumab (Bang et al., 2010), sin embargo el valor de *HER2* como factor pronóstico aun hoy es motivo de controversia (Verdaguer et al., 2017)

En relación con el CG varias vías moleculares han sido identificadas debido a que los tumores se consideran como una enfermedad multigénica, por lo que las anomalías genéticas desempeñan un papel muy importante en el desarrollo y progresión de las células tumorales (Yang et al., 2011) en este sentido se ha propuesto una clasificación con cuatro subtipos moleculares diferentes de la enfermedad: el primero es el grupo de los tumores positivos para el virus del

Epstein- Barr que generalmente tienen mutaciones en el gen *PIK3CA*, hipermetilación del ADN y amplificación de los genes *JAK2*, *PDL1* y *PDL2*. El segundo corresponde a los tumores con MSI (Inestabilidad de microsaelites) y con pérdida de heterocigosidad (LOH) que posee elevadas tasas de mutación. El tercer grupo son los tumores genómicamente estables con mutaciones en *RhoA*, el último subtipo corresponde a los tumores con inestabilidad cromosómica que muestran aneuploidia y amplificación local de los receptores tirosina quinasa (Corvalán, 2013; Verdaguer et al., 2017).

Así mismo, los factores hereditarios que se asocian con el desarrollo de cáncer gástrico han sido ampliamente estudiados, aunque se estima que solamente entre el 1% y 3% de los casos de CG ocurren como resultado de síndromes heredados. El cáncer gástrico difuso hereditario (HDGC por su sigla en inglés), es una forma autosómica dominante hereditaria de CG poco frecuente que genera un tumor de tipo difuso altamente invasivo es de muy mal pronóstico. Este tipo de cáncer muestra una marcada anormalidad molecular, la adherencia intercelular defectuosa como resultado de la pérdida de expresión de la proteína E-cadherina. El 25% de las familias con este síndrome presentan mutaciones en el gen *CDH1* (Karimi et al., 2014).

3.2 Genes *ID*

ID1 e *ID3* hacen parte de la familia de los genes inhibidores de las proteínas de unión al ADN (*ID*), la cual está conformada por cuatro genes (*ID1* - *ID4*). Esta familia hace parte del gran grupo de los factores de transcripción hélice-bucle-hélice (HLH, por sus siglas en inglés de Helix-loop-helix) (Ruzinova y Benezra, 2003). A pesar de que estos genes hacen parte de una misma familia su ubicación en los cromosomas y su patrón de expresión son diferentes. En

humanos *ID1*, *ID2*, *ID3*, *ID4* se encuentran en los cromosomas 20q1, 2p25, 1p36, 6p22-21 respectivamente (Yang et al., 2011).

La función de los cuatro miembros de la familia *ID* es compartida y está asociada con la proliferación (progresión del ciclo celular), diferenciación, invasión celular y la preservación de la multipotencialidad. Sin embargo su mayor atributo es la regulación negativa de la transcripción génica por heterodimerización de los factores básicos de transcripción hélice-bucle-hélice (bHLH), inactivando las funciones de las proteínas reguladoras positivas al inhibir sus regiones de unión con el ADN (Lasorella, Benezra, y Iavarone, 2014; Ruzinova y Benezra, 2003). Los genes *ID* también participan en la diferenciación embrionaria, el desarrollo del cáncer, apoptosis, inactivación de las proteínas Rb y Ets, invasión tumoral, metástasis y quimioresistencia (Roschger y Cabrele, 2017; Tsuchiya et al., 2005).

Los factores de acción positiva en el grupo HLH se unen al ADN como homodímeros o heterómeros y regulan la transcripción, esto debido a que el dominio HLH consiste en dos hélices α anfipáticas conectadas por un bucle y es el responsable de la homo o heterodimerización de las proteínas bHLH. La formación resultante es un pliegue de cuatro hélices no covalente, que permite la unión en forma de pinza de las dos hélices básicas que desencadena la activación transcripcional (Figura 7 A). En las proteínas *ID* esto no ocurre debido a que carecen de un dominio de unión al ADN, por lo que pueden secuestrar otras proteínas bHLH (Figura 7 B), formando dímeros incapaces de unirse al ADN, de modo que actúan como reguladores negativos de la expresión génica (Roschger y Cabrele, 2017; Ruzinova y Benezra, 2003).

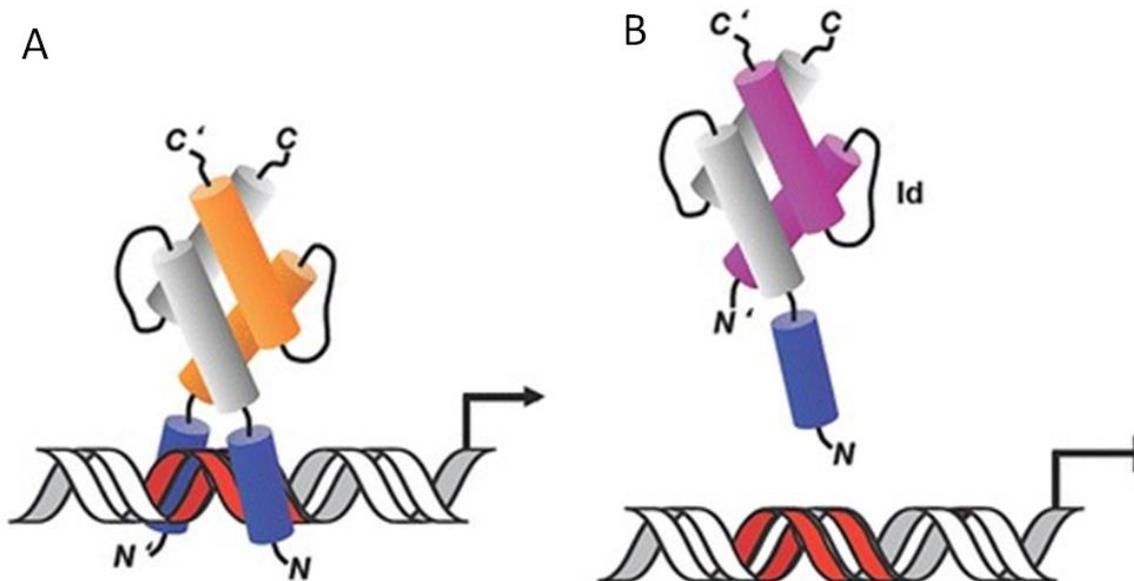


Figura 7. Esquema del control de la transcripción efectuado por reguladores positivos y negativos. **A.** Heterodímero constituido por dos proteínas bHLH (amarillo y gris), con una terminación en forma de pinza en el extremo N (azul), lo que resulta en la unión con secuencias específicas del ADN (rojo) y en la activación de la transcripción. **B.** Asociación de la proteína E (gris) con las proteínas *ID* (rosado) la cual da como resultado la formación de dímeros sin la capacidad de unirse al ADN porque la subunidad de la proteína *ID* carece de la región de unión al ADN. N y C representan los dominios estructurales N-terminal y C-terminal respectivamente. *Modificado de:* Roschger y Cabrele (2017).

La interacción mejor caracterizada de los genes *ID* es con las proteínas E las cuales son socios obligados para los factores bHLH específicos del tejido. El secuestro de proteínas E permite a *ID* controlar el repertorio transcripcional de una amplia variedad de tipos de células utilizando su mecanismo bioquímico. (Ruzinova y Benezra, 2003).

Cada uno de estos genes tiene al menos dos formas de empalme diferentes pero no se tiene claridad acerca de la importancia de cada una de ellas. Los dominios HLH de los miembros de la familia *ID* están más estrechamente relacionados entre sí que con otros miembros de la familia bHLH, sin embargo actualmente se cree que estos genes podrían haber comenzado a existir

como versiones mutantes de los bHLH, que evolutivamente se convirtieron en reguladores negativos de los demás activadores de transcripción bHLH en diversos procesos celulares, debido a que en las proteínas *ID* se encuentra presente el dominio HLH en su estructura pero ausente el dominio de unión al ADN (Ruzinova y Benezra, 2003).

Particularmente *ID1*, desde su primera clonación en ratón (Benezra, Davis, Lockshon, Turner, y Weintraub, 1990) ha sido reconocido como un inhibidor de los factores de transcripción bHLH. Los primeros estudios con este gen mostraron que funcionaba principalmente como un regulador de la diferenciación celular de las células musculares (Gundersen y Merlie, 1994), sin embargo posteriormente se descubrió que su expresión es capaz de inducir el crecimiento de las células cancerosas, la neo-angiogénesis y promover la supervivencia tumoral (Ling, Wang, Zhang, y Wong, 2006). En relación con *ID3* se sabe que desempeña un papel importante en la inhibición de la diferenciación celular y en la promoción del crecimiento celular y la metástasis de células tumorales (Yang et al., 2011).

Se ha encontrado que la estrecha relación de los genes *ID1* e *ID3* con la neo-angiogénesis, la inhibición de la diferenciación celular y el aumento de la proliferación celular, es debida, entre otros factores a su capacidad de inactivar *Est1* y *Est2*, lo que conlleva a la inhibición de *p16* y con ello la fosforilación de *Rb*, que tienen un papel fundamental en la regulación del ciclo celular (Tsuchiya et al., 2005).

3.2.1 Genes *ID* en cáncer gástrico

El nivel de expresión de *ID1* e *ID3* se ha asociado con el cáncer gástrico, presentando una relación directamente proporcional entre sus niveles de expresión con el potencial maligno de la enfermedad, pues se ha reportado que la expresión de estos genes es más elevada en tumores con estadios avanzados, en donde una diferenciación histológica tumoral pobre o moderada mostrará una expresión de *ID1* e *ID3* significativamente más elevada que las muestras con buena diferenciación celular. Así mismo, se ha mostrado una expresión de estos genes más alta en las regiones tumorales en comparación con tejidos no malignos adyacentes al tumor. Adicionalmente, la expresión alta o moderada de *ID3* pero no de *ID1* se ha propuesto como un fuerte predictor de supervivencia en esta enfermedad (Yang et al., 2011).

En adenocarcinoma gástrico se ha mostrado una regulación positiva de *ID1* y se ha observado que los tumores metastásicos expresan niveles este gen más bajos que los tumores primarios, lo que sugiere que *ID1* no puede ser un determinante para la metástasis en cáncer gástrico (Wang et al., 2004), sin embargo, en un estudio en el que se usó ARN de interferencia, se obtuvo la línea de cáncer gástrico MKN45 con double-knockdown *ID1* e *ID3*, con la cual se investigaron los efectos de estos genes sobre el desarrollo de nódulos metastásicos peritoneales de CG. Allí se mostró que en las células con expresión *ID* reducida disminuyeron las capacidades de migración, proliferación celular y unión a la laminina, pasos esenciales en el proceso metastásico, de modo que se concluyó que el knockdown de *ID1* e *ID3* perjudica significativamente la capacidad de las células tumorales para formar metástasis peritoneales (Tsuchiya et al., 2005).

3.3 Efectos del Cannabidiol CBD en cáncer gástrico y en los genes *ID*

Los fitocannabinoides son un grupo de productos químicos extraídos del *Cannabis*, varios de ellos tienen efectos terapéuticos en el cáncer como la inhibición de la proliferación celular, la angiogénesis, la metástasis, la inducción de la autofagia o la apoptosis. Dentro de este grupo el más conocido es el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC) y aunque posee estas propiedades antitumorales también es psicoactivo, característica que ha obstaculizado su desarrollo clínico. Por esta razón estudios más recientes se han desviado a otros fitocannabinoides como es el caso del Cannabidiol (CBD), este es el segundo compuesto más abundante en la planta y al tener una baja afinidad por los receptores cannabinoides canónicos no es psicoactivo y además de tener la capacidad de inducir la muerte celular también puede interferir con la señalización intracelular (Kenyon, Liu, y Dalglish, 2018).

Actualmente, los esquemas de tratamiento para el cáncer gástrico incluyen la cirugía y quimioterapia con efectos a largo plazo indeseables: la mitad de los pacientes que se someten a cirugía presentan recurrencia de la enfermedad (Wang et al., 2019) y la quimioterapia es altamente citotóxica pero poco selectiva a demás de que las células tumorales pueden generar resistencia, de modo que es importante estudiar y desarrollar fármacos antitumorales más efectivos (Liu et al., 2019).

En el estudio de Zhang et al. (2019) se examinaron las propiedades antitumorales del CBD sobre la línea celular de cáncer gástrico SGC-7901, encontrando que este compuesto inhibe la proliferación y formación de colonias celulares, aumenta la expresión del gen mutado de la telangiectasia de ataxia (*ATM*) y de la proteína p53 y regula negativamente la expresión de la proteína p21, lo que posteriormente inhibe a CDK2 y ciclina E, esto resulta en la detención del

ciclo celular en la fase G0 - G1. Así mismo, al tratar estas células con CBD aumentaron significativamente los niveles de expresión *Bax* y disminuyó los de *Bcl-2* y el potencial de membrana mitocondrial para luego aumentar los niveles de las caspasas 3 y 9 induciendo de esta forma la apoptosis. Estos resultados sugieren que el CBD puede tener efectos terapéuticos en el CG. (Zhang et al., 2019).

Se ha reportado también que el CBD representa el primer agente exógeno no tóxico que tiene la capacidad de disminuir significativamente la expresión de *MDM2* en células metastásicas de cáncer de mama a nivel de ARNm y de proteína de manera dependiente a la concentración del fitocannabinoide utilizada lo cual conduce a la regulación de la agresividad tumoral (McAllister, Christian, Horowitz, Garcia, y Desprez, 2007).

3.4 Tejido embebido en parafina fijado con formalina (FFPE)

Los tejidos fijados con formalina embebidos en parafina (FFPE) representan un extenso depósito de material biológico que en gran parte se encuentra sin explotar y un recurso fácilmente aprovechable para el estudio de biomarcadores útiles en la clasificación, diagnóstico, pronóstico o generación de nuevos objetivos terapéuticos moleculares para el cáncer (Kokkat et al., 2013). Estos bloques de tejido cuentan con una valiosa ventaja frente al tejido fresco y congelado: los datos retrospectivos del paciente contenidos en la historia clínica tales como supervivencia o respuesta al tratamiento están disponibles de modo que permite un seguimiento clínico a largo plazo y una comparación inmediata con los parámetros clínicos patológicos, configurándose así en un valioso elemento para la investigación clínica traslacional (Li et al., 2008).

La técnica de FFPE permite preservar los detalles del tejido y sus células. Es un procedimiento económicamente más eficaz para el almacenamiento de tejidos a largo plazo en comparación con

su almacenamiento por congelación a temperaturas ultrabajas, razón por la cual en la actualidad esta práctica se ha convertido en la metodología estándar para la preservación de tejidos en patología quirúrgica diagnóstica de modo que los departamentos de patología archivan rutinariamente un gran número de bloques FFPE (Kokkat et al., 2013).

A pesar de que el análisis de la expresión génica y su correlación con los parámetros clínicos tienen potencial para convertirse en un factor importante en la toma de decisiones terapéuticas (Godfrey et al., 2000) y de la amplia disponibilidad de tejidos FFPE, el uso de estos es limitado en aplicaciones que implican dicho análisis (Li et al., 2008) debido a la degradación y modificación química del ARN durante el procedimiento de fijación y procesamiento, ya que los grupos N-metilol presentes en la formalina forman enlaces cruzados con proteínas o ácidos nucleicos durante la fijación, seguidos de puentes de metileno entre los grupos amino lo que resulta en bajos rendimientos de ADN y ARN (Chaw, Eric Crane, Lange, y Shapiro, 1980). No obstante recientes avances en el campo de la biotecnología molecular han permitido extraer ácidos nucleicos de los bloques FFPE para su uso en posteriores aplicaciones moleculares. (Kokkat et al., 2013) .

4. METODOLOGÍA

4.1 Diseño del estudio

Se planteó este trabajo como un estudio exploratorio descriptivo observacional, para la normalización de un protocolo que permita realizar el análisis de expresión génica a partir de FFPE. Las muestras tumorales analizadas fueron derivadas de biopsias, gastrectomías o subgastrectomías que en su momento se obtuvieron con finalidad asistencial (diagnóstico histológico o tratamiento quirúrgico de la enfermedad oncológica) y que posteriormente fueron archivadas en el INC. Debido a que esta investigación se realizó con bloques FFPE provenientes del archivo de patología del INC, esta se clasifica como una investigación “sin riesgo” de acuerdo al artículo 11 de la resolución N° 8430 de 1993 expedida por el Ministerio de salud, en el que se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en humanos (Resolución 8430, 1993).

Todos los bloques FFPE incluidos en el estudio cuentan con constancia escrita de aceptación de consentimiento informado y la información de los pacientes es de carácter confidencial y los resultados del estudio fueron usados únicamente con fines científicos. Con el objetivo de mantener la identidad de cada paciente en completo anonimato, la información clínica y el bloque tumoral de cada paciente se asoció a un código.

Los bloques de parafina fueron obtenidos del archivo de patología del Instituto Nacional de Cancerología (INC), de pacientes diagnosticados con cáncer gástrico. Todas las partes sobrantes y no utilizadas en este estudio, fueron regresadas al archivo de patología del INC. Adicionalmente se utilizó la línea celular AGS derivada de adenocarcinoma gástrico como control para la amplificación génica. Este trabajo fue realizado en el Grupo de Investigación en

Biología del Cáncer del INC, los datos hacen parte de un trabajo de investigación en desarrollo llevado a cabo por Olga Cristina Lozano Camelo en su tesis de maestría en Genética Humana.

4.2 Población y muestra

Se incluyeron 20 bloques de biopsias embebidas en parafina derivadas de gastrectomías totales y subtotaes de algunos pacientes que asistieron a diferentes consultas en el Instituto Nacional de Cancerología (INC) durante el periodo 2012- 2014, de los cuales 18 correspondían a casos de cáncer gástrico confirmado y 2 a controles sanos que cumplían con los criterios de inclusión establecidos.

4.2.1 Criterios de inclusión/exclusión de la población participante (Bloques FFPE)

Dentro de los criterios de inclusión tomados en cuenta para la incorporación de bloques FFPE en el estudio se encuentran: 1. Diagnostico confirmado de cáncer gástrico primario (casos). 2. No administración previa de ningún tratamiento neo-adyuvante quimioterapéutico o radioterapéutico. 3. Viabilidad para tratamiento quirúrgico. Así mismo dentro de los criterios de exclusión se tuvo en cuenta: 1. Tener tratamiento previo para el cáncer. 2. Haber tenido enfermedad neoplásica previa. 3. Tener alguna enfermedad crónica que comprometa el estado general del paciente (diabetes, disfunción renal, embarazo).

4.3 Controles

Como controles calibradores para la amplificación de los genes ID1 e ID3 fueron utilizadas biopsias FFPE provenientes de la mucosa gástrica de dos pacientes sanos, los cuales no poseían ningún tipo de malignidad, displasia, metaplasia o hiperplasia. También fue usada la línea celular AGS, derivada de adenocarcinoma gástrico, como control positivo de amplificación.

4.4 Selección de áreas histológicas, confirmación patológica y realización del punch

Todos los bloques de tejidos FFPE, tienen un corte histológico de referencia, el cual fue examinado por un patólogo, para confirmar y demarcar las regiones tumorales del tejido, de modo que se seleccionaron las regiones malignas más homogéneas del bloque, áreas carentes de tejido sano, y en lo posible sin displasia, hiperplasia o metaplasia. Dichas regiones demarcadas fueron el área muestral del tejido, mediante la realización de Punch (Figura 8), para la extracción de RNA.

Con un sacabocados o aguja de punch, de 2mm de diámetro, se extrajeron de uno a dos segmentos de tejido de la biopsia embebida en parafina (Punch). Previo a esto y con cada cambio de bloque de parafina, se realizó una limpieza de la aguja con Xilol (dimetilbenceno) y etanol para eliminar restos de muestras anteriores. Los punch obtenidos fueron colocados en tubos de 1.5 ml, con su respectivo marcaje y posteriormente almacenados a 5°C hasta su posterior procesamiento de extracción de ARN.

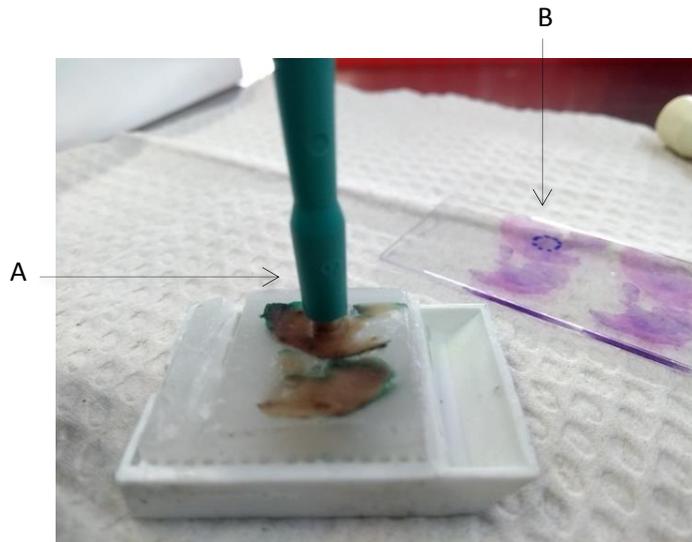


Figura 8. Obtención del punch. **A.** Se aprecia la aguja de punch penetrando en el bloque de parafina para la obtención del tejido de interés. **B.** Lámina histológica del bloque de parafina, con el área tumoral demarcada en color azul.

4.5 Desparafinación y extracción de ARN

Inicialmente, se retiró la parafina de las muestras siguiendo el protocolo del AllPrep DNA/RNA FFPE Handbook, con algunas modificaciones. Se usó 1mL de Xilol (dimetilbenceno), se dio vortex vigorosamente por 30 segundos y se centrifugó a 14000 rpm por 2 minutos, de manera que por densidad la muestra se dividió en dos fases, sobrenadante y pellet, el sobrenadante fue retirado completamente y después se realizó un lavado adicionando 1mL de etanol al 96% y centrifugando a 14000 rpm por 2 minutos. Seguidamente, se descartó el sobrenadante y se incubaron las muestras a 37°C hasta evaporar completamente el etanol. Posteriormente se adicionaron 150 uL de buffer PDK y 10 uL de proteinasa K con las que se incubó a 56°C durante hora y media. Una vez transcurrido este tiempo, las muestras fueron colocadas en hielo por 5 minutos y a continuación se centrifugaron a 14000 rpm por 15 min con el fin de separar en dos fases diferentes el ADN y el ARN.

Finalmente el sobrenadante fue puesto a incubar por 15 min a 80°C y se prosiguió a realizar la extracción automatizada del ARN utilizando el equipo QIAcube (QIAGEN, Hilden, Alemania) utilizando el AllPrep DNA/RNA FFPE Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania)

4.6 Cuantificación de muestras

El ARN total fue cuantificado mediante Qubit fluorometer (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA), utilizando el kit Qubit RNA HS assay de la misma casa comercial, obteniendo así, la concentración en ng/ μ L de cada muestra. El ARN fue almacenado hasta su posterior procesamiento a -70°C.

4.7 Retrotranscripción (RT PCR)

La transcripción reversa (RT) se realizó utilizando el kit first strand cDNA (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA). Con el fin de apreciar las posibles variaciones en la calidad de la conversión de RT-PCR se evaluaron dos concentraciones de ARN diferentes 10ng/ μL y 36ng/ μL . Una vez obtenida la concentración de ARN deseada, se adicionó 1 μl de dNTPs en cada una de las muestras de interés de las cuales se usó un volumen de 11 μl y 2 μl de random primers, posteriormente se calentó a 65°C durante 5 minutos y pasado este tiempo se incubó en hielo por 1 minuto. Se prosiguió a centrifugar brevemente, se adicionó el buffer master mix, DTT, RNasa out y Superscript III, se homogenizó la mezcla, se incubó a 60°C por 60 minutos y finalmente se inactivó la reacción por calentamiento a 70°C durante 15 minutos. Para cada muestra se utilizaron los reactivos y cantidades descritos en la (Tabla 5). La reacción de transcripción reversa se llevó a cabo en un termociclador PTC-200 PCR System (MJ Research, Reno, Nevada, USA) (Figura 8).

Componente	Cantidad
Buffer	4 μl
DTT	1 μl
RNA out	1 μl
SS3	1 μl

Tabla 5. Cantidad de reactivos utilizados en la mezcla del mix para cada muestra en la preparación de la retrotranscripción.

4.8 Pre-amplificación (PreAmp)

Se realizaron pre-amplificaciones de ADNc utilizando el Kit TaqMan PreAmp Master Mix (Thermo Fisher Scientific, DE, USA), el cual preamplifica pequeñas cantidades de ADNc sin introducir sesgo de amplificación en la muestra, esto permite aumentar la concentración de

ADNc en la muestra para un mejor rendimiento de la amplificación en qPCR. Esta reacción se llevó a un volumen final de 50 µl, utilizando los volúmenes por componentes referidos en la (Tabla 6).

Componente	Cantidad
TaqMan PreAmp master Mix	25 µL
Pooled assay mix	12.5 µL
ADNc muestra + Agua libre de nucleasas	12.5 µL
Total	50 µL

Tabla 6. Volumen de reactivos utilizados en la mezcla para la preparación de la preamplificación.

4.9 Reacción de qPCR

La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR), es un método específico para determinar la cantidad de una secuencia o gen diana que está presente en una muestra. Esta metodología, con aplicaciones en investigación y desarrollo de pruebas diagnósticas, se fundamenta en la actividad exonucleasa 5'-3' de la Taq DNA polimerasa que se utiliza para escindir una sonda marcada con un fluoróforo e hibridada a la secuencia diana. Cada vez que la Polimerasa escinde la sonda, se libera el fluoróforo, emite fluorescencia, y ésta es detectada por el termociclador que tiene un sistema óptico para detectar la señal. La intensidad de la fluorescencia es directamente proporcional a la del fluoróforo liberado y a la cantidad de cADN molde inicial en la PCR. De esta manera, es posible cuantificar la acumulación del producto de PCR amplificado durante la reacción. (Figura 9).

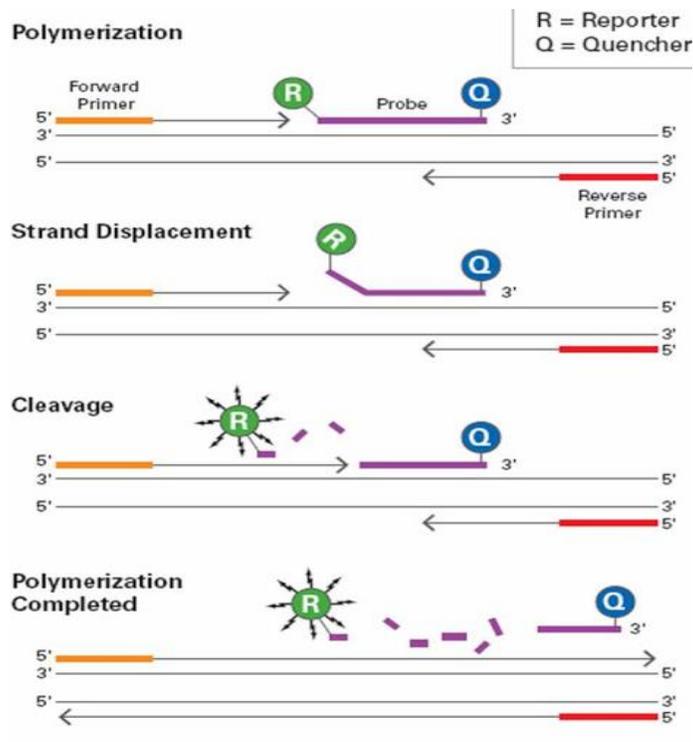


Figura 9. Fundamento de la PCR en tiempo real utilizando sondas taqman marcadas.

Tomado de: <http://technologyinscience.blogspot.com.es>

Para realizar la PCR cuantitativa se utilizó el sistema Superscript III (Thermo Fisher Scientific, DE, USA), con sondas TaqMan específicas para los genes de interés. Estas sondas tienen la ventaja de incrementar la especificidad de la detección. Se utilizó el equipo QuantStudio 3 de Applied Biosystems y sondas prediseñados para cada diana se realizaron las amplificaciones por duplicado. La Tabla 7 muestra el tamaño en pares de bases (Pb) y el fluoróforo con el que cada una está marcada, de las sondas utilizadas en este trabajo.

Gen	Tamaño (pb)	Fluoróforo	Color
<i>GAPDH</i>	58 Pb	VIC	Verde
<i>IDI</i>	100 Pb	FAM	Azul
<i>ID3</i>	135 Pb	FAM	Azul

Tabla 7. Tamaño en pares de bases y fluoróforos con los que se diseñaron las sondas para cada uno de los genes de interés.

Para medir la expresión génica se calculó el valor de Ct (ciclo umbral), que corresponde a la intersección entre una curva de amplificación y la línea de umbral y hace referencia al número del ciclo de PCR en el que fluorescencia alcanza el valor de la línea umbral, mediante el software QuantStudio v1.4.2 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, DE, USA).

4.10 Gen de referencia

Como gen de referencia (Housekeeping gene) para evaluar la expresión de los genes de interés, se utilizó Gliceraldehido-3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Esta es una enzima que contribuye a varios procesos biológicos tales como la glucólisis, la exportación del ARNt, la reparación y replicación del ADN y organización del citoesqueleto celular (Kosova, Khodyreva, y Lavrik, 2017), de manera que se encuentra constitutivamente expresado en el tejido por lo que funciona como control endógeno y ha sido ampliamente utilizado en estudios de adenocarcinoma gástrico (Korbakis, Fragoulis, y Scorilas, 2013; Norollahi, Alipour, Rashidy-Pour, Samadani, y Larijani, 2019).

4.11 Cultivo celular

La línea celular epitelial AGS derivada de adenocarcinoma gástrico, fue donada por M.Sc Esperanza Trujillo Gama (Grupo de investigación en Biología del cáncer, INC) y sembrada en cajas de cultivo T75 y T25 de acuerdo al ensayo que fuera requerido. Se cultivó en medio RPMI 1460 (Lonza, Verviers, Belgium) suplementado al 10% con suero fetal bovino SFB (Gibco, Life technologies, Thermo Fisher Scientific, DE, USA), 1% penicilina, estreptomina, anfotericina (Lonza, Walkersville, MD, USA) y 1 mM L-glutamina (Sigma, MD, USA). Se mantuvo a 37°C

en una atmosfera húmeda con 5% de CO₂. El crecimiento celular fue monitoreado diariamente (Figura 10).

AGS es una línea celular adherente derivada de fragmentos de tumor resecado en 1979, de una paciente caucásica de 54 años de edad diagnosticada con adenocarcinoma gástrico, la cual no recibió terapia alguna para tratar su enfermedad (ATCC, 2019).



Figura 10. A. Monitoreo del cultivo celular mediante el microscopio de lente invertido Seizz AX10 y el software Zeiss Zen 2.6 lite. B. Cajas T25 de cultivo celular en atmosfera húmeda con 5% de CO₂ en la incubadora HeraCell Vios 160i (Thermo Fisher Scientific, DE, USA).

4.11.1 Descongelación

Para realizar la descongelación de las células AGS, se dispuso agua estéril en un baño serológico y se precalentó a 37°C, simultáneamente en la cabina de flujo laminar se adicionaron 10 mL de medio RPMI completo + L-Glutamina en un tubo Falcón de 15 mL y otros 10 mL en una caja de cultivo T25. El vial de células que se encontraba almacenado y congelado en nitrógeno líquido (Figura 11) fue sumergido en el baño de serológico por un par de minutos, posteriormente con precaución de evitar contaminaciones, su contenido se dispuso en el tubo Falcón que contenía los

10 mL de medio suplementado y se realizó un lavado centrifugando por 5 minutos a 1000 rpm de modo que no se precipitaran los detritos. Una vez hecho el lavado, se descartó el sobrenadante y con una pipeta se tomaron las células del fondo del tubo falcón, se resuspendieron y se traspasaron a la caja de cultivo T25 (Figura 12), la cual fue incubada en las condiciones descritas anteriormente durante dos horas. Transcurrido este tiempo, se realizó un cambio de medio de cultivo con el fin de eliminar detritos y células que no sobrevivieron al proceso de descongelación.

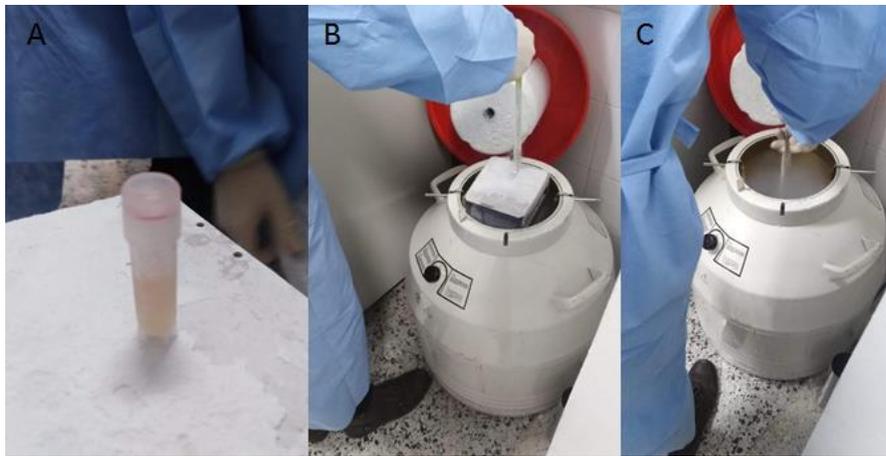


Figura 11. Proceso de descongelación línea celular. **A.** Criovial de 1.5 mL con las células vertidas en 10% DMSO, 40% medio de cultivo y 50% SFB. **B – C.** procedimiento de extracción de las células del tanque de nitrógeno líquido, almacenadas a una temperatura de -195°C .

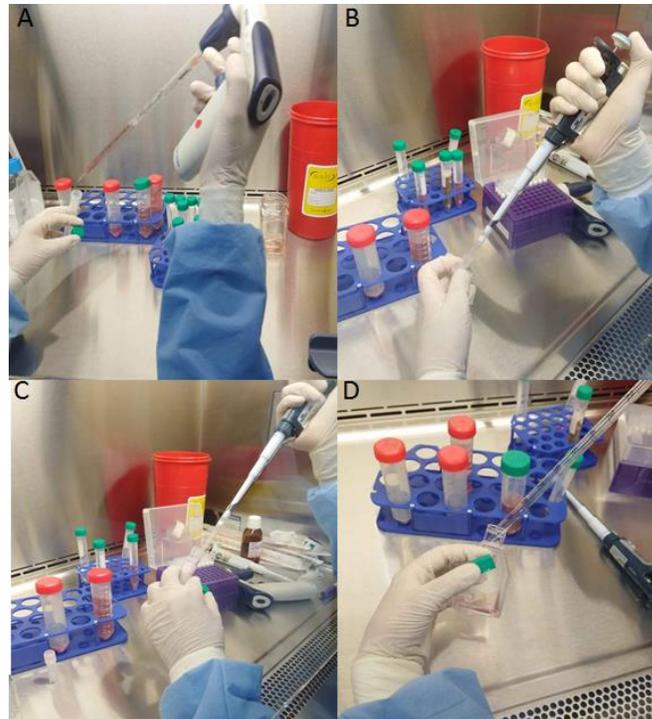


Figura 12. Proceso de descongelación línea celular en cabina de flujo laminar. **A.** Disposición de 10 mL medio RPMI 1640 en el tubo Falcón. **B.** Toma del contenido celular del criovial con micropipeta. **C.** Disposición del contenido celular en los 10 mL de medio RPMI 1640. **D.** Pase del contenido celular a la caja de cultivo T25, posterior al lavado.

4.11.2 Tripsinización

Cuando las células alcanzaron una confluencia del 80% o más se realizaron pases a nuevas cajas, congelaciones o ensayos con las células. Para esto fue necesario despegar las células que crecían en monocapa adheridas a la caja de cultivo, retirando todo el medio de cultivo de la caja, y lavando la caja con PBS 1X (Lonza, Walkersville, MD, USA) para eliminar cualquier residuo de medio. Posteriormente se agregaron 2 mL de tripsina EDTA 0.5% (Gibco, Life technologies, Thermo Fisher Scientific, DE, USA) y se incubaron a 37°C durante 2 minutos, una vez transcurrido ese tiempo y desprendidas las células, se agregaron 5 mL de medio de cultivo RPMI suplementado y se homogenizó con una pipeta con el fin de inactivar la tripsina. La suspensión celular fue transferida a un tubo Falcón de 15 mL y se centrifugó a 1500 rpm durante 7 minutos.

Posteriormente se descartó el sobrenadante, las células contenidas en el fondo del tubo fueron resuspendidas y dispuestas para el siguiente ensayo.

4.11.3 Recuento para determinación de densidad y viabilidad celular

Previo al recuento las células se tripsinizaron, lavaron y resuspendieron en un volumen final de 5 mL. Para realizar el conteo celular se hizo uso de la cámara de Neubauer (Figura 13), en la que se coloca un cubreobjetos y se carga con 10 μ L de una mezcla que contiene 20 μ L de suspensión celular bien homogenizada y 20 μ L de azul de tripán. Dicha mezcla ingresa a la cámara por capilaridad, una vez realizado este procedimiento se observa en el microscopio y se cuentan las células presentes en los cuatro cuadrantes. Para conocer la concentración celular por mL se utilizó la siguiente fórmula tomada de (Freshney, 2010):

$$\text{Concentración celular} = (\text{Promedio cel. en los 4 cuadrantes}) \times \text{factor de dilución} \times 10000$$

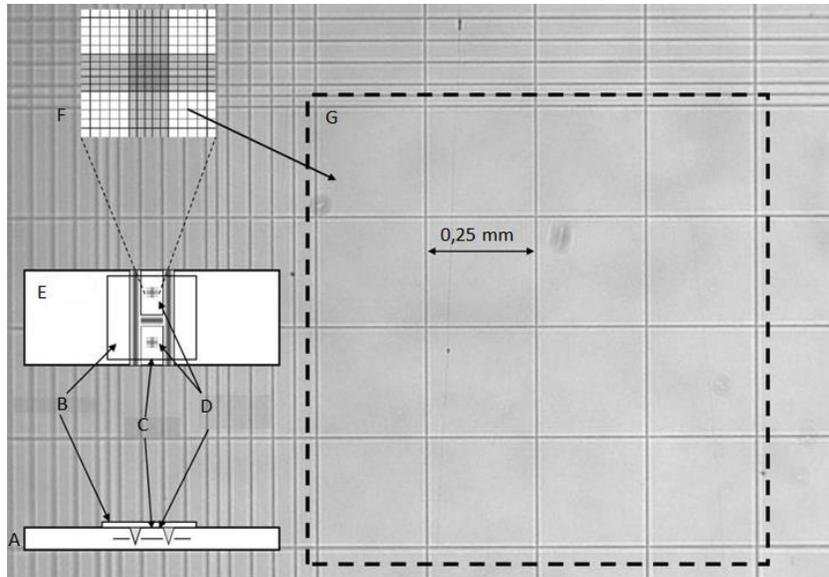


Figura 13. Esquema de la cámara de Neubauer sobre una microfotografía de una de las gradillas de recuento. **A.** Vista lateral de la cámara. **B.** Cubreobjetos. **C.** Espacio para depositar la muestra. **D.** Cámaras de recuento. **E.** Vista superior de la cámara **F.** Cuadrícula de la cámara, donde se aprecian las cuatro gradillas de conteo en color blanco. **G.** Aumento de uno de los cuadrantes, en el que se aprecia la distancia de 0.25 mm entre líneas. Modificado de: Gil-Loyzaga (2011).

Para conocer la viabilidad celular se hizo uso del colorante Azul de tripán el cual es derivado de la toluidina que posee la capacidad de teñir tejidos y células muertas, ya que las células vivas con integridad de membranas no permiten el ingreso de este compuesto al medio intracelular. Para obtener el porcentaje de células viables en la suspensión celular se utilizó la siguiente fórmula tomada de (Freshney, 2010):

$$\% \text{ células viables} = \frac{\# \text{ células no teñidas}}{\text{Total de células}} \times 100$$

Ensayos para determinar la citotoxicidad del Cannabidiol (CBD) sobre la línea celular AGS.

4.11.4 Curva de crecimiento de la línea celular AGS y estandarización de confluencia en pozos para ensayos con CBD

Para determinar la velocidad de crecimiento de la línea celular AGS, sin ser sometida a ningún tratamiento, para esto fueron utilizadas placas de 6 pozos, fondo plano. Se sembraron 10000 células por pozo, y su crecimiento fue cuantificado cada 24 horas (Figura 14) de manera que se realizó una curva de crecimiento respecto al tiempo. También se realizaron ensayos de confluencia utilizando concentraciones celulares reportadas en la literatura para cada tamaño de placa y revisando su confluencia a las 24 horas, con el fin de determinar el número de células que al día siguiente de la siembra obtuvieran una confluencia del 80% para realizar ensayos con CBD. El mismo procedimiento se replicó en placas de 96 pozos.

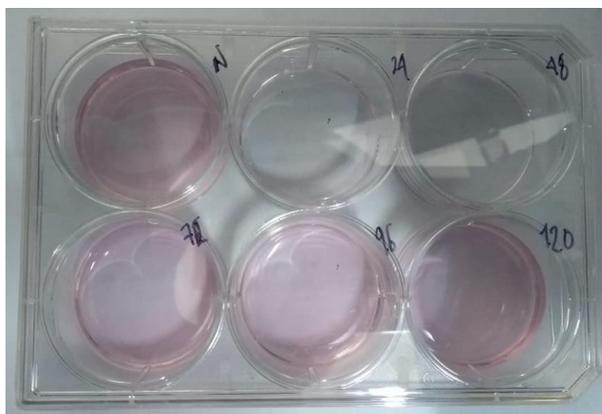


Figura 14. Placa de 6 pozos utilizada en el ensayo de densidad celular, donde se aprecia el control negativo para el ensayo y cada pozo para conteo celular cada 24 horas. Los pozos de 24h y 48h se aprecian vacíos debido a que la fotografía se tomó después de realizado su conteo.

4.12 Aproximación al ensayo colorimétrico de proliferación MTT

Adicionalmente, con el fin de sugerir el posible efecto del Cannabidiol en el crecimiento y la expresión de los genes *IDI* e *ID3* en la línea celular AGS, se planteó realizar de manera tentativa ensayos colorimétricos de proliferación MTT Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol. Esta es una técnica que se usa frecuentemente en el estudio de compuestos antitumorales, con ella es posible cuantificar mediante valores de absorbancia el efecto citotóxico de la sustancia que es directamente proporcional a la concentración de la enzima succinato deshidrogenasa, la cual tiene la capacidad, en condiciones normales, de reducir el MTT en un producto insoluble en soluciones acuosas denominado Formazan, de modo que la cantidad de formazan generado es directamente proporcional al número de células viables (Lasso, 2013). Para la realización de los experimentos se siguió el procedimiento descrito a continuación.

4.12.1 Siembra de placas para ensayos MTT

Diferentes concentraciones de células de la línea celular AGS fueron sembradas por triplicado en placas de 96 pozos. Dichas concentraciones fueron determinadas mediante la técnica de conteo celular descrita anteriormente, el volumen total de trabajo por pozo utilizado fue de 200 μL . Para esto inicialmente con una pipeta multicanal se adicionan 100 μL de medio de cultivo RPMI 1640 suplementado en cada uno de pozos a utilizar, posteriormente conociendo el número de células total obtenido, se realizan las diluciones correspondientes con el fin de obtener las concentraciones celulares requeridas para la siembra en los pozos de manera que se pudiera adicionar 100 μL de suspensión celular con el número de células indicado para cada pozo (Figura 15). Fueron sembrados por triplicado pozos con concentraciones celulares desde 1000 células hasta 50000, con varias réplicas de esta última densidad celular ya que es la que se utilizó para aplicar los tratamientos de CBD, adicionalmente se sembró un control negativo sin células, en la Figura 15C se puede apreciar el número de células sembrado en cada pozo que se encuentra marcado en el diagrama de la placa multipozos. Finalmente se incubaron toda la noche a 37°C, con 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa para la adhesión celular en el fondo de la placa.

4.12.2 Concentraciones de CBD

En diversos estudios han sido propuestas concentraciones de trabajo desde 0.01 $\mu\text{mol/L}$ hasta 10 $\mu\text{mol/L}$ para evaluar las propiedades del CBD en líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231, MCF7, SK-BR3, ZR75-1, MCF10A), cáncer de pulmón (A549, H460), Leucemia (CEM, HL60) y cáncer de cuello uterino (HELA, ME-180) (Lukhele y Motadi, 2016; Ramer et al., 2013; Scott, Dagleish, y Liu, 2017; Shrivastava, Kuzontkoski, Groopman, y Prasad, 2011), para líneas celulares de cáncer gástrico no se hallaron reportes, por lo que las mencionadas

anteriormente fueron tomadas como referencia. El CBD con una pureza del 99% fue disuelto en Etanol absoluto a una concentración de 10mM para la solución stock y posteriormente diluido en las concentraciones de trabajo (tratamientos) en medio RPMI 1640 libre de SFB (Tabla 8).

Concentraciones de trabajo CBD ($\mu\text{mol/L}$)												
150	75	37.5	18.7	9.3	4.68	2.34	1.17	0.58	0.29	0.14	0.07	0.03

Tabla 8. Concentraciones finales de las soluciones de trabajo de CBD para ser utilizado en el ensayo de MTT. Se realizaron diluciones seriadas en una relación de 1:2.

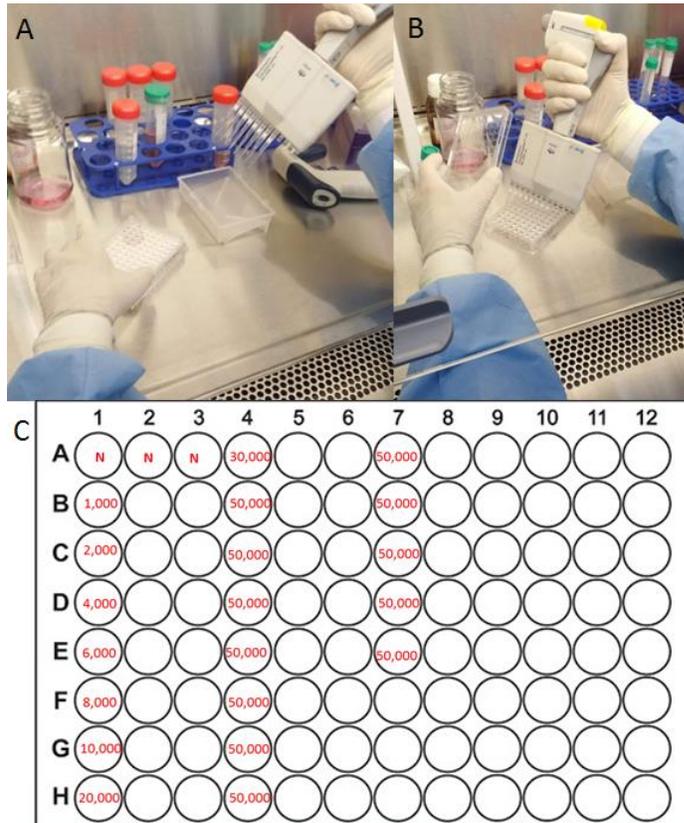


Figura 15. Siembra de células AGS en la placa multipozo. **A.** Toma de 100 μL de medio de cultivo celular mediante una pipeta multicanal **B.** Siembra del medio de cultivo celular en los pozos. **C.** Diagrama de multiplaca de 96 pozos donde se puede apreciar las concentraciones celulares del ensayo en color rojo con el número de células sembradas en cada pozo. la N que representa al control negativo.

4.12.3 Ensayo colorimétrico de proliferación MTT

Con el fin de realizar una aproximación a la concentración máxima inhibitoria (IC50), una vez las células se habían adherido al fondo de la placa y las concentraciones de trabajo habían sido preparadas, se procedió a retirar cuidadosamente el medio de cultivo de cada pozo a evaluar, y seguidamente se adicionaron 100 μL de cada concentración de CBD y se incubó a 37°C durante dos horas. Posteriormente se descartaron las soluciones de CBD de los pozos y se adicionaron 50 μL de medio de cultivo libre de SFB y 50 μL de reactivo MTT y se incubó la placa a 37°C durante 3 horas, transcurrido este tiempo se adicionaron 150 μL de solvente para MTT y se agitó la placa durante 15 minutos, protegida de la luz. Finalmente se leyó la absorbancia de los pozos en un espectrofotómetro (Figura 16) a una longitud de onda de 590 nm.

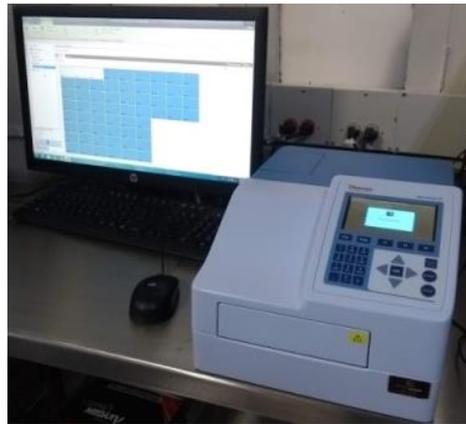


Figura 16. Espectrofotómetro accionado mediante el software SkanIt 5.0 (Thermo Scientific)

5. RESULTADOS

5.1 Bloques FFPE

Por disponibilidad de bloques FFPE en el archivo de patología del INC o por descarte histopatológico de las muestras, de los veinte pacientes que se habían planteado inicialmente como objeto de estudio, únicamente se procesaron doce pacientes de los cuales siete pertenecían al sexo femenino y cinco al masculino, la totalidad de las muestras eran provenientes de pacientes con cáncer gástrico en estadios avanzados, excepto los dos casos sanos que fueron usados como calibradores, adicionalmente siete de las muestras correspondían a CG de tipo intestinal, dos a tipo difuso y una a tipo mixto.

5.2 Normalización de las condiciones para el análisis de la amplificación mediante qPCR de los genes ID1 e ID3 en tejido parafinado de cáncer gástrico

5.2.1 Desparafinación y extracción de ARN

Al seguir el protocolo para desparafinación AllPrep DNA/RNA FFPE Handbook y realizar las respectivas extracciones de ARN se evidenció que la concentración que se estaba obteniendo era demasiado baja o incluso nula, de manera que después de realizar diversos ensayos y demostrar que no se trataba de un error en el proceso de extracción del QIAcube, se determinó que se debía realizar una modificación en alguna de las variables dispuestas en el protocolo del AllPrep DNA/RNA FFPE Handbook. Inicialmente se aumento la concentración de Proteinasa K de 10 μ l a 15 μ l sin resultado efectivo. Se encontró posteriormente que el cambio a realizar para obtener una concentración de ARN óptima, era aumentar el tiempo de incubación a 56 °C de la proteinasa K y el buffer PKD de 15 minutos a 1 hora y 30 minutos (Tabla 9). Una vez

establecido este parámetro se obtuvo un promedio de concentración de ARN para las muestras de 66.3 ng/ μ L, siendo 98 ng/ μ L la concentración más alta y 36 ng/ μ L la más baja (Tabla 10).

Tiempo de incubación a 56°C	15 minutos	1 hora y 30 minutos
Concentración	< 20 ng/ μ L	42.5 ng/ μ L

Tabla 9. Diferentes concentraciones de ARN para la misma muestra al modificar el tiempo de incubación a 56°C de la Proteinasa k y Buffer PKD, de 15 minutos a 1 hora y 30 minutos.

Muestra	Concentración de ARN
1	79 ng/ μ L
2	45.1 ng/ μ L
3	89 ng/ μ L
4	39.6 ng/ μ L
5	89 ng/ μ L
6	98 ng/ μ L
7	38.1 ng/ μ L
8	78 ng/ μ L
9	36.7 ng/ μ L
10	75 ng/ μ L
11	92 ng/ μ L
12	38.3 ng/ μ L

Tabla 10. Concentraciones de ARN de la totalidad de bloques FFPE de adenocarcinoma gástrico utilizados en el estudio, obtenidos mediante el fluorómetro Qubit (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA)

5.2.2 Retrotranscripción (RT-PCR) y Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o tiempo real (qPCR)

Al realizar la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa RT-PCR con dos concentraciones de ARN diferentes (10 ng/ μ L y 36 ng/ μ L), se evidenció que no existen mayores diferencias en la variación de este tratamiento. Los valores de los C_t , una vez realizada la qPCR, son similares en ambos casos (Tabla 11) tanto para los bloques FFPE como para la línea celular, sin embargo, se puede observar que el gen constitutivo *GAPDH* y los genes *ID1* e *ID3* amplifican en ciclos tardíos cuando la muestra provenía de bloques FFPE, pero cuando era extraída de la línea celular los C_t fueron mucho más tempranos (Figura 17 y 18). No obstante se optó por realizar los siguientes ensayos con la concentración de ARN más alta (36 ng/ μ L).

Muestra	Concentración	Target	C_t
Bloque FFPE de paciente	10 ng/ μ L	<i>ID1</i>	38.1
		<i>ID3</i>	38.5
		<i>GAPDH</i>	26.9
	36 ng/ μ L	<i>ID1</i>	35.4
		<i>ID3</i>	39.2
		<i>GAPDH</i>	26
Línea celular AGS	10 ng/ μ L	<i>ID1</i>	24.9
		<i>ID3</i>	24.7
		<i>GAPDH</i>	16.9
	36 ng/ μ L	<i>ID1</i>	23.7
		<i>ID3</i>	24.2
		<i>GAPDH</i>	16.3

Tabla 11. Valores de los C_t para los genes *ID1*, *ID3* y *GAPDH*, utilizando dos concentraciones de RNA diferentes para cada una de las muestras (bloque FFPE y Línea celular)

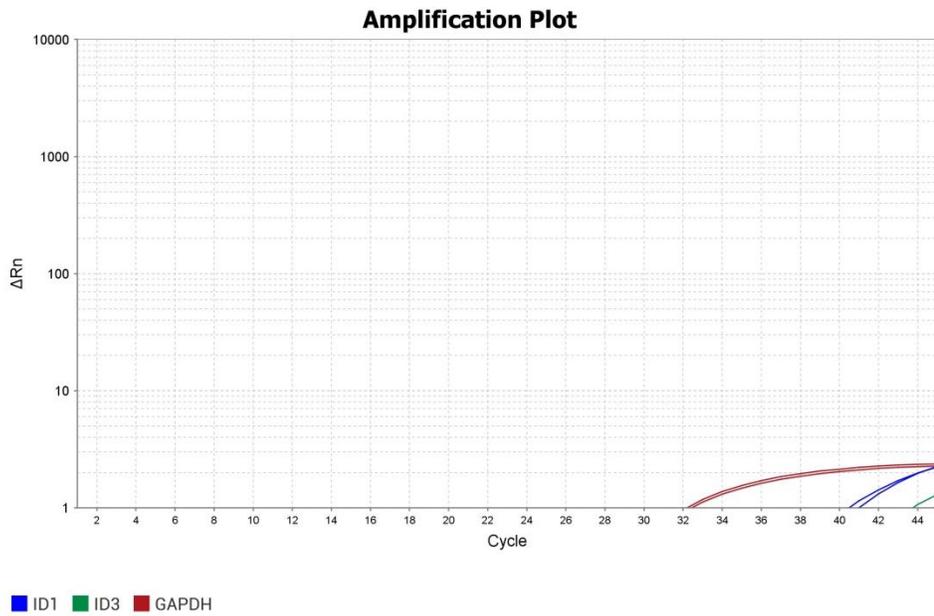


Figura 17. Gráfica de amplificación (ΔRn vs. ciclos de la PCR) de un bloque FFPE a 36 ng/ μL , donde se puede ver de color rojo la curva de amplificación para *GAPDH*, de color Azul para *ID1* y de color verde para *ID3*, teniendo C_t de 27, 37.7 y 40.9 respectivamente. El ensayo se realizó por duplicado a 45 ciclos.

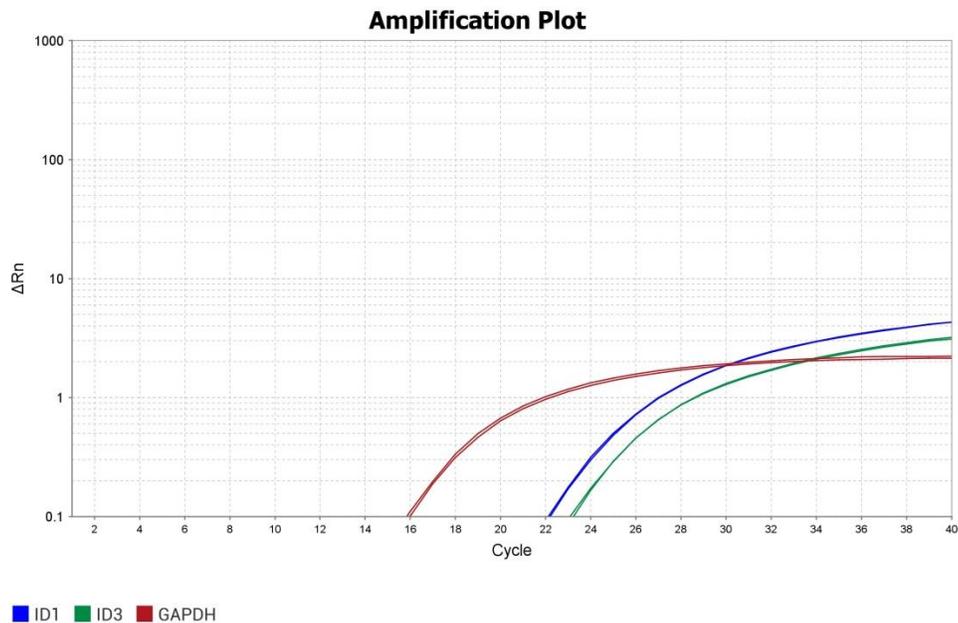


Figura 18. Gráfica de amplificación (ΔRn vs. ciclos de la PCR) de la línea AGS a 36 ng/ μL , donde se puede ver de color rojo la curva de amplificación para *GAPDH*, de color Azul para *ID1* y de color verde para *ID3*, se obtiene C_t para *GAPDH* de 16, *ID1* de 23 e *ID3* de 24. El ensayo se realizó por duplicado a 40 ciclos.

5.2.3 PREAMPLIFICACIÓN (PreAmp): uso de PreAmp vs no PreAmp

Con el fin de disminuir el valor de C_t en los ensayos se pre-amplificaron las muestras, obteniendo una reducción en la qPCR de dichos valores, tanto para los genes de interés como para el gen endógeno (Figura 19), sin embargo, con el uso de esta técnica el gen constitutivo *GAPDH* utilizado como calibrador no mantiene su ubicación en el mismo C_t entre las muestras tratadas teniendo hasta 8 C_t de diferencia entre parafinas calibradoras y muestras patológicas FFPE (Tabla 12).

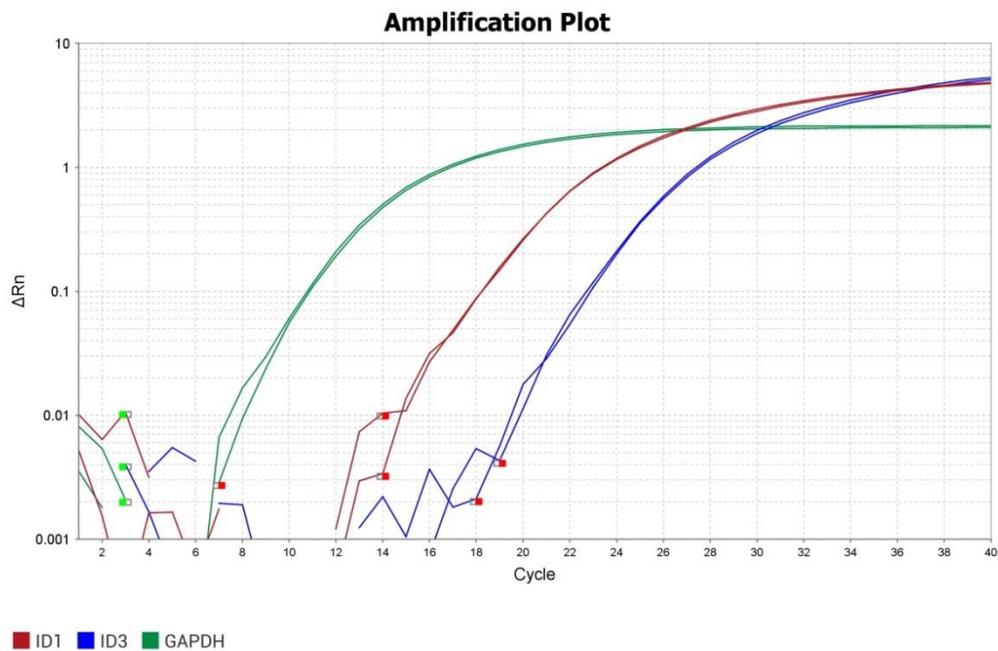


Figura 19. Grafica de amplificación (ΔRn vs. ciclos de la PCR) mediante qPCR para una muestra FFPE tratada con PreAmp, donde se puede observar una notable reducción en los valores de C_t para *ID1* (rojo), *ID3* (azul) y *GAPDH* (Verde), respecto a las amplificaciones sin PreAmp mostradas anteriormente.

Muestra	Target	C _t
Calibrador FFPE 1	<i>GAPDH</i>	16.5
Calibrador FFPE 2	<i>GAPDH</i>	23.5
Muestra FFPE	<i>GAPDH</i>	11.5
Muestra FFPE	<i>GAPDH</i>	24

Tabla 12. Valor de C_t resultantes de qPCR en bloques FFPE para el gen constitutivo, posterior a pre-amplificación, utilizando concentraciones de 36 ng/μL. Se evidencia una gran discordancia de los valores de C_t entre muestras.

Por otra parte, al realizar el ensayo de qPCR omitiendo la técnica de pre amplificación se evidenció una mayor homogeneidad de los valores de C_t entre las muestras para el gen calibrador *GAPDH* (Figura 20). Así mismo, al comparar los resultados qPCR para las muestras FFPE con PreAmp respecto a las no preamplificadas se observa una menor tendencia a la amplificación del gen *ID3* en las muestras que no fueron tratadas con dicha técnica.

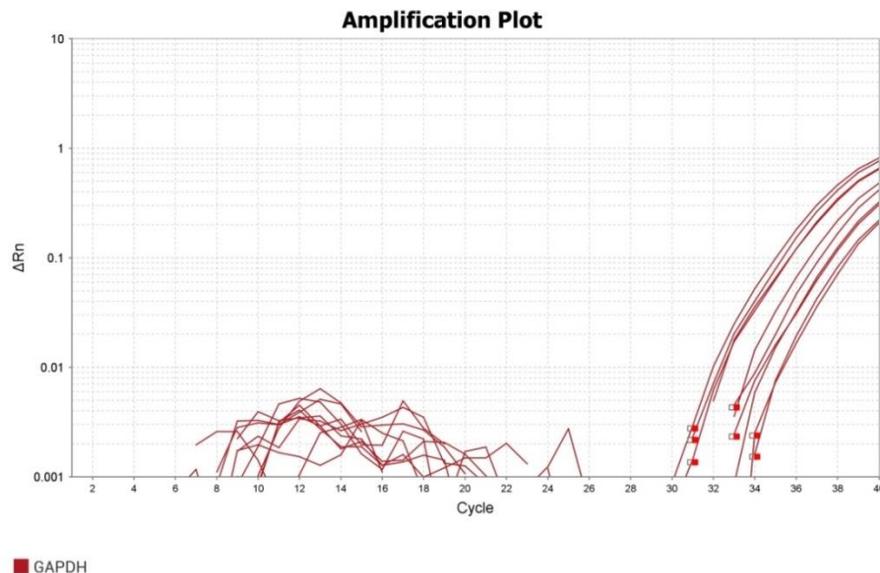


Figura 20. Gráfica de amplificación (ΔR_n vs. ciclos de la PCR) de muestras FFPE a 36 ng/μL, para el gen constitutivo *GAPDH* donde se aprecia una variación de C_t en un rango de solo cuatro unidades.

Por lo anterior, se realizaron los ensayos siguientes de amplificación de los genes *ID1* e *ID3* para las muestras embebidas en parafina FFPE sin el uso de la pre-amplificación PreAmp, debido a la mayor estabilidad del gen constitutivo *GAPDH* utilizado como calibrador. Adicionalmente, teniendo en cuenta la amplificación en este tipo de muestras en ciclos tardíos se optó por realizar los ensayos de qPCR a un total de 50 ciclos. Bajo estas condiciones se obtuvieron los resultados para el total de parafinas incluidas en el estudio que se muestran en la Figura 21 y los valores de C_t en la Tabla 13.

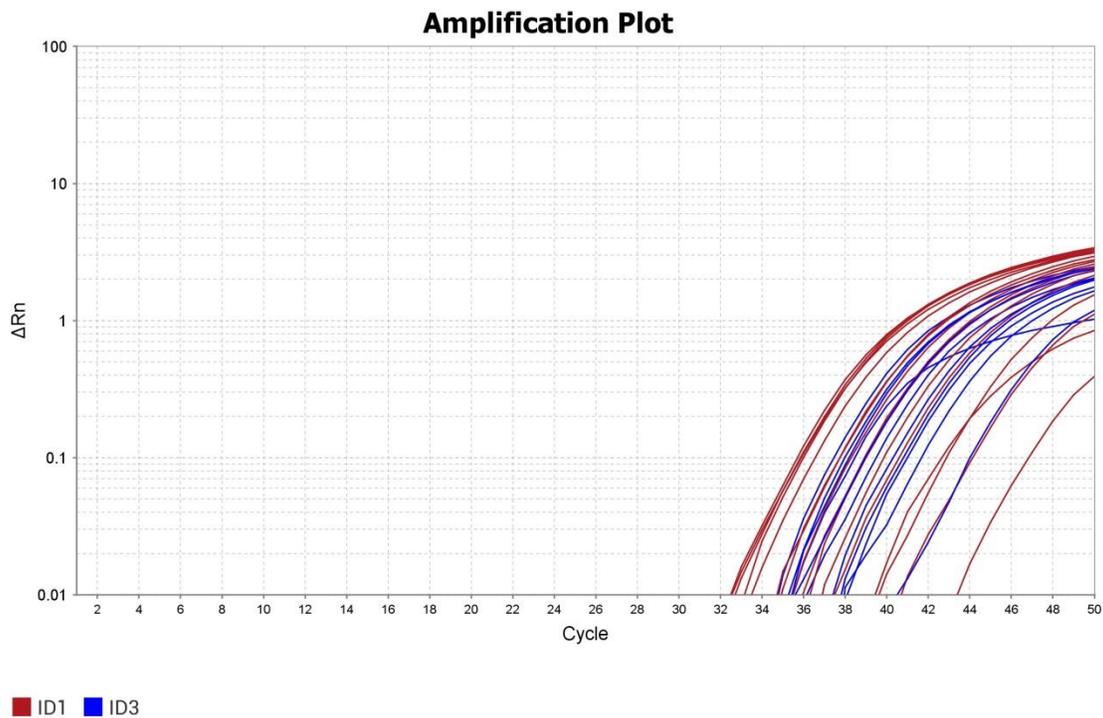


Figura 21. Gráfica de amplificación (ΔRn vs. ciclos de la PCR) de las muestras FFPE a 36 ng/ μ L, para los genes de interés. En la parte superior se muestra de color rojo la amplificación para el gen *ID1*. En la parte inferior en color azul se puede observar la amplificación para el gen *ID3*.

Muestra FFPE	Valor C _t	
	<i>ID1</i>	<i>ID3</i>
1	36.2	43.5
2	40.3	39.7
3	41.7	38
4	42	40.7
5	39.4	37.7
6	40.7	38.9
7	39.3	40.4
8	37.2	36.9
9	37.9	37.9

Tabla 13. Valor de C_t resultantes de qPCR en la totalidad de bloques FFPE para los genes *ID1* e *ID3*, a una concentración de 36 ng/μL.

Así mismo se realizaron electroforesis en gel de agarosa con los amplímeros obtenidos para los genes *GAPDH*, *ID1* e *ID3*, tanto de las parafinas como de la línea celular AGS, con el fin de confirmar la correcta amplificación de los genes de interés al verificar el tamaño de los amplímeros obtenidos (Figura 22).

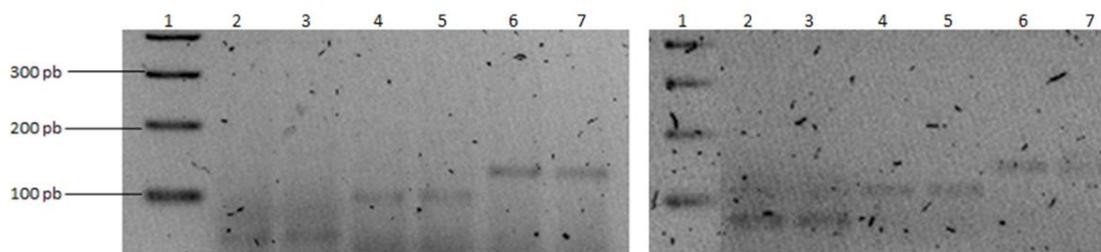


Figura 22. Amplificación de los genes *ID1*, *ID3* y *GAPDH* para la línea celular AGS y una de las muestras FFPE, en gel de agarosa al 2%. **A.** Gel para la línea celular AGS. **B.** Gel para una de las parafinas FFPE. En ambos casos en el carril 1 se observa el patrón de peso molecular, en el 2 y 3 el producto de PCR para *GAPDH* (58 pb), en el 4 y 5 el producto de PCR para *ID1* (100 pb) y en 6 y 7 el producto de PCR para *ID3* (135 pb).

5.3 CBD y línea celular AGS

5.3.1 Ensayo de crecimiento celular

En cuanto al crecimiento de la línea celular AGS en los pozos, se obtuvo una curva exponencial en la que se incrementa en el día 7 donde se evidencia que las células alcanzan el tope máximo de crecimiento y una confluencia del 80% (Figura 23), así mismo en la Figura 24 se aprecian microfotografías de la confluencia celular que alcanzó la línea respecto al tiempo. Con relación a las placas de 96 pozos se determinó que para obtener un 80% de confluencia a las 24 horas se deben sembrar 50.000 células por pozo.

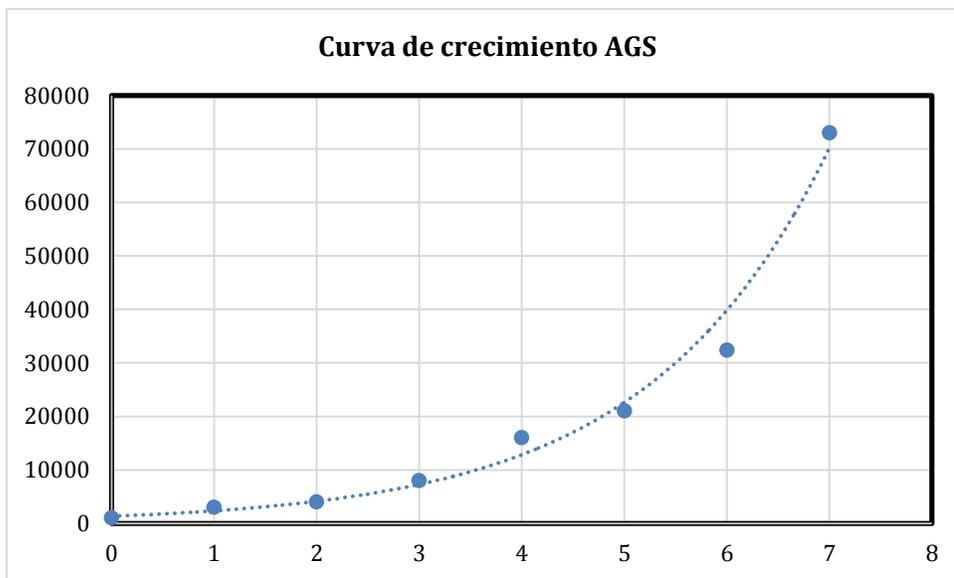


Figura 23. Curva de crecimiento celular para la línea AGS (Numero de células vs. Días)

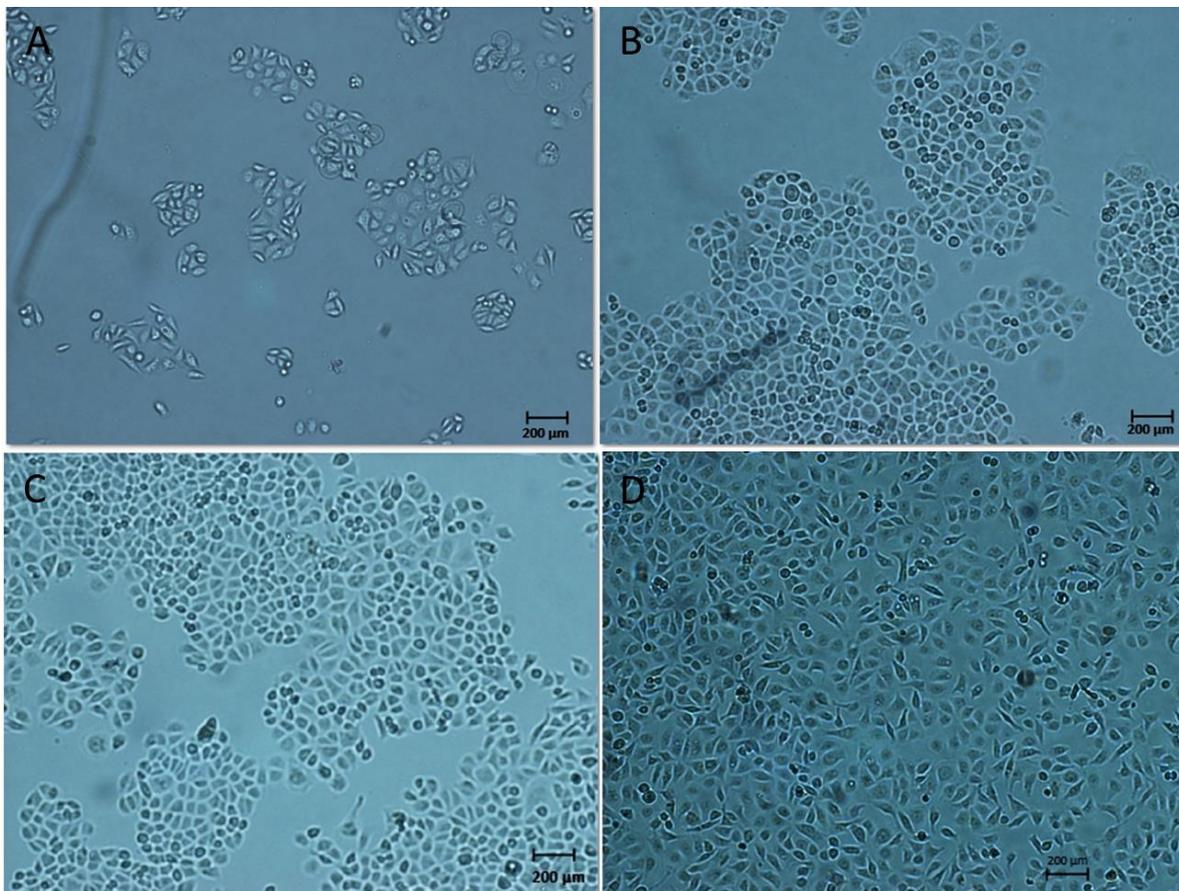


Figura 24. Microfotografías del crecimiento celular de la línea AGS donde se aprecian las confluencias celulares en los pozos respecto al tiempo. **A.** Confluencia celular día 2. **B.** Confluencia celular día 5. **C.** Confluencia celular día 6. **D.** Confluencia celular día 7.

5.3.2 Ensayo colorimétrico de proliferación MTT

Al finalizar el periodo de incubación con MTT se puede observar macroscópicamente que en la placa los tratamientos con un mayor número de células viables generan una mayor cantidad de cristales de Formazan (Figura 26). A mayor concentración de cristales, el pozo se torna de color morado, teniendo una escala de claro a oscuro de acuerdo al número de células viables que presenta el pozo (Figura 25), dicha coloración de los cristales al ser disuelta puede ser leída mediante espectrofotometría. Para el ensayo MTT se obtuvo que únicamente los tratamientos de

CBD de concentraciones de 37.5 $\mu\text{mol/L}$ y 18.7 $\mu\text{mol/L}$ tuvieron un efecto citotóxico visible en microscopio. Para las demás concentraciones no se evidenció efecto visible en el microscopio (Figura 27). Sin embargo hace falta perfeccionar la técnica colorimétrica de proliferación para CBD en la línea celular AGS para obtener un IC_{50} confiable.

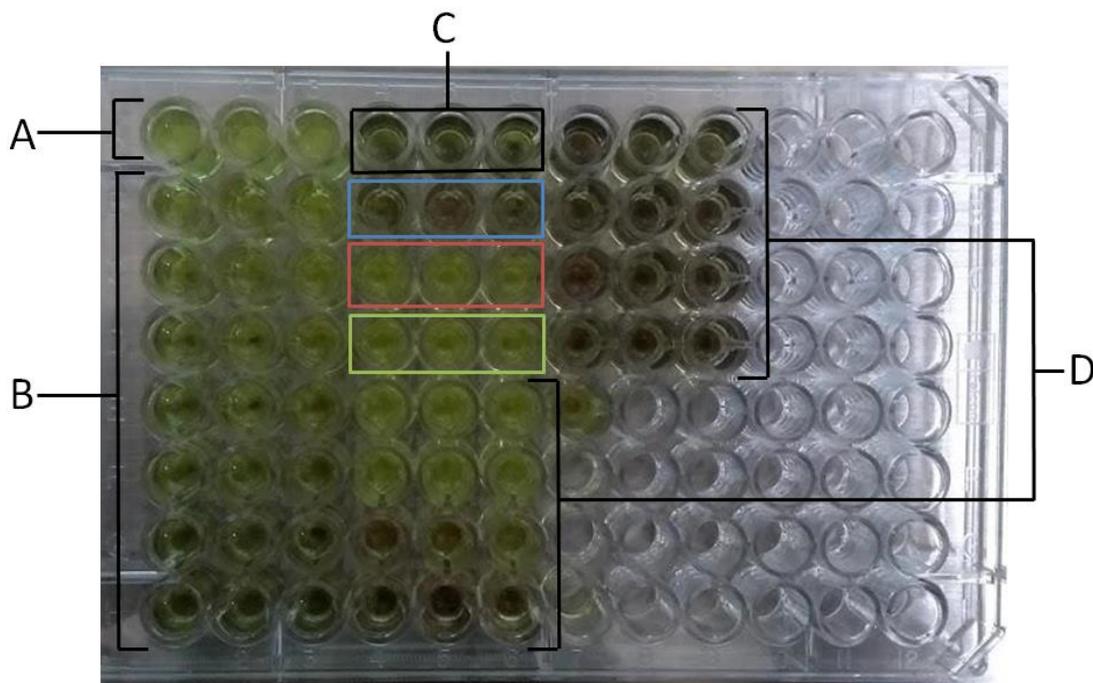


Figura 25. Resultado macroscópico del ensayo colorimétrico de proliferación MTT **A.** El control en blanco del ensayo (sin células). **B y C.** Concentraciones celulares ascendentes empezando por 1000 células en la primera fila de B y terminando con 50.000 en C. **D.** Tratamientos de CBD con las concentraciones indicadas anteriormente. Todos los pozos con CBD tienen una concentración de 50.000 células. Adicionalmente se puede observar dentro del cuadro de contorno azul el control positivo para el ensayo solo con MTT, en color rojo el control de supervivencia celular con etanol y en color verde el control de muerte celular con DMSO. Se aprecian en color morado oscuro los pozos con mayor cantidad de células viales.

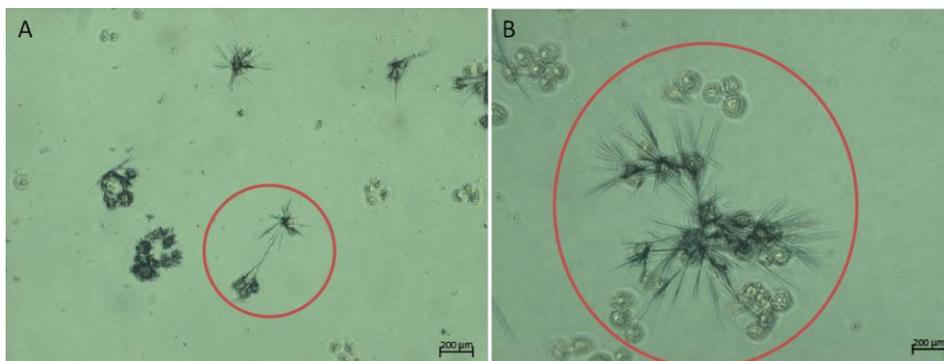


Figura 26. Cristales de Formazan obtenidos a partir del ensayo de MTT **A.** Dentro del círculo de color rojo se aprecian los Cristales de Formazan a un aumento de 10x **B.** Cristales dentro del círculo rojo a un aumento de 40x.

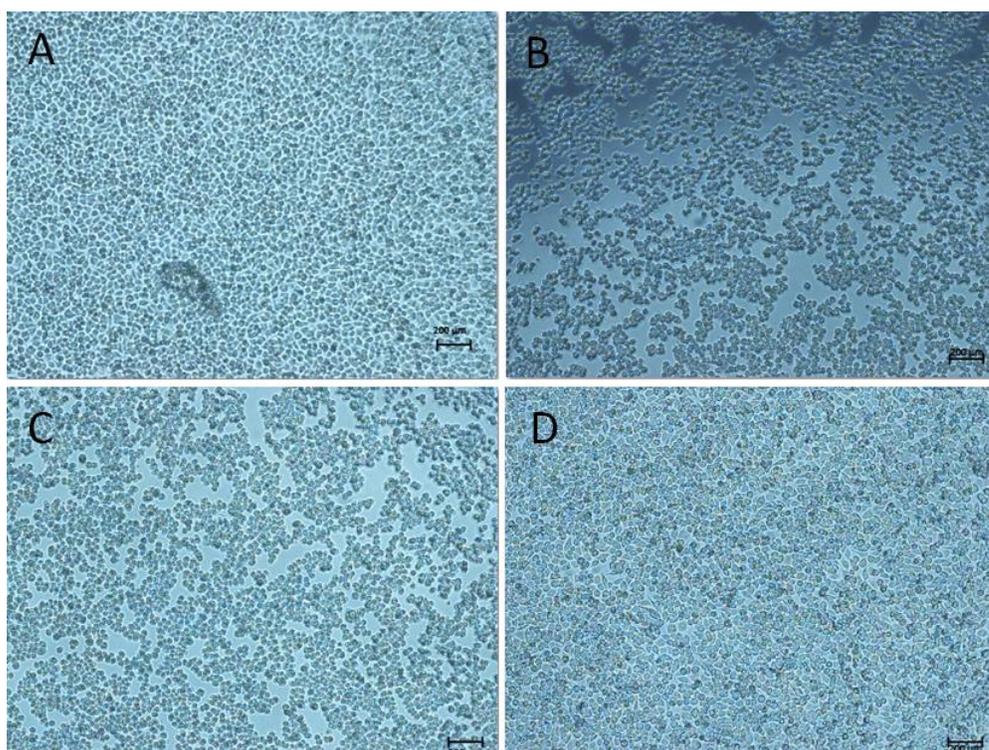


Figura 27. Microfotografías del resultado del ensayo MTT para hallar IC50 con diferentes tratamientos de CBD. **A.** se observa la concentración de CBD más alta (150 µmol/L) que no tuvo efecto significativo en las células. **B – C.** Se muestran las dos concentraciones que al parecer presentan efecto citotóxico (37.5 µmol/L y 18.7 µmol/L respectivamente). **D.** Se muestra el resultado de las células al aplicar una concentración de 1.17 µmol/L de CBD, la cual, no presenta cambios en la morfología celular.

6. ANALISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Normalización de las condiciones para el análisis de la amplificación mediante qPCR de los genes ID1 e ID3 en tejido parafinado de cáncer gástrico

La proteinasa K tiene varias funciones de importancia en el proceso de desparafinación. Estas son: lisar el tejido, liberar a los ácidos nucleicos de las proteínas que se han unido a ellos durante las modificaciones causadas por la fijación y neutralizar RNasas que son estables y no requieren cofactor para funcionar (Mathieson, Guljar, Sanchez, Sroya, y Thomas, 2018). Se pudo evidenciar que al aumentar el tiempo de incubación en el protocolo de desparafinación, AllPrep DNA/RNA FFPE para la digestión de los tejidos embebidos en parafina con proteinasa K y Buffer PKD a 56°C de 15 minutos a 1 hora y 30 minutos, la eficiencia de las extracciones de ARN mejoró en gran medida, aumentando el valor en las lecturas de concentración del ácido nucleico realizada con el fluorómetro Qubit (Tabla 9). Esto se podría deber principalmente a que los tumores de adenocarcinoma gástrico surgen en las glándulas tubulares simples de la capa más superficial o en la mucosa del estómago encargadas de la secreción de compuestos hacia la luz del estómago (Espejo y Navarrete, 2003). Dichas glándulas se encuentran conformadas y rodeadas por células epiteliales (Brüel., et al. 2014) y los epitelios tienen una mayor cantidad de moléculas de adhesión como uniones adherentes, desmosomas y uniones estrechas por lo cual este tipo de tejidos suelen ser más resistentes a los tratamientos con proteasas que otros tejidos y necesitan más tiempo de degradación (Beltrán y Gonzales de la Rosa, 2016) lo que también facilita la interrupción de los enlaces cruzados y resulta en una mejor cantidad y calidad del ARN (Li et al., 2008). Adicionalmente de todo el estómago está revestido por células epitelio simple cilíndrico y las glándulas gástricas desembocan en favéolas las cuales se encuentran tapizadas con células epiteliales (Brüel., et al. 2014).

Se obtuvieron buenos resultados en cuanto a concentración de ARN mediante la técnica de extracción automatizada con el equipo QIAcube, sin embargo, se ha reportado que métodos semi-automatizados basados en perlas de sílice tienen mejor rendimiento en cuanto a cantidades relativas de ARN, pero la ventaja de los métodos automatizados es que presentan una variación más baja entre muestras (Bohmann et al., 2009). Por otra parte, la cuantificación de ARN mediante el Qubit es una de las metodologías más efectiva de medición de ácido nucleico debido a su alta especificidad, ya que la concentración de la molécula objetivo es informada mediante un tinte que emite una señal fluorescente solo cuando se une a su molécula diana incluso a bajas concentraciones, de modo que se eliminan los efectos contaminantes de la medición incluido el ARN degradado o ADN (ThermoFisher. 2020).

A través de la técnica de qPCR fue posible cuantificar la amplificación de los genes *ID1* e *ID3* mediante los valores C_t , que equivale al número de ciclos necesarios para que cada curva alcance un umbral de fluorescencia (Aguilera et al., s.f.) ya que existe una relación cuantitativa entre la cantidad de ADN diana presente al comienzo de la reacción y la cantidad de producto amplificado en la fase exponencial de la curva, esta es una técnica sumamente confiable y altamente específico pues se basa en la detección de una señal fluorescente que es proporcional al producto amplificado, dicha fluorescencia es generada gracias a agentes intercalantes específicos de secuencia (Elgue y Vazquez, 2015). Debido a la especificidad de las sondas no es necesario realizar un análisis posterior a la PCR mediante curvas de disociación de las muestras de ADNc analizadas, las cuales son empleadas en qPCR al usar SYBR Green como intercalante el cual es un fluorocromo de unión inespecífica que identifica fragmentos amplificados de ADN concretos a partir del valor de la temperatura de fusión o T_m por sus siglas en inglés (Pfaffl. 2004).

En estudios de qPCR con muestras de tejido fresco se ha reportado una correlación inversamente proporcional entre la concentración de ADN o ADNc empleado en la reacción con el valor de los C_t , de modo que entre mayor concentración de ácido nucleico usado menor valor de lectura del ciclo umbral. (Elgue y Vazquez, 2015), sin embargo, en el presente estudio esto únicamente se cumplió para las qPCR realizadas a partir de la línea celular AGS, de las cuales se extrajo el ARN en fresco. En las muestras FFPE no se evidenció ningún tipo de patrón entre la concentración de ARN y el valor de C_t , de modo que se puede inferir que el rendimiento de ARN es mucho menor para tejido extraído de FFPE que para tejido fresco de la línea celular. Esto probablemente debido a que dependiendo del tiempo y de las condiciones de almacenamiento de los bloques, tales como la temperatura, el rendimiento y calidad del ARN disminuye debido a que el ARN se degrada en fragmentos pequeños menores a 300 pb (Bohmann et al., 2009; Kokkat et al., 2013). Siendo este un problema que al parecer se da solo con el tiempo de almacenamiento. En estudios líneas celulares tiroideas normales y células estromales de medula ósea fueron embebidas en parafina y fijadas con formalina en condiciones controladas, de las cuales se extrajeron fragmentos de ARN intactos lo que sugiere que la degradación no es un problema para los FFPE recientemente fijados (Li et al., 2008; Scicchitano et al., 2006).

En el transcurso de este trabajo se evaluaron dos tratamientos previos a la amplificación mediante qPCR de los genes de interés, la no preamplificación y la preamplificación de ADNc con el uso del PreAmp que puede amplificar pequeñas cantidades de ARN de baja calidad sin modificar el patrón de expresión génica (Ciotti et al., 2009), pero la estabilidad del gen normalizador GAPDH no se mantuvo estable. Al realizar la qPCR sin el proceso de preamplificación se pudo evidenciar un mayor homogeneidad en los valores de C_t para GAPDH, pero presenta una menor tendencia a la amplificación de ID3.

Un estudio de Li et al., (2008) demostró que la sensibilidad en la detección de la metodología TaqMan es influenciada por la elección del master mix y la longitud del amplicon en el diseño del ensayo para las muestras FFPE. De manera que la sensibilidad es reducida en amplicones cortos de menos de 90 pb, mientras que la sensibilidad es mejor para amplicones más largos (100 pb), pero no demasiado largos, debido a la fragmentación del ARN en las parafinas. Probablemente fue debido a esto que el gen normalizador *GAPDH* no mantuvo su estabilidad ya que se diseñó con 58 pb y que hubo problemas para amplificar *ID3* el cual tenía un diseño de 135 pb, mientras que el gen *IDI* diseñado con 100 pb no presentó mayores inconvenientes en su amplificación. Sin embargo, hacen falta más estudios para determinar la razón por la cual se da la inestabilidad del gen normalizador al emplear la metodología de preamplificación.

A pesar de que se lograron amplificar las muestras FFPE sin el uso del PreAmp, se evidenció que el valor del ciclo umbral en este caso fue tardío en los genes de interés, presentándose después del ciclo 36. Se ha reportado que estos valores tardíos se pueden presentar debido a la ruptura espontánea de la sonda posterior a una elevada cantidad en los ciclos térmicos de la qPCR reportando así un falso positivo (Stadejek. 2018), sin embargo, en este estudio al realizar electroforesis con los amplímeros obtenidos de la reacción qPCR, se obtuvieron las bandas para los genes de interés.

6.2 Cultivo celular y ensayo MTT

En el análisis del crecimiento celular se pudo evidenciar que la línea AGS tiene un rápido incremento, de modo que se genera una curva exponencial, llegando a su tope máximo de crecimiento en el día 7. Se puede apreciar que el mayor aumento de la densidad celular se da durante los últimos cuatro días del experimento pues en los primeros tres días el crecimiento del

número de células no es tan pronunciado. De acuerdo con la literatura esto puede deberse a que, en los cultivos celulares, el crecimiento de la densidad celular suele ser mejorado cuando el medio de cultivo cuenta con fuerte concentración de factores parácrinos homotípicos, los cuales son señales secretadas por algunas células que actúan sobre células adyacentes promoviendo el ciclo celular, de modo que la fase de mayor crecimiento se da cuando ya existe una elevada cantidad de dichos factores en el cultivo (Beltrán y Gonzales de la Rosa, 2016).

En la Figura 24 A se observan microfotografías del proceso de crecimiento celular, donde se aprecian las diferentes concentraciones de densidad celular durante algunos días del experimento. Se evidencia en ellas que la adhesión celular se da en pequeñas colonias o grupos, debido a que la línea celular AGS al pertenecer a un tejido epitelial estomacal, además de ser dependientes a la adhesión a la superficie de la caja de cultivo, también lo son a las adhesiones intercelulares de modo que crecen en parches dado que esto les permite formar uniones célula-célula. Así mismo estos amplios espacios entre colonias permiten la secreción de las sustancias mencionadas anteriormente promoviendo la proliferación, supervivencia o diferenciación celular pues permite la expresión de algunas funciones especializadas de la célula, cuando la caja de cultivo ya cuenta con una confluencia celular elevada, la secreción de los factores parácrinos entra en declive (Beltrán y Gonzales de la Rosa, 2016), por esta razón los experimentos fueron realizados a una confluencia del 80%.

El cultivo celular es el mejor método para estudiar el comportamiento celular y determinar el efecto *in vitro* de diferentes agentes a diferentes concentraciones sobre el crecimiento y metabolismo de determinado tipo celular (Castro, 2006). Así mismo, el ensayo colorimétrico de proliferación MTT es ampliamente utilizado para determinar propiedades de citotoxicidad con sustancias (Castro, 2006). En este sentido, se probaron los extractos de CBD con trece

concentraciones que se encontraban en un rango comprendido desde 150 $\mu\text{mol/L}$ hasta 0.03 $\mu\text{mol/L}$, para realizar un acercamiento al ensayo MTT en la línea celular AGS.

Al observar al microscopio la placa de las células tratadas con las diferentes concentraciones de CBD (Figura 27), se pudo inferir que la mayor sensibilidad de la línea celular a este compuesto se presentó con los tratamientos con concentraciones de 37.5 $\mu\text{mol/L}$ y 18.7 $\mu\text{mol/L}$, así mismo se evidenció que concentraciones mayores o menores a estos valores no tienen un efecto observable en la línea celular. Esta sensibilidad se mostró con la muerte de un número considerable de células pues como se puede ver en la Figura 27 B - C al finalizar el tratamiento se presentan espacios en blanco en la superficie plástica de adherencia celular, espacios que no existían al comienzo de los experimentos. Esto confirma lo expuesto en un estudio reciente, el cual ha reportado que el CBD promueve y mejora la muerte celular por apoptosis en cáncer gástrico, debido a que induce disfunción mitocondrial y regula negativamente las proteínas XIAP pertenecientes a la familia de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP), adicionalmente muestra que esta sustancia no tiene efecto en las células sanas, característica que lo convierte en un potencial objetivo terapéutico para el CG. En dicho estudio fueron usadas diversas líneas celulares de cáncer gástrico incluida AGS y la línea celular gástrica normal HFE-145 (Jeong et al., 2019).

No obstante es sabido que la validez del cultivo celular en monocapa como modelo de funciones fisiológicas es limitado debido al menor nivel de heterogeneidad, pérdida de la arquitectura tridimensional y a posibles cambios ocurridos en el fenotipo celular por cambios en el microambiente ya que las interacciones célula-célula y célula- matriz extracelular no son iguales que en un organismo vivo (Beltrán y Gonzales de la Rosa, 2016).

Cabe destacar que a pesar de que con este ensayo no se logró validar el valor de IC50 para determinar los efectos citotóxicos del compuesto, debido a que por ejemplo, los datos de absorbancia obtenidos no se ajustaron a una línea recta en la regresión lineal, se pudo evidenciar la escala de coloración púrpura en los pozos, con la cual en algunos casos de acuerdo a su intensidad es posible describir de forma observacional mayor o menor actividad metabólica y su relación con cada una de las concentraciones. Así mismo, se evidenció la formación de los cristales de Formazan en los tratamientos con actividad mitocondrial activa y mediante la microscopía óptica se pudo describir cuales concentraciones de CBD tienen mayor efecto en las células AGS, de modo que estos resultados otorgan un punto de partida para futuros estudios de este tipo utilizando CBD y línea celular AGS, además de permitir una familiarización con la técnica MTT.

7. CONCLUSIONES

Fue posible normalizar la amplificación de los genes *ID1* e *ID3* mostrando que sin el uso del PreAmp, la estabilidad del gen constitutivo *GAPDH* se mantiene de una mejor manera que al usar el tratamiento de preamplificación, pero el ciclo umbral se da más tardíamente sin ese tratamiento para los genes *ID1* e *ID3*.

El rendimiento de la amplificación es menor en las muestras FFPE que en la línea celular fresca debido a la degradación del ARN y fragmentación en las FFPE, sin embargo estas muestras pueden ser utilizadas para realizar pruebas de expresión génica de manera retrospectiva y hacer análisis sobre el pronóstico de los pacientes.

Para las muestras FFPE no se evidenció relación entre la concentración de ARN y el valor de los C_t en la qPCR.

Las concentraciones de CBD que en este estudio se evidencian con mayor efecto de inhibición de la supervivencia en la línea celular AGS son las de 37.5 $\mu\text{mol/L}$ y 18.7 $\mu\text{mol/L}$. Sin embargo aún hacen falta más estudios para confirmar esta premisa, así como perfeccionar la metodología para la realización del ensayo MTT.

8. RECOMENDACIONES

A pesar de que GAPDH es un buen gen constitutivo y ha sido ampliamente utilizado en estudios con cáncer se gástrico, se recomienda la aplicación de la qPCR, para este tipo de tejido FFPE, con dos genes normalizadores diferentes.

Con el fin de obtener resultados más sólidos se recomienda utilizar por lo menos dos líneas celulares de cáncer gástrico, de manera que sea posible realizar comparaciones de amplificación entre líneas y muestras.

Se deben emplear amplicones que no excedan 100 pb en estudios de expresión génica con FFPE debido a la fragmentación del ARN.

9. PERSPECTIVAS

Con el desarrollo del presente trabajo queda abierta la posibilidad de realizar un estudio futuro donde se evalué la relación entre las concentraciones de CBD, que parecen ser inhibitorias para la línea celular AGS, con la expresión de los genes ID1 e ID3.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera, P., Ruiz Tachiquín, M., Graciela, M., Munive, R., Olvera, B. P., María, Y., & Cárdenas, E. C. (n.d.). *PCR en tiempo real*.
- Association Japanese Gastric Cancer. (2011). Japanese classification of gastric carcinoma: 3rd English edition. *Gastric Cancer*, *14*(2), 101–112. <https://doi.org/10.1007/s10120-011-0041-5>
- ATCC. (2019). Productos AGS (ATCC ® CRL-1739™). [Internet]. Manassas, Virginia, USA. Disponible en: <https://www.atcc.org/Products/All/CRL-1739.aspx#generalinformation>
- Bang, Y. J., Van Cutsem, E., Feyereislova, A., Chung, H. C., Shen, L., Sawaki, A., ... Kang, Y. K. (2010). Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): A phase 3, open-label, randomised controlled trial. *The Lancet*, *376*(9742), 687–697. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61121-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61121-X)
- Beltrán, N., & Gonzales de la Rosa, C. (2016). *TÉCNICAS DE CULTIVOS CELULARES E INGENIERÍA DE TEJIDOS*. Morelos, Mexico D.F: Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa.
- Benezra, R., Davis, R. L., Lockshon, D., Turner, D. L., & Weintraub, H. (1990). The protein Id: A negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell*, *61*(1), 49–59. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90214-Y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90214-Y)
- Blanco, O., Cantillo, A., & Rivera, J. (2013). Enfoque actual del cáncer gástrico. *Revista*

Médicas UIS, 26(1), 59–70. Retrieved from
<http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4545655>

Bohmann, K., Hennig, G., Rogel, U., Poremba, C., Mueller, B. M., Fritz, P., ... Schaefer, K. L. (2009). RNA extraction from archival formalin-fixed paraffin-embedded tissue: A comparison of manual, semiautomated, and fully automated purification methods. *Clinical Chemistry*, 55(9), 1719–1727. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.122572>

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>

Brenner, H., Rothenbacher, D., & Arndt, V. (2009). Epidemiology of stomach cancer. In *Methods of Molecular Biology, Cancer Epidemiology* (M. Verma, Vol. 472, pp. 467–477). <https://doi.org/10.1007/978-1-60327-492-0>

Brüel, A., Christensen, E., Trandum-Jensen, J., Qvortrup, K., Geneser, F. (2014). GENESER HISTOLOGÍA. Cuarta edición. Editorial Médica Panamericana. México D.F.

Campuzano, G. (2010). Utilidad clínica de los marcadores tumorales. In *Medicina & Laboratorio* (Vol. 16). Editora Médica Colombiana S.

Carneiro, F., Oliveira, C., Leite, M., & Seruca, R. (2008). Molecular targets and biological modifiers in gastric cancer. *Seminars in Diagnostic Pathology*, 25(4), 274–287. <https://doi.org/10.1053/j.semmp.2008.07.004>

Castro, S. (2006). *EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE EXTRACTOS Y FRACCIONES DE Isertia laevis EMPLEANDO LÍNEAS CELULARES DERIVADAS DE TUMORES HUMANOS.*

Chaw, Y. F. M., Eric Crane, L., Lange, P., & Shapiro, R. (1980). Isolation and Identification of Cross-Links from Formaldehyde-Treated Nucleic Acids. *Biochemistry*, *19*(24), 5525–5531. <https://doi.org/10.1021/bi00565a010>

Ciotti, P., Garuti, A., Ballestrero, A., Cirmena, G., Chiaramondia, M., Baccini, P., ... Mandich, P. (2009). Reliability and reproducibility of a RNA preamplification method for low-density array analysis from formalin-fixed paraffin-embedded breast cancer samples. *Diagnostic Molecular Pathology: The American Journal of Surgical Pathology, Part B*, *18*(2), 112–118. <https://doi.org/10.1097/PDM.0b013e3181831320>

Consejo de salubridad general Mexico. (n.d.). Guía de Referencia Rápida, Diagnostico y tratamiento del adenocarcinoma gástrico en adultos. In *Guía de Referencia Rápida.*

Corvalán R, A. (2013). Bases epigenéticas del cáncer gástrico: oportunidades para la búsqueda de nuevos biomarcadores. *Revista Médica de Chile*, *141*(12), 1570–1577. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872013001200011>

Cruz-Rodriguez, N., Combita, A. L., Enciso, L. J., Quijano, S. M., Pinzon, P. L., Lozano, O. C., ... Zabaleta, J. (2016). High expression of ID family and IGJ genes signature as predictor of low induction treatment response and worst survival in adult Hispanic patients with B-acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, *35*(64), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0333-z>

- Cruz-Rodriguez, N., Combata, A. L., Enciso, L. J., Raney, L. F., Pinzon, P. L., Lozano, O. C., ... Quijano, S. (2017). Prognostic stratification improvement by integrating ID1/ID3/IGJ gene expression signature and immunophenotypic profile in adult patients with B-ALL. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 36(1), 37. <https://doi.org/10.1186/s13046-017-0506-4>
- Csendes, A., & Figueroa, M. (2017). Situación del cáncer gástrico en el mundo y en Chile. *Revista Chilena de Cirugia*, 69(6), 502–507. <https://doi.org/10.1016/j.rchic.2016.10.014>
- Daza, E. (2012). *CÁNCER GÁSTRICO EN COLOMBIA ENTRE 2000 Y 2009* (UNIVERSIDAD DEL ROSARIO – UNIVERSIDAD CES). Retrieved from <http://repository.urosario.edu.co/bitstream/handle/10336/4004/DazaDuque-Doris-2012.pdf?sequence=4&isAllowed=y>
- de Vries, E., Uribe, C., Pardo, C., Lemmens, V., Van de Poel, E., & Forman, D. (2015). Gastric cancer survival and affiliation to health insurance in a middle-income setting. *Cancer Epidemiology*, 39(1), 91–96. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2014.10.012>
- Elgue, M., & Vazquez, C. (2015). *Diseño y puesta a punto de un sistema de diagnóstico de PCR en Tiempo Real para las mutaciones en los genes que codifican para Factor II, Factor V y Metilentetrahidrofolato reductasa*. Universidad ORT Uruguay.
- Espejo, H., & Navarrete, J. (2003). Clasificación de los Adenocarcinomas de estómago. *Revista de Gastroenterología Del Perú*, 23(3), 199–212. Retrieved from http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1022-51292003000300006
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D. M., Piñeros, M., ... Bray, F.

- (2019). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International Journal of Cancer*, Vol. 144, pp. 1941–1953.
<https://doi.org/10.1002/ijc.31937>
- Ferlay, J., Shin, H.-R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., & Parkin, D. M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer*, 127(12), 2893–2917. <https://doi.org/10.1002/ijc.25516>
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., ... Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), E359–E386.
<https://doi.org/10.1002/ijc.29210>
- Freshney, R. (2010). Culture of animal cells: A manual of basic technique. In *Journal of Immunological Methods* (Vol. 183). [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(95\)90024-1](https://doi.org/10.1016/0022-1759(95)90024-1)
- Fong, S., Debs, R. J., & Desprez, P. Y. (2004, August 1). Id genes and proteins as promising targets in cancer therapy. *Trends in Molecular Medicine*, Vol. 10, pp. 387–392.
<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2004.06.008>
- Fuentes-Pananá, E., Camorlinga-Ponce, M., & Maldonado-Bernal, C. (2009). Infección, inflamación y cáncer gástrico. *Salud Pública de México*, 51(5), 427–433.
<https://doi.org/10.1590/S0036-36342009000500010>
- Galindo, F. (2009). CARCINOMA GÁSTRICO. *Cirugía Digestiva*, 223(II), 1–31. Retrieved from www.sacd.org.ar,

- García, C. (2013). Actualización del diagnóstico y tratamiento del cáncer gástrico. *Revista Medica Clínica Condes*, 24(4), 627–636.
- GASTRO-ESOFÁGICOS, C. D. T. (2013). *Protocolos de actuación para el manejo del cáncer gástrico*. Donostia, España.
- Godfrey, T. E., Kim, S. H., Chavira, M., Ruff, D. W., Warren, R. S., Gray, J. W., & Jensen, R. H. (2000). Quantitative mRNA expression analysis from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using 5' nuclease quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *Journal of Molecular Diagnostics*, 2(2), 84–91. [https://doi.org/10.1016/S1525-1578\(10\)60621-6](https://doi.org/10.1016/S1525-1578(10)60621-6)
- Gomez, M., Riveros, J., Ruiz, O., Concha, A., Angél, D., Torres, M., ... Sabbagh, L. (2015). Guía de práctica clínica para la prevención diagnóstico y tratamiento del cáncer gástrico temprano - 2015. *Revista Colombiana de Gastroenterología*, 30(1), 34–42.
- GLOBOCAN. (2018). Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide IARC. Cancer Base [Internet]. Lyon: IARC Press. Available at: <http://gco.iarc.fr/>
- Gravalos, C., & Jimeno, A. (2008). HER2 in gastric cancer: A new prognostic factor and a novel therapeutic target. *Annals of Oncology*, Vol. 19, pp. 1523–1529. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdn169>
- Gil-Loyzaga. (2011). Cultivo de células animales y humanas, Aplicaciones en medicina regenerativa. Editorial Visión Libros. Madrid, España.
- Gundersen, K., & Merlie, J. P. (1994). Id-1 as a possible transcriptional mediator of muscle

disuse atrophy (denervation/tetrodotoxin block/hypertrophy/helix-loop-helix proteins/myogenic factors). In *Cell Biology Id-1* (Vol. 91).

Haenszel, W., Correa, P., & Cuello, C. (1976). Gastric cancer in Colombia. II. Case control epidemiologic study of precursor lesions. *Journal of the National Cancer Institute*, 57(5), 1021–1026. Retrieved from

<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L7214927>

Jeong, S., Jo, M. J., Yun, H. K., Kim, D. Y., Kim, B. R., Kim, J. L., ... Lee, D. H. (2019). Cannabidiol promotes apoptosis via regulation of XIAP/Smac in gastric cancer. *Cell Death & Disease*, 10(11), 846. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2001-7>

Karimi, P., Islami, F., Anandasabapathy, S., Freedman, N. D., & Kamangar, F. (2014). Gastric cancer: descriptive epidemiology, risk factors, screening, and prevention. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 23(5), 700–713. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-13-1057>

Kenyon, J., Liu, W., & Dalglish, A. (2018). Report of Objective Clinical Responses of Cancer Patients to Pharmaceutical-grade Synthetic Cannabidiol. *Anticancer Research*, 38(10), 5831–5835. <https://doi.org/10.21873/anticancer.12924>

Kokkat, T. J., Patel, M. S., McGarvey, D., Livolsi, V. A., & Baloch, Z. W. (2013). Archived formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) blocks: A valuable underexploited resource for extraction of DNA, RNA, and protein. *Biopreservation and Biobanking*, 11(2), 101–106. <https://doi.org/10.1089/bio.2012.0052>

- Korbakis, D., Fragoulis, E. G., & Scorilas, A. (2013). Quantification and study of the L-DOPA decarboxylase expression in gastric adenocarcinoma cells treated with chemotherapeutic substances. *Anti-Cancer Drugs*, 24(3), 291–299. <https://doi.org/10.1097/CAD.0b013e32835db25a>
- Kosova, A. A., Khodyreva, S. N., & Lavrik, O. I. (2017, June 1). Role of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in DNA repair. *Biochemistry (Moscow)*, Vol. 82, pp. 643–654. <https://doi.org/10.1134/S0006297917060013>
- Lasorella, A., Benezra, R., & Iavarone, A. (2014). The ID proteins: Master regulators of cancer stem cells and tumour aggressiveness. *Nature Reviews Cancer*, 14(2), 77–91. <https://doi.org/10.1038/nrc3638>
- Lasso, C. (2013). *EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y ANTIPROLIFERATIVA DE FRACCIONES METANÓLICAS Y ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE COMPUESTOS PUROS DE LA ESPONJA MARINA Ectyoplasia ferox*. Universidad Nacional de Colombia.
- Lauren, P. (1965). THE TWO HISTOLOGICAL MAIN TYPES OF GASTRIC CARCINOMA: DIFFUSE AND SO-CALLED INTESTINAL-TYPE CARCINOMA. AN ATTEMPT AT A HISTO-CLINICAL CLASSIFICATION. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, 64, 31–49. <https://doi.org/10.1111/apm.1965.64.1.31>
- Li, J., Smyth, P., Cahill, S., Denning, K., Flavin, R., Aherne, S., ... Sheils, O. (2008). Improved RNA quality and TaqMan® Pre-amplification method (PreAmp) to enhance expression analysis from formalin fixed paraffin embedded (FFPE) materials. *BMC Biotechnology*, 8(1), 10. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-8-10>

- Ling, M. T., Wang, X., Zhang, X., & Wong, Y. C. (2006). The multiple roles of Id-1 in cancer progression. *Differentiation*, 74(9–10), 481–487. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2006.00083.x>
- Liu, J. B., Jian, T., Yue, C., Chen, D., Chen, W., Bao, T. T., ... Yu, C. (2019). Chemo-resistant Gastric Cancer Associated Gene Expression Signature: Bioinformatics analysis based on gene expression omnibus. *Anticancer Research*, 39(4), 1689–1698. <https://doi.org/10.21873/anticancerres.13274>
- Lukhele, S. T., & Motadi, L. R. (2016). Cannabidiol rather than Cannabis sativa extracts inhibit cell growth and induce apoptosis in cervical cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1280-0>
- Luo, G., Zhang, Y., Guo, P., Wang, L., Huang, Y., & Li, K. (2017). Global patterns and trends in stomach cancer incidence: Age, period and birth cohort analysis. *International Journal of Cancer*, 141(7), 1333–1344. <https://doi.org/10.1002/ijc.30835>
- Lv, Y., Wang, XN., Liang, H. (2012). Clinical analysis of 200 patients with primary gastric lymphoma. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi*, 15 (2).
- Matsuoka, T., & Yashiro, M. (2018, July 1). Biomarkers of gastric cancer: Current topics and future perspective. *World Journal of Gastroenterology*, Vol. 24, pp. 2818–2832. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i26.2818>
- Mathieson, W., Guljar, N., Sanchez, I., Sroya, M., & Thomas, G. A. (2018). Extracting DNA from FFPE Tissue Biospecimens Using User-Friendly Automated Technology: Is There an Impact on Yield or Quality? *Biopreservation and Biobanking*, 16(3), 191–199.

<https://doi.org/10.1089/bio.2018.0009>

McAllister, S. D., Christian, R. T., Horowitz, M. P., Garcia, A., & Desprez, P. Y. (2007). Cannabidiol as a novel inhibitor of Id-1 gene expression in aggressive breast cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6(11), 2921–2927. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-07-0371>

McAllister, S. D., Murase, R., Christian, R. T., Lau, D., Zielinski, A. J., Allison, J., ... Desprez, P.-Y. (2011). Pathways mediating the effects of cannabidiol on the reduction of breast cancer cell proliferation, invasion, and metastasis. *Breast Cancer Research and Treatment*, 129(1), 37–47. <https://doi.org/10.1007/s10549-010-1177-4>

Min Chung, J., Sheedlo, M. J., Campbell, A. M., Sawhney, N., Frick-Cheng, A. E., Borden Lacy, D., ... Ohi, M. D. (2019). *Structure of the Helicobacter pylori Cag type IV secretion system*. <https://doi.org/10.7554/eLife.47644.001>

Ministerio de salud Chile. (2014). *Guías Clínicas AUGE Cáncer Gástrico* (Tercera ed). Retrieved from <http://www.bibliotecaminsal.cl/wp/wp-content/uploads/2016/04/GPC-Gástrico-PL.pdf>

Ministerio de salud (04 de octubre de 1993). Normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud. [Resolución número 8430 de 1993]. Recuperado de: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/RESOLUCION-8430-DE-1993.PDF>

Nagahashi, M., Shimada, Y., Ichikawa, H., Nakagawa, S., Sato, N., Kaneko, K., ... Wakai, T. (2017). Formalin-fixed paraffin-embedded sample conditions for deep next generation

sequencing. *Journal of Surgical Research*, 220, 125–132.
<https://doi.org/10.1016/j.jss.2017.06.077>

National Center for Biotechnology Information NCBI (2019). Gene Base [Internet]. U.S. National Library of Medicine. Rockville Pike, Bethesda MD, USA: Available at:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Norollahi, S. E., Alipour, M., Rashidy-Pour, A., Samadani, A. A., & Larijani, L. V. (2019). Regulatory Fluctuation of WNT16 Gene Expression Is Associated with Human Gastric Adenocarcinoma. *Journal of Gastrointestinal Cancer*, 50(1), 42–47.
<https://doi.org/10.1007/s12029-017-0022-y>

Otero, W. (2008). Cáncer gástrico en Colombia: un diagnóstico tardío que amerita el compromiso del Estado William. *Revista Colombiana de Gastroenterología*, 23(4), 302–304. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99572008000400002

Pardo, C., & Cendales, R. (2015). *Incidencia, mortalidad y prevalencia de Cáncer en Colombia 2007-2011*. (Primera ed; I. N. de Cancerología, Ed.). Retrieved from www.cancer.gov.co

Pardo, C., De Vries, E., Buitrago, L., & Gamboa, O. (2017). *Atlas de mortalidad por cáncer en Colombia* (Cuarta edi; Instituto Nacional de Cancerología, Ed.). Retrieved from www.cancer.gov.co

Pfaffl M. (2004). A-Z of Quantitative PCR. Chapter 3. Quantification strategies in real-time PCR. Bustin SA, editor. International University Line. La Jolla, CA. USA. Disponible en: http://www.innofoodsee.eu/downloads/quantification_real_time.pdf

- Ramer, R., Heinemann, K., Merkord, J., Rohde, H., Salamon, A., Linnebacher, M., & Hinz, B. (2013). COX-2 and PPAR- γ confer cannabidiol-induced apoptosis of human lung cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 12(1), 69–82. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-12-0335>
- Resende, C., Thiel, A., Machado, J. C., & Ristimäki, A. (2011). Gastric Cancer: Basic Aspects. *Helicobacter*, 16, 38–44. <https://doi.org/10.1111/j.1523-5378.2011.00879.x>
- Rodríguez, J. M., Sasako, M., & Osorio, J. (2011). TNM 7.a edición 2009 (UICC/AJCC) y Clasificación Japonesa 2010 en Cáncer Gástrico. Hacia la simplicidad y estandarización en el manejo del cáncer gástrico. *Cirugia Espanola*, 89(5), 275–281. <https://doi.org/10.1016/j.ciresp.2010.10.011>
- Roschger, C., & Cabrele, C. (2017, January 25). The Id-protein family in developmental and cancer-associated pathways Fritz Aberger. *Cell Communication and Signaling*, Vol. 15. <https://doi.org/10.1186/s12964-016-0161-y>
- Ruzinova, M. B., & Benezra, R. (2003). Id proteins in development, cell cycle and cancer. *Trends in Cell Biology*, 13(8), 410–418. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(03\)00147-8](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(03)00147-8)
- Scicchitano, M. S., Dalmas, D. A., Bertiaux, M. A., Anderson, S. M., Turner, L. R., Thomas, R. A., ... Boyce, R. W. (2006). Preliminary comparison of quantity, quality, and microarray performance of RNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded, and unfixed frozen tissue samples. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 54(11), 1229–1237. <https://doi.org/10.1369/jhc.6A6999.2006>
- Scott, K. A., Dalglish, A. G., & Liu, W. M. (2017). Anticancer effects of phytocannabinoids

used with chemotherapy in leukaemia cells can be improved by altering the sequence of their administration. *International Journal of Oncology*, 51(1), 369–377. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4022>

Shrivastava, A., Kuzontkoski, P. M., Groopman, J. E., & Prasad, A. (2011). Cannabidiol induces programmed cell death in breast cancer cells by coordinating the cross-talk between apoptosis and autophagy. *Molecular Cancer Therapeutics*, 10(7), 1161–1172. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-10-1100>

Siewert, J. R., & Sandler, A. (2001). Preoperative staging for gastric cancer. In R. Holzheime & J. Mannick (Eds.), *Surgical Treatment Evidence-Based and Problem-Oriented*. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6869/?report=reader>

Stadejek, T. (2018). PCR limitations in PRRS diagnosis. Professional pig community. Disponible en: https://www.pig333.com/articles/pcr-limitations-in-prrs-diagnostics_14136/

Thermo Fisher Scientific. (2020). ThermoFisher Scientific. Retrieved from: <https://www.thermofisher.com/co/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/fluorometers/qubit.html>

Tsuchiya, T., Okaji, Y., Tsuno, N. H., Sakurai, D., Tsuchiya, N., Kawai, K., ... Nagawa, H. (2005). Targeting Id1 and Id3 inhibits peritoneal metastasis of gastric cancer. *Cancer Science*, 96(11), 784–790. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2005.00113.x>

Verdaguer, H., Saurí, T., & Macarulla, T. (2017, June 1). Predictive and prognostic biomarkers in personalized gastrointestinal cancer treatment. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, Vol. 8, pp. 405–417. <https://doi.org/10.21037/jgo.2016.11.15>

- Wang, S., Xu, L., Wang, Q., Li, J., Bai, B., Li, Z., ... Yin, J. (2019). Postoperative complications and prognosis after radical gastrectomy for gastric cancer: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *World Journal of Surgical Oncology*, 17(1), 52. <https://doi.org/10.1186/s12957-019-1593-9>
- Wang, Q., Tsao, S. W., Fu, S., Xue, W., Meng, X., Feng, H., ... Wang, X. (2004). Overexpression of Id-1 in Gastric Adenocarcinoma: Implication for a Novel Diagnostic Marker. *Anticancer Research*, 24(2 B), 881–886.
- Yang, H.-Y., Liu, H.-L., Liu, G.-Y., Zhu, H., Meng, Q.-W., Qu, L.-D., ... Jiang, H.-C. (2011). Expression and Prognostic Values of Id-1 and Id-3 in Gastric Adenocarcinoma. *Journal of Surgical Research*, 167(2), 258–266. <https://doi.org/10.1016/J.JSS.2009.08.006>
- Zhang, X., Qin, Y., Pan, Z., Li, M., Liu, X., Chen, X., ... Li, D. (2019). Cannabidiol induces cell cycle arrest and cell apoptosis in human gastric cancer SGC-7901 cells. *Biomolecules*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/biom9080302>