

UNIVERSIDAD DE GRANADA

PROGRAMA DE MEDICINA CLÍNICA Y SALUD PÚBLICA



PAPEL DE PARP-1 EN EL ADENOCARCINOMA DE COLON

María del Moral Martínez

Granada 2025

DIRECTORES

Dra. Josefa León López

Dr. Javier Salmerón Escobar

Dr. José Antonio Muñoz Gámez

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: María del Moral Martínez
ISBN: 978-84-1195-845-5
URI: <https://hdl.handle.net/10481/106332>

La doctoranda María del Moral Martínez, y los directores de tesis Francisco Javier Salmerón Escobar, Josefa León López y José Antonio Muñoz Gámez garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por la doctoranda bajo la dirección de los directores de tesis y hasta donde nuestros conocimientos alcanzan, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

En Granada, a 22 de enero de 2025.

Directores de tesis:

Dr. Salmerón Escobar

Dra. León López

Dr. Muñoz Gámez

Doctoranda

María del Moral Martínez

ÍNDICE

ABREVIATURAS	7
TABLAS Y FIGURAS	10
INTRODUCCIÓN	13
1. CÁNCER COLORRECTAL	14
1.1 Epidemiología y generalidades	14
1.2 Etiopatogenia	15
Carcinogénesis colorrectal	15
Cáncer esporádico vs cáncer familiar/hereditario	17
Factores de riesgo	18
factores protectores	20
1.3. Presentación clínica	20
1.4. Diagnóstico	22
Cribado del CCR	22
Métodos de diagnóstico	23
Estadía	25
1.5. Factores pronósticos	26
1.6 Tratamiento	27
CCR localizado	27
CCR metastásico	29
2. POLI(ADP-RIBOSA)POLIMERASA TIPO 1 (PARP-1)	30
2. 1 Introducción	30
2.2 Estructura de PARP	30
2.3 Familia PARP	31
2.4 Metabolismo Poli ADP-ribosa (PAR)	33
Síntesis de PAR	33
Degradación de PAR	34
2.5 Funciones de PARP-1	35
Transcripción	35
Replicación	36
Reparación de daños en el ADN	36

Control de la maquinaria transcripcional	37
Muerte celular	38
2.6 PARP y CCR	38
2.7 Inhibidores de PARP	39
3. CÉLULAS MADRE CANCERÍGENAS	39
3.1 Introducción	39
3.2 Origen	40
3.3 Características	42
Auto-renovación	42
Plasticidad	43
Transición epitelio-mesenquimal (EMT)	43
Resistencia a terapias convencionales	44
3.4 Caracterización y aislamiento	45
3.5 CMCs y CCR	47
3.6 CMCs y PARP-1	49
4. P53	50
4.1 Introducción	50
4.2 Estructura de P53	50
4.3 Regulación	51
4.4 Mutaciones de P53	52
4.5 Funciones de P53	53
4.6 P53 y CCR	54
4.7 P53 y PARP-1	54
4.8 P53 y CMCs	55
5. ÓXIDO NÍTRICO SINTASA INDUCIBLE (iNOS)	56
5.1 Introducción	56
5.2 Estructura	57
5.3 Funciones	57
5.4 Regulación	57
5.5 iNOS y CCR	58
5.6 iNOS y PARP	59
5.7 iNOS y CMCs	59
5.8 iNOS y p53	60

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	61
MATERIALES Y MÉTODOS	63
1. Obtención de muestras	64
2. Análisis de las mutaciones de P53	65
3. Extracción de ARN y síntesis de la primera cadena de ADNc	65
4. PCR en tiempo real (RT-PCR)	65
5. Cultivo celular y reactivos	66
6. Protocolos de transfección	66
7. Inmunotransferencia	66
8. Ensayo de nitritos	67
9. Ensayo MTT	67
10. Ensayo de apoptosis	67
11. Ensayo clonogénico	67
12. Ensayo Aldefluor	67
13. Caracterización fenotípica de CMCs	67
14. Ensayo de formación de esferas	68
15. Microscopía de inmunofluorescencia	68
16. Análisis estadístico	68
RESULTADOS	71
1. Expresión de iNOS en mucosa tumoral frente a no tumoral según estado de p53	72
2. Relación de la expresión de iNOS con variables clínico-patológicas	73
3. Relación de la expresión de iNOS con los marcadores de CMCs en el CCR	74
4. Efectos de la inhibición del NO sobre el crecimiento y la viabilidad celular inducido por PARP-1 en CCR	78
5. Efecto de la inhibición del NO sobre las regulación de las propiedades de las CMCs por PARP-1 en CCR	82
DISCUSIÓN	87

CONCLUSIONES	94
BIBLIOGRAFÍA	96
ANEXOS	123
1. Consentimiento informado para donación de muestras biológicas	124
2. Tabla de mutaciones de p53.	128
3. Artículos y comunicaciones	131

ABREVIATURAS

AAS: ácido acetilsalicílico.

ABC: Transportador de unión a ATP (ATP-binding cassette)

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

AINES: Antiinflamatorios no esteroideos

ALDH: Aldehído deshidrogenasa

ARDT: Terapia de privación de andrógenos (Androgen Deprivation Therapy)

ARH: ADP-ribosa hidrolasa

ARN: Ácido ribonucleico

BER: Reparación por escisión de bases (Base Excision Repair)

BH4: Tetrahidrobiopterina

BRAF: Serina/treonina proteína quinasa (gen B-Raf)

CaCAM: Calmodulina asociada al calcio

CCR: Cáncer colorrectal

CEA: Antígeno carcinoembrionario

CIN: Inestabilidad cromosómica

CMCs: Células madre cancerígenas

CM: Células madre

CSC: Cancer Stem Cells

CU: Colitis ulcerosa

DBD: Dominio de unión al ADN (DNA-binding domain)

DEAB: Detilaminobezaldehído

DMEM: Medio Eagle modificado de Dulbecco

EC: Enfermedad de Crohn

EMT: Transición epitelio-mesenquimal (Epithelial-Mesenchymal Transition)

FAD: Flavina adenina dinucleótido

FBS: Suero fetal bovino (Fetal Bovine Serum)

FMN: Mononucleótido de flavina

HIF: Factor inducible por hipoxia

IFN- γ : Interferón gamma

IGF-1: Factor de crecimiento insulínico tipo 1

IMC: Índice de masa corporal

iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible

eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial

ISC: Células madre intestinales (Intestinal Stem Cells)

TAD: Dominio de activación transcripcional (Transcriptional Activation Domain)

LMA: Ligando de membrana asociado

LPS: Lipopolisacáridos

M: Metástasis

MET: Transición mesenquimal-epitelial

MMR: Reparación de errores de emparejamiento (Mismatch Repair)

MSI: Inestabilidad de microsatélites (Microsatellite Instability)

N: Nodo linfático

NAD⁺: Nicotinamida adenina dinucleótido

NF- κ B: Factor nuclear kappa B

NLS: Señal de localización nuclear (Nuclear Localization Signal)

nNOS: Óxido nítrico sintasa neuronal

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintasa

NTR: Transferencia nuclear de receptor

OCT-4: Factor octamer-binding transcription 4

OMS: Organización Mundial de la Salud

PAF: Poliposis Adenomatosa Familiar

PARP: Poli(ADP-ribosa) polimerasa

PARPi: Inhibidores de PARP

PARG: Poli-ADP-ribosa glicohidrolasa

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PET: Tomografía por emisión de positrones

PET-TC: PET combinado con tomografía computarizada

PIK3CA: Fosfatidilinositol 3-quinasa catalítica alfa

PRD: Dominio rico en prolina

QT: Quimioterapia

R0: Resección quirúrgica completa

RBTA: Red de Biobancos de Tumores de Andalucía

RNM: Resonancia magnética nuclear

RNS: Especies reactivas de nitrógeno

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SC: Stem cells

SHBG: Globulina fijadora de hormonas sexuales

SSBR: Reparación por escisión de una sola hebra (Single Strand Break Repair)

STAT1: Transductor de señal y activador de transcripción 1

STAT3: Transductor de señal y activador de transcripción 3

T: Tumor primario

TARG1: ADP-ribosa terminal glicohidrolasa 1

TD: Dominio de tetramerización

TGFBR: Receptor del factor de crecimiento transformante beta

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

TS: Timidilato sintasa

TSOH: Test de sangre oculta en heces

USE: Ultrasonido endoscópico

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

VPP: Valor predictivo positivo

WCRF: Fondo Mundial para la Investigación del Cáncer (World Cancer Research Fund)

WHO: World Health Organization

ZF1: Dedo de zinc 1

ZF2: Dedo de zinc 2

TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Incidencia global CCR.

Figura 2. Vías de carcinogénesis colorrectal. (Mundade et al., 2014).

Figura 3. Estructura de PARP-1.

Figura 4. Familia PARP.

Figura 5. Metabolismo de PARP.

Figura 6. Activación de PARP en respuesta a daños en el ADN.

Figura 7. Modelos de carcinogénesis.

Figura 8. Hipótesis sobre el origen de las células madre tumorales.

Figura 9. Bases moleculares y celulares de la interacción entre las CMCs y su nicho.

Figura 10. Nicho de células madre tumorales en tumor primario y metástasis.

Figura 11. Arquitectura del intestino delgado y el colon

Figura 12. Estructura de P53.

Figura 13. Correlaciones entre iNOS y PARP-1 en todos los casos y según el estado de p53.

Figura 14. Correlación entre la expresión de iNOS y marcadores CMCs en todos los casos y en función del estado p53.

Figura 15. Correlación entre la expresión de PARP-1 y marcadores CMCs en todos los casos y en función del estado de p53.

Figura 16. Diagramas de caja mostrando la expresión de iNOS y PARP-1 en los tumores con diferente expresión de marcadores CMCs en todos los casos y en función del estado de p53.

Figura 17. La sobreexpresión de PARP-1 induce la expresión de iNOS y la producción de NO en células de CCR. Estudios in vitro.

Figura 18. Expresión simultánea de iNOS y PARP-1 en células CCR. Estudios in vitro.

Figura 19. Regulación del crecimiento y viabilidad celular por iNOS en células que sobreexpresan PARP-1. Estudios in vitro.

Figura 20. Porcentaje de células ALDH1+ según diferente estado de p53 y tras sobreexpresión de PARP-1 e inhibición de iNOS. Estudios in vitro.

Figura 21 Gráficos representativos obtenidos por citometría de flujo de la actividad de células ALDH1+ en cada situación estudiada.

Figura 22. Porcentaje de subpoblaciones según estado de p53 y tras sobreexpresión de PARP-1 e inhibición de iNOS. Estudios in vitro.

Figura 23. Número de esferas formadas según estado de p53 y tras sobreexpresión de PARP-1 e inhibición de iNOS. Estudios in vitro.

Tabla 1: CCR hereditario: síndromes polipósicos y no polipósicos.

Tabla 2. Clasificación TNM (8ª edición, 2017)

Tabla 3. Grupos pronósticos según estadio, 2017

Tabla 4. Criterios histológicos de buen pronóstico

Tabla 5. Principales marcadores empleados para la identificación de CMCs en diferentes tumores.

Tabla 6. Características de los pacientes incluidos en el estudio.

Tabla 7. Cebadores empleados en el análisis de mutaciones de p53.

Tabla 8. Cebadores empleados en el estudio.

Tabla 9. Expresión de PARP-1 e iNOS en todos los pacientes y en función del estado de p53.

Tabla 10. Relación entre la expresión de iNOS y las características clínico-patológicas de los pacientes incluidos en el estudio en función del estado de p53.

Tabla 11.- Relación entre la expresión de PARP-1 y las características clínico-patológicas de los pacientes incluidos en función del estado de p53

Tabla 11. Relación de PARP-1 e iNOS con la expresión de marcadores CSC en nuestra cohorte de pacientes con CCR en función del estado de p53.

Tabla suplementaria 1. Mutaciones p53.

RESUMEN

Poli(ADP-ribosa)polimerasa tipo 1 (PARP-1) se ha relacionado con la progresión de varios tipos de cáncer. Recientemente, en estudios previos realizados en nuestro laboratorio, hemos observado que PARP-1 influye en la progresión tumoral en el cáncer colorrectal (CCR) a través de la regulación de las células madre cancerígenas (CMCs) de forma dependiente de p53. En este estudio, proponemos que el óxido nítrico (NO) producido por la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) podría actuar como mediador. Se evaluó la expresión de iNOS en una cohorte de pacientes utilizada previamente para analizar los efectos de PARP-1 en CCR en relación con el estado de p53. También se desarrolló un modelo in vitro en el que PARP-1 se sobreexpresaba de forma estable. En los pacientes con CCR, la expresión de iNOS se correlacionó con el grado de diferenciación y con una alta expresión de marcadores de CMCs, aunque solo en tumores p53 de tipo salvaje, como se había encontrado previamente para PARP-1. In vitro, la sobreexpresión de PARP-1 indujo un mayor crecimiento y pluripotencialidad en las células p53 de tipo salvaje, mientras que ejerció el efecto opuesto en los casos con p53 mutado, como se esperaba. El tratamiento con 1400 W, un inhibidor selectivo de iNOS, o el silenciamiento del gen, contrarrestaron los efectos de la PARP-1 tanto en células con p53 de tipo salvaje como en células con p53 mutado. Dado que se ha demostrado el desarrollo de resistencia tras el tratamiento con inhibidores de la PARP-1, la iNOS podría considerarse una nueva diana terapéutica en el CCR, aunque sólo en pacientes con tumores con p53 de tipo salvaje.

INTRODUCCIÓN

1. CÁNCER COLORRECTAL

1.1 EPIDEMIOLOGÍA Y GENERALIDADES

El cáncer colorrectal (CCR) es un importante problema de salud pública debido a su alta incidencia y mortalidad. Globalmente, el CCR es el tercer tumor más frecuentemente diagnosticado si consideramos ambos sexos. Representa la tercera neoplasia más frecuente en hombres tras el cáncer de pulmón y próstata, y la segunda en mujeres tras el cáncer de mama. En 2022, se diagnosticaron 1,93 millones de nuevos casos, lo que supone el 10% de todos los diagnósticos de cáncer (Bray et al., 2024). Su incidencia continúa aumentando, se estima que para el año 2040 se diagnosticarán unos 3,2 millones de nuevos casos y producirá 1,6 millones de muertes al año (Morgan et al., 2022).

Casi el 55% de los casos ocurren en las regiones más desarrolladas. Existe una gran variabilidad geográfica en la incidencia en todo el mundo, las tasas de incidencia más alta están en Europa, Australia y Nueva Zelanda y las más bajas en África Occidental y centro-sur asiático. Estas diferencias geográficas han sido atribuidas a diferencias en las exposiciones ambientales, estilos de vida y conductas alimentarias (Bray et al., 2024).

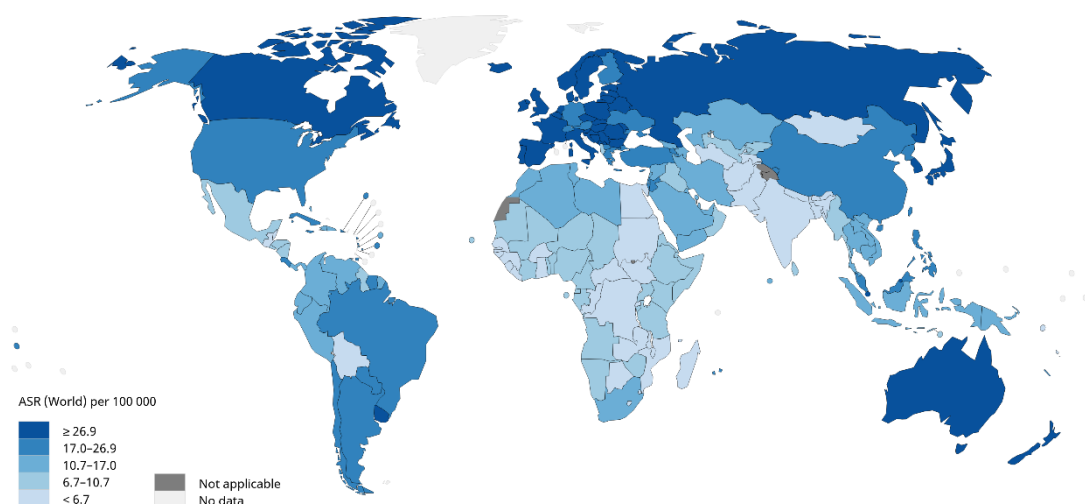


Figura 1. Incidencia global CCR. (GLOBOCAN, 2020).

En España ha habido un incremento significativo en la última década, lo que ha hecho que sea el tumor más frecuentemente diagnosticado en 2024, por delante del de próstata o mama (SEOM, 2024). Cada año se diagnostican en nuestro país 43.600 nuevos casos, se estima que en torno a un 40% de los pacientes fallecerán por esta causa. El CCR es el responsable de 11.142 fallecimientos al año, siendo la segunda causa de muerte por cáncer en España (SEOM, 2024).

La probabilidad de desarrollar CCR aumenta con la edad, especialmente en mayores de 50 años, siendo la edad media al diagnóstico de 70 años. Se estima que en nuestro país, uno de cada veinte hombres y una de cada 30 mujeres serán diagnosticados de CCR antes de los 74 años (AECC, 2024).

Pese a estos datos, gracias a los avances llevados a cabo en los últimos años en el diagnóstico precoz y tratamiento, se ha conseguido aumentar la tasa de supervivencia, sin embargo, las cifras siguen siendo muy alarmantes. El estadio tumoral en el momento del diagnóstico sigue siendo el factor pronóstico más importante. Sólo un 39-45% de los pacientes son diagnosticados en estadios precoces (I-II), alcanzando una supervivencia media a los 5 años cercana al 90% (REDECAN, 2023; OMS, 2024). Sin embargo, si analizamos la supervivencia combinando todos los estadios tumorales, se estima que es de un 65-67% a los 5 años, reflejando avances en terapias quirúrgicas y dirigidas. En España, entre las neoplasias más frecuentes, el mayor aumento absoluto de supervivencia en los últimos años se ha observado para el cáncer colorrectal (5 % para colon y 4.5% para recto) (Guevara et al., 2022).

En cuanto a la morbilidad, es el tumor que provoca el mayor número de estancias hospitalarias, muy por encima del cáncer de pulmón o mama, lo que implica un elevado consumo de recursos sanitarios asociados a este tumor (INE, 2022).

1.2 ETIOPATOGENIA

CARCINOGENÉISIS COLORRECTAL

El CCR es una patología compleja y heterogénea que se desarrolla a partir de alteraciones genéticas, epigenéticas y desregulación de vías de señalización celular que conducen a la transformación de las células epiteliales en células cancerígenas. Existen varias vías principales implicadas, junto con otras emergentes, cada una de las cuales muestra diferencias moleculares e histológicas (Figura 2). Estas vías no son mutuamente excluyentes y puede haber solapamiento entre ellas, sin embargo, el mecanismo dominante será el que determine diferentes asociaciones clínicas, e incluso el tipo de lesión precursora (Goel et al., 2003).

VÍA CLÁSICA O DE INESTABILIDAD CROMOSÓMICA (CIN):

La vía CIN (Chromosomal Instability) es un modelo de secuencia adenoma-carcinoma que sugiere que una acumulación gradual de mutaciones da lugar al desarrollo de un CCR (Vogelstein et al., 1988). Los cambios genómicos incluyen la activación de oncogenes como KRAS, c-Src, c-Myc y la inactivación de al menos tres genes supresores de tumores, tales como el gen de la poliposis adenomatosa (APC), el gen p53 (TP53) y la pérdida de heterozigosidad para el brazo largo del cromosoma 18 (18q LOH) (Kinzler y Vogelstein, 2002). Posteriormente, también se ha demostrado que las mutaciones en los genes que codifican la subunidad catalítica α de la fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato 3-quinasa (PIK3CA) y el receptor del TGF β (TGFBR) parecen desempeñar un papel importante en el desarrollo de CCR (Armaghany et al., 2012).

Entre un 80-85% de los casos esporádicos de CCR y los hereditarios de poliposis adenomatosa familiar (PAF) (con mutaciones a nivel germinal del gen APC) están causados por esta vía (Müller et al., 2016).

VÍA MUTADORA O DE INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES (MSI):

La vía MSI (Microsomal Instability) se debe a una alteración del sistema mismatch repair (MMR). Este sistema es el encargado de corregir los errores que se producen durante la replicación del ADN, y es controlado por varios genes (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, entre otros). Las células con MMR anormalmente funcionales tienden a acumular mutaciones (inserciones o deleciones) en microsatélites ubicados en las regiones codificantes de ADN que conducirán al desarrollo de CCR esporádico (Geiersbach y Samowitz, 2011). Dentro de los genes que se ven

implicados, se encuentran, además, distintos genes supresores tumorales, como son TGF- β RII, IGFIIR, MSH3 y BAX (Raut et al., 2004).

Los tumores con MSI representan el 10-15% de todos los CCR, y es habitual en las formas hereditarias como el síndrome de Lynch, cuya base molecular son mutaciones a nivel germinal (Sun, 2020).

VÍA SERRADA O FENOTIPO METILADOR:

Las islas CpG son regiones del ADN donde existe una gran concentración de pares de Citosina y Guanina enlazados por fosfatos (de ahí la "p" en CpG). La inactivación transcripcional mediante la metilación de islas CpG promotoras de genes supresores de tumores es un importante mecanismo de carcinogénesis, también denominado fenotipo metilador. Esta vía serrada de carcinogénesis colorrectal surgiría de una lesión precursora serrada, y parece no seguir los mecanismos habituales de la secuencia clásica de adenoma-carcinoma (Perea et al., 2011). Los CCR iniciados por esta vía se caracterizan por la presencia de mutaciones en BRAF (proteína quinasa B-Raf) y por el silenciamiento epigenético de los genes que participan en la diferenciación celular, la reparación del ADN y el control del ciclo celular (Legget y Whitehall, 2010). Estos tumores representan aproximadamente el 20-30 % de los CCR que se diagnostican.

Es posible que no haya dos CCR iguales y que sólo unas pocas mutaciones sean comunes en la mayoría de los CCR esporádicos. Por lo tanto, cada tumor tiene su propia combinación única de alteraciones genéticas que estarán influenciadas por factores metabólicos y el propio microambiente tumoral. Estados de inflamación crónica van a producir la activación de diversas vías como NF- κ B y STAT3 favoreciendo la proliferación celular, la resistencia a la apoptosis y la remodelación del microambiente, generando un entorno favorable para la degeneración celular (Fan et al, 2013). Es por ello, que además de las vías descritas, la heterogeneidad del CCR se atribuye a la interacción de las vías descritas con otras vías menos o aún no conocidas (Hinoi, 2021; Perea et al., 2011).

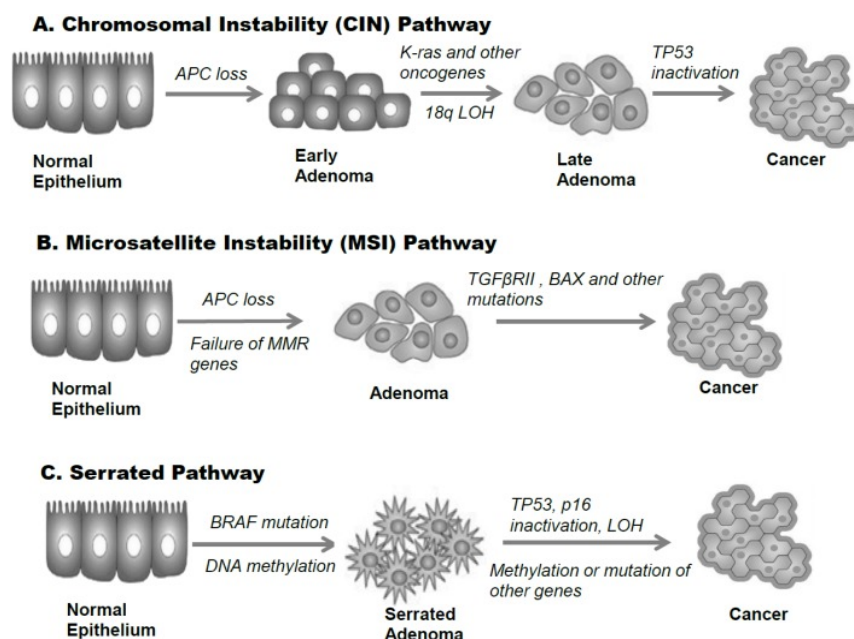


Figura 2: Vías de carcinogénesis colorrectal. (Mundade et al., 2014).

CÁNCER ESPORÁDICO VS CÁNCER FAMILIAR/HEREDITARIO

Como se acaba de ver, las mutaciones en genes específicos pueden conducir al desarrollo de CCR, como ocurre en otros tipos de cáncer. Dependiendo del origen de la mutación, el CCR puede clasificarse en esporádico, hereditario y familiar.

El CCR esporádico representa el 70% de todos los casos de CCR y suele ocurrir por mutaciones puntuales que ocurren de manera aleatoria en pacientes sin antecedentes familiares significativos. La patogénesis molecular de este tipo de cáncer es heterogénea, ya que las mutaciones pueden producirse en diferentes genes, predominando la vía CIN (Fearon y Vogelstein, 1990). La incidencia aumenta de forma significativa con la edad, principal factor de riesgo, siendo más frecuente en pacientes mayores de 50 años. Su desarrollo se asocia además a factores ambientales como la dieta o el sedentarismo o situaciones de inflamación crónica intestinal.

Los cánceres hereditarios representan sólo el 5% de todos los casos de CCR. Estos cánceres son causados por mutaciones heredadas que afectan a uno de los alelos del gen mutado, lo que significa que una mutación puntual en el otro alelo provocará la aparición de la célula tumoral. Dentro de ellos podemos encontrar los síndromes polipósicos, como la PAF que representa menos del 1%, y los no polipósicos como el síndrome de Lynch (2-4% de los casos) (Tabla 1) (Lynch y de la Chapelle, 2003). A diferencia del CCR esporádico, suele presentarse a edades más tempranas y es más frecuente el desarrollo de lesiones sincrónicas o metacrónicas y la asociación con otros tumores extracolónicos. En ellos, existen programas específicos de cribado intensivo tanto para pacientes como familiares.

Tabla 1: CCR hereditario: síndromes polipósicos y no polipósicos.

CCR HEREDITARIO (CCRH)	Genes implicados
SD. POLIPÓSICOS	
Poliposis adenomatosa familiar	APC
Poliposis adenomatosa familiar atenuada	APC (mutaciones en la región 5') MYH (herencia autosómica recesiva)
Síndrome de Gardner	APC
Síndrome de Turcot	APC
Síndrome de Peutz-Jeghers	LKB1 (STK11)
Poliposis juvenil	SMAD4 (DPC4).BMPR1. PTEN.
Enfermedad de Cowden	PTEN
Síndrome de Bannayan-Ruvalcaba-Riley	PTEN
CCRH NO ASOCIADO A POLIPOSIS	
Síndrome de Lynch	MSH2, MLH1, MSH6, PMS2

Un 25% del CCR será de tipo familiar no sindrómico, caracterizado por la agregación familiar sin una mutación identificable, no se clasifican como cánceres heredados per se ya que no pueden ser incluidos en ninguna variante del cáncer hereditario (Stoffel y Kastrinos, 2014). Al igual que el cáncer hereditario suele manifestarse en pacientes más jóvenes.

FACTORES DE RIESGO

La probabilidad de sufrir CCR a lo largo de la vida es del 4% al 5%, el riesgo de desarrollarlo se asocia con ciertas características personales, el desarrollo de enfermedades crónicas o características propias del estilo de vida. Algunos factores, como la edad o el sexo, no son modificables, pero existe evidencia a favor de que la modificación de diversos factores de riesgo reduce el riesgo de enfermedad. Según la OMS, entre el 30 y el 50% de los cánceres se pueden prevenir evitando los factores de riesgo e implementando estrategias de prevención existentes basadas en evidencia (WHO, 2025).

EDAD

La edad es el factor de riesgo más importante para el desarrollo de CCR, la probabilidad de padecer CCR aumenta significativamente después de los 50 años. La edad promedio de diagnóstico es de 70 años y el 90% de los casos se presenta en personas de más de 50, sólo en un 5% de los casos aparece en menores de 40 años (Benson, 2007). Se ha observado un aumento de la incidencia de CCR en pacientes menores de 50 años (Sung et al., 2025), lo que ha llevado a algunas sociedades médicas a recomendar disminuir la edad de cribado de CCR a los 45 años (Howren et al., 2021; US Preventive Services Task Force, 2021).

SEXO

El CCR es ligeramente superior en hombres con respecto a mujeres, la probabilidad de desarrollar CCR se estima de 1:23 para hombres y 1:25 en mujeres. Además, la mortalidad también es mayor en hombres que en mujeres, independientemente de la edad al diagnóstico (Nawras et al., 2024; González-Flores et al., 2025).

OBESIDAD

La obesidad está asociada con un aumento del riesgo y la mortalidad en el CCR (Bardou et al., 2022; Nguyen y Shanmugan, 2024). Cada vez es mayor la evidencia que confirma que el tejido adiposo visceral contribuye al desarrollo de CCR debido a la inflamación sistémica de bajo grado y la interacción directa con el microambiente tumoral (Chaplin et al., 2022). Los individuos con un IMC > 30 muestran un riesgo aumentado del 19% de CCR en comparación con aquellos con un IMC entre 20 y 25 kg/m² (Tárraga-López et al., 2014), se ha observado que el riesgo de CCR aumenta un 8% por cada aumento de 5 Kg/m² en el IMC (Abar et al., 2018). Además, la obesidad en la infancia y juventud se ha asociado a desarrollo de cáncer colorrectal en edades tempranas (Li et al., 2022).

DIABETES MELLITUS

La hiperinsulinemia crónica (debido a una mayor resistencia a la insulina) estimula la síntesis de andrógenos ováricos y la expresión del receptor de la hormona del crecimiento e inhibe la producción hepática de proteínas de unión tales como las globulinas fijadoras de hormonas sexuales (SHBG) y las proteínas de unión a IGF-1, dando lugar a una mayor biodisponibilidad de estrógenos circulantes e IGF, lo que favorece la carcinogénesis (Slattery y Fitzpatrick, 2009). Un metaanálisis reciente estimó que el riesgo de cáncer de colon entre personas diabéticas era aproximadamente un 37 % más alto que en los no diabéticos (Luo et al., 2016).

ACTIVIDAD FÍSICA

La actividad física regular y moderada eleva el metabolismo basal y mejora la oxigenación tisular, reduciendo la grasa corporal, los niveles de insulina, la resistencia a la insulina y el volumen del tejido adiposo. En consecuencia, la actividad física reduce el riesgo de CCR. Un estudio

demostró que sujetos físicamente más activos tienen un 24% menos de riesgo de CCR en comparación con personas más sedentarias (Wolin et al., 2009). Resultados similares a los observados en un meta-análisis posterior en el que se observó que el riesgo de CCR es un 30% superior en personas sedentarias (Cong et al., 2014). Se ha observado que la realización regular de ejercicio físico reduce el riesgo de CCR en un 40% (Tárraga-López et al., 2014).

ALCOHOL

Existe una asociación positiva entre el consumo de alcohol y el desarrollo de CCR. Un metaanálisis que incluyó 66 estudios sobre CCR y alcoholismo determinó que tanto el consumo moderado (≤ 50 g/día) como el consumo elevado (> 50 g/día) de alcohol suponían un incremento en el riesgo de desarrollar CCR (Vieira et al., 2017).

El papel carcinogénico del alcohol parece ser debido a su interacción en la síntesis del folato. El alcohol en el colon se metaboliza en acetaldehído que degrada el folato in vivo, el cual es necesario para la síntesis y reparación del ADN; la deficiencia de folato parece conducir a la rotura del cromosoma, apropiación indebida del uracilo y otros desequilibrios del precursor del ADN, todo lo cual puede contribuir a la carcinogénesis (Homann et al., 2000).

TABACO

El tabaquismo aumenta significativamente la incidencia y mortalidad del CCR y se ha asociado con un aumento de dos a tres veces en el riesgo de desarrollar adenoma colorrectal. Esto se debe a la capacidad del tracto gastrointestinal y el sistema circulatorio para difundir carcinógenos del cigarrillo a la mucosa colónica, aumentando el estado inflamatorio y, por tanto, favoreciendo el desarrollo de CCR (Botteri et al., 2008). Un estudio observó que el riesgo de CCR es dosis-dependiente, aumentando con la intensidad y la duración del tabaquismo. Este mismo estudio demostró que dejar de fumar reduce el riesgo de cáncer colorrectal (Botteri et al., 2020).

ANTECEDENTES FAMILIARES DE CCR

El número de familiares afectados, el grado de parentesco, la edad de diagnóstico del CCR en los familiares afectados y la localización son las principales variables asociadas al riesgo de CCR en los diferentes estudios. Excluyendo las formas hereditarias de la enfermedad, los individuos con uno o más familiares de primer grado con CCR, tienen un riesgo relativo de padecer la enfermedad en torno a un 1,8 respecto al resto de la población (Samadder et al., 2014).

Finalmente, es importante distinguir entre una cierta agrupación familiar (hasta un 25% de los pacientes tienen un familiar afecto), la existencia de un componente hereditario ($< 10\%$ de todos los casos) y por último la existencia de síndromes que predisponen al desarrollo de un cáncer de colon ($< 5\%$ de todos los casos).

ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

El riesgo de desarrollar CCR es del 3.7% para los pacientes con colitis ulcerosa (CU) y del 2.5% para los pacientes con enfermedad de Crohn (EC) (Canavan et al., 2006; Eaden et al., 2001). La enfermedad inflamatoria intestinal aumenta el riesgo de desarrollar CCR debido a la condición inflamatoria que soporta el colon. El riesgo aumenta con la duración (2% a los 10 años hasta 18% a los 30 años), con la severidad y con la extensión de la enfermedad (Cunningham et al., 2010).

DIETA

Existen grandes variaciones a nivel de incidencia mundial del CCR, por lo que la dieta podría tener un impacto importante a la hora de padecer o no la enfermedad. De hecho, en las poblaciones con menor incidencia de CCR el consumo de grasa representa un 10% del aporte calórico total, mientras que en aquellos cuya incidencia es elevada, representa entre el 40-45%

de la ingesta calórica diaria (Benson, 2007). Sin embargo, un metaanálisis de 13 estudios prospectivos de cohortes con 3.635 casos y 459.910 sujetos incluidos mostró que la dieta rica en grasa no producía un incremento en el riesgo de CCR (Liu et al., 2011). De hecho, Alsheridah et al., informaron que un mayor riesgo de CCR estaba vinculado a la obesidad, el consumo excesivo de carne roja y el consumo de menos frutas y verduras (Alsheridah y Akhtar, 2018). El CCR se ha visto asociado al consumo de carne en numerosos estudios. Un metaanálisis estimó que el consumo diario de alrededor de 100 g de carne roja o 50 g de carne procesada aumenta el riesgo de CCR en aproximadamente un 15-20% (Chan et al., 2011). Otro metaanálisis encontró que, si bien la carne roja procesada se asocia positivamente con el riesgo de CCR, en particular el cáncer de colon distal, la carne roja sin procesar muestra una asociación más débil y no significativa con el CCR (Bernstein et al., 2015).

FACTORES PROTECTORES

FIBRA

El grado en el que la fibra dietética protege contra el desarrollo de adenomas o CCR es incierto ya que los resultados de los estudios son discordantes (Rashed et al., 2024). En 2011, la WCRF (World Cancer Research Fund) elevó la evidencia de que la acción protectora de la fibra contra el CCR era "convinciente" (Baena y Salinas, 2015). Numerosos estudios han demostrado que una dieta rica en verduras y frutas tiene un efecto protector contra el CCR (Rashed et al., 2024). Sin embargo, no todas las investigaciones respaldan este efecto protector, ya que algunos estudios no han encontrado una asociación significativa entre el consumo de frutas y verduras y el riesgo de CCR (Bener et al., 2010).

CALCIO Y VITAMINA D

Aunque hay estudios que han demostrado la eficacia de los suplementos de calcio en la prevención de la recidiva de los adenomas colorrectales, no se ha asociado a disminución del riesgo de CCR.

Un análisis realizado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha identificado el cáncer de colon como el tipo de cáncer con mayor riesgo asociado con la deficiencia de vitamina D. Sin embargo, numerosos estudios han determinado que esta asociación es inconcluyente ya que sus posibles efectos pueden ser modificados por la interacción de diferentes hormonas (Tárraga-López et al., 2014).

FÁRMACOS

Aspirina (AAS), AINE, estatinas, antioxidantes y bifosfonatos parecen ser protectores. Los estudios sobre la aspirina han indicado que es probable que la aspirina produzca una reducción modesta del riesgo de adenoma y cáncer colorrectal, aunque sólo después de un uso prolongado y continuo y acompañado de un mayor riesgo de hemorragia (Katona y Weiss, 2020). El uso regular de AAS y otros AINE se asocia con una reducción del 20 al 40 % en el riesgo de adenomas de colon y CCR en personas con riesgo medio, sin embargo, son necesarios más estudios que permitan seleccionar qué sujetos pueden beneficiarse, dosis y duración (Clevers, 2006; Rothwell et al., 2010; Katona y Weiss, 2020).

1.3. PRESENTACIÓN CLÍNICA

El CCR es una enfermedad heterogénea cuya presentación clínica depende de diversos factores, como la localización anatómica del tumor, su tamaño y la extensión de la enfermedad. Su presentación clínica se puede agrupar en tres escenarios principales:

1.3.1 Pacientes con síntomas o signos sugestivos de CCR

Los síntomas y signos del CCR suelen ser inespecíficos y comunes en la población general, lo que dificulta su diagnóstico temprano. Constituyen una de las principales causas de consulta en atención primaria, aunque la mayoría de los casos se deben a patologías benignas altamente prevalentes como hemorroides, síndrome de intestino irritable o infecciones gastrointestinales. Sin embargo, ciertos síntomas tienen un valor predictivo positivo (VPP) elevado y nos deben hacer sospechar la existencia de un CCR, especialmente en combinación con antecedentes familiares o personales relevantes. Los principales signos y síntomas sugestivos de CCR incluyen:

- Rectorragia (sangrado rectal).
- Alteraciones en el hábito intestinal, como diarrea persistente, estreñimiento prolongado o cambios en la consistencia de las heces.
- Tenesmo rectal, la sensación de evacuación incompleta.
- Dolor abdominal persistente o cólico.
- Sensación de masa abdominal palpable.
- Anemia ferropénica, en especial en personas mayores de 50 años sin causa aparente.
- Síntomas constitucionales, como pérdida de peso inexplicada, fatiga y fiebre.

La anamnesis detallada y la exploración física completa son esenciales en estos casos, prestando especial atención a los antecedentes familiares y personales de CCR o enfermedades predisponentes como pólipos adenomatosos, colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn. Una combinación de estos factores, junto con los síntomas mencionados, puede justificar la solicitud de estudios diagnósticos.

1.3.2. Pacientes que presentan complicaciones agudas

En aproximadamente un 25-30% de los casos, el CCR se diagnostica tras la aparición de complicaciones agudas, que suelen ser indicativas de enfermedad avanzada. Estas complicaciones incluyen:

- Obstrucción intestinal: se presenta con síntomas como distensión abdominal, vómitos y ausencia de evacuación o flatulencia.
- Perforación intestinal: puede ocurrir en estadios avanzados debido a la invasión tumoral o necrosis.
- Hemorragia digestiva: aunque la rectorragia es más común en estadios iniciales, en algunos casos avanzados puede ocurrir hemorragia significativa, con anemia severa o inestabilidad hemodinámica.

Estos pacientes suelen requerir una evaluación y manejo urgente mediante estudios de imagen como la tomografía computarizada (TC) para determinar la extensión de la enfermedad y planificar intervenciones quirúrgicas o terapias paliativas. El pronóstico de estos pacientes tiende a ser menos favorable debido al diagnóstico tardío y a la presencia de metástasis en algunos casos.

1.3.3. Pacientes asintomáticos incluidos dentro de programas de cribado

El tercer escenario clínico corresponde a pacientes asintomáticos identificados a través de programas de cribado poblacional. Estos programas, implementados en muchos países para la detección precoz del CCR, están dirigidos principalmente a individuos de riesgo medio, mayores de 50 años, y a aquellos con antecedentes familiares de CCR. El cribado permite detectar lesiones premalignas (como pólipos adenomatosos) o cáncer en etapas iniciales, lo que mejora

significativamente las tasas de supervivencia. Estudios recientes han demostrado que los programas de cribado reducen la mortalidad por CCR en un 30-40% al facilitar la intervención temprana (Gini et al., 2020).

1.4. DIAGNÓSTICO

El CCR es un tumor de crecimiento lento y, a menudo, no presenta sintomatología hasta que la enfermedad está avanzada. Los programas de cribado de CCR contribuyen al diagnóstico precoz del CCR. A pesar de la implementación del cribado poblacional, un porcentaje significativo de los CCR se diagnostican en pacientes sintomáticos. En la última década, la mortalidad por CCR se ha mantenido estable, pese a que se ha experimentado un aumento global de la incidencia. Estas tendencias, reflejan las mejoras en la supervivencia de los pacientes con tumores debido a las actividades preventivas, las campañas de diagnóstico precoz y a los avances terapéuticos.

CRIBADO DEL CCR

Las pruebas de cribado forman parte de los programas de prevención secundaria, se realizan en pacientes asintomáticos con el fin de detectar lesiones premalignas o en estadios iniciales. El diagnóstico precoz permite un tratamiento en estadios iniciales, donde la supervivencia es mucho mayor. Se ha comprobado que las tasas de supervivencia a 5 años aumentan en aquellas sociedades donde se realizan de manera activa programas de cribado (Edwards et al., 2010).

En 2003, el Consejo de la Unión Europea recomendó que todos los Estados miembros deberían establecer programas de detección temprana de CCR para hombres y mujeres de 50 a 69 años, con prueba de sangre oculta en heces (TSOH) anuales o bienales, seguidos de colonoscopia, cuando los resultados fuesen positivos. Las sociedades médicas y las autoridades sanitarias han establecido recomendaciones para el despistaje del CCR que se adaptan a las necesidades de cada país. La mayoría de ellas estratifica a los pacientes en grupos de riesgo, en función de su historia clínica, antecedentes personales y familiares, para los que se recomiendan programas de despistaje diferentes.

Se considera población de alto riesgo a aquellos sujetos con antecedentes familiares de CCR, antecedentes personales de pólipos de colon, enfermedad inflamatoria intestinal u otra patología de colon que predisponga a la aparición de CCR. Se estima que un 6% de la población es de alto riesgo. Esta población seguirá programas especiales de vigilancia o cribado de alto riesgo.

Será población de riesgo medio aquella sin antecedentes familiares ni personales de riesgo, su inclusión en los programas de cribado será exclusivamente por criterios de edad y es a la que están dirigidos los programas de cribado poblacional. En España, existe un programa de cribado organizado desde 2014, con una estrategia poblacional basada en TSOH con periodicidad bienal a una población diana de 50-69 años. Cuando el test es positivo (tasa del 6-7%) es necesario la realización de una colonoscopia para despistaje de lesiones. En nuestro país, las tasas de participación varían entre las diferentes regiones, pero en el año 2020 la el promedio fue de 46,1% (Molina-Barceló et al., 2021).

Hablamos de población de riesgo bajo, aquella que no posee antecedentes personales ni familiares de riesgo y no ha alcanzado la edad de cribado; en este caso no están indicadas medidas de cribado.

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

➤ ESTUDIO INICIAL

En un paciente con síntomas o signos que nos hagan sospechar un CCR estaría indicado iniciar un estudio con alguna de las siguientes exploraciones:

Colonoscopia

Es la técnica de elección para el diagnóstico y prevención del CCR. Permite identificar lesiones sospechosas de malignidad con una sensibilidad del 90-95%, determinar su localización en el segmento de colon en el que asienta, descartar lesiones sincrónicas y tomar biopsias para obtener un diagnóstico histológico que confirme la sospecha. En el caso de lesiones premalignas permite su extirpación, evitando así el desarrollo de un futuro CCR. En ciertas situaciones la colonoscopia puede tener además un papel terapéutico como en el control de hemorragias o la colocación de endoprótesis paliativas en casos de obstrucción.

Enema con bario

Es menos sensible que la colonoscopia o la colono-TC para detectar lesiones (Halligan et al., 2013). Si se detecta un pólipo o masa por enema de bario, se recomienda colonoscopia para establecer la histología, eliminar el pólipo y buscar lesiones sincrónicas.

Colonografía-TC o colonoscopia virtual

La colono-TC puede ser una alternativa a la colonoscopia en pacientes con síntomas sugestivos de CCR, tiene como inconveniente que puede confundir lesiones de pequeño tamaño con heces si el colon está poco distendido o mal preparado y carece de la capacidad para tomar biopsias o realizar polipectomías. Es útil en pacientes en los que no se ha podido realizar una colonoscopia completa para descartar lesiones sincrónicas.

Cápsula de colon

Podría estar indicada en pacientes con colonoscopia incompleta sin obstrucción. Su papel es cuestionado en el cribado.

Marcadores tumorales

Las guías recomiendan que los marcadores tumorales no se utilicen como herramienta de detección inicial o diagnóstico definitivo de CCR debido a su baja sensibilidad y especificidad, sino como apoyo en el manejo integral del CCR (Duffy et al., 2003). Existen varios marcadores tumorales asociados al CCR, particularmente el antígeno carcinoembrionario (CEA). El CEA es útil como marcador pronóstico, ya que unos niveles elevados antes de la cirugía se relacionan con una mayor carga tumoral y un peor pronóstico. Además, está indicada su medición durante el seguimiento, un aumento en los niveles de CEA puede ser un indicador precoz de recurrencia. (Konishi et al., 2018; Becerra et al., 2016).

➤ ESTUDIO DE EXTENSIÓN

Una vez que el CCR está diagnosticado las distintas pruebas de imagen completarán la caracterización de la tumoración primaria y permitirán valorar la diseminación tumoral, estableciendo el estadio tumoral. Las técnicas que se emplean en la estadificación del CCR son:

Radiografía de tórax

Permite valorar la presencia de metástasis pulmonares o lesiones pleurales, aunque su papel hoy en día es limitado.

Ecografía abdominal

La ecografía abdominal tiene baja sensibilidad para detectar el tumor primario. Puede ser útil para valorar la detección de metástasis hepáticas, sin embargo, a día de hoy ha sido desplazada por el empleo de la TC abdominal.

Tomografía computarizada (TC)

Tiene un papel fundamental en el diagnóstico y estadiaje del CCR. Permite determinar la localización y extensión del tumor primario, su relación con estructuras vecinas, la presencia de afectación ganglionar o metástasis a distancia. La sensibilidad para la detección de metástasis viscerales es mayor (75- 87%) que para las adenopatías (45-75%) o la invasión transmural (50%), por lo que estaría indicada especialmente para valorar la presencia de metástasis a distancia. La fiabilidad de la TC para detectar correctamente las metástasis hepáticas preoperatoriamente ha mejorado, con una sensibilidad estimada del 85%, un valor predictivo positivo del 96% y una tasa de falsos positivos del 4% (Valls et al., 2001). La precisión global en la detección de metástasis pulmonares en el preoperatorio es de 83,9%, con una sensibilidad y especificidad de hasta 73% y 74%, respectivamente (Oh et al., 2014).

Resonancia Nuclear Magnética (RNM)

El papel de la RNM pélvica en la estadificación local del cáncer rectal es fundamental. Es el “gold standard” para la valorar la afectación transmural, determinar los márgenes de resección e identificar los ganglios mesorrectales afectados, independientemente de la distancia al margen anal del tumor. Presenta una precisión diagnóstica para la estadificación de T y N según las diferentes series del 75-85% y del 57-85% respectivamente (Al-Sukhni et al., 2012).

Ecoendoscopia transanal (USE)

La principal indicación es en la estadificación precisa de los tumores poco invasivos, es decir, T0, T1 y T2, así como para valorar la afectación esfinteriana en los tumores de recto inferior. La precisión de la USE para la estadificación para T y N es de 80-95% y 61-82%, respectivamente, superior a la de la TC y la RNM en algunas series. Las limitaciones de la USE son la disminución de la sensibilidad para la re-estadificación post-tratamiento neoadyuvante (sobre todo en aquellos que responden a tratamiento) debido la dificultad para diferenciar cambios inflamatorios de persistencia de tejido tumoral y la necesidad de ser realizada por personal entrenado. Esta técnica puede verse afectada por la localización del tumor, de manera que tumores en recto alto presenten mayores dificultades técnicas (Nasseri y Langenfeld, 2017).

Tomografía por emisión de positrones (PET)/PET-TC

Aunque no tiene un papel en la estadificación rutinaria del CCR, tiene utilidad en la detección de lesiones ocultas, así como en la evaluación de lesiones indeterminadas, y puede ser útil en la

identificación de enfermedad metastásica cuando existe incertidumbre con respecto al beneficio de la cirugía resección.

➤ ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO

El diagnóstico deberá confirmarse histológicamente. Además, el estudio anatomopatológico es fundamental para establecer el pronóstico de la enfermedad no solo basado en los marcadores patológicos clásicos (subtipo, grado diferenciación, presencia de invasión linfovascular o perineural), sino en la determinación del estado del sistema de reparación del ADN. Para ello, en la actualidad se recomienda evaluar las cuatro proteínas reparadoras (MSH2, MLH1, MSH6 y PMS2) mediante inmunohistoquímica en todos los pacientes con CCR (estrategia universal). El estudio no solo es de utilidad para la identificación de los pacientes con síndrome de Lynch, sino también como marcador de respuesta al tratamiento (quimioterapia basada en fluoropirimidinas o inmunoterapia).

ESTADIAJE

La clasificación de elección es la clasificación TNM, la octava edición es su última actualización publicada en el año 2017.

Tabla 2. Clasificación TNM (8ª edición, 2017)

Tumor primario (T)	
Tx	No se puede determinar
T0	No se evidencia tumor primario
Tis	Carcinoma in situ (afectación de la lámina propia sin extensión a <i>muscularis mucosae</i>)
T1	Tumor invade submucosa (a través de <i>muscularis mucosae</i> pero no en la muscular propia)
T2	Tumor invade la muscular propia
T3	Tumor invade muscular propia hasta los tejidos pericólorrectales
T4a	Tumor invade peritoneo visceral (incluida la perforación intestinal)
T4b	Tumor invade o adhiere órganos o estructuras adyacentes
Afectación ganglionar (N)	
Nx	No se puede determinar
N0	No hay adenopatías metastásicas
N1	Metástasis en 1-3 ganglios regionales, o cualquier número de depósitos tumorales
N1a	Metástasis en 1 ganglio regional
N1b	Metástasis en 2-3 ganglios regionales
N1c	Implantes en subserosa, mesenterio o tejido pericólorrectal no recubierto de peritoneo
N2	Metástasis en 4 o más ganglios regionales
N2a	Metástasis en 4-6 ganglios regionales
N2b	Metástasis en 7 o más ganglios regionales
Metástasis a distancia (M)	
M0	No existen metástasis a distancia
M1	Metástasis a distancia
M1a	Metástasis en un órgano a distancia sin metástasis peritoneal
M1b	Metástasis en dos o más órganos a distancia sin metástasis peritoneal
M1c	Metástasis peritoneal aislada o en otros órganos

Tabla 3. Grupos pronósticos, 2017

Estadio	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1,T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1-2	N1/N1c	M0
	T1	N2a	M0
IIIB	T3-T4a	N1-N1c	M0
	T2-T3	N2a	M0
	T1-T2	N2b	M0
IIIC	T4a	N2a	M0
	T3-T4a	N2b	M0
	T4b	N1-N2	M0
IVA	Cualquier T	Cualquier N	M1a
IVB	Cualquier T	Cualquier N	M1b
IVC	Cualquier T	Cualquier N	M1c

1.5. FACTORES PRONÓSTICOS

Dada la elevada incidencia de recurrencia posoperatoria es fundamental establecer los factores pronósticos en el CCR que nos permitan identificar subgrupos de pacientes con peor pronóstico con el fin de proporcionarles un tratamiento adyuvante, ya que hasta un 50% de los pacientes intervenidos de CCR desarrollarán metástasis.

El factor más importante que influirá de forma determinante en el pronóstico de la enfermedad es el estadio tumoral, basado en la clasificación TNM. Sin embargo, este sistema no es siempre capaz de predecir de manera clara cuál será la evolución de los pacientes, especialmente en los estadios intermedios, si se beneficiarán de un tratamiento con quimioterapia (QT) o radioterapia (RT) y cuál de todas las posibilidades terapéuticas será la más adecuada. Por ello, en los últimos años se han realizado un gran número de investigaciones cuyo objetivo es descubrir otros marcadores clínicos, patológicos o moleculares que aporten una mayor precisión a la clasificación.

La forma de presentación clínica como obstrucción intestinal o perforación es considerada criterio de mal pronóstico (Biondo et al., 2019; Mohd et al., 2015).

Marcadores histológicos como la invasión venosa, linfática y perineural se han asociado a mal pronóstico, el grado tumoral y el tipo histológico van a determinar que nos encontremos ante tumores más o menos agresivos o la infiltración linfocitaria del tumor que parece ser indicativa de una respuesta inmune del organismo frente al cáncer, siendo considerada un marcador pronóstico favorable (Betge et al., 2011; Compton et al., 2000; Hu et al., 2020).

Dentro de los marcadores moleculares, el más empleado en la práctica clínica es el CEA, se ha observado que niveles elevados preoperatorios de este marcador (más de 5 ng/ml en suero) confieren una menor probabilidad de supervivencia libre de enfermedad a los 5 años y que

incluso niveles mayores a 15 ng/ml podrían ser indicativos de presencia de metástasis ocultas (Wiratkapun et al., 2001). Otros marcadores como la inestabilidad de microsatélites, p53, KRAS, EGFR, timidilato sintasa (TS) o LOH 18q han producido resultados prometedores, sin embargo, la aparición de otros estudios que contradicen los resultados previos, la falta de consenso en cuanto a la técnica más precisa para medir estos marcadores y la falta de experimentos de validación de carácter prospectivo en los que se utilice un tamaño muestral adecuado, ha frenado su inclusión en la práctica clínica diaria.

1.6 TRATAMIENTO

El tratamiento dependerá del estadio tumoral, de las características del tumor (tamaño, localización, perfil molecular) y del estado general del paciente.

CCR LOCALIZADO

El porcentaje de CCR localizado al momento del diagnóstico puede variar según la población y los sistemas de detección implementados, pero se calcula entre un 37-40% de los casos de CCR se diagnostican en etapas iniciales.

TRATAMIENTO ENDOSCÓPICO

La implementación de los programas de cribado ha comportado un aumento en la detección de cánceres invasivos incipientes (pT1; sobrepasa la *muscularis mucosae* y se extiende a la submucosa sin alcanzar la muscular propia) y en estadios iniciales (Cardoso et al., 2022). La decisión de efectuar tratamiento endoscópico o quirúrgico dependerá del riesgo de resección incompleta y de la posibilidad de afectación ganglionar (estimada entre 1-36%). La elección del tratamiento debe evaluarse en comités multidisciplinares y debe individualizarse en cada caso. Se han descrito unos criterios de buen pronóstico según los cuales podría considerarse el tratamiento endoscópico como la terapia inicial de elección (Tabla 4) (Albéniz et al., 2018).

Tabla 4. Criterios histológicos de buen pronóstico

Extirpación en bloque
Grado de diferenciación bueno o moderado
Ausencia de invasión linfática o vascular
Distancia margen de resección a ≥ 1 mm del carcinoma
Ausencia de budding (nidos tumorales)
Grado de infiltración de la submucosa:
- En pólipos planos y sésiles: infiltración $\leq 1.000 \mu\text{m}$ (1 mm)
- En pólipos pediculados: Haggitt 1 o 2, o infiltración < 3 mm

CIRUGÍA

La cirugía se indica con finalidad curativa cuando la enfermedad está limitada al colon, o en aquellos pacientes con enfermedad metastásica potencialmente resecable.

La resección quirúrgica del CCR primario debe incluir la extirpación completa del tumor, los principales pedículos vasculares y el sistema de drenaje linfático del segmento colónico afectado. Debe cumplir una serie de requisitos para que técnicamente sea correcta como son los márgenes de seguridad sean amplios (mínimo 5 cm proximal y distal al tumor), que se extirpen al menos 12 ganglios y que se realice la escisión total del mesenterio asociado (Otchy et al., 2004).

Ante un tumor con invasión de los órganos adyacentes (T4), se requiere una resección en bloque para obtener una resección macroscópica completa (R0) (Costas-Chavarri et al., 2019).

La técnica quirúrgica dependerá fundamentalmente de la localización del tumor y de la forma de presentación. Si el tumor se localiza en ciego o colon ascendente la técnica de elección será una hemicolectomía derecha, si se localiza en colon descendente será una hemicolectomía izquierda. Cuando el tumor se localice en colon transversal se realizará hemicolectomía ampliada. En el caso de que el tumor se localice en el recto superior y medio, se realizará una resección anterior, dejando la amputación rectal y colostomía definitiva (operación de Miles) para cuando se localice en el tercio inferior. Es importante asegurar un correcto margen de resección tanto distal como proximal, aceptándose un margen libre de neoplasia de 2 cm por debajo del tumor primario. La resección completa del recto debe incluir la escisión total del mesorrecto con un adecuado margen circunferencial y una linfadenectomía inferior completa. Esta aproximación conduce a una disminución significativa de la recidiva local y una mejora en la supervivencia. Si el tumor produce un cuadro obstructivo intestinal hay que realizar una resección del tumor en bloque con colostomía del muñón cólico proximal y cierre del muñón distal (intervención de Hartmann), con posibilidad de realizar la anastomosis intestinal en un segundo tiempo.

TRATAMIENTO ADYUVANTE

A pesar de un adecuado tratamiento quirúrgico, existe una elevada tasa de recaídas, llegando incluso al 30-40% en los casos N0. Por otro lado, la proporción de pacientes intervenidos de CCR que desarrollarán enfermedad metastásica o localmente avanzada es mayor del 50%.

El tratamiento adyuvante es un tratamiento sistémico administrado tras la resección del tumor primario con el objetivo de reducir el riesgo de recaída y muerte del paciente.

En los estadios 0 y I el tratamiento es la resección del tumor mediante endoscopia o cirugía y no suele recomendarse terapia adyuvante. En estadio II los diferentes estudios muestran resultados contradictorios sobre la necesidad de suministrar tratamiento adyuvante. En un metanálisis, la supervivencia libre de enfermedad estimada a 5 años para pacientes con CCR en estadio II tratados con terapia adyuvante fue del 79,3%, en comparación con el 81,4% para los pacientes que no la recibieron (Böckelman et al., 2015). Lo que sí parece claro es que la mayoría de los oncólogos opta por el tratamiento adyuvante en pacientes en estadio II de alto riesgo (perforación, obstrucción intestinal, lesiones T4, alto grado histológico, invasión vascular o neural, menos de 12 ganglios analizados, o ausencia de inestabilidad de microsatélites). El papel de la terapia adyuvante en la fase III del CCR está bien definido (una reducción del 30% en el riesgo de recurrencia y del 22 al 32% en la mortalidad). La terapia adyuvante estándar en este estadio consiste en la combinación de fluoropirimidina (5FU o capecitabina) y oxaliplatino. Ni irinotecan, cetuximab, bevacizumab ni celecoxib han demostrado beneficios en el tratamiento adyuvante del CCR, por lo que no se recomienda su uso (Pericay et al., 2024).

La terapia neoadyuvante se ha convertido en el tratamiento estándar para los tumores de recto localmente avanzados en la última década. Los beneficios de la quimiorradiación neoadyuvante incluyen regresión tumoral, descenso de estadio y mejor resecabilidad, pero no se ha observado un aumento en la supervivencia global. El tratamiento neoadyuvante se está probando como una alternativa emergente para el tratamiento de pacientes con cáncer de colon localmente avanzado. En este escenario podría ofrecer algunos beneficios, incluyendo la

reducción del tumor, la erradicación de micrometástasis y la prevención del desprendimiento de células tumorales durante la cirugía. Las posibles desventajas son el aumento de la morbilidad posoperatoria y el sobretratamiento (Pericay et al., 2024)..

CCR METASTÁSICO

Aproximadamente el 20% de los pacientes con CCR presentan metástasis en el momento del diagnóstico, mientras que hasta el 50% de los CCR inicialmente localizados desarrollarán metástasis (Fernández-Montes et al., 2023).

TRATAMIENTO SISTÉMICO

El tratamiento sistémico constituye el pilar del tratamiento en casos de enfermedad metastásica irresecable. Los objetivos del tratamiento son prolongar la supervivencia, aliviar los síntomas secundarios a la enfermedad y mejorar y mantener la calidad de vida de los pacientes. La elección del tratamiento dependerá de factores relacionados con el tumor (perfil molecular, carga tumoral), con el estado del paciente (comorbilidades, edad, estado funcional), así como características propias del tratamiento (perfil de toxicidad, costes y disponibilidad).

Existen en el momento actual varios regímenes de terapia sistémica basados en la combinación de los agentes quimioterápicos (5-fluoracilo, oxaliplatino, irinotecán, capecitabina, bevacizumab y cetuximab) con indicaciones aprobadas y que han conseguido doblar las tasas de supervivencia global (Fernández-Montes et al., 2023).

La quimioterapia de conversión se refiere a pacientes diagnosticados inicialmente con enfermedad irresecable, en quienes una respuesta óptima a la quimioterapia permitiría la resección de sitios metastásicos. En el caso de la resección hepática, se estima que la cirugía de rescate es factible en el 12,5% de estos pacientes después de la quimioterapia con o sin agentes dirigidos (Bolhuis et al., 2020).

TRATAMIENTO QUIRÚRGICO

En el momento del diagnóstico, el CCR metastásico puede ser técnicamente resecable en un pequeño porcentaje de pacientes. Se considera una enfermedad potencialmente curable, con tasas de supervivencia global a 5 años de 20 a 45 % en una población altamente seleccionada (Adam y Kitano, 2019). Los sitios comúnmente afectados son el hígado, el pulmón, el peritoneo, los ganglios linfáticos y el ovario. No se debe realizar la resección a menos que sea posible la extirpación completa de todos los sitios tumorales y metastásicos conocidos (resección R0), porque la resección incompleta o la reducción de volumen no han demostrado prolongar la supervivencia global.

En la actualidad, el tratamiento quirúrgico de las metástasis se considera un tratamiento multimodal junto con la QT sistémica y las técnicas ablativas locales (Vera et al., 2020).

Algunos pacientes que no son candidatos a resección curativa pueden beneficiarse de paliación quirúrgica cuando el tumor primario produce obstrucción intestinal o sangrado. No está indicado la resección quirúrgica del tumor primario en casos de enfermedad metastásica irresecable cuando este no produzca síntomas, ya que la cirugía no ha observado un aumento en la supervivencia global en este escenario (Kanemitsu et al., 2021).

2. POLI(ADP-RIBOSA)POLIMERASA TIPO 1 (PARP-1)

2.1 INTRODUCCIÓN

Las Poli (ADP-Ribosa) Polimerasas (PARPs), más recientemente denominadas ADP-ribosiltransferasas (ARTDs) son un grupo de enzimas nucleares dependientes del ADN que catalizan la síntesis y transferencia de monómeros de ADP-ribosa cargada negativamente desde nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) a un número de sustratos proteicos diana. La modificación transitoria de proteínas nucleares por poli(ADP-ribosilación), también conocida como PARilación (PARylation), constituye un tipo de modificación post-traducciona necesaria para la activación y desactivación de diferentes procesos celulares (Ummarino et al., 2021).

El miembro más representativo y estudiado de esta familia es PARP-1, descrita por primera vez en 1963 por Chambon (Chambon et al., 1963). PARP-1 juega un papel clave en la reparación del ADN, así como una amplia variedad de procesos celulares, incluyendo la regulación transcripcional, la modulación de la cromatina, las vías de señalización celular, en la inflamación, la respuesta a estrés celular y otros procesos.

Desde su identificación se han llevado a cabo muchas investigaciones para tratar de descifrar los aspectos estructurales, biológicos y las consecuencias patológicas de la mala regulación de la familia PARP, que, en los últimos años, se ha convertido en un prometedor enfoque terapéutico (Lupo y Trusolino, 2014).

2.2 ESTRUCTURA DE PARP

Como hemos dicho anteriormente, PARP-1 es la proteína PARP mejor estudiada. Codificada por la región q41-q42 del cromosoma 1 tiene un peso molecular de 114 kDa. Es una proteína altamente conservada en la escala filogenética, aunque no se ha evidenciado en levaduras ni células procariotas (Bürkle, 2005). La estructura de PARP fue descrita por primera vez en 1984 (Kameshita et al., 1984), y está formada por tres dominios estructurales:

Dominio de unión al ADN

Con un peso molecular de 46 kDa y localizado en el extremo N-terminal, este dominio presenta tres estructuras en dedos de zinc (ZF1, ZF2 y, la recientemente descubierta, ZF3) (Langelier et al., 2008) esenciales para la interacción con el ADN. Además, en este dominio se localiza la secuencia de localización nuclear (NLS, Nuclear Localization Sequence) responsable del emplazamiento nuclear de PARP y, dentro de esta, se encuentra la secuencia aminoacídica DEVD o zona de reconocimiento de las caspasas durante los procesos de muerte celular (Kaufman et al., 1993).

Dominio de automodificación

Este dominio de 22 kDa, rico en residuos de glutamato, aspartato y lisina, es el principal aceptor de polímero de ADP-ribosa y es donde va a tener lugar la automodificación de PARP-1 por poli(ADP-ribosilación) (Desmarais et al., 1991). Otro motivo de gran importancia es el denominado cremallera de leucina (Leucine zipper), responsable de las interacciones proteína-proteína en reacciones de homo y/o heteromodificación (Uchida et al., 1993). También incluye el motivo BRCT (Breast Cancer Susceptibility Protein, BRCA1 C-terminal), responsable de la interacción con proteínas de respuesta a daños en el ADN.

Dominio catalítico

Tiene un peso de 54 KDa y se localiza en el extremo C-terminal. Es el responsable de la actividad de la enzima, transformando residuos de NAD⁺ en largos y ramificados polímeros de poli(ADP- ribosa) sobre proteínas nucleares aceptoras. Tiene un dominio WGR rico en triptófano, glicina y arginina necesario para la síntesis de PAR inducida por daño de ADN (Langelier et al., 2012).

Este dominio presenta una alta homología con otras mono-ADP-ribosiltransferasas y presenta una estructura terciaria altamente conservada que ha permitido definir la “firma de PARP” mediante la cual se ha podido establecer la familia PARP, actualmente formada por 17 miembros.

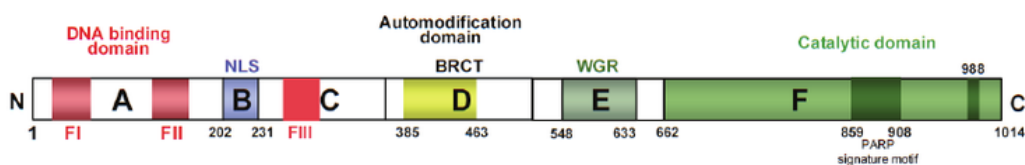


Figura 3. Estructura de PARP-1. Dominio de unión al ADN, dominio de automodificación y dominio catalítico. Adaptado de Yelamos et al., 2011.

2.3 FAMILIA PARP

Las PARPs constituyen una familia de 17 miembros que comparten una homología de secuencia altamente conservada en el dominio catalítico. Esta familia se divide en cuatro subgrupos según la arquitectura de sus dominios (Gibson y Kraus, 2012):

PARPs dependientes de ADN

Dentro de este grupo encontramos:

- PARP-1/ARTD-1
- PARP-2/ARTD-2
- PARP-3/ARTD-3

Este tipo de PARPs se activan por lesiones producidas en el ADN a través de su dominio de unión al ADN. PARP-1, PARP-2 y PARP-3 tienen en común dos dominios C-terminales: WGR y el dominio catalítico. Por el contrario, la región N-terminal (NTR) de PARP-1 tiene más de 500 residuos e incluye cuatro dominios reguladores, mientras que PARP-2 y PARP-3 tienen NTR más pequeños (70 y 40 residuos, respectivamente) de composición y función estructural desconocida.

Tanquirasas

- Tanquirasa-1/PARP-5A/ARTD-5
- Tanquirasa-2/PARP-5B/ARTD-6

La proteína Tanquirasa-1 (PARP-5A) se describió en 1998 mientras que la tanquirasa-2 (PARP-5B) fue descrita posteriormente, en 2001. Ambas proteínas se caracterizan por presentar largas repeticiones de anquirina en su dominio que facilitan las interacciones proteína-proteína. Los motivos estériles alfa (SAM) son específicos de esta subfamilia y también están involucrados en la interacción proteína-proteína.

CCCH PARPS

- TIPARP (PARP-7, ARTD7)
- PARP-12 (ARTD12)
- PARP-13 (ARTD13)

Los PARP de este grupo contienen motivos de dedos de zinc de Cys-Cys-Cys-His que se unen a ARN, y dominios WWE (Trp-Trp-Glu) que pueden exhibir actividad de unión a PAR.

Macro PARPs

- BAL1 (PARP-9, ARTD9)
- BAL2 (PARP-14, ARTD8)
- BAL3 (PARP-15, ARTD7)

Se caracterizan por la presencia de pliegues macrodominio. Estos dominios median la localización de la proteína en posiciones de poli(ADP-ribosilación) y tal vez también mono(ADP-ribosilación).

Otras PARPs

Existen otro tipo de proteínas que no se han podido ubicar en ninguno de los grupos anteriormente descritos, como son:

- PARP-4 (ARTD4)
- PARP-6 (ARTD17)
- PARP-8 (ARTD16)
- PARP-10 (ARTD10)
- PARP-11 (ARTD11)
- PARP-16 (ARTD15)

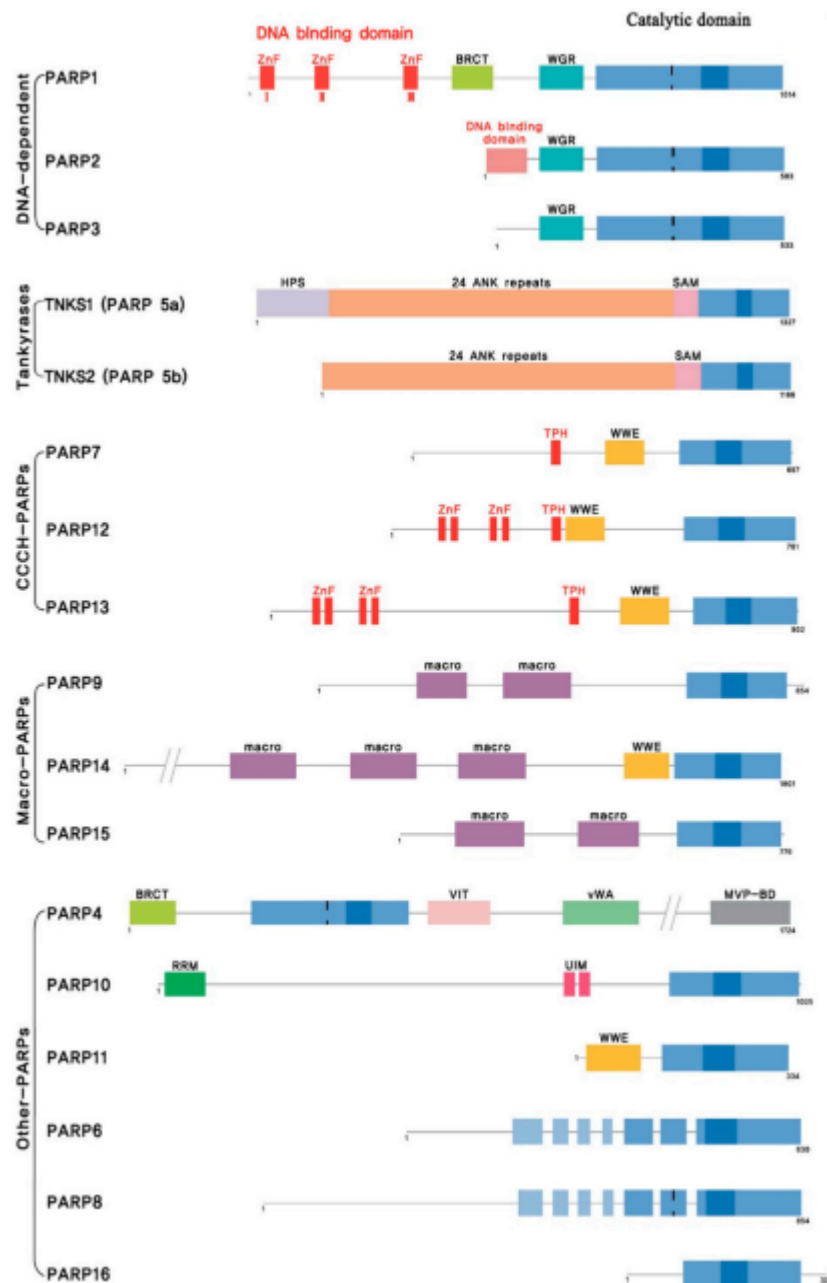


Figura 4. Familia PARP. La familia PARP consta de 17 miembros, divididos en cinco subgrupos según la estructura y función del dominio. El dominio catalítico en el C-terminal se conserva en todos los miembros y contiene dedos de zinc adicionales, motivos de tipo BRCA C-terminal (BRCT), repeticiones de anquirina, macrodominios y dominios WWE. Adaptado de Min et al., 2020.

2.4 METABOLISMO DE LA POLI ADP-RIBOSA (PAR)

SÍNTESIS DE PAR

La actividad enzimática de PARP-1 consiste en la síntesis de un polímero de poli(ADP-ribosa) o PAR mediante un proceso conocido como poli ADP-ribosilación o PARilación (Parylation) (Hassa y Hottiger, 2008). Para llevar a cabo esta actividad, la PARP-1 está dotada de dos actividades enzimáticas que le permiten la formación del polímero, la actividad de poli(ADP-ribosa)sintetasa y la de poli(ADP-ribosa)transferasa. Este proceso consta de dos partes:

FASE INICIACIÓN:

Mediante su actividad de poli(ADP-ribosa) sintetasa, cataliza la hidrólisis de β -nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) en nicotinamida y monómeros de ADP-ribosa por escisión del enlace glicosídico entre nicotinamida y ribosa. Tras esto, la ADP-ribosa obtenida se va a unir covalentemente a proteínas aceptoras mediante la formación de un enlace tipo éster (a través de residuos de glutamato, aspartato o lisina) y ADP-ribosa (Zhang et al., 2013).

FASE DE ELONGACIÓN Y RAMIFICACIÓN:

A través de su actividad de poli(ADP-ribosa)transferasa la PARP-1 es capaz de catalizar reacciones de elongación y ramificación. La elongación del polímero para dar lugar a la cadena lineal se va a producir a través de la unión de monómeros de ADP-ribosa mediante enlaces O-glicosídicos entre sus carbonos 1''->2'. Las ramificaciones sobre la cadena lineal se realizan mediante enlaces glicosídicos entre los carbonos 2''->1' de dos unidades de ribosa (Álvarez-González et al., 1999). La longitud del polímero sintetizado puede variar de unos pocos monómeros hasta más de 200 subunidades de ADP-ribosa. Los puntos de ramificación en el polímero se producen después unos 20 monómeros de ADP-ribosa aproximadamente.

DEGRADACIÓN DE PAR

La poli(ADP-ribosilación) de proteínas es un proceso muy dinámico. El polímero se sintetiza y degrada rápidamente (su semivida es de 0,5-5 minutos). Son varias las enzimas encargadas de la degradación del polímero.

La poli(ADP-ribosa)glicohidrolasa (PARG) está presente en tres isoformas: PARG99 y PARG102 localizadas en el citoplasma; y PARG 110, localizada en el núcleo (Meyer-Ficca et al., 2004). PARG está dotada de actividad exoglicosidasa y endoglicosidasa que actúa degradando el polímero tanto por los extremos como por el interior. Parece que, en un primer momento, se liberan monómeros de ADP-ribosa y polímeros más cortos sobre los que, en un segundo tiempo, la actividad endoglicosidasa actuará.

La familia de ADP-ribosa hidrolasa (ARH) consta de tres proteínas: ARH1, ARH2 y ARH3. Si bien los sustratos de ARH2 aún no han sido descubiertos, ARH1 es una ADP-ribosil-arginina hidrolasa muy activa y ARH3 es una ADP-ribosil-serina hidrolasa, ambas con capacidad de escindir proteínas ribosiladas con ADP o cadenas PAR (Bu et al., 2019).

Existen otras proteínas que participan en la degradación de PARP como MACROD1, MACROD2, la proteína ADP-ribosa terminal glicohidrolasa 1 (TARG1) y las hidrolasas de la familia NUDIX. Muchas de estas enzimas contienen un motivo de pliegue de macrodominio que permite la interacción con sustratos ribosilados con ADP, consiguiendo eliminar la ADP-ribosa unida covalentemente a proteínas y modulando PAR (Maluchenko et al., 2021).

Una vez que el polímero se ha degradado, la ADP-ribosil-proteína liasa rompe el enlace éster entre el primer monómero de ADP-ribosa y la proteína aceptora. Los productos finales de la degradación de PAR son poli(ADP-ribosa) libre y monómero de ADP-ribosa, el cual es capaz de producir daño proteico, por ello la ADP-ribosa-pirofosfatasa convierte moléculas de ADP-ribosa libres en AMP y ribosa 5-fosfato, produciendo así compuestos mucho menos propensos a inducir glicación que pueden reaccionar para generar NAD⁺ (Diefenbach y Bürkle, 2005).

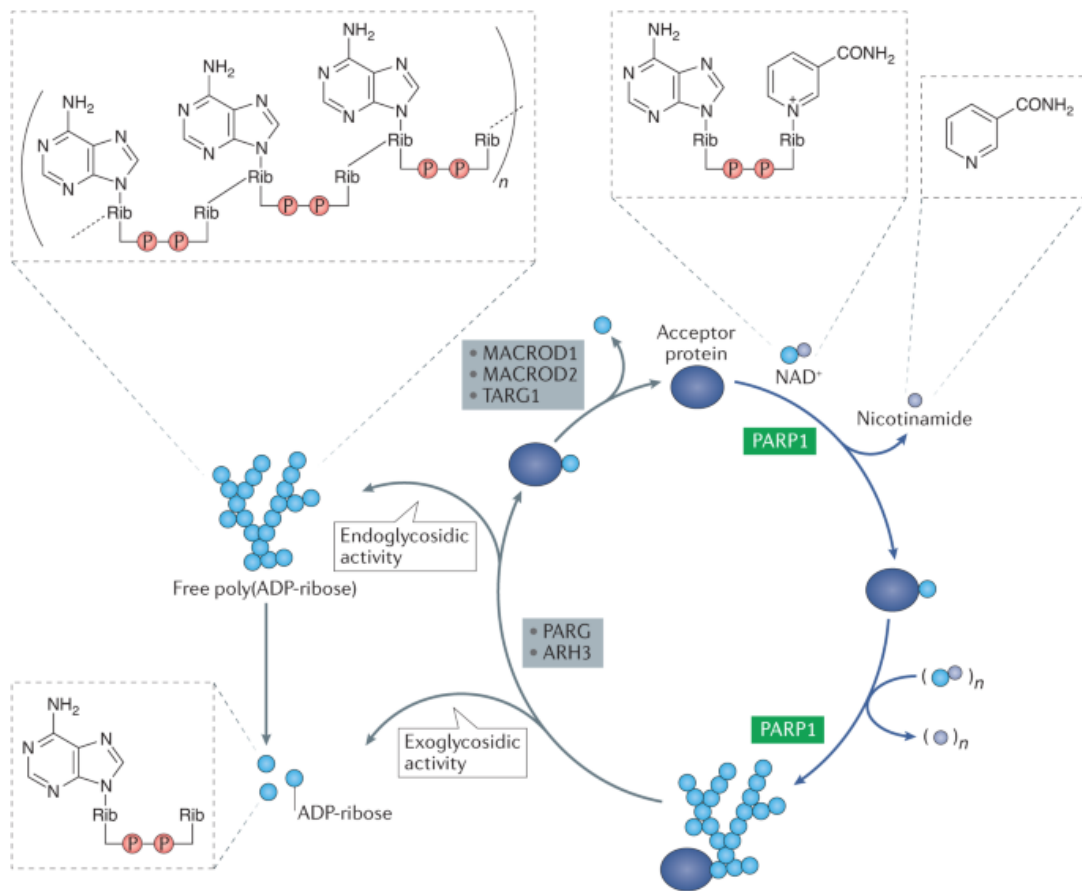


Figura 5. Metabolismo de PARP. La poli(ADP-ribosa) polimerasa 1 (PARP1) escinde NAD⁺ en ADP-ribosa y nicotinamida, y une covalentemente ADP-ribosa a una proteína aceptora. Se pueden escindir moléculas NAD⁺ adicionales y construir formas lineales y ramificadas de PAR. Dos enzimas, poli(ADP-ribosa) glicohidrolasa (PARG) y ADP-ribosilhidrolasa 3 (ARH3), desempeñan un papel central en la degradación de PAR a través de sus actividades exoglicosidasa y endoglicosidasa. Las glicohidrolasas ADP-ribosa MACROD1, MACROD2 y TARG1 actúan sobre péptidos mono(ADP-ribosil)ados generados por PARG. La PAR libre también se puede degradar a mono(ADP-ribosa). Adaptado de Curtin y Szabo, 2020.

2.5 FUNCIONES DE PARP-1

TRANSCRIPCIÓN

Mediante PARilación, PARP-1 es capaz de modificar la estructura de la cromatina de forma transitoria, facilitando así la transcripción génica. Usando NAD⁺ como sustrato, PARP-1 cataliza su propia automodificación y, como consecuencia, el polímero con carga negativa interactúa con las histonas (H1, H2A, H2B), lo cual va a provocar repulsión electrostática con el ADN. Las fuerzas de repulsión favorecen la disociación de los nucleosomas y la descondensación de la cromatina en esa localización del ADN, favoreciendo los procesos de transcripción génica. Por el contrario, en ausencia de NAD⁺, la unión de PARP-1 a los nucleosomas promueve la compactación de la cromatina (D'Amours et al., 1999; Strickfaden et al., 2016).

REPLICACIÓN

Durante la replicación del material genético el metabolismo de PARP se encuentra acelerado en el núcleo celular. Múltiples estudios han demostrado que PARP-1 interacciona con un complejo multiproteico compuesto por muchas de las proteínas implicadas en replicación del ADN. Se ha propuesto que PARP-1 interviene en el mecanismo de supervivencia que controla la progresión de la horquilla de replicación en presencia de daños al ADN (Dantzer et al., 1998). En este sentido se sabe que PARP-1 puede interaccionar con las ADN polimerasas α y β , ADN primasa, ADN Helicasa, ADN Ligasa y las Topoisomerasas I y II (Bauer et al., 2001), muchas de las cuales sufren modificaciones por poli(ADP-ribosilación).

En conjunto, estos resultados sugieren que PARP-1 puede desempeñar un papel en la intersección entre la reparación del daño del ADN, el estancamiento de la replicación del ADN y el reinicio y la señalización del punto de control (Petermann et al., 2005).

REPARACIÓN DE DAÑOS EN EL ADN

PARP-1 participa activamente en los procesos de reparación del ADN. En respuesta a daños en el ADN, bien sea ruptura de cadena o daños en las bases, se produce una respuesta bioquímica inmediata por parte de PARP-1, siendo capaz de aumentar su actividad basal hasta 500 veces (Schreiber et al., 2006).

Por un lado, el dominio de unión al ADN de PARP-1, a través de sus motivos de dedo de zinc, se une específicamente a las roturas de cadenas simples y dobles del ADN. Esto induce un cambio conformacional de la proteína PARP-1, activa el dominio catalítico e incrementa la síntesis de poli(ADP-ribosa) (Meyer-Ficca et al., 2005).

Por otro lado, numerosos trabajos demuestran la participación de PARP-1 en los procesos de reparación de daños de cadena simple a través del complejo de reparación por escisión de bases (BER, Base Excision Repair) o mediante el sistema de reparación de daños de cadena simple (SSBR, Single Strand Break Repair) (Shall y de Murcia, 2000). En estos sistemas, PARP-1 participa en el reclutamiento y regulación funcional de las proteínas XRCC1, DNA-polimerasa β y DNA ligasa III que forman parte de estos complejos de reparación por modificación por poli(ADP-ribosilación) y por interacción directa proteína-proteína, formando de esta manera parte del complejo de reparación por escisión de bases (Leppard et al., 2003). Además, PARP-1 también modula la reparación de daños de cadena doble a través de sistema de reparación no homóloga, regulando el funcionamiento de la proteína de reparación DNA-PK mediante modificación post-transcripcional por poli(ADP-ribosilación) de esta proteína (Chalmers et al., 2004).

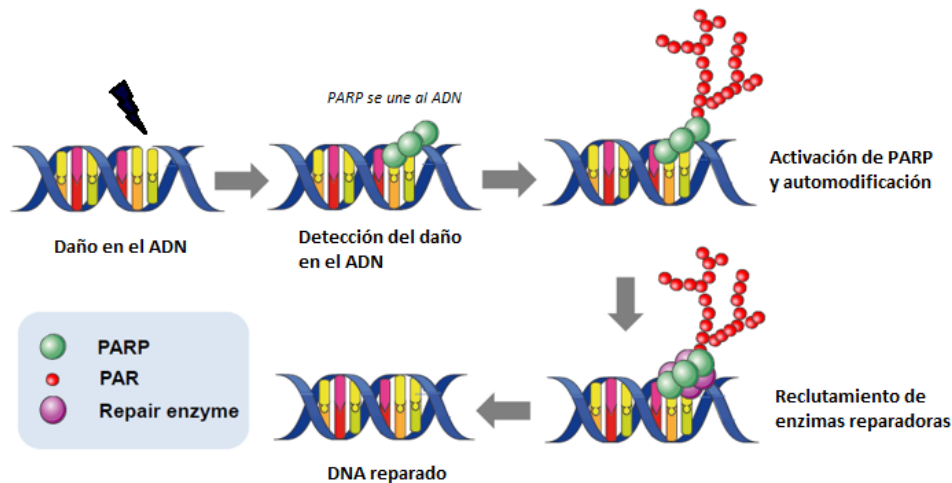


Figura 6. Activación de PARP en respuesta a daños en el ADN. Adaptado de Niu et al., 2015.

CONTROL DE LA MAQUINARIA TRANSCRIPCIONAL

Actualmente se conoce que PARP-1 puede regular la expresión génica de tres formas no excluyentes entre sí.

Alteración de la estructura de la cromatina a través de la modificación de histonas.

PARP-1 es capaz de modular la cromatina favoreciendo la transcripción a través de la interacción y PARilación de histonas, concretamente se conoce que PARP-1 puede excluir a la histona H1 de los promotores de ciertos genes dependientes de PARP-1, bien compitiendo por la unión a los nucleosomas o bien por poli(ADP-ribosilación) directa la de la histona H1 (Kim et al., 2005).

Actuando como coactivador o correpresor a través de la interacción con los factores de transcripción.

PARP-1 es capaz de interactuar con multitud de complejos proteicos nucleares, muchos de los cuales incluyen a factores de transcripción (Droit et al., 2007). Numerosos estudios han demostrado asociaciones funcionales de PARP-1 con una amplia variedad de factores de transcripción como son AP-1, AP-2, NF- κ B, B- Myb, STATs, TEF-1, SP1, HIF-1 α , HIF2 α , Snail1, etcétera (González-Flores et al., 2014; Le Page et al., 1998; Martín-Oliva et al., 2006; Oei y Shi, 2001; Oliver et al., 1999; Rodríguez et al., 2011; Whitacre et al., 1995; Zaniolo et al., 2007) muchas de estas interacciones implican la existencia de complejos de proteínas en los que interviene PARP-1 y no necesariamente que se dé el proceso de poli(ADP-ribosilación). Esto se debe a que PARP-1 facilitaría las interacciones cooperativas entre activadores específicos de secuencia y diferentes complejos coactivadores; por lo tanto, la presencia de PARP- 1 crearía el ambiente idóneo y ejercería un efecto “armazón” para que se establezca el complejo de inicio de la transcripción (Hassa y Hottiger, 2002).

Uniéndose a secuencias reguladoras o promotoras de distintos genes.

Estudios recientes han demostrado que PARP-1 es capaz de regular su propia transcripción interactuando con ciertas regiones próximas a su promotor, actuando de forma

similar a como lo haría un cofactor transcripcional. Soldatenkov y colaboradores han encontrado que PARP-1 puede unirse a la horquilla y activar o bloquear su transcripción (Soldatenkov et al., 2002). También se conoce que PARP-1 modula la expresión de los genes CXCL1 y BCL6, mediante el proceso de unión a secuencias reguladoras próximas a dichos genes dependientes de PARP-1 (Ambrose et al., 2007; Amiri et al., 2006).

MUERTE CELULAR

PARP-1 es uno de los primeros sustratos conocidos de caspasas, principales ejecutoras de la apoptosis (Kaufmann et al., 1993). Concretamente, las caspasas 3 y 7 son capaces de reconocer el motivo DEVD situado en la región NLS de PARP-1, produciendo su fragmentación en polipéptidos de aproximadamente 83 y 24 kDa. La ruptura del dominio de unión al ADN donde se localiza la secuencia DEVD, provoca que PARP-1 se separe del ADN, inactivando al enzima. Se sabe que la presencia de los fragmentos de 83 y 24 kDa contribuyen también a la retroinhibición del enzima no proteolizada o forma intacta, lo cual va a impedir que se produzca la homodimerización y la unión al ADN (Kim et al., 2000). Todo este proceso de retroinhibición va a facilitar un adecuado funcionamiento de la maquinaria apoptótica, preservando las fuentes de energía necesarias para la correcta activación y actuación de las caspasas efectoras. Dado que la proteólisis de PARP-1 por caspasas se identificó como uno de los primeros marcadores bioquímicos de la apoptosis, se han llevado a cabo una serie de estudios en los que se ha intentado identificar a PARP-1 como un agente activo en el desarrollo de la apoptosis. Así, se comprobó que la presencia de un mutante de PARP insensible a caspasas impedía el desmantelamiento nuclear durante la apoptosis (Oliver et al., 1998) y favorecía la muerte celular por necrosis (Herceg y Wang, 1999).

Otros estudios relacionan a PARP-1 con procesos de muerte celular no apoptótica, tanto necrosis como autofagia. En este sentido se sabe que PARP-1 puede modular la entrada en necrosis, un proceso de muerte poco conocido a nivel molecular. En los últimos años se han publicado una serie de estudios en los que se demuestra que la necrosis puede tener un cierto grado de regulación y programación (Kaczmarek et al., 2013). Del mismo modo, rutas de adaptación y supervivencia, como es la autofagia, pueden derivar en procesos de muerte celular programada, denominados Muerte Celular Autofágica o de Tipo II, cuya inducción y desarrollo están tremendamente regulados por PARP-1 y el proceso de poli(ADP-Ribosilación) (Muñoz-Gómez et al., 2009).

2.6 PARP Y CCR

Desde que se describió PARP, han sido muchos los estudios realizados con el fin de dilucidar el papel de PARP en el proceso de carcinogénesis. En general, estos estudios indican que existe una sobreexpresión de PARP-1 en muchos tipos de tumores, lo que sugiere su participación en el proceso oncogénico y su pronóstico (Pazzaglia et al., 2019).

PARP está implicado en varias líneas prooncogénicas, favoreciendo el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis. PARP-1 estabiliza HIF (Hypoxia-Inducible Factor) permitiendo la adaptación del tumor a condiciones microambientales hipóxicas, por lo que la inhibición de PARP comprometería el crecimiento tumoral en condiciones desfavorables (Gonzalez-Flores et al., 2014). Además, PARP está implicado en los procesos de angiogénesis, fundamentales para el desarrollo y crecimiento tumoral. PARP interactúa y modifica diferentes

marcadores celulares, como por ejemplo Snail1, favoreciendo la invasión y la transformación epitelio-mesenquimal (EMT) (Rodríguez et al., 2011). Por este motivo, la inhibición de PARP evitaría el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis. También se han desarrollado estudios con inhibidores de PARP en combinación con otros tratamientos oncológicos, en esta línea, se ha visto que la inhibición de PARP y su efecto en la reparación de daños en el ADN podría potenciar el efecto del tratamiento convencional (Ohmoto y Yachida, 2017; Wang et al., 2017; Yang et al., 2021).

En cuanto al CCR, se han observado altos niveles de PARP-1 y su producto PAR en el carcinoma colorrectal humano. PARP podría tener efectos contrapuestos en la carcinogénesis colorrectal. Por un lado, PARP-1 contrarresta la iniciación tumoral mediante la reparación del daño por alquilación del ADN y la eliminación de células colónicas que albergan mutaciones. Por otro lado, PARP1 favorece la inflamación intestinal a través de la respuesta inmune innata y promueve el crecimiento del tumor (Dörsam et al., 2018). En conjunto, estos hallazgos demuestran que, a nivel fisiológico, los efectos de PARP son necesarios para crear las condiciones para iniciar y mantener la respuesta inmune pero su acción prolongada puede tener efectos patogénicos. Esto, además, podría explicar que no se haya encontrado un efecto claro en ensayos clínicos en los que se han utilizado inhibidores de PARP-1 (PARPi) en régimen de monoterapia en esta enfermedad (Leinchman et al., 2016). Por lo tanto, se necesita más investigación para determinar los parámetros que influyen en la respuesta al tratamiento con PARPi en el CCR.

2.7 INHIBIDORES DE PARP

PARP-1 es cada vez más atractiva como objetivo terapéutico contra el cáncer. Muchos inhibidores de PARP-1 han sido aprobados para el tratamiento de tumores malignos humanos o están en investigación clínica, como olaparib (AZD2281), veliparib (ABT-888) y rucaparib (AG-014699, PF-01367338), para el tratamiento del cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de páncreas y tumores sólidos no especificados (Kaufman et al., 2015; Kumar et al., 2011; Solimando y Waddell, 2017).

Hasta ahora, los inhibidores de PARP-1 se han usado clínicamente no solo en monoterapia para suprimir varios tumores, sino también como terapia adyuvante, para mantener o mejorar los efectos terapéuticos de fármacos antineoplásicos, así como para proteger a los pacientes contra la QT y la lesión inducida por cirugía (Jagtap y Szabó, 2005; Wang et al., 2017).

3. CÉLULAS MADRE CANCERÍGENAS

3.1 INTRODUCCIÓN

Las células madre cancerígenas (CMCs) son una pequeña subpoblación de células localizadas dentro de la masa tumoral que comparten características con las células madre, como son su capacidad de autorrenovación y diferenciación indefinida. Numerosos estudios han demostrado que estas células son responsables del inicio de la carcinogénesis, así como de la progresión, invasión y resistencia a tratamientos convencionales en muchos tipos de tumores (Batlle y Clevers, 2017).

Aunque la existencia de las CMCs no se evidenció hasta el siglo XX ya en 1858 Virchow describió por primera vez similitudes entre el tejido embrionario y tumoral. Cohnheim fue más allá de las similitudes morfológicas y en 1877 formuló su teoría del origen embrionario del cáncer, según la cual, el origen del desarrollo de un tumor es debido a la presencia de “restos embrionarios” que permanecen en el organismo y no se utilizaron durante el desarrollo (Capp, 2019).

En 1994 aparecieron las primeras evidencias del papel de las CMCs en cáncer con un estudio de leucemia mieloide aguda (LMA) humana. Para ello, se inyectaron células de pacientes con LMA en ratones con inmunodeficiencia severa y se observó que sólo un grupo de células cancerosas que expresaban o no unos determinados antígenos de superficie eran capaces de originar tumores y que estos reflejaban los efectos de las mutaciones oncogénicas del tumor original (Lapidot et al., 1994).

En 1997, Bonnet y Dick mediante estudios en LMA demostraron que estas células presentan características de células madre leucémicas como son su capacidad de autorrenovación, diferenciación y proliferación (Bonnet y Dick, 1997).

El primer estudio realizado en tumores sólidos se realizó en 2003, donde se analizó la presencia de determinados antígenos de superficie en el cáncer de mama (Al-Hajj et al., 2003). Los resultados mostraron, al igual que en el estudio de la LMA, que sólo las células que expresan o no algunos antígenos tienen capacidad oncogénica, reforzando así la teoría de la célula madre tumoral. A partir de aquí surgieron numerosos estudios en diferentes tipos de tumores que identifican subpoblaciones celulares con capacidad de iniciar la progresión tumoral (Al-Hajj et al., 2003; Lenkiewicz et al., 2009; O'Brien et al., 2007; Ricci-Vitiani et al., 2007; Tomuleasa et al., 2010).

3.2 ORIGEN

Los tumores están compuestos por una población celular heterogénea, en los últimos años se ha defendido que esta heterogeneidad funcional y fenotípica puede favorecer tanto el desarrollo tumoral como la resistencia terapéutica. Las mutaciones genéticas, las interacciones con el medio ambiente y la presencia de CMCs se han descrito como factores que contribuyen a esta heterogeneidad (Clevers, 2011). Se han propuesto dos modelos principales para explicar el crecimiento del cáncer y la heterogeneidad tumoral a nivel celular: el modelo estocástico o tradicional y el modelo jerárquico o teoría de las células madre tumorales.

El modelo estocástico o tradicional del cáncer postula que una o varias células tisulares adquieren una mutación y que, a partir de esta, y a través de un proceso de división no controlado, se van acumulando nuevas alteraciones genéticas que aumentan la heterogeneidad tumoral. Siempre que la nueva variante proporcione una ventaja de supervivencia frente a la población existente esta célula se convertirá en la siguiente población clonal dominante. Según este modelo, cada célula del tumor comparte inicialmente las mismas características debido a su origen clonal, siendo capaz de mantener y expandir el tumor, así como de dar lugar a nuevos tumores (Nowel, 1976; Pierce, 1974).

Por el contrario, según el modelo jerárquico o la teoría de las CMCs los tumores estarían organizados jerárquicamente de manera similar al tejido del que provienen y el crecimiento tumoral estará impulsado por una subpoblación de células tumorales denominadas CMCs con capacidad de célula madre, capaces de proliferar y mantenerse en el tumor de forma indefinida. En este modelo, sólo las CMCs tienen la capacidad de generar y mantener el tumor, a diferencia

del resto de células que lo forman que no tienen esa habilidad (Bosch et al., 2007; Vermeulen et al., 2012).

No obstante, ambos modelos no son excluyentes y en la mayoría de los tumores coexisten ambos modelos, esto puede explicarse por la plasticidad celular que sugiere que diferentes estados celulares puedan interconvertirse, como explicaremos más adelante. En la versión actual sobre el crecimiento tumoral, la heterogeneidad tumoral puede surgir de diferentes células tumorales que presentan mutaciones distintas en combinación con una organización aberrante pero jerárquica que muestra un grado variable de plasticidad (Hernández-Camarero et al., 2018).

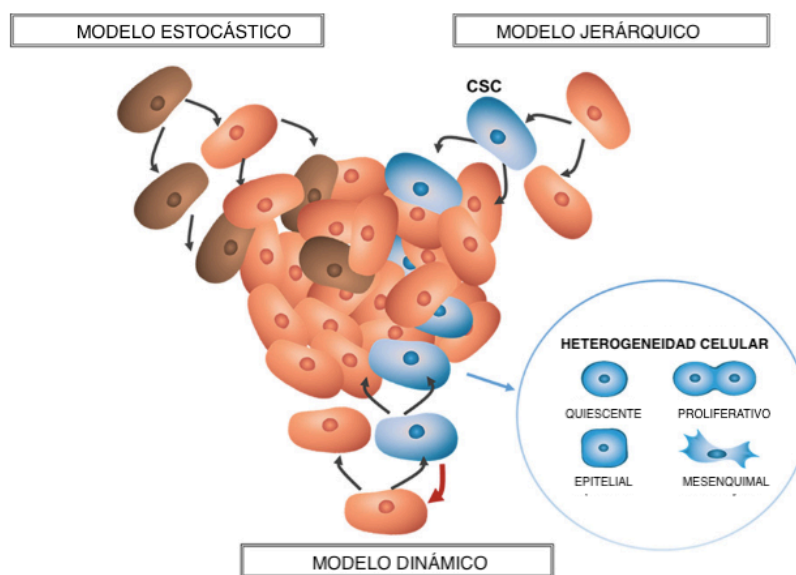


Figura 7. Modelos de carcinogénesis. Adaptado de Hernández-Camarero et al., 2018.

A pesar de los avances en el conocimiento de las CMCs, aún no se conoce con claridad cuál es su origen y se han planteado diferentes hipótesis para tratar de explicarlo. Por un lado, debido a que comparten características fenotípicas similares a las células madre normales (CM), se cree que puedan derivar de estas debido a alteraciones genéticas que ocurren durante la replicación del DNA, dando lugar a células con capacidad tumoral (Tomasetti y Vogelstein, 2015). Se ha demostrado que, bajo señales estromales anormales y condiciones de inflamación, las CM pueden formar tumores. Otra teoría postula la dediferenciación de células progenitoras como origen de las CMCs. Se ha evidenciado que debido a procesos de inestabilidad genómica, alteraciones epigenéticas y bajo ciertas condiciones del microambiente tumoral, células diferenciadas pueden sufrir un proceso de dediferenciación que origina células con propiedades de célula madre (Bu et al., 2013; Hashimoto et al., 2014; Wainwright y Scaffidi, 2017).

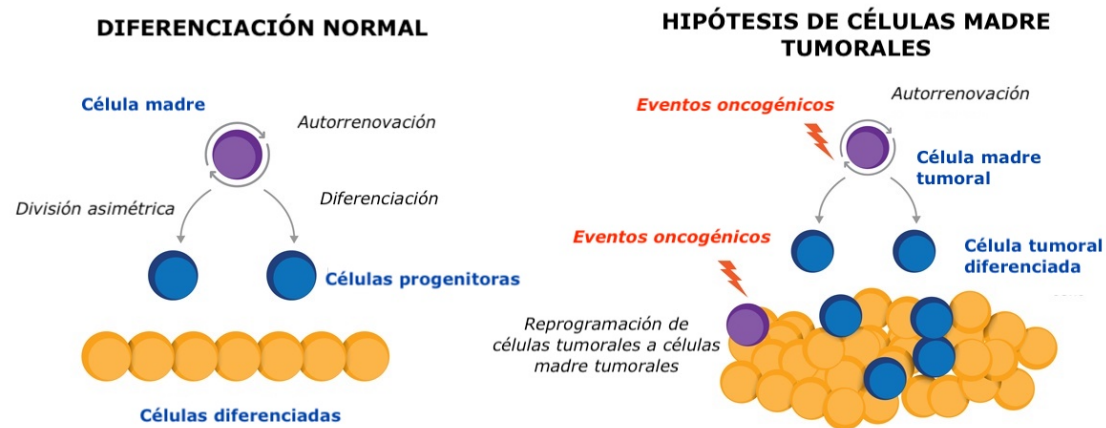


Figura 8. Hipótesis sobre el origen de las células madre tumorales.

3.3 CARACTERÍSTICAS

Como hemos visto anteriormente, el concepto de CMCs se refiere a células tumorales con comportamientos variados y plasticidad pero caracterizados por su capacidad de autorrenovación y multilinaje. Se han utilizado otros rasgos interesantes para identificar esta subpoblación celular y comprender su relevancia en la progresión tumoral.

AUTO-RENOVACIÓN

Las CMCs tienen la capacidad de autorenovarse para dividirse de forma asimétrica (produciendo una stem cell y una célula diferenciada) o simétrica (produciendo dos stem cells similares). Las células madre normales y las CMCs actúan a través de vías de señalización comunes que regulan la actividad de autorrenovación, las más conocidas son Wnt, Notch y Sonic Hedgehog. La vía Wnt/ β -catenina desempeña un papel importante en la proliferación, regulación y mantenimiento de las propiedades tanto de células madre normales como de CMCs. La sobreexpresión o sobreactivación de esta vía induce desdiferenciación de células tumorales hacia células madre, quimiosensibilidad, expresión de marcadores de CMCs, carcinogénesis y capacidad de autorrenovación (Hoffmeyer et al., 2012; Kanwar et al., 2010). La desregulación de esta vía se ha asociado con diversos tipos de cáncer (Mao et al., 2014; Rajakulendran et al., 2019; Takahashi-Yanaga y Kahn, 2010).

Dentro de los órganos las células madre normales residen en núcleos específicos llamados nichos que proporcionan un entorno adecuado para una población de células madre y proporcionan sustratos para controlar su autorrenovación y producción de progenie. Varias evidencias sugieren un papel relevante del microambiente en la regulación de la capacidad de autorrenovación de las CMCs (Calabrese et al., 2007; Li et al., 2012; Park et al., 2014).

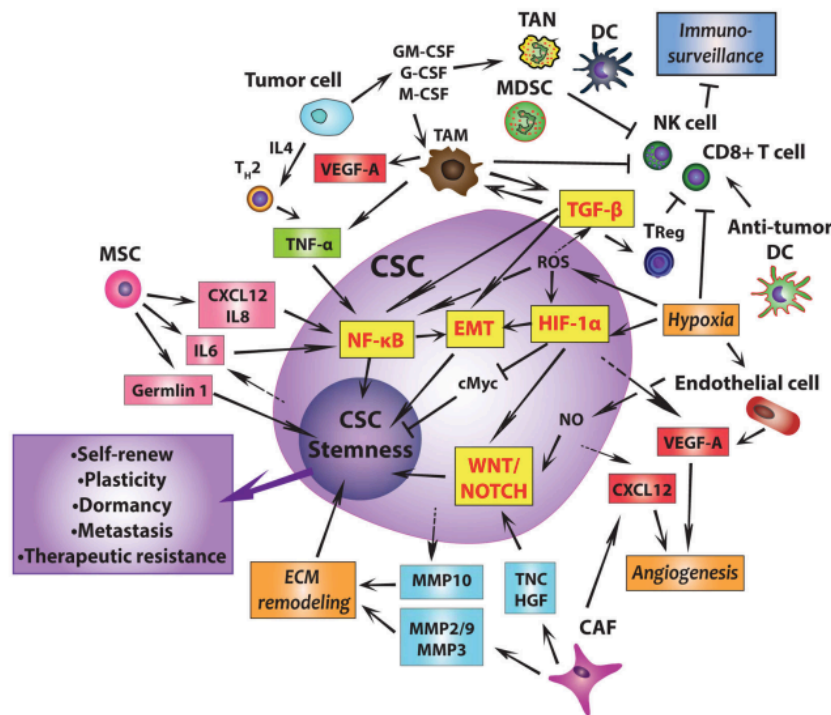


Figura 9. Bases moleculares y celulares de la interacción entre las CMCs y su nicho. Aparecen representadas las distintas funciones del microambiente tumoral sobre las CMCs (Plaks et al., 2015).

PLASTICIDAD

La plasticidad celular es un proceso en el cual hay una transformación de células madre en células no madre o viceversa como respuesta a estímulos y situaciones de estrés. Las células tumorales presentan una marcada habilidad para activar la plasticidad, la cual puede ser inducida por diversos factores (Tang, 2012). Aunque la diferenciación espontánea y la desregulación de los mecanismos de diferenciación pueden contribuir a la plasticidad de las CMCs, numerosos estudios han puesto de manifiesto que los procesos que más plasticidad generan son los que tienen lugar en condiciones inducidas. Los cambios que se producen durante la progresión tumoral, como pueden ser las condiciones hipóxicas, la acción de diversos tipos de células y mediadores y la transición epitelial-mesenquimal, pueden promover la plasticidad, favoreciendo la desdiferenciación de células tumorales y la adquisición de propiedades CMCs, proceso que también ha sido descrito con el empleo de diferentes terapias antitumorales (Yuan et al., 2019). Estudios recientes han sugerido que la plasticidad fenotípica es un nuevo paradigma para comprender mejor el inicio, la progresión y el desarrollo de la terapia del cáncer contra la resistencia terapéutica (Gupta et al., 2019).

TRANSICIÓN EPITELIO-MESENQUIMAL (EMT)

Uno de los procesos más esenciales en la plasticidad es la transición epitelio-mesenquimal (EMT) que afecta al estado de las CMCs desde su origen hasta su potencial metastásico.

La EMT es un proceso esencial en el desarrollo embrionario en el que las células epiteliales se convierten en mesenquimales. La EMT se inicia con la desagregación de las células epiteliales seguida de múltiples cambios bioquímicos que incluyen la expresión de factores de

transcripción, reordenamiento citoesquelético y cambios en la expresión de proteínas de superficie que les permiten adquirir un fenotipo mesenquimatoso móvil. Algunas células tumorales pueden realizar este proceso y se ha implicado en el inicio y progresión hacia un estado/fenotipo más invasivo y metastásico (Das et al., 2019; Hay, 2005).

Para que una célula tumoral metastatice, también debe someterse al proceso inverso de transición mesenquimal a epitelial (MET). La razón por la cual una célula se somete a MET en un sitio específico se atribuye al entorno local favorable proporcionado por este órgano secundario (Chaffer et al., 2007; Nieto et al., 2016).

La EMT y el proceso inverso asociado de MET se han identificado en tres entornos biológicos distintos. El primero tiene lugar durante la embriogénesis. El segundo es en respuesta al daño o inflamación tisular; con el fin de reparar el tejido, se reclutan células mesenquimales para regenerar el tejido y este proceso se detiene una vez que cesa la inflamación. El tercer escenario se encuentra sólo en células neoplásicas que han adquirido cambios genéticos y epigenéticos específicos que les permiten someterse a EMT. Una vez que las células tumorales adquieren esta capacidad para migrar y sobrevivir fuera de su nicho celular, pueden diseminarse por todo el cuerpo (Friedl y Wolf, 2003).

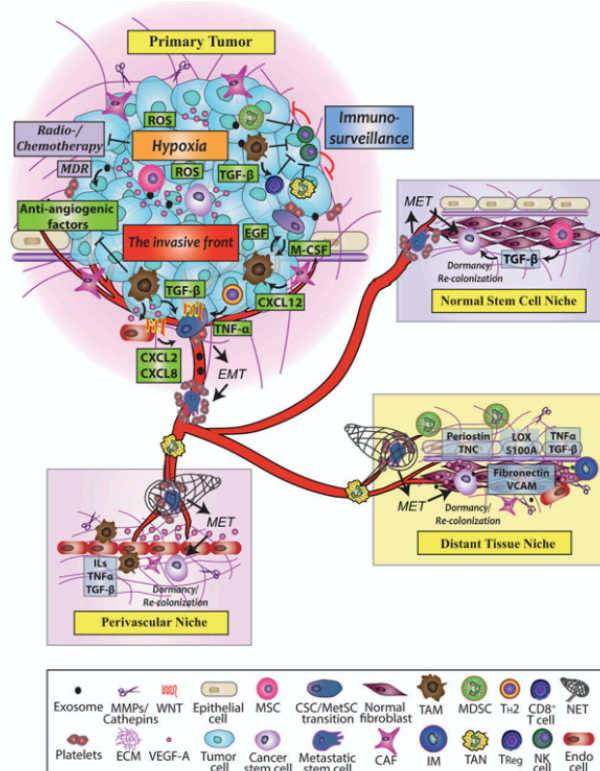


Figura 10. Nicho de células madre tumorales en tumor primario y metástasis. Proceso de EMT y MET (Plaks et al., 2015).

RESISTENCIA A TERAPIAS CONVENCIONALES

Numerosos estudios han demostrado que células con propiedades de CMC tienden a ser más resistentes a terapias convencionales en comparación con otras poblaciones celulares

tumorales. Las células que sobreviven al tratamiento son capaces de expandirse y contribuyen a la recurrencia de la enfermedad o diseminación metastásica, disminuyendo la supervivencia general del paciente (Chang, 2016).

Las CMCs presentan unas características inherentes que las hacen resistentes a las terapias convencionales, entre ellas su habilidad para activar la plasticidad celular como hemos visto anteriormente, pero existen otras propiedades que van a suponer un desafío para el diseño de terapias dirigidas contra esta población celular, entre las que destacan:

- Una sobreexpresión de bombas de eflujo, como transportadores ABC (ATP-binding cassette), ABCG2, MDR1 y MRP1. Estos transportadores utilizan la energía obtenida de la hidrólisis del ATP para expulsar los fármacos fuera de la célula (An y Ongkeko, 2009).
- Una mayor expresión de aldehído deshidrogenasa (ALDH) que les confiere resistencia a múltiples agentes quimioterápicos. La ALDH es enzima citosólica que oxida los aldehídos intracelulares, protegiendo a las células de los niveles elevados de especies reactivas de oxígeno (ROS). Disminuir o mantener un nivel bajo de ROS es fundamental para una célula, ya que la acumulación de ROS provoca la muerte celular (Xu et al., 2015).
- Alta expresión de proteínas anti-apoptóticas y baja expresión de proteínas proapoptóticas (Zhang et al., 2010).
- Estado de quiescencia: en condiciones normales, la mayoría de las CMCs se encuentran en estado de quiescencia, fase G0 del ciclo celular, en el cual no se dividen y del que pueden salir en respuesta a determinados estímulos. Esto va a tener importantes implicaciones, por un lado, la mayor parte de las terapias van dirigidas a células en división, por lo que no tendrán efecto sobre estas células y por otro lado esta característica podría explicar la alta tasa de metástasis y recidivas; las CMCs permanecerían en estado quiescente durante largos periodos de tiempo y se activarían como respuesta a determinados estímulos produciendo recurrencia y progresión tumoral (Sistigu et al., 2020).
- Elevada actividad de reparación de daños en el ADN: Las CMCs tienen una respuesta al daño del ADN alterada y vías de reparación que imitan estrechamente a las de las células madre normales. Como se necesitan células madre normales para repoblar el tejido normal después del daño, su respuesta al daño debe estar libre de errores para preservar el ADN del tejido normal. En las CMCs, esta respuesta eficiente conduce a radio y quimiorresistencia.

3.4 CARACTERIZACIÓN Y AISLAMIENTO

Como hemos visto, las CMCs presentan unas características que nos permiten distinguirlas de otros tipos celulares, la determinación de estas propiedades ha dado lugar a varios métodos para su identificación y aislamiento.

Podemos realizar una caracterización fenotípica mediante la identificación de marcadores de superficie celular, genes o factores de transcripción, sin embargo, estos biomarcadores no son específicos de un determinado tipo, por lo que es necesario llevar a cabo ensayos funcionales tanto in vitro como in vivo para realizar una adecuada caracterización de estas células (Podberezin et al., 2013).

El uso de marcadores de superficie celular ha sido fundamental para la identificación de subpoblaciones de CMCs. La primera evidencia de este fenómeno surgió durante el estudio de

células de leucemia mieloide aguda, donde el fenotipo CD34⁺/CD38⁻ se correlacionó con la existencia de células propagadoras del tumor (Lapidot et al., 1994). Desde entonces se han propuesto una gran variedad de marcadores de superficie para la identificación de CMCs en diferentes tipos tumorales (Tabla 5). La detección de estos marcadores suele realizarse mediante citometría de flujo y su separación mediante sorting (Fluorescence-activated cell sorting o FACS) o separación magnética (magnetic-activated cell sorting MACS) (Camareri et al., 2008). Sin embargo, en muchos cánceres no existe un consenso en cuanto al valor y la especificidad de los diferentes marcadores de superficie, ya que su expresión es heterogénea, por ello, para el correcto aislamiento de CMCs se recurre al estudio de más de un biomarcador (Beck y Blanpain, 2013). También es posible completar la caracterización fenotípica mediante la identificación de diferentes genes y factores de transcripción. Así, por ejemplo, el mantenimiento de la capacidad de diferenciación de las CM se ha relacionado con la expresión de las moléculas de señalización OCT-4 (Octamer-binding Transcription factor 4), Nanog y Sox2 (Hadjimichael et al., 2015). Pese a que una expresión elevada de estos genes ha sido vinculada a la presencia de CMCs en diferentes tipos de tumores, se recomienda que el análisis de estos marcadores sea complementario a otros métodos dado que aún no se conocen cuáles son los marcadores específicos de las CMCs (Stuelten et al., 2010; Tirino et al., 2013).

Tabla 5. Principales marcadores empleados para la identificación de CMCs en diferentes tumores.

Tipo de tumor	Marcador
Leucemia mieloide aguda	CD34 ⁺ , CD28 ⁻
Cáncer de mama	EPCAM(ESA) ⁺ , CD44 ⁺ , CD24 ⁻ , ALDH, CD29, CD133
Cáncer de ovario	CD133 ⁺ , CD44 ⁺ , CD117 ⁺ , CD24 ⁺
Glioblastoma	CD133 ⁺ , CD15 ⁺
Meduloblastoma	CD133 ⁺ , CD15 ⁺
Microcítico y no microcítico de pulmón	CD133 ⁺
Hepatocarcinoma	CD45 ⁻ , CD90 ⁺
Cáncer colorrectal	CD133 ⁺ , CD44 ⁺ , CD26 ⁺ , ALDH
Cáncer de próstata	CD133 ⁺ , CD44 ⁺ , CD49
Melanoma	CD20 ⁺ , CD271 ⁺
Adenocarcinoma de páncreas	CD44 ⁺ , CD24 ⁺
Carcinoma renal	CD133 ⁺
Carcinoma escamoso de cabeza y cuello	CD44 ⁺ , ALDH
Pulmón	CD133 ⁺ , CD90, CD117, ALDH1

Como ya se ha comentado, las CMCs presentan una elevada expresión de actividad ALDH, por lo que se propuso la identificación y aislamiento de esta subpoblación celular mediante la determinación de la actividad enzimática de ALDH a través del ensayo Aldefluor. En este ensayo se proporciona a las células un sustrato de ALDH cuyo metabolismo por parte de la enzima genera un producto fluorescente que queda retenido en el interior de la célula. Una elevada actividad ALDH ha sido relacionada con la presencia de CMCs en múltiples tumores, aunque algunos estudios consideran que la actividad ALDH no puede ser un método de identificación adecuado para todos los tipos de tumores (Ginestier et al., 2007).

Las CMCs presentan una sobreexpresión de bombas de eflujo que les permite eliminar sustancias del interior de la célula con mayor eficacia. Teniendo en cuenta esta propiedad se

realiza un ensayo en el cual las células son cargadas con un colorante fluorescente (Rodamina 123 o Hoechst 33342) y mediante citometría de flujo se identifica una población celular que emite una señal fluorescente de menor intensidad, la designada “side population” (SP). Se ha demostrado que la fracción de células que constituye la SP está enriquecida en células con propiedades de CMCs, sin embargo, varios estudios ponen de manifiesto que esta SP puede contener otro tipo de células no CMCs y que no todas las CMCs pueden identificarse mediante este método (Abbaszadegan et al., 2017).

El cultivo de un tejido tumoral en un medio sin suero que contenga factores de crecimiento dará como resultado la formación de colonias de esfera. En dichos medios de cultivo, las células no cancerosas o las células diferenciadas mueren, pero las células inmaduras crecen lentamente y forman grupos no adherentes, llamados células formadoras de esferas. Para aislar las CMCs se realiza un ensayo en el cual se coloca una única célula en medio libre de suero y se analiza la colonia formada mediante su tinción con cristal violeta. Normalmente, las colonias de células madre tumorales son más grandes en tamaño y número que las colonias derivadas de no-CMCs (Weiswald et al., 2015)

Mediante los avances en las técnicas de biología molecular y celular, se abordó que la capacidad de las CMCs para formar un tumor en ratones inmunodeficientes es un método beneficioso para el diagnóstico de CMCs y es considerado hoy en día como el ensayo estándar para la identificación de esta subpoblación celular. Dicho ensayo se basa en la capacidad que presentan estas células de generar un tumor histológicamente similar al de origen, y en una frecuencia mucho mayor que el resto de células tumorales (Dalerba et al., 2007).

3.5 CMCs Y CCR

Hace décadas que se describió en el CCR un modelo de carcinogénesis escalonada según el cual la célula colónica acumulaba una serie de mutaciones que daban lugar a su degeneración a través de la secuencia adenoma-carcinoma (Volgstein et al., 1988). Sin embargo, hoy en día se sabe que la carcinogénesis colorrectal es un proceso altamente complejo que va más allá de una serie de aberraciones genéticas. En los últimos años ha cobrado gran importancia el microentorno tumoral, siendo una pieza clave para comprender el desarrollo, progresión y respuesta tumoral a los diferentes tratamientos (Lenos et al., 2013; Vermeulen et al., 2010). Como ocurre con otros tumores, en el CCR existe una gran heterogeneidad inter e intratumoral que obliga a la búsqueda de terapias personalizadas. El concepto de CMCs proporciona una explicación convincente de los mecanismos subyacentes a esta heterogeneidad y, hoy en día, supone una importante línea de investigación (De Sousa et al., 2013).

El intestino está formado por una monocapa de células epiteliales que se pliegan formando vellosidades hacia el lumen, los espacios entre las vellosidades se denominan criptas de Lieberkühn y son la unidad funcional del intestino. Las células madre intestinales (intestinal stem cells o ISC) se localizan en el fondo de las criptas, mientras que las células progenitoras y diferenciadas se localizan hacia la parte superior de las criptas y vellosidades (Clevers, 2013). El intestino presenta un potencial de regeneración impresionante que permite, en caso de lesión intestinal, la regeneración completa de criptas, evitando su pérdida. El epitelio colónico muestra un patrón similar al descrito en intestino delgado, la cripta colónica también presenta células madre en su parte inferior que producen células especializadas que recubren la pared de la cripta. Se cree que las ISC son las células de origen de la gran mayoría de los CCR (Barker et al., 2009).

En los últimos años, se han realizado grandes avances para tratar de identificar y comprender las propiedades de estas células con el fin de comprender mejor la carcinogénesis del CCR.

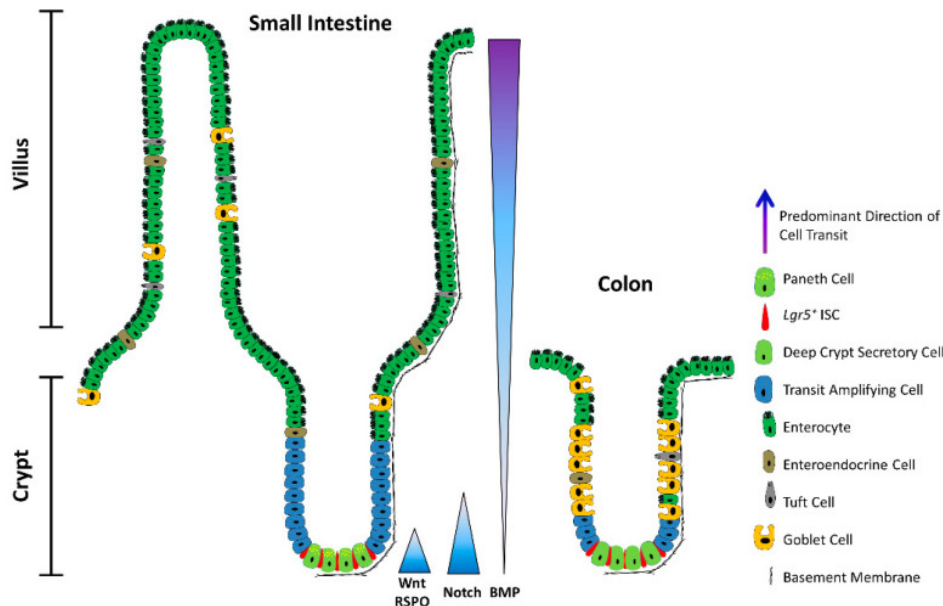


Figura 11. Arquitectura del intestino delgado y el colon. Esquema que representa una sección longitudinal de la mucosa intestinal (Sphyris et al., 2021).

Existen dos hipótesis que intentan explicar el mecanismo por el cual se inicia la carcinogénesis. La hipótesis “ascendente” establece que el inicio de todo ocurre en las criptas del epitelio colónico, ya sea a través de mutaciones de la ISC o de células más diferenciadas. Según esta teoría, un clon de célula adenomatosa se produce por expansión estocástica de una ISC de la base de la cripta, siendo el epitelio displásico el que coloniza toda la cripta formando un adenoma monoclonal en la cripta. Existe una segunda teoría, que ha cobrado más fuerza en los últimos años, la hipótesis “descendente”, donde una ISC mutada localizada en una zona intercripta próxima al lumen intestinal prolifera y migra lateralmente hacia criptas adyacentes reemplazando al epitelio normal y generando una lesión monoclonal (Shih et al., 2001).

Como hemos visto anteriormente, las CMCs son poblaciones muy dinámicas. Las CMCs colorrectales están reguladas por múltiples procesos, incluidas alteraciones genéticas y epigenéticas, interacciones entre células tumorales, factores microambientales, señales hormonales y terapias contra el cáncer. Cualquiera o todos estos factores podrían contribuir a producir heterogeneidad en las poblaciones de CMCs colorrectal.

Múltiples vías de señalización se han visto implicadas en el mantenimiento de las CMCs colorrectales, entre ellas, las más estudiadas son Wnt / β -catenina, Notch, TGF- β y Hedgehog (HH) (Dandawate et al., 2013; Elamin et al., 2010; Jaiswall et al., 2002; Sphyris et al., 2021). La vía de señalización Wnt/ β -catenina juega un papel central en la regulación de las CMCs colorrectales, está implicada en el mantenimiento de sus propiedades de célula madre y en la resistencia terapéutica. Aunque en la mayoría de los CCR se observa activación de esta vía, su nivel de activación y de β -catenina nuclear es mayor en las CMCs y las células que derivan de ellas. Además, hay evidencia de que la activación y señalización de Wnt está involucrada en el proceso de EMT, favoreciendo la invasión de células tumorales y como consecuencia, un peor pronóstico

(Gujral et al., 2014). La vía Wnt como el resto de vías implicadas, favorecen en mayor o menor medida el mantenimiento, desarrollo y progresión de las CMCs, por lo que hoy en día es un importante campo de investigación para el desarrollo de futuros tratamientos (Takebe et al., 2011).

Los factores microambientales son importantes en la regulación de las CMCs colorrectales, así como de las ISC. El estroma tumoral sufre cambios dramáticos durante el proceso de progresión del tumor y, por lo tanto, podría producir efectos más complejos que en condiciones homeostáticas normales (Junttila y de Sauvage, 2013). Se ha puesto de manifiesto que los miofibroblastos estromales secretan un factor de crecimiento que aumenta la actividad de la vía de señalización Wnt. También se ha visto que es posible que las CMCs adquieran una capacidad metastásica por la acción de las citocinas secretadas por los fibroblastos durante la progresión del tumor. Además de las células estromales, las células se constituyen nichos para las ISC, donde proporcionan señales esenciales para el mantenimiento de las células madre (Prager et al., 2019).

Como ya hemos expuesto, las CMCs pueden ser identificadas por un grupo de marcadores de superficie. En el caso del CCR, los más ampliamente estudiados son CD133+, EpCAM, CD44, CD166, ALDH, EphB2high y Lgr5 + (Zhou et al., 2018). Sabemos que los marcadores de superficie son inespecíficos y su expresión es heterogénea y dinámica al igual que las CMCs, por lo que su uso para identificar a las CMCs debería asociarse al estudio de otros biomarcadores. Además de servir de marcadores, son moléculas biológicamente funcionales y su expresión tiene implicaciones pronósticas en el proceso de carcinogénesis. El empleo de marcadores podría ayudar a caracterizar mejor el tumor, permitiendo la selección personalizada del tratamiento y vigilancia de los pacientes.

Los tratamientos que se emplean actualmente en el CCR no están dirigidos a las CMCs, está podría ser la razón por la cual sigue existiendo un alto porcentaje de resistencias terapéuticas y recidivas. Las nuevas perspectivas del tratamiento del CCR reside en investigaciones actuales y futuras sobre las CMCs. Hay muchos estudios en marcha que tratan de proponer nuevos enfoques terapéuticos en el CCR a través de las CMCs. Se ha propuesto el empleo de marcadores de CMCs para intentar definir mejor el objetivo terapéutico. Dirigir fármacos citotóxicos a CMCs con la ayuda de marcadores proporciona un método útil para tratar el cáncer. Otra forma de apuntar al crecimiento tumoral es a través de las vías. Los marcadores de las vías mencionadas anteriormente pueden permitirnos localizar células madre y controlar la progresión tumoral. Si conseguimos localizar estas CMCs y se comprenden mejor las vías, los cánceres resistentes a la quimiorradioterapia pueden ser dirigidos, ofreciendo un mejor pronóstico que con el arsenal terapéutico actual (Effendi-Ys, 2017; Jahanafrooz et al., 2020; Liu et al., 2020).

3.6 CMCs Y PARP1

Se ha puesto de manifiesto en diferentes estudios que existe un aumento de la expresión y actividad de PARP en CMCs de diferentes tumores como glioblastoma, mama, ovario o cáncer colorrectal (Ahmed et al., 2015; Bellio et al., 2019; Carey et al., 2018; Lucena-Cacace et al., 2018). Actualmente existen numerosas líneas de investigación en los que se trabaja con inhibidores de PARP en combinación con radioterapia u otros agentes quimioterápicos como tratamiento frente a CMCs con resultados prometedores.

En CCR se han asociado niveles más altos de expresión y actividad de PARP-1 con el fenotipo de CMCs y con etapas avanzadas o metastásicas de la enfermedad. Se han realizado

estudios que demuestran que la inhibición de PARP-1 sensibiliza a las CMCs del cáncer colorrectal a la quimioterapia con 5-fluorouracilo (5-FU) al reducir la viabilidad de la CMC, su capacidad de autorrenovación, la eficiencia de reparación del ADN y el mantenimiento del tumor in vivo. En conjunto, estos datos indican que la inhibición de PARP sirve como un punto de fragilidad de las CMCs al aumentar la eficacia terapéutica de la radio y/o la quimioterapia (Jarrar et al., 2019). Sin embargo, en algunos contextos, las CMCs muestran resistencia a la inhibición de PARP1, como se ha demostrado en algunos estudios en cáncer de ovario (Bellio et al., 2019).

A pesar de que existen múltiples ensayos clínicos con resultados prometedores es necesario a día de hoy llevar a cabo más estudios que nos ayuden a comprender mejor la función de PARP y su relación con las CMCs.

4. P53

4.1 INTRODUCCIÓN

El gen supresor de tumores p53 (TP53) es el gen mutado con más frecuencia en el cáncer humano. Este gen codifica una proteína que regula el crecimiento celular y juega un papel fundamental en respuesta al daño celular. Debido a su papel central en la prevención de la propagación de células con daño en el ADN, se ha hecho referencia a p53 como el "guardián del genoma" (Lane, 1992).

Múltiples evidencias sugieren que la pérdida de función de p53 es un evento relativamente tardío en la carcinogénesis colorrectal, relacionándose con estadios avanzados de la enfermedad (Kirsch y Kastan, 1998). La identificación de mutaciones de p53 en un CCR individual tiene una importancia clínica potencial, tanto pronóstica como terapéutica. En muchos estudios, se ha observado que los pacientes cuyos tumores albergan mutaciones en TP53 tienen peores resultados y una supervivencia menor. Se espera que, en un futuro, gracias a las mejoras en el conocimiento de este gen, p53 pueda ser un objetivo de intervención terapéutica altamente selectivo y eficaz.

4.2 ESTRUCTURA DE P53

El gen p53, se localiza en el cromosoma 17p13.1, contiene 11 exones y codifica un ARNm de 2.8 Kb. Su forma activa, p53, es una proteína tetramérica, donde cada monómero de 393 aminoácidos se divide en cinco dominios funcionales: dominio de transactivación N-terminal (TAD), un dominio rico en prolina (PRD), dominio de unión a ADN (DBD), dominio de tetramerización (TD), y dominio básico C- terminal (BD).

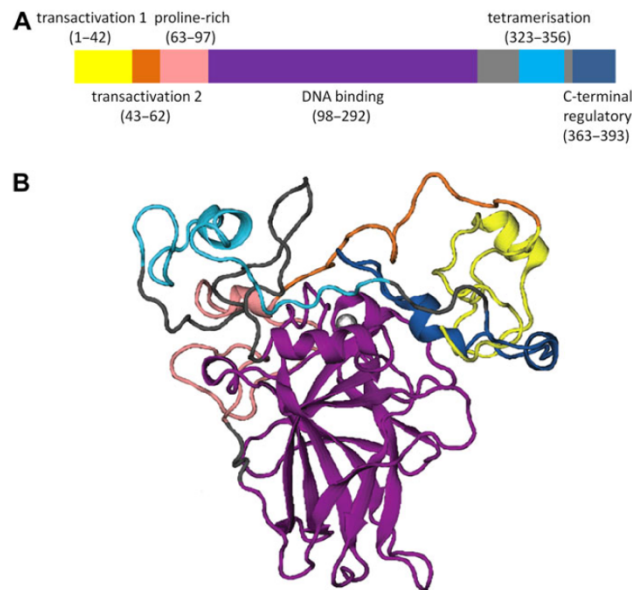


Figura 12. Estructura de P53. A: Dominios funcionales de P53. B: estructura tetramérica de P53 (Tan et al., 2019).

El dominio N-terminal contiene dos dominios de transactivación, TAD 1 y TAD 2, que contienen los residuos aminoácidos 1-42 y 43-62 respectivamente. TAD1 y TAD2 son imprescindibles para la activación transcripcional y la interacción con algunas proteínas y factores de transcripción. Se trata de un dominio de vital importancia para la activación de la proteína, ya que cuando se fosforila el N-terminal ésta se libera de MDM2, su regulador celular natural. El dominio rico en prolina se localiza entre los aminoácidos 63 y 97 y es importante para la estabilidad de p53, la actividad transcripcional y para la inducción de la apoptosis independiente de la transcripción (Yoon et al., 2015). El dominio de unión al ADN (DBD) se localiza entre los aminoácidos 98-292 y es el responsable de la unión con secuencias específicas de ADN localizadas en regiones promotoras de los genes diana regulados por p53. La estructura del DBD se conforma por dos láminas β antiparalelas, dos grandes lazos y un motivo lazo-lámina-hélice final. La morfología de los lazos está estabilizada por un ión zinc coordinado con residuos de cisteína e histidina. Cualquier mutación a este nivel que impida la unión del zinc, desestabilizará todo el dominio, no logrando la unión con el ADN, causando la inactivación y pérdida de función de p53 (Duan et al., 2006; Zhao et al., 2001). El dominio de tetramerización está localizado entre los aminoácidos 323-356 y es responsable de la formación del tetrámero. El dominio C-terminal se sitúa entre los aminoácidos 363-393 y contiene varios puntos que son modificados postraduccionalmente ante señales de estrés, como ubiquitinación, fosforilación, acetilación o glicosilación.

4.3 REGULACIÓN

Sabemos que p53 tiene funciones celulares imprescindibles, sin embargo, su activación descontrolada puede tener efectos negativos sobre los tejidos. Por ello, en condiciones fisiológicas, p53 se expresa a niveles bajos y presenta una vida media corta que favorece su rápida renovación.

La proteína p53 se encuentra regulada principalmente por MDM2, una ubiquitina E3 ligasa que se encarga de conducir a p53 a su degradación en el proteasoma. Existen otras oncoproteínas implicadas en su regulación como PIRH2, COP1 y ARF-BP1. El dominio N-terminal

de MDM2 interacciona con el TAD de p53 favoreciendo su degradación, y además de regular la estabilidad de p53, MDM2 bloquea la incorporación de componentes transcripcionales inhibiendo su función de transactivación. No obstante, también juega un papel fundamental MDMX, también conocido como MDM4, un homólogo de MDM2 que regula negativamente p53 al unirse directamente a ella o a través de MDM2, estabilizándola y potenciando su capacidad de ubiquitinación. A su vez, MDM2 es codificada por genes controlados por p53, lo que genera un sistema autorregulable imprescindible para el mantenimiento de la homeostasis celular (Brady et al., 2010).

En respuesta a señales de estrés, p53 se moviliza por la inhibición de MDM2 a través de varios mecanismos. Por un lado, se activan una serie de sistemas de reconocimiento (ATM/ATR/DNA-PK/ChK1/ChK2/JNK) que a través de modificaciones postraduccionales (fosforilaciones, ubiquitinaciones, metilaciones y acetilación) modifican el extremo N-terminal de p53, disminuyendo su afinidad a MDM2/MDMX. Puede ocurrir también que se activen señales mitogénicas (c-MYC y K-RAS) favoreciendo la acumulación de p14ARF en el nucleolo. P14ARF es una proteína supresora de tumores con capacidad para unirse a MDM2, inhibiendo la unión p53-MDM2 y liberando p53. En condiciones de estrés, la biogénesis ribosomal se restringe, fomentando la acumulación de proteínas ribosomales como RPL5 y RPL11 que tienen alta afinidad por MDM2 (Nguyen et al., 2017).

Todas estas modificaciones que tienen lugar como respuesta a determinadas señales, provocan la acumulación y activación de p53. Una vez activa, p53 forma un complejo tetramérico con secuencias específicas de ADN de algunos genes implicados en la parada ciclo celular, reparación del daño en el ADN, inhibición de la angiogénesis e inducción de la apoptosis (Kastan et al., 1991).

Sabemos que cuando p53 se encuentra mutado, MDM2 presenta menor capacidad de interacción con p53 para su degradación y, además, no puede inducir su transcripción. De esta forma, la forma mutada de p53 aumenta su concentración, con las consecuencias que, como veremos más adelante, conlleva (Levine et al., 2009).

4.4 MUTACIONES DE P53

En condiciones normales, en una célula se expresan los dos alelos de p53. En caso de mutación de uno de ellos, se expresarían ambos igualmente, obteniéndose p53 “salvaje” (wild-type p53) y p53 mutada (mutp53). En casi el 50% de los tumores humanos, p53 está mutado. La mayoría de las mutaciones en p53 residen en el dominio de unión al ADN (DBD), y aproximadamente el 70% de ellas provocan un cambio de aminoácido por otro diferente (mutaciones missense) dando lugar a la producción de una proteína de longitud completa (Bártek et al., 1991). Estas mutaciones pueden ser de dos tipos: mutaciones que afectan a los dominios de la proteína que están directamente involucrados en la unión del ADN o mutaciones conformacionales que provocan una distorsión del plegamiento del DBD. El cambio de aminoácido impide el reconocimiento específico del ADN diana por el DBD, alterando la funcionalidad de la proteína p53 como gen supresor de tumores, lo que puede originar dos efectos (Olivier et al., 2010). Por un lado, puede existir una pérdida de función de la proteína, debido a que p53 mutado ejerce una regulación dominante negativa a nivel postraducciona sobre el alelo de p53 salvaje, bloqueando su función como supresor de tumores. En segundo lugar, puede ocurrir una ganancia de función, donde p53 mutado adquiere propiedades oncogénicas inherentes que son independientes de la pérdida de función (Brosh y Rotter, 2009).

p53 mutado interactúa con un gran número de factores de transcripción y cofactores, incrementando o disminuyendo su acción transcripcional para promover la progresión del tumor.

4.5 FUNCIONES DE P53

Como hemos visto antes, en condiciones fisiológicas, p53 está presente en su forma inactiva a muy baja concentración, mientras que en situaciones de estrés celular o de daño en el ADN, se produce su activación y estabilización. Cuando el daño es leve o hay un bajo nivel de estrés, p53 intenta preservar la vida de la célula, deteniendo el ciclo celular para permitir su reparación y posteriormente reiniciarlo. Ante un daño grave o irreparable, activa irreversiblemente el proceso de apoptosis o senescencia, reduciendo de esta manera la posibilidad de que células con mutaciones puedan sobrevivir y contribuir al proceso de carcinogénesis.

p53 actúa regulando múltiples vías importantes en la señalización y decisión del destino celular. p53 lleva a cabo su función supresora actuando como un factor de transcripción que regula la expresión de genes implicados en procesos celulares que controlan la detención del ciclo celular, apoptosis, senescencia, reparación del ADN y diferenciación.

La primera respuesta de p53 frente a un daño en el ADN es la detención del ciclo celular. La activación de p53 favorece la expresión de p21, un inhibidor de las quinasas dependientes de ciclinas (CDK). A través de su efecto negativo sobre las CDKs, p21 inhibe el paso G1-S del ciclo celular (Harper et al., 1995). Una vez que se ha detenido el ciclo celular, p53 activa las enzimas de reparación del ADN para reparar los daños detectados. p53 induce proteínas como GADD45, la cual se une a una subunidad de la ADN polimerasa, inhibiendo la síntesis de ADN. Además, regula la transcripción de la unidad R2 de la ribonucleótido reductasa, muy importante en la replicación y reparación del ADN, por escisión de nucleótidos (Tanaka et al., 2000). Si el daño se repara, p53 regula su autodestrucción permitiendo que el ciclo celular continúe, si no se repara, activará mecanismos para la inducción de apoptosis o senescencia celular.

El proceso de senescencia es un mecanismo no conocido en su totalidad, que produce una parada permanente en el ciclo celular. Este proceso requiere la activación de p53 y la expresión de mediadores como inhibidores de CDK, dando lugar a cambios celulares específicos e irreversibles en la morfología y en la expresión génica. Cuando el daño es irreparable, p53 activa la expresión de genes que favorecen la apoptosis. El más conocido es Bax, un miembro de la familia Bcl-2, que tiene sitios de unión a p53 en su promotor y se regula positivamente en respuesta a daños en el ADN y p53, promoviendo la apoptosis (Miyashita y Reed, 1995). Existen otros genes regulados por p53, denominados NOXA y PUMA, que son miembros de la familia Bcl2 y que actúan como inductores de la apoptosis (Iurlaro y Muñoz-Pinedo, 2016; Oda et al., 2000). También se han descrito mecanismos de regulación de p53 no transcripcionales que se asocian a su capacidad de interactuar con otras proteínas que pueden modificar su función (Caelles et al., 1994). La inducción de la apoptosis es un proceso complejo que no va a depender solo de la potencialidad de p53 de actuar como factor de transcripción, sino que la respuesta final también dependerá de aquellas proteínas con las que interactúa, ya que p53 también controla las vías y eventos posteriores a la apoptosis.

Además de los procesos que se acaban de describir, p53 participa en numerosos procesos biológicos: modula la autofagia, inhibe la autorrenovación de las células y la reprogramación de células diferenciadas en células madre, restringe la invasión y la metástasis, modera las respuestas inmunitarias innatas e influye en varios procesos metabólicos celulares, incluida la glucólisis, la fosforilación oxidativa y la glutaminólisis (Ak y Levine, 2015; Bieging et al., 2014; Liu

et al., 2009; Rosenfeldt et al., 2013). Es por todo esto que hoy en día, el conocimiento de la actividad y funciones de p53 continúan siendo objeto de numerosos estudios e investigaciones.

4.6 P53 Y CCR

En 1990, Fearon y Volgenstein describieron la carcinogénesis colorrectal es un proceso secuencial en el que se van acumulando alteraciones genéticas específicas que tienen como consecuencia la degeneración maligna de la lesión inicial. Análisis genómicos han identificado los genes que con más frecuencia se encuentran mutados en el CCR, incluyendo APC, KRAS, SAMD4 y p53.

p53 es el gen mutado con más frecuencia en los cánceres humanos (Kandoth et al., 2013). La desregulación del gen supresor de tumores p53 es uno de los eventos más frecuentes en la carcinogénesis colorrectal, encontrándose mutado en el 40-50% de los CCR esporádicos. La mayoría de estas mutaciones ocurren en los exones 5 a 8, pertenecientes al dominio de unión del ADN, y principalmente en algunos codones de los denominados “puntos calientes” que conducen a la sustitución de un solo aminoácido en la proteína p53 provocando una alteración en la unión específica del ADN. Se cree que la pérdida de la actividad transcripcional de p53 es el mecanismo principal por el cual las mutaciones de pérdida de función de TP53 promueven la carcinogénesis en varios órganos, incluido el colon. Gracias al avance en genómica, se ha demostrado que la presencia de p53 con mutación de tipo missense en determinados puntos calientes, juega un papel importante en la invasión submucosa, la inducción de EMT y el desarrollo de metástasis. Además de otros mecanismos inducidos por p53 mutado, los cambios en la estructura de la cromatina son posiblemente determinantes para el mecanismo de ganancia de función.

Los diferentes tipos de mutaciones de p53 van a marcar el comportamiento biológico del tumor y, por tanto, van a influir en el pronóstico de estos pacientes (Russo et al., 2005). Las mutaciones de p53 están asociadas con invasión linfática en el CCR proximal y con invasión linfática y vascular en el CCR distal, además estos pacientes presentarán mayor resistencia a las terapias y, por tanto, peor pronóstico que aquellos con p53 salvaje. Cuando analizamos el CCR en estadios avanzados observamos que p53 se encuentra mutado en más del 80% de los casos. Sin embargo, las mutaciones de p53 son mucho menos frecuentes en adenomas siendo del 15 al 30% en estos casos. Estos resultados apoyan la hipótesis de que las mutaciones de TP53 juegan un papel en la etapa tardía de la carcinogénesis, como el paso de progresión de los adenomas a adenocarcinomas invasivos o metástasis a órganos distantes (Nakayama et al., 2019). Aunque la inactivación de la vía p53 parece ser un evento tardío en la mayoría de los CCR humanos, puede representar un evento anterior en el CCR relacionado con la enfermedad inflamatoria intestinal.

4.7 P53 Y PARP1

En los últimos años se ha tratado de dilucidar la relación entre PARP y p53. Se ha demostrado que la unión de PARP-1 es fundamental para la activación y función de p53, no obstante, quedan por aclarar muchos puntos en la interacción entre estas dos proteínas.

La activación de PARP-1 y p53 ocurre de forma simultánea debido a que están implicadas en la respuesta celular a daños en el DNA, en el mantenimiento de la estabilidad genómica y en la regulación de los mecanismos apoptóticos. p53 y PARP-1 pueden interactuar a varios niveles. A nivel molecular, se ha propuesto que PARP-1 podría actuar sobre p53 mediante interacciones proteína-proteína directas o por poli(ADP-ribosilación). Esta interacción va a tener consecuencias a nivel celular, se ha demostrado que la unión a PARP disminuye la afinidad de unión al ADN de p53, además, la PARilación de p53 bloquea la interacción entre p53 y el receptor de exportación

nuclear Crm1, lo que da como resultado la acumulación nuclear de p53 (Kanai et al., 2007; Malanga et al., 1998).

A nivel funcional, la interacción entre p53 y PARP-1 es crucial en el mantenimiento de la estabilidad genómica. Se ha evidenciado que p53 y PARP-1 interactúan en células envejecidas que experimentan un acortamiento de los telómeros, aunque se desconocen los cambios moleculares exactos que resultan de esta interacción, se demostró que la unión de PARP-1 es crítica para la activación y función de p53 en estas células (Vaziri et al., 1997).

Múltiples estudios han demostrado que, junto con otras proteínas, p53 experimenta una extensa PARilación en las etapas iniciales de la apoptosis. Parece que esta transformación inhibe transitoriamente la actividad de transactivación de p53. Esta unión podría tener dos consecuencias. Por un lado, inhibir la unión de p53 a las secuencias diana de genes promotores, limitando transitoriamente la activación de estos genes por p53. Por otro lado, al localizarse la unión cerca de una zona de corte proteolítico, sugiere que podría proteger a p53 de la proteólisis. La escisión de PARP-1 mediada por caspasas puede posteriormente liberar p53 cuando las células se dirigen irreversiblemente a la muerte (Simbulan-Rosenthal et al., 1999). Parece que las consecuencias funcionales de la interacción p53-PARP-1 dependen en gran medida de la gravedad del estrés celular. En determinadas condiciones celulares, p53 puede regular positivamente la actividad de PARP-1 que conduce a una necrosis dependiente de esta última (Elkholi y Chipuk, 2014).

Además, PARP-1 puede que contribuya indirectamente a la regulación de p53 al actuar sobre p21 y MDM-2, implicadas en la degradación de p53 por fosforilación (Valenzuela et al., 2002).

4.8 P53 y CMCs

El papel de p53 está bien establecido en algunos tejidos. Hallazgos recientes sugieren que p53 también puede llevar a cabo su función de supresión tumoral regulando la homeostasis de las SC. P53 puede actuar como un regulador principal del compartimento de SC al contrarrestar su expansión por diversos mecanismos, entre ellos, limitando su autorrenovación y bloqueando la reprogramación de células normales en SC (Bonizzi et al., 2011). La perturbación funcional de p53 puede favorecer la proliferación descontrolada de SC además de la desviación de SC hacia CMCs (Sarig et al., 2010). Varios estudios en tumores cerebrales evidenciaron que una delección de p53 es insuficiente para hacer que las CMCs adquieran su fenotipo maligno, siendo necesaria la expresión de p53 mutante para manifestar el potencial maligno completo de estas CMCs. Se ha establecido un vínculo entre mutaciones en p53, formación de CMCs y mal pronóstico (Kemp et al., 1993).

Se han sugerido algunas vías para explicar cómo p53, o su ausencia, ejerce sus efectos sobre las CMCs. Se ha demostrado que p53 reprime la expresión de CD44, marcador de CMCs involucrado en la capacidad de metástasis de las CMCs (Hiraga et al., 2013). Además, conocemos que p53 reprime la expresión de c-KIT, a través de la familia de miR-34a diana de p53. Esta regulación a la baja da como lugar una reducción de la capacidad de formación de esferas, la quimiorresistencia y el fenotipo SC en el cáncer colorrectal (Siemens et al., 2013). También se ha evidenciado que p53 reprime la expresión de otros genes SC como Nanog y Oct4, cruciales para la población de CMCs en varios tumores. Hay amplia evidencia de que p53 regula negativamente el proceso de EMT a través de la activación transcripcional de miR (Chang et al., 2011; Siemens et al., 2011). Numerosos estudios han demostrado que p53 ejerce un efecto negativo sobre la reprogramación. Es de destacar que p53 mutado parece afectar vías específicas que son

fundamentales para la capacidad de resistencia a los fármacos de las CMCs. p53 mutado regula positivamente MDR1, un miembro importante de la familia de transportadores ABC (Chin et al., 1992). Además, se ha demostrado que p53 mutado no solo pierde la capacidad de p53 salvaje para inducir apoptosis, sino también para ganar función aumentando la expresión de proteínas antiapoptóticas (Bcl-2 y Bcl-xL) y reduciendo las señales proapoptóticas (Bax, Bad y Bid). Gran parte de la resistencia de las CMCs a la quimioterapia ocurre cuando el estado de p53 está comprometido.

p53 participa en varios mecanismos de regulación de las CMCs en cáncer colorrectal. Este gen está implicado en la activación transcripcional de la expresión de CD133, un marcador de CMCs de CCR. El silenciamiento o la sobreexpresión de p53 disminuye o restaura la expresión de CD133, respectivamente. Se ha demostrado que las células CD133 positivas son más resistentes a la radiación y la quimioterapia convencional en comparación con las células CD133 negativas (Liu et al., 2006; Ma et al., 2007). Aunque varios estudios han indicado que p53 puede estar involucrado en la regulación de las células madre del cáncer de colon los mecanismos precisos no están totalmente aclarados.

5. ÓXIDO NÍTRICO SINTASA INDUCIBLE (iNOS)

5.1 INTRODUCCIÓN

El óxido nítrico (NO) es un radical libre, altamente reactivo y lábil, que actúa como molécula de señalización celular en numerosas funciones fisiológicas del organismo como son la vasodilatación, la relajación del músculo liso, la neurotransmisión y la respuesta inmune. La síntesis endógena de NO se lleva a cabo por una familia de enzimas llamadas óxido nítrico sintasas (NOS) que se encargan de convertir L-arginina en citrulina y NO utilizando nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) y oxígeno (Knowles y Moncada, 1994). Esta familia, está constituida por tres isoformas: NOS neuronal (nNOS o NOS I), NOS endotelial (eNOS o NOS III) y NOS inducible (iNOS o NOS II). Las dos primeras son constitutivas y dependientes de calcio, mientras que la tercera se induce frente a determinados estímulos y de forma independiente del calcio.

La nNOS se localiza principalmente en el sistema nervioso y es esencial para la señalización neuronal, mientras que la eNOS está involucrada en procesos de vasodilatación, inhibe la adhesión de plaquetas y glóbulos blancos, previene la replicación de las células del músculo liso, promueve la angiogénesis y controla la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). Estas dos isoenzimas constitutivas, nNOS y eNOS, producen pequeñas cantidades de NO durante breves periodos de tiempo, fundamentales en determinados procesos fisiológicos. Sin embargo, la iNOS presenta niveles mínimos de manera fisiológica y solo se expresa cuando la célula es estimulada por determinadas señales proinflamatorias o bacterianas, dando lugar a la liberación celular de cantidades variables de NO hasta su degradación enzimática.

Los efectos celulares del NO van a depender de su concentración en los tejidos, de modo que una cantidad moderada de NO es fundamental para una adecuada respuesta inflamatoria e inmunitaria, sin embargo, concentraciones elevadas de NO pueden provocar efectos citotóxicos (Khan et al., 2020). Varios estudios han demostrado que la sobreexpresión o desregulación de iNOS tiene un papel importante en enfermedades inflamatorias crónicas y en el desarrollo de

cáncer. Esta dualidad de la iNOS es a día de hoy un importante campo de investigación para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas (Sahebnasagh et al., 2022).

5.2 ESTRUCTURA

iNOS es una proteína homodimérica de 113 kDa compuesta por 1153 aminoácidos. La estructura genómica del monómero de las tres isoformas de NOS comparte una homología del 50-60%, estando especialmente conservado el lugar donde se produce la transformación del sustrato (Alderton et al., 2001). La estructura del monómero consta de dos dominios, uno oxigenasa N-terminal y otro reductasa C-terminal, con una secuencia de reconocimiento para Ca^{++} y calmodulina (CaM) situada entre ellos (Abu-Soud et al., 1993). iNOS adopta una estructura cuaternaria homodimérica con puente de zinc que la hace funcionalmente activa (Campbell et al., 2014). Para llevar a cabo su función NOS necesita una serie de cofactores, los principales son NADPH, el complejo calcio-calmodulina (CaCAM), flavina adenina dinucleótido (FAD), flavina mononucleótido (FMN), el grupo hemo y la tetrahidrobiopterina (BH4). El dominio de la oxigenasa es la región central que se une al hemo, BH4 y L-arginina y es lugar donde se va a producir la síntesis de NO. El dominio de la reductasa está unido a NADPH, FMN y FADH y participa en la transferencia de electrones desde estos cofactores al grupo hemo del dominio oxidasa (Cinelli et al., 2019). De forma muy simplificada podríamos decir que la transferencia de electrones del dominio reductasa al de la oxigenasa, va a producir la activación del grupo hemo, estimulando la oxidación de la L-arginina a citrulina y NO (Stuehr et al., 2019). Pese a que las tres isoformas de iNOS presentan similitudes estructurales y funcionales, las diferencias morfológicas del dominio son las responsables de su especialización.

5.3 FUNCIONES

La principal función fisiológica de la iNOS y el NO producido por esta última es participar en la respuesta inmune frente a determinados patógenos. Aunque se ha localizado mayoritariamente en macrófagos, la expresión de la enzima se puede observar en prácticamente cualquier célula o tejido, siempre tras ser inducida por citocinas y productos microbianos, en particular interferón-gamma ($\text{IFN-}\gamma$) y lipopolisacárido (LPS) (Kleinert et al., 2003). La iNOS presenta una alta afinidad por el hierro, lo que le va a permitir unirse a proteínas que contengan grupo hemo en su estructura, produciendo un efecto directo y rápido mediante su inactivación o ruptura. Estas proteínas sobre las que iNOS actúa van a participar en diferentes procesos celulares fundamentales para mantener la homeostasis. El NO puede combinarse con especies reactivas de oxígeno (ROS) como el superóxido para formar peroxinitrito (ONOO^-), un potente agente oxidante y nitrante que puede causar daños en el ADN, además de interactuar con otras moléculas dando lugar a otros radicales. Todos estos compuestos, capaces de nitrosar, nitrosilar u oxidar se denominan especies reactivas de nitrógeno (RNS). Las RNS pueden actuar junto con ROS causando estrés nitrosativo (Dröge, 2002; Squadrito y Pryor, 1998).

Como se ha dicho anteriormente, la dualidad del NO se explica gracias a sus niveles alcanzados, ya que se ha observado que va a interactuar con diferentes vías según su concentración, siendo las concentraciones elevadas las responsables del efecto patológico.

5.4 REGULACIÓN

Existen diferentes vías implicadas en la regulación de iNOS. En la expresión de iNOS, las citocinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral α ($\text{TNF-}\alpha$), la interleucina-1 (IL-1), el $\text{IFN-}\gamma$ y el LPS, se unen a receptores en la superficie celular y activan las quinasas, lo que lleva a la fosforilación de diversas proteínas intracelulares y la posterior activación de factores de

transcripción específicos, como es el factor nuclear κB (NF- κB) o el transductor de señal y activador de la transcripción 1 (STAT1) que se unirán a la región promotora del gen. Cualquier modificación en las citocinas o en cualquiera de estos receptores alterará la expresión de iNOS (Cinelli et al., 2020).

Además, la actividad de iNOS puede estar condicionada por la disponibilidad de sus sustratos y cofactores. La arginina, además de ser el sustrato principal de iNOS, participa también en el ciclo de la urea para la degradación del amoníaco. La arginasa se va a encargar de degradar la arginina en ornitina y urea. Se ha observado que, al competir por el mismo sustrato, la inhibición de la arginasa aumenta la síntesis de NO, mientras que su sobreexpresión la disminuye por menor actividad de iNOS. Los transportadores de arginina (CAT1, CAT2 y CAT 3) también van a regular la expresión de iNOS. Se ha observado que cuando iNOS es inducida se favorece la expresión de los transportadores de arginina y, por tanto, aumenta la captación de esta (Peluffo, 2021). Parte de la citrulina sintetizada junto con NO puede volver a convertirse en arginina a través de la enzima arginosuccinato sintasa, proceso fundamental para mantener la homeostasis de iNOS. La arginosuccinato e iNOS son inducidas por las mismas células como respuesta a determinados estímulos (Mori y Gotoh, 2000). Tanto el cofactor HB4 como su precursor, la sepiapterina, son necesarios para la regulación de iNOS, ya que HB4 ayuda a la formación del dímero activo de iNOS (Schoedon et al., 1994).

Por otro lado, la expresión de iNOS puede estar mediada por su interacción con otras proteínas. La kalirina es una proteína que se une al monómero de iNOS, impidiendo la formación del dímero y favoreciendo su proteólisis. Su actividad va a depender de las concentraciones de NO, un exceso de NO va a favorecer la unión de kalirina al monómero de iNOS (Youn et al., 2007). Se ha identificado otra proteína, llamada Proteína asociada a NOS 110 (NAP110) que actúa de manera similar a kalirina. En este caso, la coexpresión de NAP110 e iNOS reduce un 90% la actividad de la enzima, aunque sin disminuir su expresión (Ratovitski et al., 1999). Rac2 es una proteína que parece tener un papel clave en la respuesta antimicrobiana (Jyoti et al., 2013). Rac2 estimula la producción de iNOS cuando es inducida por bacterias mediante LPS. La proteína de choque térmico (Hsp90), aunque su papel no es totalmente conocido, parece que se encarga de realizar modificaciones en el dominio oxidasa de NOS para favorecer la unión del cofactor hemo necesario para la actividad de la enzima (Ghosh et al., 2011).

Se han descrito numerosos procesos de autoregulación de NOS a través del propio NO. Se sabe que el NO puede regular negativamente la maduración de NOS y la estabilidad del homodímero de varias formas. Puede interaccionar con los monómeros de NOS evitando la formación del homodímero, o puede desestabilizar y romper el homodímero una vez formado. El mecanismo principal para la autoinactivación de iNOS es a través de la nitrosación. Mediante nitrosación del zinc de la interfaz del dímero, se produce la disociación irreversible del dímero de iNOS y la subsiguiente pérdida de actividad. También mediante nitrosación de un residuo de cisteína en GADPH se va a producir la inhibición de la inserción del cofactor hemo, dando lugar a la inactivación de la enzima (Stuehr y Haque, 2019).

5.5 iNOS y CCR

La carcinogénesis colorrectal es un proceso complejo en el cual están implicadas numerosas vías. La expresión de iNOS y el NO pueden tener efectos contrapuestos en la carcinogénesis colorrectal, por un lado, puede promover el crecimiento tumoral y en otras condiciones inhibir su desarrollo. Esta dualidad se explica, como se ha explicado anteriormente, por la variabilidad en las concentraciones del NO, aunque también va a depender del tiempo de

exposición a este, la sensibilidad celular, la localización dentro del tejido y diversas condiciones del microambiente tumoral (Kashfi et al., 2021; McGinity et al., 2021).

Los productos derivados del estrés oxidativo/nitrosativo pueden desencadenar y potenciar el crecimiento tumoral a través de múltiples eventos celulares y moleculares, como daño en el ADN e inestabilidad del genoma, modificación del microambiente tumoral y alteración en la señalización celular, favoreciendo la transformación de células normales en neoplásicas. Sin embargo, pese a sus efectos prooncogénicos, se ha demostrado que el NO tiene efectos antitumorales relacionados con su citotoxicidad y efectos inmunogénicos (Wang et al., 2020). Aunque la expresión de iNOS se ha asociado a progresión tumoral, su papel durante el desarrollo tumoral no es totalmente conocido y la variabilidad de su expresión en los diferentes estadios tumorales sigue siendo objeto de estudio con el fin de diseñar nuevas estrategias terapéuticas.

5.6 iNOS y PARP

Varios estudios han puesto de manifiesto una interrelación entre PARP-1 e iNOS a diferentes niveles. PARP-1 participa en numerosos procesos inflamatorios al regular, de forma directa o indirecta, mediadores proinflamatorios entre los que se encuentra iNOS. La regulación puede ser directa, por unión de PARP-1 al promotor de iNOS (Yu et al., 2006), actuando en este caso como factor de transcripción. Existen estudios in vitro en los que se ha observado que PARP-1 es necesaria para la activación de genes específicos dependientes de NF- κ B y como coactivador transcripcional de NF- κ B. Como se ha visto antes, NF- κ B es fundamental en la expresión de iNOS, por tanto, la implicación de PARP-1 en esta vía aporta datos a favor de su papel en la regulación de iNOS (Buzzo et al., 2017; Naura et al., 2009; Park et al., 2004). Por otro lado, una sobreexpresión de iNOS puede dar lugar a una producción excesiva de NO y RNS, como el ONOO⁻, que puede producir daños en la cadena de ADN y como consecuencia, la activación de PARP-1. Se ha observado que la exposición de PARP-1 a ONOO⁻ produce la modificación de PARP-1 por nitración y la inhibición de su actividad enzimática, revelando una nueva faceta de la regulación por subproductos de iNOS en PARP-1 (Bai y Virág, 2012; Naura et al., 2009; Yu et al., 2006).

5.7 iNOS y CMCs

La inducción de iNOS como respuesta a determinados estímulos inflamatorios o infecciosos va a producir, como ya sabemos, un aumento de NO y como consecuencia una elevada producción de ROS/RNS. Bajo condiciones de inflamación crónica, existe una sobreexpresión de iNOS y una elevada producción de especies reactivas que pueden producir lesiones en el ADN y promover la activación de células madre dentro del tejido para su regeneración. En estas células con capacidad pluripotencial, los subproductos de iNOS pueden causar mutaciones, dando lugar a CMCs, favoreciendo así la carcinogénesis (Kawanishi et al., 2017; Ohnishi et al., 2013).

Por otro lado, varios estudios han evidenciado que las CMCs presentan como característica una elevada expresión de iNOS que favorece la síntesis autónoma de NO en estas células (Eyler et al., 2011). La iNOS juega un papel importante en la regulación de una amplia gama de vías de señalización en las CMCs como la vía de señalización Wnt/ β -catenina y el NF- κ B. Aunque el mecanismo no es totalmente conocido, se ha sugerido que la iNOS tiene un papel determinante en el inicio de la carcinogénesis y en el mantenimiento del tumor mediado por CMCs. Se ha observado también que la iNOS afecta al potencial de diferenciación en las CMCs de colon, lo que sugiere que iNOS es crucial para promover el fenotipo de CMC (Puglisi et al., 2015). Otros estudios, sin embargo, muestran efectos contrarios, observando que una baja expresión

de iNOS induce la expresión de marcadores CMCs y favorece la troncalidad de estas (Du et al., 2023).

5.8 iNOS y p53

Existe una interacción entre la expresión de iNOS y p53 que regula la carcinogénesis. Se ha observado que alteraciones en el ADN inducidas por los productos de iNOS y sus reactivos van a producir el acúmulo, activación y modificación postraducciona de p53. Como se ha visto, la activación de p53 induce la expresión de una variedad de genes que pueden detener el ciclo celular y facilitar la reparación o inducir la apoptosis en las células dañadas. Varios estudios han puesto de manifiesto que p53 juega un papel central en la modulación de la respuesta inflamatoria al estrés al regular negativamente la expresión de iNOS (Goodman et al., 2004, Hu et al., 2020).

Sin embargo, se ha observado que cuando existe una sobreexpresión de iNOS y la concentración de NO es muy elevada, se van a producir mutaciones espontáneas de p53. Estas mutaciones de p53 implican la pérdida de función de este, favoreciendo una mayor expresión de iNOS y como consecuencia de todo ello, favoreciendo la carcinogénesis (Hu et al., 2020).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Resultados previos de nuestro laboratorio han puesto de manifiesto la influencia del estado de p53 (mutado o no mutado) en el efecto de la sobreexpresión de PARP-1 en el CCR. En el caso de pacientes con tumores que portan un gen p53 mutado, la sobreexpresión de PARP-1 conlleva mayor supervivencia acumulada y libre de enfermedad. Los estudios in vitro han demostrado que además esto se correlaciona con un fenotipo de CMCs menos agresivo.

PARP-1 puede actuar a través del enzima iNOS en modelos de inflamación, ya que se comporta como un factor de transcripción que puede unirse a su promotor y aumentar su expresión.

Por otro lado, el efecto de la sobreexpresión de la iNOS en el CCR ha dado lugar a resultados contradictorios en la bibliografía (Kashfi et al., 2021; McGinity et al., 2021) y está influenciado por el estado de p53, de la misma forma que el efecto de PARP-1.

Por todo ello, nos planteamos si el NO producido por la iNOS podría ser el responsable de los efectos encontrado para PARP-1 en el CCR.

En este contexto nos hemos planteado los siguientes objetivos:

1. Analizar la expresión de los genes de PARP-1, iNOS y los marcadores de CMCs, CD133 y CD44, en muestras de pacientes de CCR.
2. Estudiar la relación que existe entre estos genes según la expresión de los marcadores de CMCs y la presencia o no de mutaciones en el gen p53.
3. Determinar si la iNOS actúa como mediadora de los efectos de PARP-1 en el CCR en modelos in vitro con diferente estado de p53.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Este estudio se llevó a cabo en una subcohorte de un estudio anterior en el que se determinó la relación de la expresión de PARP-1 con el fenotipo de CMCs en función del estado de p53 (Puentes-Pardo et al, 2023; Ríos-Arrabal et al, 2021). Se analizaron muestras tumorales y de mucosa no tumoral adyacente de 186 pacientes (edad media 71 ± 11 años) con CCR esporádico. Las muestras fueron proporcionadas por la Red de Biobancos de Tumores de Andalucía (RBTA). El Comité de Ética del Hospital Universitario San Cecilio aprobó el estudio (código proyecto: PI-067/2013; fecha de aprobación: 24/01/2014) y todos los pacientes dieron su consentimiento por escrito para el almacenamiento de muestras tras la cirugía y su uso en investigación biomédica. Los criterios de exclusión fueron los siguientes:

- Edad ≤ 18 o > 80 años.
- Tratamiento neoadyuvante previo a cirugía.
- CCR hereditario.
- Antecedente personal de neoplasia.

Los datos clinicopatológicos de los pacientes como edad, sexo, localización del tumor, grado de diferenciación y estadio tumoral TNM fueron proporcionados por la RBTA. Los pacientes se incluyeron en el estudio si habían sido diagnosticados mediante histología de CCR y si habían sido tratados de forma primaria con cirugía (Tabla 6).

Tabla 6. Características de los pacientes incluidos en el estudio.

Características	N (%)
Sexo	
Mujer	73 (38,8)
Hombre	115 (71,2)
Localización	
Colon	176 (93,6)
Recto	12 (6,4)
Tipo histológico	
Bien diferenciado	45 (25,0)
Moderadamente diferenciado	106 (58,9)
Pobrementemente diferenciado	29 (16,1)
Estadio TNM	
Estadio I	2 (1,1)
Estadio II	24 (12,8)
Estadio III	127 (67,9)
Estadio IV	34 (18,2)
Número de ganglios analizados	
<12	71 (35,5)
≥ 12	130 (64,5)

2. ANÁLISIS DE LAS MUTACIONES DE P53

El ADN de las muestras de tejido se aisló usando el kit QIAamp DNA Mini (Qiagen, Hildem, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN fue cuantificado con un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Implen GmbH, Munich, Alemania) y su integridad se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa.

Se analizaron las muestras de tejido en busca de mutaciones de TP53 (Tabla suplementaria 1-Anexos). Mediante PCR se realizó amplificación de ADN con primers específicos que flanquean los exones 2-10 en regiones intrónicas (Tabla 7). Previo al proceso de secuenciación de los exones, los productos obtenidos se purificaron utilizando el kit Wizard SV gel y PCR clean-up System (Promega, Madison, WI, EEUU). Tras la purificación, se realizó secuenciación automática de los productos de la PCR mediante electroforesis multicapilar usando el Sistema Applied Biosystems 3130 XL (Foster City, CA, EEUU). Los resultados se analizaron utilizando el software Chromas Lite 2.1.1 (St South Brisbane, QLD, Australia).

Tabla 7. Cebadores empleados en el análisis de mutaciones de p53.

Cebadores			
Exones	Sentido	Antisentido	Tamaño (pb)
2-4	agctgtctcagacactggcatggtgttg	cactgacaggaagccaaagggtgaagagg	840
5-6	gttgctttatctgttcactgtgccctgac	tagggagggtcaatatagcagcaggagaaag	548
7-9	cagcctgggacagagcgagattccatc	aaccaggagccattgtctttgaggcatcac	987
10	tacttgaagtgcagtttctactaaatgcatg	aggaagactaaaaaatgtctgtgcagggc	393

3. EXTRACCIÓN DE ARN Y SÍNTESIS DE LA PRIMERA CADENA DE ADNc

El ARN total de muestras tisulares o células cultivadas se aisló empleando el reactivo TRIzol (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU). La cantidad de ARN total se determinó mediante espectrometría ultravioleta y su integridad fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa. Mediante transcripción inversa usando un kit comercial con primers oligo-dT (kit de síntesis de ADNc qScript™, Quanta Biosciences, Gaithersburg, MD, EEUU) se sintetizó la primera cadena de ADNc.

4. PCR EN TIEMPO REAL (RT-PCR)

Una vez finalizada la retrotranscripción, 5 µl de ADNc se amplificaron durante 40 ciclos (20 segundos a 95°C durante 10 minutos), utilizando primers específicos para PARP-1, CD44, CD133, UBC TBP y RPS13 (Tabla 8). UBC, TBP y RPS13 se emplearon para normalizar los niveles de ARNm. Para cada uno de los genes, se generaron curvas estándar que representaban los valores de Ct frente a las diluciones logarítmicas de ADNc. Después de cada experimento, los productos obtenidos de la PCR se verificaron mediante el perfil de fusión y la electroforesis en gel de agarosa para eliminar productos no específicos y los dímeros de los primers.

Tabla 8. Cebadores empleados en el estudio.

Gen	Sentido	Antisentido	Tamaño (pb)
PARP-1	agggcaagcacagtgtcaaa	tacccatcagcaacttagcg	316
iNOS	gatgaggaccacatctaccaggag	atagcgcttctggctcttgagctg	206
CD133	ctatcgctgaatggattcggaggacgtg	tccactttgagtatcctgatgctcaagcag	412
CD44	gctttcaatagcaccttggccacaatgg	aaagaggctcctgtcctgtccaaatcttcc	594
RPS13	ggtgttgcacaaagtacgttttgtgacaggc	tcatattccaattgggagggaggactcgc	251
TBP	ttgtccttttggcatttgcctgggctcctc	gtcatcagtgagacggtttccatttaacc	289
UBC	tgggatgcaaatcttctgtgaagaccctgac	accaagtgcagagtggactcttcttgatg	213

5. CULTIVO CELULAR Y REACTIVOS

Se usaron dos líneas celulares de CCR obtenidas de American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, EEUU) con diferente estado de p53: HCT-116 (p53 wild type) y HT-29 (p53 mutado). Ambas líneas celulares se cultivaron en medio DMEM (Gibco, Carlsbad, CA, EEUU) suplementado con 2 mM de L-glutamina, 10% de FBS y 1% de un combinado antibiótico-antifúngico que contenía penicilina (100U/ml), estreptomycin (100µg/ml) y anfotericina B (250ng/ml) (Gibco, Carlsbad, CA, EEUU) en condiciones estándar (37°C y atmósfera humidificada con 5% de CO₂). 1400 W fue adquirido desde Selleckchem (Houston, TX, EEUU).

6. PROTOCOLOS DE TRANSFECCIÓN

Para obtener clones celulares que sobreexpresaran PARP-1, las células fueron transfectadas con el reactivo de transfección lipofectamina 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y seleccionadas con el tratamiento antibiótico adecuado. El plásmido pCMV6 que contenía el gen humano PARP-1 y el vector vacío correspondiente se obtuvieron de Origene Technologies (Rockville, MA, EEUU). La iNOS fue inhibida por transfección transitoria con siRNA (si-iNOS) desde Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, EEUU) (50 ng/ml) y el reactivo de transfección lipofectamina 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU) siguiendo con las recomendaciones del fabricante.

7. INMUNOTRANSFERENCIA

Clones celulares estables que sobreexpresaban PARP-1 fueron transfectados con siRNA-iNOS (si-INOS2), y recogidos tras 72 h o tratados con 1400W 20 µM durante 72 h. Tras los tratamientos, las células se lavaron en PBS helado y fueron incubadas en tampón RIPA que contenía inhibidores de proteasa. Las proteínas fueron transfectadas a membranas PVDF y examinadas con los anticuerpos adecuados contra PARP-1 (Abcam), iNOS (Proteintech), y β-actin (Santa Cruz Biotechnology). Anticuerpos secundarios fueron observados mediante quimioluminiscencia potenciada usando anticuerpos secundarios conjugados con HRP (Santa Cruz Biotechnology). La intensidad de banda se calculó usando Quantity One 4.6.8 (Bio-Rad Laboratories, Inc.) desde el software analítico de Windows

8. ENSAYO DE NITRITOS

Las células se cultivaron en placas de 96 pocillos a una densidad de 4000 células por pocillo, se transfectaron con siRNA-iNOS (siNOS2) durante 72 h o se trataron con 1400W 20 μ M durante 72 h. Posteriormente, se analizaron 100 μ l de sobrenadante con el kit fluorimétrico de nitrato/nitrito para determinar los nitritos totales (Cayman Chemical Company, MI, EEUU). La fluorescencia se midió en un lector de microplacas (serie TRIAD, Dynex Technologies Multimode Reader). Todos los experimentos se realizaron tres veces por duplicado.

9. ENSAYO MTT

Las células se cultivaron en placas de 96 pocillos a una densidad de 4000 células por pocillo, se transfectaron con siNOS2 durante 72 h o se trataron con 1400W 20 μ M durante 72 h. Tras esto, se añadieron a cada pocillo 10 μ l de MTT (solución de 5 mg/ml de PBS de Dulbecco). Cuatro horas después, se incorporaron 100 μ l de tampón de lisis (20% SDS en 50% N, N-dimetilformamida a pH 4,7) y las células se lisaron a 37°C durante la noche.

10. ENSAYO DE APOPTOSIS

La apoptosis se analizó usando el kit IP-Annexin V (BD Biosciences, RU). Brevemente, las células se sembraron en placas de 6 pocillos y después del tratamiento con 1400W 20 μ M o la transfección con siNOS2 durante 72 h, se tripsinizaron, se lavaron y se incubaron tanto con AnnexinV-FITC como con yoduro de propidio y se analizaron inmediatamente utilizando el citómetro de flujo BD FACS Aria IIIu (Becton Dickinson, BD Bioscience, RU).

11. ENSAYO CLONOGÉNICO

Después del tratamiento con 1400W 20 μ M durante la noche o la transfección con siNOS2, las células se sembraron en placas de 6 pocillos a una concentración de 1.000 células/pocillo y se dejaron crecer en condiciones estándar durante 14 días más. Para realizar la fijación y tinción de las colonias, se retiró el medio y las células se incubaron durante 5 minutos en metanol al 50% con solución violeta cristal oxalato al 0,5%. Se contaron las colonias mayores de 50 células.

12. ENSAYO ALDEFLUOR

Para detectar la actividad ALDH1 en células viables se realizó el ensayo Aldefluor siguiendo las indicaciones de fábrica (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canadá) con algunas modificaciones. Después de tratarlas con 1400W o transfección con siNOS2 durante 72 h, fueron recogidas, suspendidas en tampón de ensayo Aldefluor que contiene sustrato ALDH1 (BAAA, 1 μ mol/L por 1×10^6 células) e incubadas durante 45 minutos a 37°C en oscuridad. Se utilizó detilaminobezaldehído (DEAB) como inhibidor ALDH1 para activar los receptores de ALDH1. Las células que expresaban ALDH1 con una fluorescencia brillante fueron detectadas en el canal fluorescente verde (520–540 nm) utilizando citometría de flujo BD FACS Aria III (Becton Dickinson, BD Biosciences, RU).

13. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE CMCs

Los niveles de marcadores de superficie celular de CMC se determinaron con anticuerpos humanos anti-CD44-PE, anti-CD326-FITC y anti-CD133-APC (Biolegend, San Diego, CA, EEUU). Tras 30 minutos de incubación en oscuridad y a una temperatura de 4°C, las muestras se analizaron con un equipo de citometría de flujo BD FACS Aria III flow cytometry (Becton Dickinson,

BD Biosciences) en el Servicio de Investigación en Citometría y Microscopía del Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada (ibs.GRANADA).

14. ENSAYO DE FORMACIÓN DE ESFERAS

Para analizar la capacidad de autorrenovación de las células, 1000 células de la población total del cultivo fue resuspendida en medio de cultivo de esferas (DMEM:F12, 1% de penicilina/estreptomicina, B27, 10 µg/mL de ITS, 1 µg/mL de Hidrocortisona, 4 ng/mL de Heparina, 10 ng/mL de EGF, 20 ng/mL de FGF) en placas de 96 pocillos previamente recubiertas con poli-2-hidroxietil metacrilato (Merk, Darmstadt, Alemania). Las esferas mayores de 75 µm de diámetro se contaron a los 4 días mediante microscopía óptica en el Servicio de Investigación en Citometría y Microscopía del Instituto de Investigaciones Biosanitarias de Granada (ibs.GRANADA).

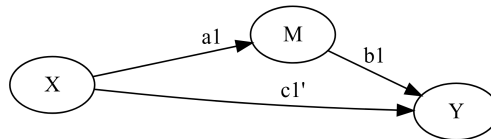
15. MICROSCOPIA DE INMUNOFLUORESCENCIA

Las células se sembraron en placas de 24 pocillos con cubreobjetos, se dejaron adherir durante la noche y se trataron con 1400 W 20 µM durante 72 h. Tras esto, las células se fijaron en formalina helada al 4 % durante 15 minutos. Las células fijadas se lavaron tres veces con PBS-Tween 20 0,1 % y se incubaron a 4 °C con anticuerpos primarios contra PARP-1 (Abcam, Cambridge, Reino Unido) (dilución 1:100) e iNOS (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, EEUU) (dilución 1:50) durante la noche. Al día siguiente, las células se lavaron tres veces con PBS-Tween 20 0,1% y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios (IgG conjugada con Alexa Fluor 555; IgG conjugada con Alexa Fluor 488 Molecular Probes, OR, EEUU). La tinción nuclear se realizó incubando las células con Hoechst 3342 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, EEUU). La inmunotinción se visualizó con un microscopio ZEISS Celldiscoverer 7 (Carl Zeiss Microscopy, GmbH, Alemania) y se analizó con el software Zen (edición azul) (Carl Zeiss Microscopy, GmbH, Alemania).

16. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

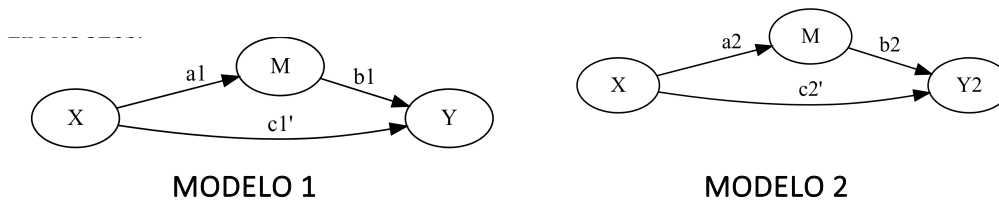
El análisis de las muestras de pacientes se realizó con el programa SPSS versión 15.0 para Windows (IBM, Chicago, EEUU). Para la estadística descriptiva se utilizó la mediana y el rango intercuartílico (RIQ) para variables continuas y el número de pacientes y el porcentaje para las variables categóricas. Los niveles de ARNm de tejido tumoral y no tumoral adyacente se compararon mediante la prueba T de Wilcoxon para muestras pareadas. Para cada paciente, los niveles de ARNm en muestras tumorales fueron normalizadas usando los niveles en muestras de mucosa normal del mismo paciente. La asociación entre las características clínico-patológicas de los pacientes con CCR y la expresión génica se analizó con las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney. Se utilizó el test de Pearson para el análisis de correlación después de transformar las variables aplicando logaritmos naturales. La prueba exacta de Fisher se utilizó para comparar los niveles de PARP-1 e iNOS y los marcadores de CMCs. La expresión alta o baja de ARNm de cada gen se determinó en función de la mediana de nuestra población de estudio. Los valores de p inferiores a 0.05 se consideraron significativos y los niveles de confianza se establecieron en el 95 %.

Para el análisis de mediación se utilizó la macro PROCESS (versión 3.3) para SPSS. El modelo de trabajo propuesto inicialmente fue el siguiente:

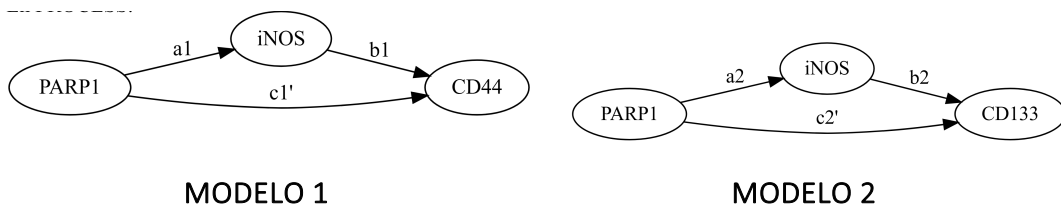


En el que X corresponde a PARP-1, M corresponde a iNOS e Y corresponde a los marcadores de CMCs. Nuestro modelo corresponde con el MODELO 1 propuesto por la macro. En este modelo, c' representa el efecto directo, el producto $a*b$ representa el efecto indirecto y el efecto total vendría dado por la suma $c' + a*b$.

Teniendo en cuenta que en nuestro estudio en pacientes se ha analizado la expresión de los marcadores de CMCs CD44 y CD133, la solución se ha obtenido utilizando 2 modelos:

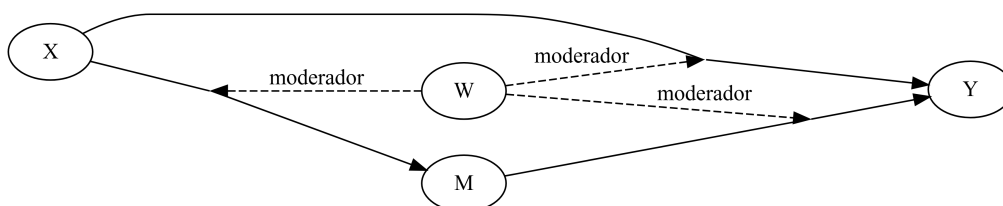


Que con nuestras variables de estudio quedarían con se muestra:

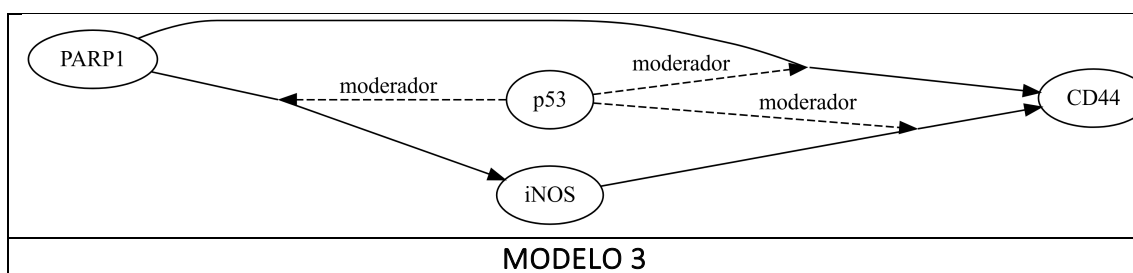


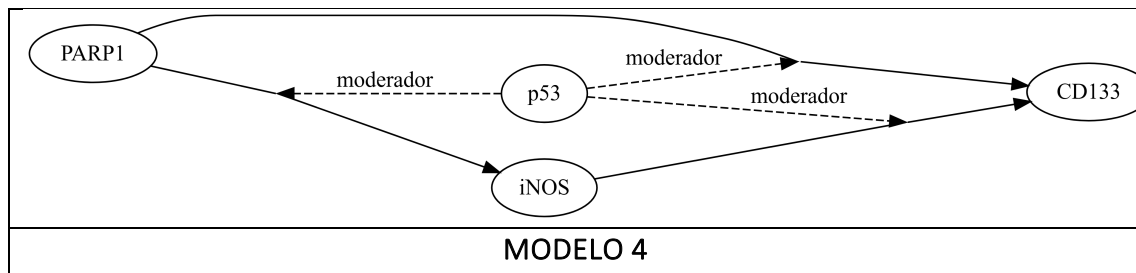
El tamaño del efecto se analizó con la variable u representa la varianza en Y explicada conjuntamente por M y X que corrige la correlación falsa inducida por el ordenamiento de las variables. Para la obtención de los intervalos de confianza se ha utilizado bootstrap 500.

Para el análisis de mediación moderada por p53, el modelo de trabajo propuesto fue:



Teniendo en cuenta nuestras variables, los modelos de estudio que hemos utilizado son:





Para la obtención de los intervalos de confianza se ha utilizado bootstrap 5000.

Todos los experimentos in vitro se realizaron al menos por triplicado y los datos se expresaron como media $\pm$ DE. Después de la normalización de las variables, se realizó la comparación mediante una prueba T o un ANOVA de 2 vías con el software Graphpad Prism 7.0 (GraphPad, La Jolla, EEUU)

RESULTADOS

1. EXPRESIÓN DE iNOS EN MUCOSA NO TUMORAL FRENTE A MUCOSA TUMORAL SEGÚN EL ESTADO DE P53

En este estudio se analizó la expresión del ARNm de iNOS en tejido tumoral y no tumoral de pacientes con CCR. Teniendo en cuenta todos los casos analizados, se observó que la expresión de iNOS fue mayor en muestras tumorales frente a muestras de tejido sano ($P < 0.0001$). Al estratificar los pacientes en función del estado de p53, se objetivó que la expresión de iNOS fue mayor en tejido tumoral cuando p53 no presentaba mutaciones ($P < 0.006$), pero cuando p53 estaba mutado no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.238$). Estos mismos hallazgos se evidenciaron al analizar la expresión de PARP-1, cuya expresión se encontró mucho más elevada en tejido tumoral que en tejido no tumoral adyacente ($P < 0.0001$). Sin embargo, la expresión de PARP-1 fue significativamente mayor en tejido tumoral que en tejido no tumoral en casos con p53 salvaje ($P < 0.0001$) y p53 mutado ($P < 0.002$) (Tabla 9).

Tabla 9. Expresión de PARP-1 e iNOS en muestras no tumorales y tumorales de todos los pacientes incluidos en el estudio y en pacientes estratificados por estado salvaje y mutado de p53.

		TODOS LOS CASOS		p53 SALVAJE		p53 MUTADO	
		Mediana $\pm$ RIC ¹	P ²	Mediana $\pm$ RIC ¹	P ²	Mediana $\pm$ RIC ¹	P ²
iNOS	Tumoral	180 (104-266)	<0.0001	44 (14-116)	0.006	37 (13-81)	ns
	No tumoral	72 (52-483)		27 (13-49)		30 (12-75)	
PARP-1	Tumoral	985 (1103-4936)	<0.0001	878 (376-1643)	0.001	770 (416-1775)	0.013
	No tumoral	876 (791-5538)		476 (141-1198)		686 (207-1181)	

¹LC: límites de confianza. El análisis se realizó utilizando test no paramétricos para muestras relacionadas.

Por otro lado, se analizó la correlación entre la expresión de iNOS y PARP-1 en las muestras de pacientes incluidos en el estudio, observando una correlación positiva en todos los casos analizados e independiente del estado de p53 (Figura 13).

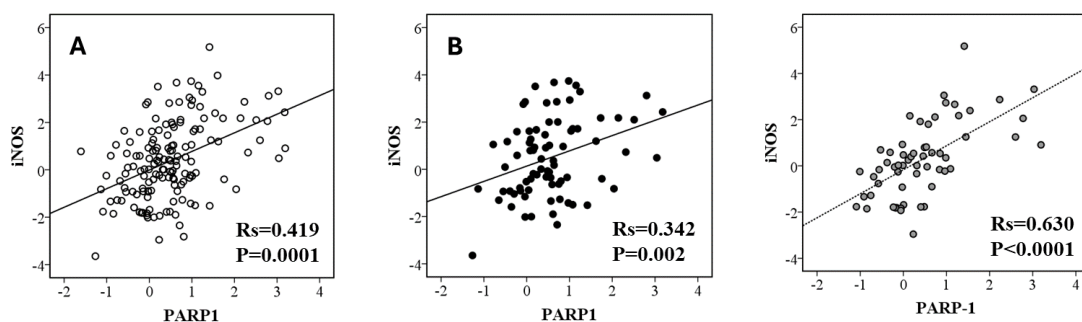


Figura 13. Correlaciones entre iNOS y PARP-1 en las muestras de los pacientes incluidos en el estudio (A) en todos los casos; (B) en los casos con p53 salvaje; (C) en los casos con p53 mutado.

2. RELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE iNOS CON LAS VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE LOS PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO.

Para analizar el papel de iNOS en la progresión del CCR (Tabla 10). se analizó la relación de la expresión del ARNm del gen con diferentes variables clínico-patológicas de los pacientes incluidos en el estudio. Como se muestra en la tabla 10, la expresión del ARNm de la iNOS aumentó de forma significativa en tumores moderadamente y pobremente diferenciados frente a aquellos bien diferenciados, aunque únicamente en los casos que poseían el gen P53 en estado salvaje. Además, la expresión de iNOS disminuyó a medida que aumentó el tamaño e infiltración local del tumor en los casos que albergaban un p53 de tipo salvaje. No se encontró ningún tipo de relación significativa con parámetros como la edad, el sexo, la localización tumoral (colon o recto), el número de ganglios afectados o el estadio TNM.

Tabla 10. Relación entre la expresión de iNOS y las características clínico-patológicas de los pacientes incluidos en el estudio según el estado de p53.

Características		Todos ¹		p53 salvaje ²		p53 mutado ³	
		Mediana ± RIQ ⁵	P	Mediana ± RIQ ⁵	P	Mediana ± RIQ ⁵	P
Edad (años)* ⁴	<72	1.44 (0.41-3.49)	0.978	1.68 (0.41-4.88)	0.348	1.15 (0.28-2.59)	0.331
	≥72	1.10 (0.33-3.49)		1.41 (0.39-3.55)		0.87 (0.19-2.30)	
Sexo*	Varón	1.41 (0.41-3.29)	0.827	1.63 (0.41-3.98)	0.631	1.14 (0.37-2.82)	0.281
	Mujer	1.22 (0.29-3.64)		0.80 (0.29-4.33)		0.96 (0.17-1.96)	
Localización*	Colon	1.35 (0.40-3.50)	0.541	1.63 (0.39-4.82)	0.342	1.02 (0.27-2.31)	0.957
	Recto	1.01 (0.40-3.29)		0.67 (0.54-2.89)		1.01 (0.10-13.17)	
GD* ^{&}	Bien	1.06 (0.41-2.62)	0.189	1.10 (0.42-2.74)	0.020	1.03 (0.39-3.04)	0.485
	Moderado	1.17 (0.38-3.16)		1.76 (0.39-5.20)		0.96 (0.17-1.63)	
	Pobre	2.82 (0.41-6.65)		2.39 (0.38-6.41)		1.63 (0.34-16.23)	
Estadio T	T1+T2	1.37 (0.43-7.08)	0.034	5.32 (0.19-13.10)	0.004	0.92 (0.43-5.04)	0.079
	T3	1.03 (0.27-3.12)		1.37 (0.40-3.25)		0.93 (0.17-2.31)	
	T4	1.76 (1.04-5.41)		2.04 (0.59-7.41)		1.60 (1.29-4.77)	
Afectación ganglionar (N)* [#]	Ausente	1.63 (0.44-3.64)	0.827	1.72 (0.44-3.37)	0.150	0.95 (0.22-2.24)	0.877
	Presente	1.17 (0.37-3.25)		1.37 (0.33-7.20)		1.22 (0.35-3.49)	
Estadio pTNM *	Estadio I+II	1.41 (0.47-3.26)	0.408	1.80 (0.67-3.29)	0.562	0.95 (0.26-2.21)	0.526
	Estadio III+IV	1.24 (0.37-3.70)		1.19 (0.31-5.56)		1.22 (0.24-3.5)	

¹Todos los casos estudiados; ²Tumores con p53 salvaje; ³tumores con p53 mutado *Análisis realizado usando el test no paramétrico U de Mann-Whitney para muestras independientes o †el test Kruskal-Wallis para muestras independientes; #Afectación ganglionar; &Grado de diferenciación.; ⁴Dicotomizado por la mediana; ⁵Rango intercuartílico.

En el caso de PARP-1, según resultados publicados previamente por nuestro grupo, su expresión se correlaciona con el grado de diferenciación tumoral, también en tumores p53 de tipo salvaje (Puentes-Pardo et al., 2023). Estos resultados también se han encontrado en la subcohorte utilizada para este estudio (Tabla 11).

Tabla 11.- Relación entre la expresión de PARP-1 y las características clínico-patológicas de los pacientes incluidos en el estudio según el estado de p53

		All ¹		wtp53 ²		mtp53 ³	
Characteristic		Median $\pm$ CL ⁵	P	Median $\pm$ CL ⁵	P	Median $\pm$ CL ⁵	P
Age (y)* ⁴	<72	1.41 (0.92-2.34)	0.825	1.41 (0.99-2.10)	0.763	1.06 (0.81-1.72)	0.588
	$\geq$ 72	1.56 (0.84-2.25)		1.33 (0.96-2.10)		1.70 (0.89-1.76)	
Gender*	Male	1.54 (0.91-2.63)	0.245	1.40 (0.94-2.46)	0.698	1.36 (0.81-2.33)	0.250
	Female	1.38 (0.83-2.11)		1.42 (0.96-2.04)		1.25 (0.9-1.76)	
Location*	Colon	1.50 (0.89-2.25)	0.954	1.33 (0.94-2.05)	0.985	1.23 (0.81-2.33)	0.514
	Rectum	1.41 (0.94-5.06)		1.56 (1.01-5.06)		1.66 (0.10-9.05)	
DG†&	Well	1.17 (0.64-2.32)	0.030	1.10 (0.64-1.27)	0.007	1.20 (0.68-2.96)	0.934
	Moderately	1.63 (1.00-2.34)		1.70 (1.05-2.69)		1.36 (0.84-1.69)	
	Poor	1.60 (0.99-1.77)		1.60 (1.05-1.76)		1.45 (0.99-3.61)	
T stage	T1+T2	1.73 (0.88-2.88)	0.109	1.47 (1.13-2.71)	0.075	1.93 (0.66-10.88)	0.426
	T3	1.48 (0.89-2.24)		1.54 (0.87-2.27)		1.23 (0.85-2.39)	
	T4	1.90 (1.23-2.76)		2.10 (1.62-4.65)		1.75 (1.22-3.35)	
LNM*#	Absent	1.58 (0.82-2.34)	0.823	1.26 (1.01-2.46)	0.823	1.63 (0.79-2.31)	0.920
	Present	1.46 (0.92-2.04)		1.54 (0.92-2.02)		1.19 (0.87-2.14)	
pTNM Stage*	Stage I+II	1.40 (0.81-2.19)	0.838	1.23 (0.88-2.21)	1.000	1.63 (0.78-2.18)	0.713
	Stage III+IV	1.52 (0.93-2.29)		1.56 (0.96-2.04)		1.16 (0.86-2.34)	

¹Todos los casos estudiados; ²Tumores con p53 salvaje; ³tumores con p53 mutado *Análisis realizado usando el test no paramétrico U de Mann-Whitney para muestras independientes o †el test Kruskal-Wallis para muestras independientes; #Afectación ganglionar; &Grado de diferenciación.; ⁴Dicotomizado por la mediana; ⁵Rango intercuartílico.

3. RELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE iNOS CON LOS MARCADORES DE CMCs EN EL CCR

Debido a la asociación observada entre iNOS y el grado de diferenciación en los tumores con p53 salvaje. se estudió la correlación entre la expresión de iNOS y los marcadores de CMCs (CD44 y CD133) en nuestra cohorte de estudio (Figura 14). Se observó una correlación positiva entre iNOS y los marcadores analizados. independiente del estado de p53, salvo en el caso de los casos con p53 mutado y CD133, que no se encontró correlación (Figura 14F).

Teniendo en cuenta nuestra hipótesis de trabajo, también se analizaron las correlaciones entre la expresión de PARP-1 y estos mismos marcadores. En este caso, encontramos una correlación positiva entre PARP-1 y CD44 y CD133, en todos los casos y, por tanto, independiente de p53 (Figura 15).

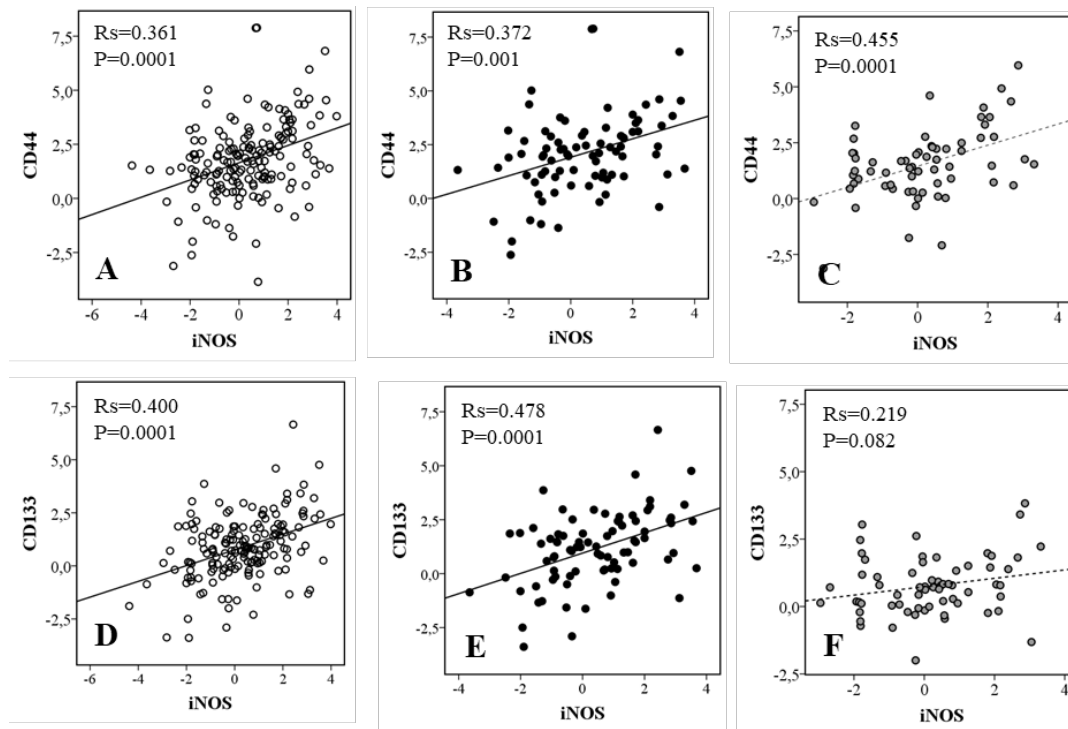


Figura 14. Correlación entre la expresión de iNOS y CD44 en (A) todos los casos. (B) los casos con p53 salvaje. y (C) los casos con p53 mutado; y entre la expresión de iNOS y CD133 en (D) todos los casos. (E) los casos con p53 salvaje. y (F) los casos con p53 mutado. La correlación se analizó a través del coeficiente de correlación de Spearman.

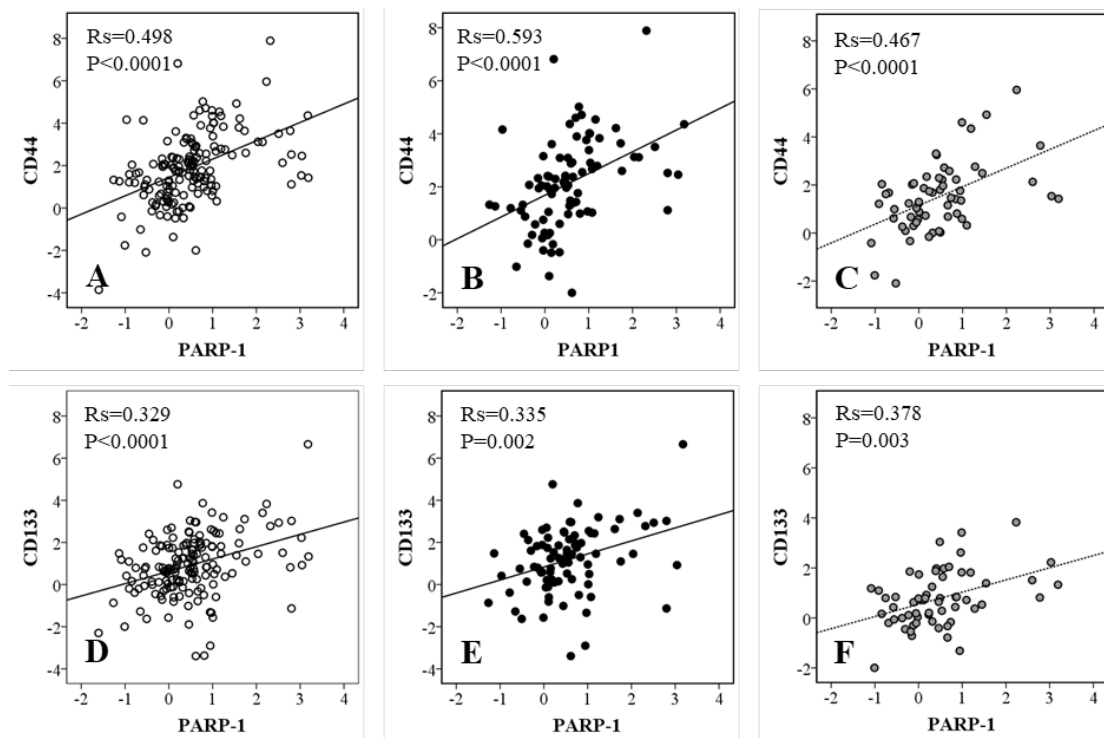


Figura 15. Correlación entre la expresión de PARP-1 y CD44 en (A) todos los casos. (B) los casos con p53 salvaje. y (C) los casos con p53 mutado; y entre la expresión de PARP-1 y CD133 en (D) todos los casos. (E) los casos con p53 salvaje. y (F) los casos con p53 mutado. La correlación se analizó a través del coeficiente de correlación de Spearman.

Dado que a nivel práctico la identificación de CMCs es compleja, la aproximación más precisa es a través de la combinación de diferentes características de éstas. Para ello, y para estudiar de manera más exacta la relación de iNOS con las CMCs en el tumor, se hizo una estratificación adicional de los pacientes en CD44_{alto}CD133_{alto} y CD44_{bajo}CD133_{bajo}, según los valores de la mediana (Tabla 12). Como se puede observar, los casos con expresión alta de iNOS también presentaron una expresión mayor de marcadores de CMCs en todas las muestras y en tumores con p53 salvaje. Sin embargo, esto no sucedió en los casos con p53 mutado. Estos resultados son similares a los encontrados para PARP-1 en esta subcohorte, y a los publicados previamente por nuestro grupo (Puentes-Pardo et al., 2023).

Tabla 12. Relación de PARP-1 e iNOS con la expresión de marcadores CSC en nuestra cohorte de pacientes con CCR según estado de p53.

	Todos los casos ¹			p53 salvaje ²			p53 mutado ³		
	iNOS			iNOS			iNOS		
	Baja	Alta	P*	Baja	Alta	P*	Baja	Alta	P*
CD133 _{bajo} CD44 _{bajo}	50 (59.5)	34 (40.5)	0.002	21 (63.6)	12 (36.4)	0.014	23 (63.9)	13 (36.1)	ns
CD133 _{alto} CD44 _{alto}	14 (30.4)	32 (69.6)		9 (32.1)	19 (67.9)		5 (38.5)	8 (61.5)	
	PARP-1			PARP-1			PARP-1		
	Baja	Alta	P*	Baja	Alta	P*	Baja	Alta	P*
CD133 _{bajo} CD44 _{bajo}	30 (61.2)	19 (38.8)	<0.001	17 (53.1)	15 (46.9)	<0.001	13 (76.5)	4 (23.5)	ns
CD133 _{alto} CD44 _{alto}	13 (22.4)	45 (77.6)		6 (14.0)	37 (86.0)		7 (46.7)	8 (53.3)	

* Las diferencias se analizaron usando el test Chi-cuadrado o el test exacto de Fisher; ¹Todos los casos estudiados; ² tumores con p53 salvaje; ³tumores con p53 mutado.

La representación gráfica de la expresión relativa de iNOS entre aquellos tumores con una elevada o baja expresión de los marcadores CD44 y CD133, en todos los casos y según el estado de p53 se muestra en la Figura 16.

Al tener en cuenta todos los tumores, la expresión de iNOS en los tumores CD44_{alto}CD133_{alto} es significativamente mayor que en los tumores CD44_{bajo}CD133_{bajo} ($p<0.0001$) (Figura 16A). Estas diferencias se mantienen en los tumores que presentan p53 en estado salvaje ($p<0.0001$) (Figura 16B). Sin embargo, en el caso de los tumores con p53 mutado, aunque se observa una mayor expresión de iNOS en los tumores con elevada expresión de CD44 y CD133, ésta no es significativa ($p=0.183$) (Figura 16B). Estos resultados son similares a los obtenidos en el caso de Parp-1, ya que solo aparecen diferencias significativas en el total de casos y en aquellos con p53 salvaje, con mayor expresión del ARNm en los tumores CD44_{alto}CD133_{alto} (Figura 16C y 16D).

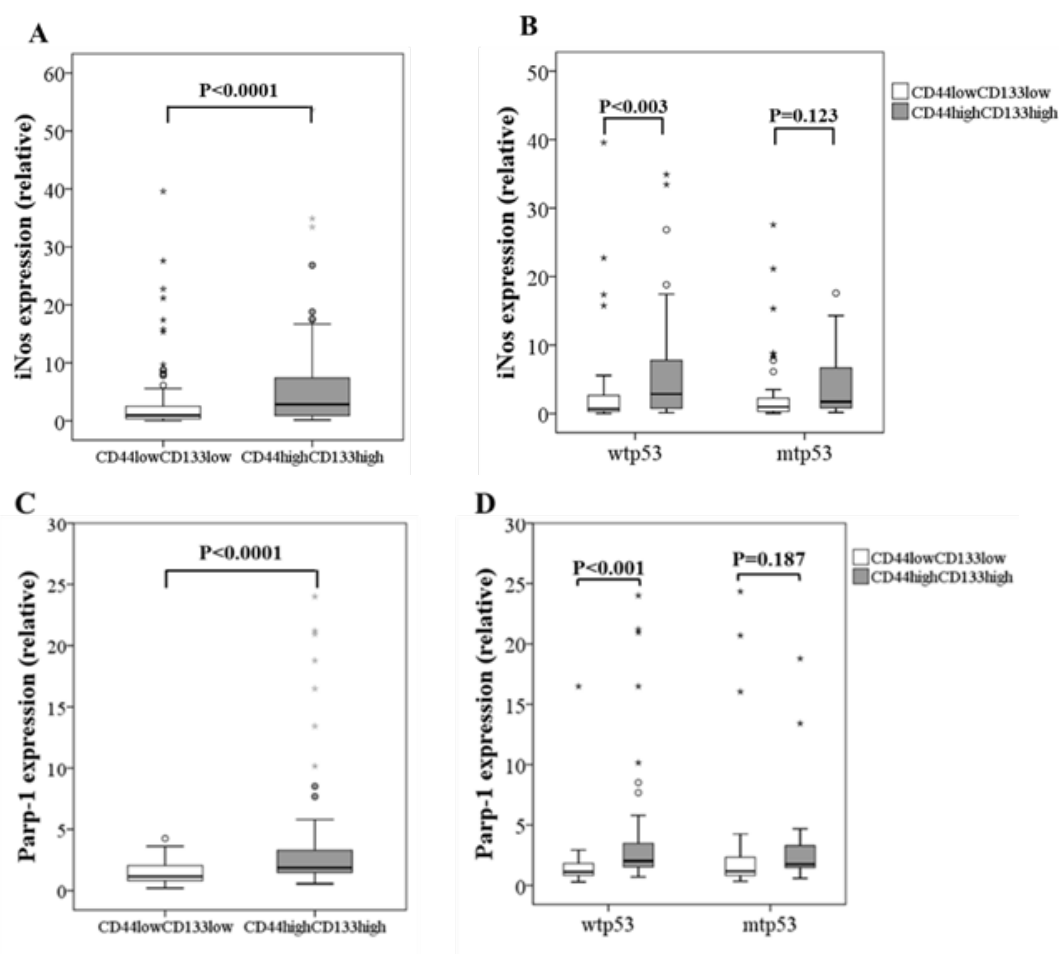


Figura 16. Diagramas de caja mostrando la expresión de iNOS y PARP-1 en los tumores CD44_{bajo}CD133_{bajo} y CD44_{alto}CD133_{alto} en (A) y (C) todos los casos. (B) y (D) en tumores p53 salvaje (WTP53) y mutados (MUTp53). Las comparaciones se realizaron usando un test no paramétrico. ° representa valores atípicos 1.5 veces mayores que el rango intercuartílico; * representa los valores atípicos 3 veces mayores que el rango intercuartílico.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, realizamos un análisis de estadístico de mediación utilizando la macro PROCESS para SPSS para determinar de forma teórica si la iNOS actúa como intermediario en los efectos de PARP-1 sobre el fenotipo de las CMCs. Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 13. El efecto directo es una medida del impacto directo de la sobreexpresión de PARP-1 sobre los marcadores de CMCs. El efecto indirecto describe la mediación de iNOS en el impacto de la sobreexpresión de PARP-1 sobre los marcadores de CMCs. El efecto total representa la suma de los efectos directo e indirecto, según el modelo de mediación utilizado, descrito en la sección “Materiales y Métodos”. Los datos de la tabla representan los datos de correlación directos (coeficientes a y b), los datos de correlación obtenidos tras el análisis de mediación, así como los límites de confianza del efecto indirecto (o efecto mediado). Como puede observarse, el efecto mediado por iNOS es significativo, aunque tan solo para CD133.

Tabla 13. Resultados del análisis de mediación causal por iNOS sobre los marcadores CD44 y CD133

	a	b	Total	Directo	Indirecto	IC ¹	
PARP1-> iNOS-> CD44	0.485	0.163	0.487	0.408	0.079	-0.029	0.183
PARP1-> iNOS-> CD133	0.485	0.265	0.350	0.222	0.128	0.028	0.231

¹ IC: Intervalos de confianza

Puesto que p53 podría cambiar el efecto mediador de iNOS en el impacto de la sobreexpresión de PARP-1 en los marcadores de CMCs, para tenerlo en cuenta en nuestro modelo estadístico se ha realizado un análisis de mediación moderada (Tabla 14). En este caso, el resultado del análisis indica que p53 actúa como moderador sobre CD133 cuando se encuentra en estado salvaje.

Tabla 14. Resultados del análisis de mediación causal por iNOS sobre los marcadores CD44 y CD133, moderada por el estado de p53

Casos p53 mutados			
	Indirecto	Límites de Confianza	
PARP1 -> iNOS -> CD44	0.124	-0.210	0.421
PARP1 -> iNOS -> CD133	0.024	-0.279	0.309

Casos p53 salvaje			
	Indirecto	Límites de Confianza	
PARP1 -> iNOS -> CD44	0.120	-0.080	0.345
PARP1 -> iNOS -> CD133	0.236	0.057	0.464

4. EFECTOS DE LA INHIBICIÓN DEL NO PRODUCIDO POR iNOS SOBRE EL CRECIMIENTO Y VIABILIDAD CELULAR INDUCIDO POR PARP EN EL CCR. ESTUDIOS IN VITRO.

Para investigar más a fondo si el NO sintetizado por la iNOS actuaba como intermediario en la regulación de las propiedades de las células madre por PARP-1 en el CCR, se utilizó el plásmido pCMV6-PARP1 para sobreexpresar de forma estable PARP-1 en las líneas celulares HCT-116 (p53 de tipo salvaje) y HT-29 (p53 mutado). Como control se usó el plásmido vacío pCMV6. Una vez que fue verificada la sobreexpresión de PARP-1 (Figura 17A), los clones estables (HCT-116 P y HT-29 P) y los controles (HCT-116 V y HT-29 V) se transfectaron con un siRNA-iNOS/NOS2 (siNOS2) disponible comercialmente (ver apartado de material y métodos para más detalle) para inhibir la expresión del gen iNOS, por lo tanto, evitar la síntesis de la proteína iNOS y la liberación de NO (Figura 17B y 17C). Como se muestra en la Figura 17A, la sobreexpresión de PARP-1 condujo a una mayor expresión de iNOS en ambas líneas celulares. Como se esperaba, la inhibición de la expresión (Figura 17A) y la actividad (Figura 17B) de iNOS con siNOS2 produjo una disminución de la expresión de PARP-1 en el control y en las células que sobreexpresaban PARP-1. El tratamiento de las células con 1400W 20 μ M (un inhibidor selectivo de iNOS) inhibió la producción de NO con una eficiencia similar a la obtenida después de la transfección con siNOS2 (Figura 17B). Se detectó PARP-1 rota (85 kDa) en HCT-116 V (Veh) no tratadas y en HCT-116 P después de la transfección con siNOS2, aunque muy débilmente. Esta forma de PARP-1 no se detectó en las células derivadas de HT-29 (Figura 17A).

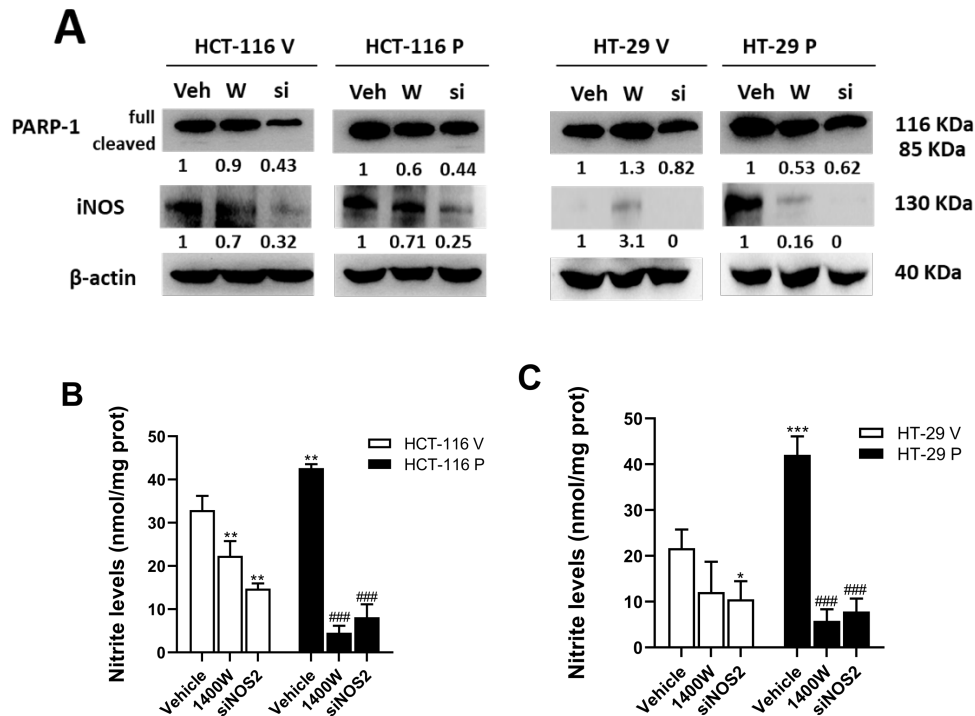


Figura 17. La sobreexpresión de PARP-1 induce la expresión de iNOS y la producción de NO en células de CCR. (A) Expresión proteica de iNOS y PARP-1 en HCT-116 y HT-29 después de la sobreexpresión de PARP-1 (HCT-116 P y HT-29 P, respectivamente) y en células simuladas transfectadas (HCT-116 V y HT-29 V, respectivamente). Se utilizó β-actina como marcador interno. Veh: células no tratadas; W: tratamiento con 20 μM 1400W; si: transfección con siNOS2. (B) Actividad de iNOS, medida como niveles de nitrito en HCT-116 después de la sobreexpresión de PARP-1 (HCT-116 P) y en células transfectadas simuladas (HCT-116 V). (C) Actividad de iNOS, medida como niveles de nitrito en células HT-29 después de la sobreexpresión de PARP-1 (HT-29 P) y en células simuladas transfectadas (HT-29 V) *** P<0.001 vs HCT-116 V; ** P<0.01 vs HCT-116 V; * P<0.05 vs HCT-116 V; ### P<0.001 vs HCT-116 P.

Para analizar si iNOS y PARP-1 se expresaban simultáneamente en las células utilizadas en nuestro modelo in vitro, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia en células control (HCT-116 V y HT-29 V) y en células con sobreexpresión de PARP-1 (HCT-116 P y HT-29 P) antes y después del tratamiento con 20 μM 1400W. Nuestros resultados revelaron que ambas proteínas se expresaron en controles y en células que sobreexpresaban PARP-1, independientemente del tratamiento con el inhibidor selectivo de iNOS y del estado de p53 (Figura 18A y 18B).

Después de su sobreexpresión, PARP-1 se acumuló en el núcleo tanto de las células p53 de tipo salvaje como de las células p53 mutadas, mientras que la expresión de iNOS aumentó tanto en el núcleo como en el citoplasma, de forma independiente al estado de p53 (Figura 18C-18D).

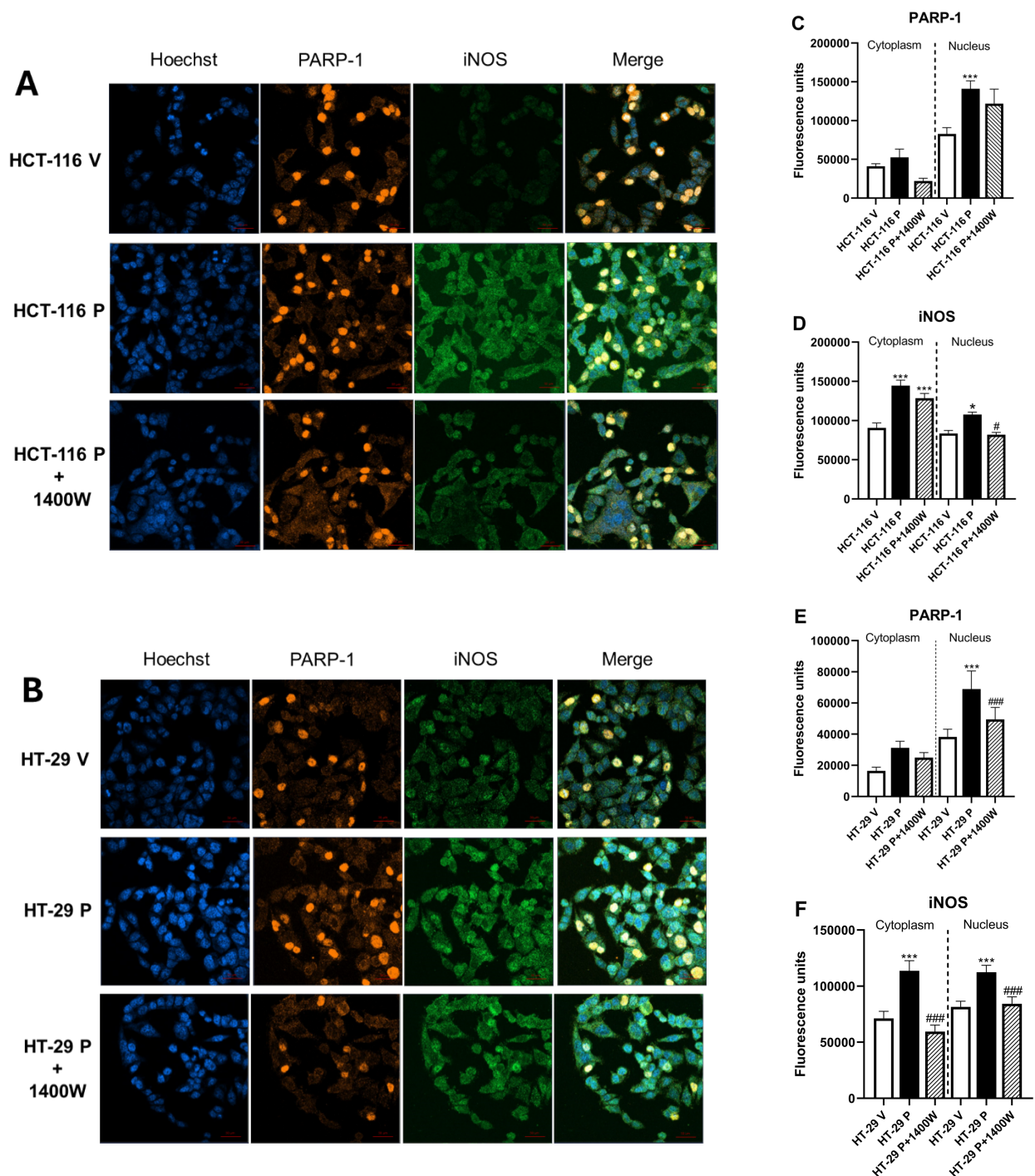
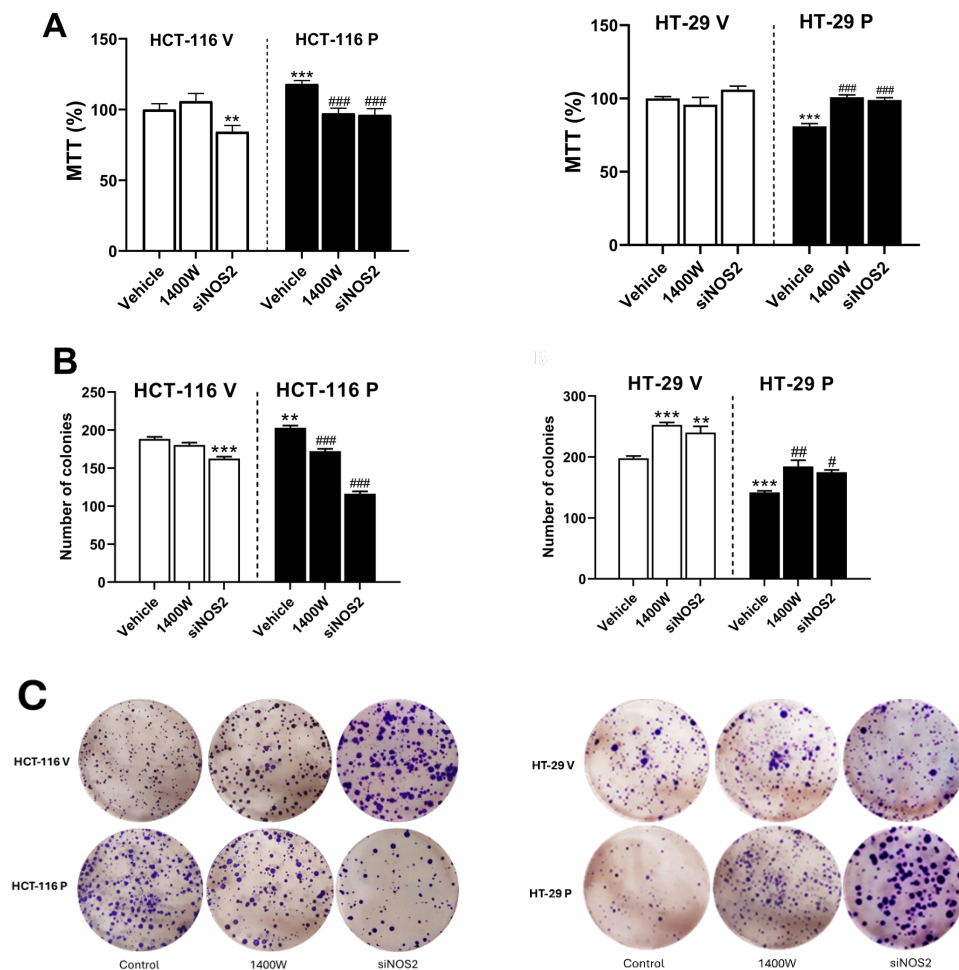


Figura 18. Las proteínas iNOS y PARP-1 se expresan simultáneamente en células CCR. Se sembraron células de control y células que sobreexpresaban PARP-1 de (A) HCT-116 y (B) HT-29 y solo las células que sobreexpresaban PARP-1 se trataron durante 72 h con vehículo o 20 μ M 1400W. Luego, las células se marcaron con anticuerpos anti-iNOS o anti-PARP-1 como se describe en la sección "Materiales y métodos" y se visualizaron con un microscopio ZEISS Celldiscoverer 7. Las imágenes se analizaron con el software Zen (edición azul), obteniendo datos de fluorescencia de (C) PARP-1 y (D) iNOS diferencialmente en citoplasma y núcleo en HCT-116 V y HCT-116 P. De manera similar, obtuvimos datos de fluorescencia de (E) PARP-1 y (F) iNOS, distintivamente en citoplasma y núcleo en HT-29 V y HT-29 P. Los datos representan la media $\pm$ S.E.M de dos experimentos realizados por duplicado. * $P < 0.05$ vs V; *** $P < 0.001$ vs V; # $P < 0.05$ vs P; ### $P < 0.01$ vs P.

A continuación, se estudió el crecimiento y la viabilidad celular tras la sobreexpresión de PARP-1 y la posterior inhibición de la producción de NO (Figura 19A). La sobreexpresión de PARP-1 condujo a un aumento del crecimiento en HCT-116 P mientras que se redujo en HT-29 P frente a HCT-116V y HT-29V no tratados, respectivamente. El tratamiento con 20 μ M 1400W o siRNA2 restauró el crecimiento celular a valores similares a los encontrados en células control no tratadas en ambos casos.

También se realizó un ensayo clonogénico durante 10 días para evaluar los efectos a largo plazo de la sobreexpresión de PARP-1 y el posterior tratamiento con 1400W o siNOS2 (Figura 19B). Los resultados obtenidos fueron casi idénticos a los encontrados en el ensayo MTT.

Además de los efectos sobre el crecimiento celular, se analizó la muerte celular inducida mediante apoptosis utilizando anexina V y yoduro de propidio y analizando las poblaciones celulares teñidas mediante citometría de flujo (Figura 19C). En HCT-116 V, el tratamiento con 1400W o siNOS2 no indujo cambios en la apoptosis. Sin embargo, se encontró un aumento de muerte celular en las células HCT-116 P después del tratamiento con siNOS2. Curiosamente, la sobreexpresión de PARP-1 favoreció un aumento de la muerte celular por apoptosis en las células HT-29 P. El tratamiento con 1400W y siNOS2 indujo efectos opuestos en las células HT-29 V y HT-29 P, aumentando la muerte celular en HT-29 V mientras que la redujo en HT-29 P (Figura 19C).



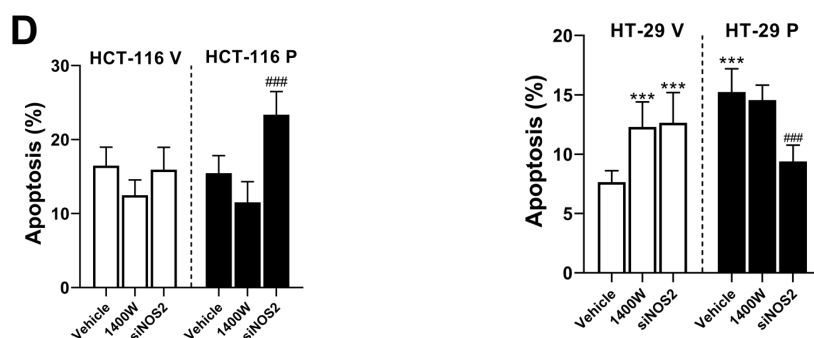


Figura 19. Regulación del crecimiento y viabilidad celular por iNOS en células que sobreexpresan PARP-1. (A) El crecimiento celular de los controles y las células que sobreexpresan PARP-1 de HCT-116 y HT-29, antes y después del tratamiento con vehículo, 20 μ M 1400W, o transfectadas con siNOS2. se analizó con el ensayo MTT. Los datos representan la media $\pm$ DE. (B) Representaciones gráficas de los resultados del ensayo de colonias de los controles y las células que sobreexpresan PARP-1 de HCT-116 y HT-29, antes y después del tratamiento con vehículo, 20 μ M 1400W, o transfectadas con siNOS2 como se describe en la sección Materiales y métodos. Los resultados se presentan como media $\pm$ DE. (C) Ejemplo representativo del ensayo de formación de colonias. (D) Porcentaje de apoptosis en controles y células que sobreexpresan PARP-1 de HCT-116 y HT-29, antes y después del tratamiento con vehículo, 20 μ M 1400W, o transfectadas con siNOS2. Los resultados se presentan como media $\pm$ DE. ** $P < 0.01$ vs HCT-116 V (vehículo) o HT-29 V (vehículo); *** $P < 0.001$ vs HCT-116 V (vehículo) o HT-29 V (vehículo); # $P < 0.05$ vs HCT-116 P (vehículo) o HT-29 P (vehículo); ## $P < 0.01$ vs HCT-116 P (vehículo) o HT-29 P (vehículo); ### $P < 0.001$ vs HCT-116 P (vehículo) o HT-29 P (vehículo).

5. EFECTO DE LA INHIBICIÓN DEL NO SINTETIZADO POR INOS SOBRE LA REGULACIÓN DE PROPIEDADES DE LAS CÉLULAS MADRE CANCERÍGENAS POR PARP-1 EN CCR. ESTUDIOS IN VITRO.

Para investigar si el NO sintetizado por la iNOS actuaba como intermediario en la regulación de las propiedades de las CMCs por PARP-1 en el CCR, primero analizamos el porcentaje de la subpoblación con actividad positiva de aldehído deshidrogenasa 1 (ALDH1+). Como se esperaba, la sobreexpresión de PARP-1 en células HCT-116 (HCT-116 P) aumentó la subpoblación ALDH1+. La transfección con siNOS2 restableció los niveles de esta subpoblación a los encontrados en las células control transfectadas (HCT-116 V). En este caso, el tratamiento de las células HCT-116 P con 20 μ M 1400W disminuyó significativamente la subpoblación ALDH1+, aunque fue menos eficaz que el silenciamiento génico de iNOS (Figura 20A). La transfección de células HCT-116 V con siNOS2 también indujo una disminución en la subpoblación ALDH1+ (Figura 20A). Por otro lado, la sobreexpresión de PARP-1 en células HT-29 (HT-29 P) condujo a una disminución en el porcentaje de células ALDH1+, y el tratamiento con 1400W o siNOS2 restauró su nivel (Figura 20B). Los gráficos representativos de cada situación analizada se resumen en la Figura 21.

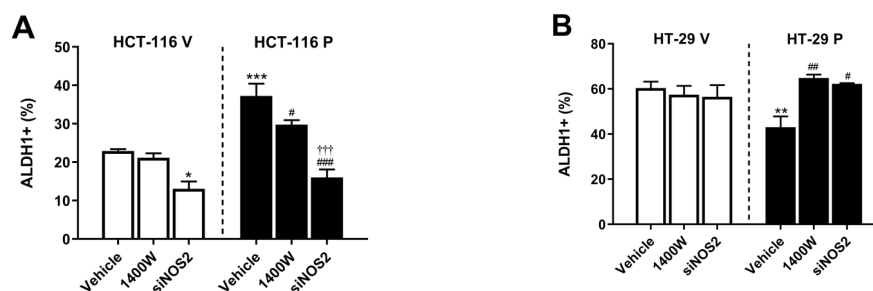


Figura 20. Porcentaje de células ALDH1+ en (A) HCT-116 y (B) HT-29 en células control (HCT-116 V y HT-29 V) y tras sobreexpresión de PARP-1 (HCT-116 P y HT-29 P) y, en todos los casos, sin tratamiento (vehículo), tratadas con 20 μ M 1400W o transfectadas con siNOS2. Los datos representan la media $\pm$ DE. * $P < 0.05$ vs HCT-116 V (vehículo); ** $P < 0.01$ vs HT-29 V (vehículo); *** $P < 0.001$ vs HCT-116 V (vehículo); # $P < 0.05$ vs HCT-116 P (vehículo) o HT-29 P (vehículo); ### $P < 0.01$ vs HCT-116 P (vehículo); #### $P < 0.001$ vs HCT-116 P (vehículo); ††† $P < 0.001$ vs HCT-116 P (1400 W).

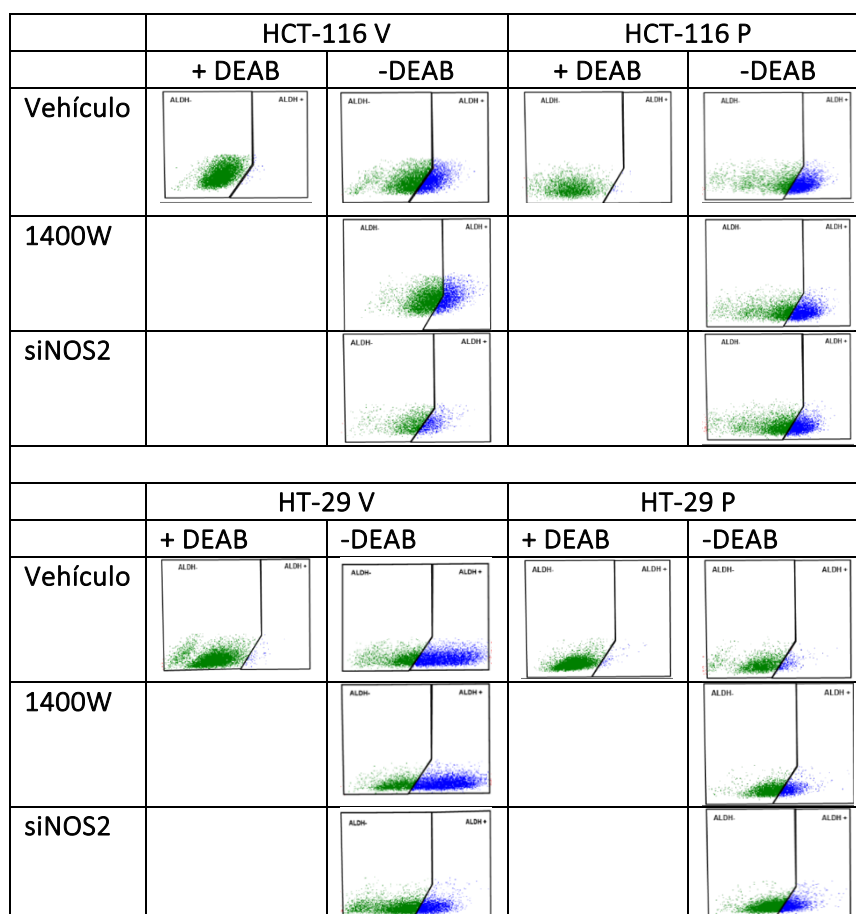


Figura 21 Gráficos representativos obtenidos por citometría de flujo de la actividad de células ALDH1+ en cada situación estudiada.

Para caracterizar el fenotipo de las CMCs tras la sobreexpresión de PARP-1, y antes y después de los tratamientos, se analizó el porcentaje de células con alta expresión de CD44 y CD326 (CD44_{alto}CD326_{alto}) y con alta expresión de CD44, CD326 y CD133 (CD44_{alto}CD326_{alto}CD133_{alto}), todos ellos reconocidos como marcadores de superficie de la subpoblación de CMCs en CCR.

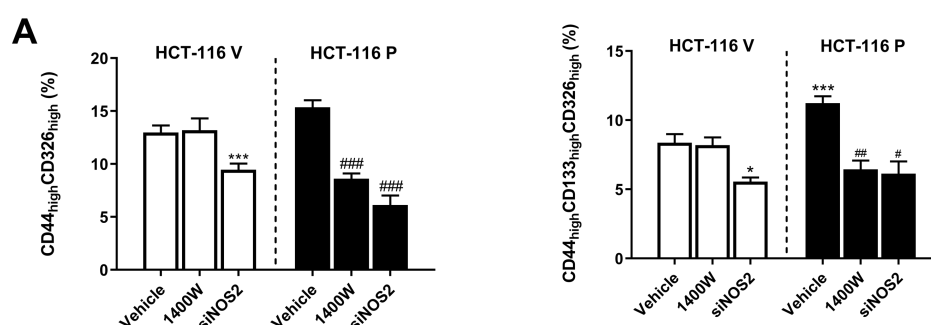
El porcentaje de la subpoblación CD44_{alto}CD326_{alto}CD133_{alto} aumentó en las células HCT-116 que sobreexpresaban PARP-1 (HCT-116 P) frente a las células control transfectadas (HCT-116 V). El tratamiento con 20 μ M de 1400W o la transfección con siNOS2 disminuyó esta subpoblación en HCT-116 P a niveles encontrados en las células HCT-116 V (Figura 22B). El porcentaje de células CD44_{alto}CD326_{alto} no cambió en HCT-116 P frente a HCT-116 V, aunque el tratamiento con 20 μ M de 1400W o la transfección con siNOS2 lo redujeron significativamente en HCT-116 P frente a las células no tratadas (HCT-116 P. vehículo) (Figura 22A). El porcentaje de células doble o triplemente marcadas en las células HCT-116 V disminuyó solo después de la transfección con siNOS2 (Figura 22A y 22B).

Estos resultados indicaban que la sobreexpresión de PARP-1 transformó las células HCT-116 hacia un fenotipo más agresivo que fue contrarrestado por la inhibición química o génica de la liberación de NO. Este efecto también fue encontrado en las células control (HCT-116 V), pero solo después de la inhibición génica de la síntesis de NO.

La sobreexpresión de PARP-1 en células HT-29 (HT-29 P) disminuyó tanto las subpoblaciones CD44_{alto}CD326_{alto} como CD44_{alto}CD326_{alto}CD133_{alto} en comparación con las células de control (HT-29 V) y la inhibición de la liberación de NO por iNOS solo restauró parcialmente el porcentaje de CD44_{alto}CD326_{alto}CD133_{alto} (Figuras 22C y 22D). Curiosamente, en células HT-29 V la inhibición de la transcripción de iNOS por siNOS2 disminuyó tanto las subpoblaciones CD44_{alto}CD326_{alto} como CD44_{alto}CD326_{alto}CD133_{alto}, y el tratamiento con 1400W solo disminuyó el porcentaje de la subpoblación CD44_{alto}CD326_{alto}CD133_{alto} (Figuras 22C y 22D).

A diferencia de lo que ocurría en las células HCT-116, una elevada expresión de PARP-1 en HT-29 condujo a un fenotipo menos agresivo de las CMC, y la inhibición de la producción de NO por parte de ellas lo restauró significativamente. Cabe señalar que en las células de control HT-29, el efecto era el opuesto, ya que la inhibición de iNOS/NO dio como resultado un cultivo celular con un menor porcentaje de subpoblaciones CD44_{alto}CD326_{alto} y CD44_{alto}CD326_{alto}CD133_{alto}.

En conclusión, y, a diferencia de lo que ocurría en las células HCT-116, la sobreexpresión de PARP-1 condujo a un fenotipo menos agresivo que se contrarrestaba con la inhibición química o génica de la liberación de NO en HT-29.



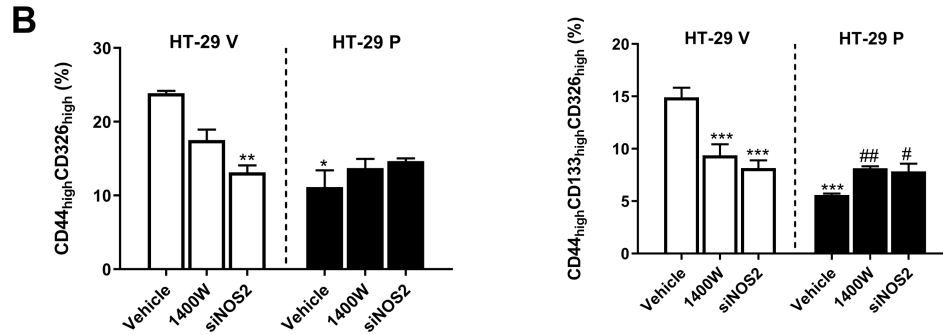


Figura 22. Porcentaje de subpoblaciones CD44^{alto}CD326^{alto} y CD44^{alto} y CD326^{alto}CD133^{alto} en (A) HCT-116 y (B) HT-29 en células control (HCT-116 V y HT-29 V) y tras sobreexpresión de PARP-1 (HCT-116 P y HT-29 P) y, en todos los casos, sin tratamiento (vehículo), tratadas con 20 μ M 1400W o transfectadas con siNOS2. Los datos representan la media $\pm$ DE. *P<0.05 vs HCT-116 V (vehículo) o HT-29 V (vehículo); **P<0.01 vs HT-29 V (vehículo); ***P<0.001 vs HCT-116 V (vehículo) o HT-29 V (vehículo); #P<0.05 vs HCT-116 P (vehículo) o HT-29 P (vehículo); ##P<0.01 vs HCT-116 P (vehículo); ###P<0.001 vs HCT-116 P (vehículo) o HT-29 P (vehículo).

Finalmente, se analizó el crecimiento celular independiente del anclaje en condiciones libres de suero para determinar la capacidad de autorrenovación celular. La sobreexpresión de PARP-1 en HCT-116 condujo a un aumento en la capacidad de formación de esferas. La inhibición de la liberación de NO por iNOS después del tratamiento con 1400W o la transfección con siNOS2 redujo significativamente el número de esferas formadas. Por el contrario, la capacidad de formación de esferas disminuyó después de la sobreexpresión de PARP-1 en HT-29 y solo la transfección con siNOS2 casi restauró el número de esferas formadas al encontrado en las células de control (Figura 23).

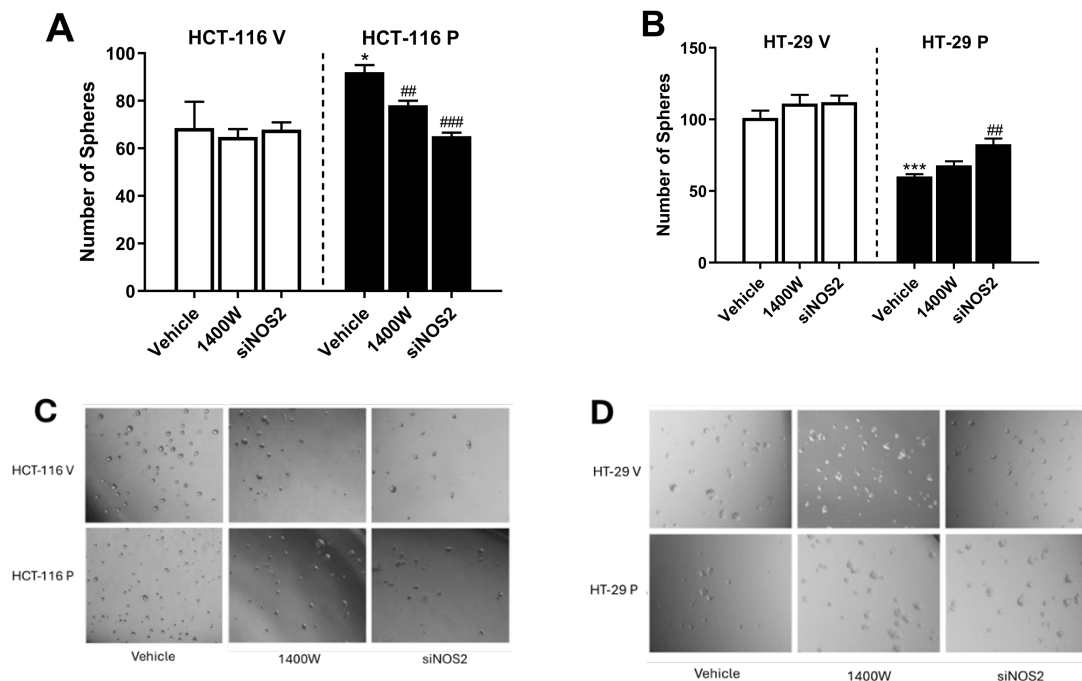


Figura 23. Número de esferas formadas en (A) HCT-116 y (B) HT-29 en células control (HCT-116 V y HT-29 V) y tras sobreexpresión de PARP-1 (HCT-116 P y HT-29 P) y, en todos los casos, sin tratamiento (vehículo), tratadas con 20 μ M 1400W o transfectadas con siNOS2. Los datos representan la media $\pm$ DE. *P<0.05 frente a HCT-116 V (vehículo) o HT-29 V (vehículo); ***P<0.001 vs HT-29 V (vehículo); ##P<0.01

vs HCT-116 P (vehículo) o HT-29 P (vehículo); ### $P < 0.001$ vs HCT-116 P (vehículo). Imágenes representativas de esferas obtenidas de (C) células derivadas de HCT-116 y de (D) células derivadas de HT-29, antes y después de los tratamientos

DISCUSIÓN

El CCR ha experimentado un aumento de su prevalencia en las últimas décadas. Pese a las mejoras en el diagnóstico que permiten su detección en estadios más precoces y la aparición de nuevas dianas terapéuticas más eficaces, el CCR continúa siendo una de las principales causas de muerte por cáncer en el mundo (Bray et al., 2024). Investigar nuevas líneas de tratamiento, más dirigidas y con mejores tasas de respuesta es crucial para mejorar el pronóstico y la calidad de vida de los pacientes.

Desde que se describió PARP-1, han sido muchos los estudios realizados con el fin de dilucidar el papel de esta enzima en el proceso de carcinogénesis. Se ha observado una elevada expresión de PARP-1 en distintos tipos de cáncer, donde regula características intrínsecas de las células tumorales, como la proliferación descontrolada, la evasión de la apoptosis, la inestabilidad genómica y el metabolismo energético reprogramado. Además, esta sobreexpresión influye en interacciones propias entre el tumor y el huésped, incluyendo la angiogénesis, la inflamación, la regulación del microambiente tumoral, la invasión y desarrollo de metástasis y el escape de la respuesta inmune (Demény et al., 2021). En CCR, la sobreexpresión de PARP-1 ha mostrado efectos opuestos que van a depender del estado de los mecanismos de reparación celular, del grado de daño genómico o metabólico y de las condiciones específicas del microambiente tumoral.

PARP-1 participa en múltiples funciones celulares, sin embargo, es esencial su rol en la reparación del daño del ADN. En tumores que presentan mutaciones en los sistemas de reparación, PARP-1 supone una vía alternativa de reparación de ADN que trata de asegurar la supervivencia celular. La inhibición de PARP-1 va a favorecer la acumulación de daños irreparables en el ADN y como consecuencia la no viabilidad de estas células. Este mecanismo, denominado letalidad sintética, motivó la realización de ensayos clínicos en pacientes con cáncer de ovario o mama con mutaciones en la línea celular BRCA en los que está alterada la maquinaria de reparación del ADN mediante recombinación homóloga (HRD) (Robson et al., 2017; Ledermann et al., 2012). A raíz de esto, el empleo de los inhibidores de PARP se ha posicionado como una estrategia prometedora en el tratamiento oncológico (Hage Chehade et al., 2025). Sin embargo, en CCR existe un contexto molecular diferente que ha hecho que el uso de inhibidores de PARP no tenga los resultados clínicos esperados. La inestabilidad de microsatélites es una alteración más frecuente que la HRD en el CCR, además los genes comúnmente implicados en HRD, como el sistema BRCA, tienen una tasa de mutación mucho más baja en CCR que en otro tipo de cáncer, lo que genera un perfil molecular distinto. Las firmas transcriptómicas/genómicas que funcionan bien en cáncer de mama u ovario podrían no captar las características específicas de HRD en CCR. De ahí la importancia de encontrar biomarcadores específicos para CCR.

p53 es el gen supresor de tumores que con más frecuencia se encuentra mutado en los cánceres humanos, encontrándose mutado en el 40-50% de los CCR esporádicos. Es por ello, que en los últimos años se ha tratado de determinar la relación existente entre PARP-1 y p53. Se ha demostrado que PARP-1 puede actuar sobre p53 alterando su capacidad de unión al ADN y su actividad transcripcional, modulando procesos clave como la reparación, la apoptosis o la detención del ciclo celular. Por otro lado, p53 puede interferir en la actividad de PARP-1 en ciertas condiciones, especialmente cuando la función celular está gravemente comprometida, activando los mecanismos de muerte celular en lugar de la reparación (Montero et al., 2013; Elkholi y Chipuk, 2014). Es ahí, donde surge el estudio del papel del gen p53 como un factor determinante

en el tratamiento con inhibidores de PARP-1 en CCR. Considerando esta interacción, un estudio reciente empleó el inhibidor de PARP AZD2461, solo o combinado con radioterapia, contra líneas celulares de colon con diferente estado de p53, observando efectos variables en la respuesta a los inhibidores de PARP en función del estado de p53 (Romeo et al., 2021). Otro estudio, describió una clara asociación entre la función de p53 de tipo salvaje y la sensibilidad a los inhibidores de PARP mediante estudios in vitro en líneas celulares de CCR. La supresión mediada por p53 de RAD51, un actor esencial en la HR, parece ser el mecanismo a través del cual podrían actuar los inhibidores de PARP (Smeby et al., 2020). Esto está en concordancia con otros resultados previamente publicados por nuestro grupo, en los que señalamos la necesidad de analizar el estado de p53 antes de considerar el uso de inhibidores de PARP-1 para el tratamiento del CCR (Puentes-Pardo et al., 2023). En este estudio encontramos que la sobreexpresión de PARP-1 en CCR indujo un aumento de la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad en casos que albergaban un p53 mutado y que la sobreexpresión de PARP-1 era un factor pronóstico independiente de supervivencia en estos pacientes, también observamos que la sobreexpresión de PARP-1 regulaba las características de las CMCs en CCR de manera dependiente de p53, aumentando su cantidad y capacidad de renovación en casos con p53 salvaje, pero induciendo efectos opuestos en aquellos con p53 mutado, lo cual podría explicar los resultados observados en los pacientes. Estos resultados nos llevaron a cuestionar el tratamiento con inhibidores de PARP-1 en estos casos. Las CMCs son una subpoblación de células localizadas dentro del tumor que se caracterizan por su capacidad de autorrenovación, diferenciación y resistencia a tratamientos. Son responsables de la iniciación tumoral, progresión, metástasis y recaída tras los tratamientos, desempeñando un papel clave en la heterogeneidad y persistencia del cáncer. PARP-1 desempeña un rol crucial en la regulación de la pluripotencialidad de las CMCs tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, se ha observado una mayor expresión de PARP-1 en células tumorales con características de CMCs (Jarrar et al., 2019; Gilabert et al., 2014; Venere et al., 2014). El empleo de los inhibidores de PARP, se ha convertido en un enfoque terapéutico clave por su impacto sobre las CMCs, ya que permiten explorar sus vulnerabilidades, observar cambios en sus fenotipos y entender mejor la biología tumoral facilitando el desarrollo de estrategias terapéuticas más eficaces capaces de abordar la resistencia y la recaída tumoral asociada a esta subpoblación celular. Si bien el mecanismo no ha sido completamente elucidado, se ha observado que los inhibidores de PARP favorecen la acumulación de daños, la inestabilidad genómica y la no viabilidad de estas células (Jarrar et al., 2019). En este trabajo, proponemos un efecto mediador del sistema iNOS/NO como el responsable de los efectos observados para PARP-1 en CMCs.

Aunque la mayoría de los estudios se centran en el papel de PARP-1 en la reparación del ADN, PARP-1 tiene otras importantes funciones celulares. Su activación es una pieza esencial en la regulación de la cascada inflamatoria, en la cual está implicada iNOS. La iNOS es una enzima que sintetiza NO en respuesta a determinados estímulos proinflamatorios. El NO desempeña funciones clave en la regulación de procesos fisiológicos y patológicos, como la inflamación, la respuesta inmune y la defensa antimicrobiana. Sin embargo, su desregulación se ha asociado a enfermedades como el cáncer, donde puede influir en la proliferación celular, la apoptosis, la angiogénesis y el daño tisular (Khan et al., 2020). Es amplia la evidencia que ha puesto de manifiesto una interrelación entre PARP-1 e iNOS a diferentes niveles (Naura et al., 2009; Hassa et al., 2005; Yu et al., 2006). PARP-1 participa en numerosos procesos inflamatorios al regular, de

forma directa o indirecta, mediadores proinflamatorios entre los que se encuentra iNOS. Por otro lado, una elevada expresión de iNOS y una producción excesiva de sus reactivos puede producir daños a nivel celular y, como consecuencia, la activación de PARP. Como se ha descrito con PARP-1, la expresión de iNOS y su producto, el NO, pueden tener efectos contrapuestos en la carcinogénesis colorrectal, por un lado, puede promover el crecimiento tumoral y en otras condiciones inhibir su desarrollo. Esta dualidad podría ser explicada por la variabilidad en las concentraciones del NO, aunque también va a depender del tiempo de exposición a este, la sensibilidad celular, la localización dentro del tejido y diversas condiciones del microambiente tumoral (Kashfi et al., 2021; McGinity et al., 2021). Existen estudios que muestran que el efecto de iNOS en CCR, al igual que en PARP-1, está influenciado por el estado de p53 (Matsumoto et al., 2003; Wang et al., 2005). Es por ello, que nos planteamos si la iNOS y sus productos podrían ser los responsables los efectos encontrados para PARP-1 en CCR.

Al analizar la expresión de iNOS en nuestra cohorte se observa que, de forma similar a lo encontrado en PARP-1, existe una mayor expresión de iNOS en tejido tumoral frente a no tumoral. El estado proinflamatorio, el estrés oxidativo y las condiciones de hipoxia existentes en el microambiente tumoral van a inducir y favorecer la expresión de iNOS. Se observa en nuestras muestras una correlación positiva entre la expresión de iNOS y PARP-1 que apoyaría esta interrelación anteriormente descrita en la que PARP-1 regula promotores de iNOS y los subproductos de esta regulan PARP-1. Al categorizar estos resultados en función del estado de p53 observamos que la sobreexpresión PARP-1 es independiente del estado de p53, sin embargo, observamos que la expresión de iNOS es mayor en los casos en los que p53 presenta fenotipo salvaje, no encontrando diferencias en el caso de p53 mutado, probablemente debido a una falta de regulación transcripcional adecuada que limitaría la activación de iNOS.

Cuando analizamos la relación de la expresión de iNOS y PARP-1 con diferentes variables clínico-patológicas de nuestros pacientes, observamos que la expresión de ambas se relaciona con el grado de diferenciación tumoral y la invasión local, pero sólo en aquellos casos con p53 salvaje, no encontrando diferencias en p53 mutado. Este grado de diferenciación que implica una mayor heterogeneidad dentro del tumor se ha asociado con una mayor proporción de células con características de CMC que conservan propiedades pluripotentes que contribuyen a la agresividad y la capacidad invasiva del tumor (Clevers, 2011). La iNOS y las CMCs tienen una relación compleja y sinérgica en el contexto del cáncer. El NO regula procesos clave como la pluripotencialidad, la autorrenovación y la capacidad de invasión de las CMCs, favoreciendo su agresividad y resistencia terapéutica (Kawanishi et al., 2017). Además, iNOS produce una modulación del microambiente tumoral que puede limitar la capacidad de supervivencia celular. Por otro lado, las CMCs pueden amplificar la actividad de iNOS, generando un circuito sinérgico que contribuye a la progresión tumoral. En conclusión, PARP-1 e iNOS potencian características de CMCs como la autorrenovación y plasticidad, promoviendo un fenotipo más agresivo. En nuestro estudio, observamos una correlación positiva entre la expresión de iNOS y los marcadores CMCs, evidenciando que los casos con una alta expresión de iNOS presentaban una mayor expresión de marcadores de CMCs en todos los casos y en aquellos con p53 salvaje, no encontrando diferencias en casos de p53 mutado. Estos mismos resultados se han encontrado para PARP-1, al igual que se describió en los resultados previos publicados por nuestro grupo. Estos resultados apoyarían nuestra hipótesis y es que los efectos descritos para PARP-1 dependiendo del estado de p53 pueden ser debidos al efecto de la iNOS y su papel sobre las

CMCs. Sin embargo, se necesitan más estudios que empleen modelos más próximos al tumor real para dilucidar aún más cómo la expresión de PARP-1 influye en el efecto del NO y la iNOS sobre las características de las CMCs. Esta consideración proviene del hecho de que el NO puede liberarse desde la propia célula cancerosa pero también de las células del microambiente, es decir, fibroblastos, células endoteliales e inmunes (Ben-Neriah y Karin, 2011; Ambs et al., 1997, Ambs et al., 1999; Gallo et al., Du et al., 2009; Stempel et al., 2007). Existen otras isoformas de NOS, denominadas neuronal (nNOS) y endotelial (eNOS), asociadas inicialmente a la señalización fisiológica en cerebro y vasos sanguíneos, respectivamente (Lala, 2001). La isoforma responsable de la liberación de NO desde el microambiente tumoral podría depender de la célula de origen. Así, la iNOS sería la principal isoforma en células inmunes y fibroblastos, mientras que la eNOS se expresaría principalmente en células endoteliales. Por otro lado, el NO producido por las CMCs se secreta en el microambiente tumoral, induciendo una amplia gama de cambios fenotípicos en las células del estroma, que se han implicado en la resistencia a fármacos, la invasión y la metástasis (Ben-Neriah y Karin, 2011). Finalmente, aunque la isoforma iNOS ha recibido la mayor parte de la atención, la literatura reciente indica que la isoenzima endotelial (eNOS) también puede estar presente en la célula cancerosa donde puede modular el fenotipo de las CMCs, como se ha observado para el CCR (Du et al., 2009) y el cáncer de próstata (Shah y Itzkowitz, 2022), lo que agrega más complejidad a la relación entre el NO y el cáncer.

Para confirmar los hallazgos observados en nuestros pacientes, llevamos a cabo experimentos *in vitro* donde valoramos el efecto de la inhibición de iNOS sobre la expresión de PARP-1, el crecimiento celular, la apoptosis y la regulación de las CMCs. Se observa que la sobreexpresión de PARP-1 provoca un aumento en la expresión de iNOS seguida de un aumento en la liberación de NO, mientras que la inhibición de la actividad de iNOS induce una disminución en la expresión de PARP-1 independientemente del estado de p53. Como molécula altamente reactiva, el NO puede inducir daño al ADN, lo cual se ha relacionado con la carcinogénesis asociada a la inflamación (Lala, 2001). En estos casos, el NO induce la acumulación de p53, el arresto del ciclo celular y la apoptosis (Forrester et al., 1996). También se ha demostrado que p53 puede unirse al promotor de iNOS e inhibir su transcripción (Ambs et al., 1996). En general, esto podría ejercer una presión de selección sobre las células con p53 mutado, lo que podría reducir la expresión de iNOS en tumores con p53 salvaje en comparación con aquellos con p53 mutado. Sin embargo, no encontramos diferencias en la expresión de iNOS con respecto al estado de p53 en nuestra cohorte de estudio. Sabemos que PARP-1 regula la expresión de iNOS tanto de manera directa, actuando como un cofactor transcripcional, como indirectamente, mediante alteraciones epigenéticas como la ADP-ribosilación de histonas, que modifica la estructura de la cromatina y facilita el acceso de factores de transcripción como NF- κ B, un regulador clave de iNOS (yu et al., 2006; Buzzo et al., 2017; Naura et al., 2009). La activación de iNOS por PARP-1 genera NO, que a su vez amplifica la actividad PARP-1 en un bucle de retroalimentación positiva, como se demuestran en nuestros resultados en los que ambas proteínas se expresan simultáneamente, independientemente de estado de p53.

Cuando analizamos el efecto de la sobreexpresión de PARP-1 sobre la viabilidad celular observamos que la sobreexpresión de PARP-1 produjo un aumento del crecimiento celular y resistencia a la apoptosis en casos con p53 salvaje, observando el efecto contrario en casos con mutaciones en p53, estos efectos fueron revertidos con la inhibición de iNOS. La muerte celular

por apoptosis suele ir acompañada de una mayor actividad de caspasas. Tanto la caspasa-3 como la caspasa-7 dividen a PARP-1 en dos fragmentos de 89 kDa y 24 kDa, lo que resulta en su inactivación. De hecho, el fragmento de 89 kDa, que contiene los dominios de automodificación y catalíticos de la enzima, tiene una capacidad reducida de unión al ADN (Soldani et al., 2021; Kaufmann et al., 1993). La inhibición de iNOS condujo a un aumento de apoptosis en células con p53 funcional que sobreexpresan PARP-1. Sin embargo, los niveles de PARP-1 fragmentado fueron similares en todas las condiciones, lo que indica que la reducción en la expresión de PARP-1 se debe a la regulación transcripcional mediada por NO y no a la escisión por caspasas. En tumores con p53 salvaje, PARP-1 e iNOS trabajan conjuntamente para crear un entorno favorable para la proliferación, facilitando la inflamación, promoviendo la angiogénesis, la invasión y la proliferación tumoral. El NO podría activar vías que permitan la supervivencia celular como PI3K/AKT, limitando la apoptosis (Yoo et al., 2018; Ha et al., 2003). En este caso, la inhibición de iNOS rompería este equilibrio, reduciendo el crecimiento y favoreciendo la apoptosis. Sin embargo, cuando p53 está mutado, el exceso de NO inducido por la sobreexpresión de PARP-1 podría ser tóxico, induciendo estrés oxidativo y apoptosis, por lo que la inhibición de iNOS en este contexto reduciría el estrés, restaurando parcialmente el crecimiento celular.

Nuestros estudios *in vitro* demuestran que la sobreexpresión de PARP-1 en tumores con p53 funcional activa iNOS para potenciar las características de CMCs, aumentando la agresividad y su capacidad de autorrenovación, estos efectos son revertidos por la inhibición de iNOS, lo que confirma nuestra hipótesis de que el NO es un mediador crítico en este contexto. En casos con p53 mutado, se observa el efecto contrario, lo cual podría deberse a la toxicidad del NO o a la incapacidad de las células para responder adecuadamente sin un p53 funcional. Estos resultados sugieren un doble papel del eje PARP-1/iNOS, que depende del estado de p53. En tumores con p53 funcional, el eje PARP-1/iNOS es altamente activo, lo que resulta en un microambiente tumoral favorable para el crecimiento tumoral y el desarrollo de CMCs. Los inhibidores de PARP-1 ampliamente usados en tumores con deficiencias en la reparación del ADN, podrían tener efectos adicionales al interrumpir el eje PARP-1 e iNOS, reduciendo la producción de NO y las características de células madre. Bloquear la producción de NO mediante la inhibición selectiva de iNOS podría ser una estrategia eficaz para disminuir la agresividad tumoral y las propiedades de las CMCs en el tumor. Por ello, la combinación de inhibidores de PARP-1 e iNOS nos ofrece un enfoque prometedor para reducir la progresión tumoral y la resistencia a terapias, especialmente en tumores con p53 funcional.

La localización citoplasmática de PARP-1 ha sido descrita en células cancerosas, aunque sus funciones aún no están claras (Chen et al., 2024). En el cáncer de páncreas, promueve la carcinogénesis y la resistencia terapéutica (Xu et al., 2019). De manera similar, en pacientes con cáncer de mama, una alta expresión citoplasmática de PARP-1 es un factor pronóstico que se correlaciona con la agresividad y predice la sensibilidad a la quimioterapia (von Minckwitz et al., 2011). En nuestro estudio *in vitro*, observamos tinción nuclear y citoplasmática de PARP-1 en las células. Aunque la localización nuclear de PARP-1 cambia tras la sobreexpresión de la proteína y la inhibición de iNOS, al menos en células con p53 mutado, la expresión de PARP-1 citoplasmática fue similar en todas las condiciones analizadas, mostrando su falta de relevancia en este estudio.

Aunque el presente estudio no profundiza en el mecanismo que relaciona la inhibición de iNOS con las características de las CMCs colorrectales, investigaciones previas sugieren que podrían estar involucradas las vías de señalización Wnt/ β -catenina y Notch, además del factor de transcripción NF- κ B (Puglisi et al., 2015; Ma y Hottiger, 2016). En modelos murinos de carcinogénesis, se ha observado que la activación de NF- κ B aumenta la actividad de la vía de señalización Wnt/ β -catenina e induce la desdiferenciación de células no madre las cuales adquieren capacidad de oncogénica (Schiewer y Knudsen, 2014). PARP-1 interactúa con NF- κ B para regular el crecimiento celular, la apoptosis y la transición epitelio-mesenquimal (Kannan et al., 2011). Por otro lado, el tratamiento con inhibidores de PARP-1 regula la señalización de β -catenina y la resistencia a la quimioterapia (Kumar et al., 2021). Por lo tanto, es posible que PARP-1 regule la pluripotencialidad a través de iNOS/NO, que a su vez podría modular la señalización NF- κ B/Wnt/ β -catenina en el CCR, sin embargo, son necesarios más estudios para confirmar esta hipótesis. Dependiendo del tipo de célula, la vía de señalización de Notch puede desempeñar funciones pro-oncogénicas o supresoras de tumores. En el CCR, la activación de la vía Notch aumenta la subpoblación de CMCs (Gustavsson et al., 2015). Se ha evidenciado que la interacción entre HES1, un efector posterior de Notch, y PARP-1 induce finalmente la apoptosis en células leucémicas B, como un mecanismo protector contra este tipo de cáncer (López-Sánchez et al., 2021). No obstante, aún se desconoce si PARP-1 regula la vía de señalización de Notch y sus implicaciones en la desdiferenciación celular en el CCR.

En conclusión, el eje PARP/iNOS/NO es un mediador crucial en el microambiente tumoral que influye en la inflamación, proliferación, apoptosis y propiedades de las CMCs. Aunque su actividad depende en gran medida del estado de p53, su disfunción puede generar efectos tanto pro como antitumorales. Sin embargo, es necesario seguir investigando para descubrir las vías implicadas. Teniendo en cuenta que el NO puede ser sintetizado por diferentes células dentro del tumor, sería necesario realizar estudio que utilicen modelos 3D multicelulares que incluyan CMC, células tumorales normales, así como células del microambiente tumoral para evaluar las diferentes implicaciones. Dado que el uso de inhibidores de PARP-1 se ha relacionado con la aparición de resistencias tras un periodo de tratamiento, teniendo en cuenta todo lo anterior y en base a los hallazgos encontrados en nuestro estudio, consideramos que el uso de inhibidores selectivos de iNOS podría plantearse como un nuevo objetivo terapéutico en CCR, especialmente dirigido a casos con alta expresión de PARP-1 y fenotipo salvaje de p53.

CONCLUSIONES

1. En muestras de pacientes con CCR, la expresión de PARP-1 e iNOS se correlaciona con un mayor grado de dediferenciación tumoral y con una alta expresión de marcadores de CMCs, aunque solo en casos con p53 salvaje.
2. En modelos in vitro de CCR, PARP-1 e iNOS se expresan simultáneamente en células tumorales de CCR, independientemente del estado de p53. En modelos in vitro de CCR, la sobreexpresión de PARP-1 induce mayor capacidad de crecimiento en células que poseen el p53 de forma salvaje, mientras que lo inhibe cuando p53 está mutado. La inhibición de la actividad iNOS inhibe estos efectos, independientemente de p53. En modelos in vitro de CCR, PARP-1 potencia las características de las CMCs, aumentando su agresividad, capacidad de autorrenovación y resistencia a la apoptosis, promoviendo un fenotipo tumoral más agresivo en casos con p53 funcional, mientras que ejerce el efecto contrario cuando p53 se encuentra mutado.
3. La inhibición de la producción de NO por la iNOS en células de CCR que sobreexpresan PARP-1, contrarresta los efectos de esta última sobre las características de las CMCs, independientemente de p53.
4. El uso de inhibidores selectivos de iNOS podría plantearse como un nuevo objetivo terapéutico en CCR, especialmente dirigido a casos con alta expresión de PARP-1 y fenotipo salvaje de p53.

BIBLIOGRAFÍA

- Abar L, Vieira AR, Aune D, et al. Height and body fatness and colorectal cancer risk: an update of the WCRF-AICR systematic review of published prospective studies. *Eur J Nutr.* 2018 Aug;57(5):1701-20. doi: 10.1007/s00394-017-1557-1. PMID: 29080978; PMCID: PMC6060816.
- Abbaszadegan MR, Bagheri V, Razavi MS, et al. Isolation, identification, and characterization of cancer stem cells: A review. *J Cell Physiol.* 2017 Aug;232(8):2008-18. doi: 10.1002/jcp.25759. PMID: 28019667.
- Abu-Soud HM, Stuehr DJ. Nitric oxide synthases reveal a role for calmodulin in controlling electron transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Nov;90(22):10769-72. doi: 10.1073/pnas.90.22.10769. PMID: 7504282; PMCID: PMC47859.
- Adam R, Kitano Y. Multidisciplinary approach of liver metastases from colorectal cancer. *Ann Gastroenterol Surg.* 2019 Jan;3(1):50-56. doi: 10.1002/ags3.12227. PMID: 30697610; PMCID: PMC6345652.
- Ahmed SU, Carruthers R, Gilmour L, et al. Selective inhibition of parallel DNA damage response pathways optimizes radiosensitization of glioblastoma stem-like cells. *Cancer Res.* 2015 Oct;75(20):4416-28. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3790. PMID: 26282173.
- Ak P, Levine AJ. p53 and NF- κ B: different strategies for responding to stress lead to a functional antagonism. *FASEB J.* 2010 Oct;24(10):3643-52. doi: 10.1096/fj.10-160549. PMID: 20530750.
- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Apr;100(7):3983-8. doi: 10.1073/pnas.0530291100. PMID: 12629218; PMCID: PMC153034.
- Al-Sukhni E, Milot L, Fruitman M, et al. Diagnostic accuracy of MRI for assessment of T category, lymph node metastases, and circumferential resection margin involvement in patients with rectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Ann Surg Oncol.* 2012 Jul;19(7):2212-23. doi: 10.1245/s10434-011-2210-5. PMID: 22271205.
- Albéniz E, Pellisé M, Gimeno-García AZ, et al. Clinical guidelines for endoscopic mucosal resection of non-pedunculated colorectal lesions. *Rev Esp Enferm Dig.* 2018 Mar;110(3):179-94. doi: 10.17235/reed.2018.5086/2017. PMID: 29421912.
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 2001 Aug;357(Pt 3):593-615. doi: 10.1042/0264-6021:3570593. PMID: 11463332; PMCID: PMC1221991.
- Alsheredah N, Akhtar S. Diet, obesity and colorectal carcinoma risk: results from a national cancer registry-based middle-eastern study. *BMC Cancer.* 2018 Dec;18(1):1227. doi: 10.1186/s12885-018-5132-9. PMID: 30526552; PMCID: PMC6286580.
- Alvarez-Gonzalez R, Watkins TA, Gill PK, et al. Regulatory mechanisms of poly(ADP-ribose) polymerase. *Mol Cell Biochem.* 1999 Mar;193(1-2):19-22. PMID: 10331633.
- Ambrose HE, Papadopoulou V, Beswick RW, et al. Poly-(ADP-ribose) polymerase-1 (Parp-1) binds in a sequence-specific manner at the Bcl-6 locus and contributes to the regulation of Bcl-

- 6 transcription. *Oncogene*. 2007 Sep;26(42):6244-52. doi: 10.1038/sj.onc.1210434. PMID: 17404575.
- Ambs S, Bennett WP, Merriam WG, et al. Relationship between p53 mutations and inducible nitric oxide synthase expression in human colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1999;91(1):86-88. doi:10.1093/jnci/91.1.86
- Ambs S, Hussain SP, Harris CC. Interactive effects of nitric oxide and the p53 tumor suppressor gene in carcinogenesis and tumor progression. *FASEB J*. 1997;11(6):443-448. doi:10.1096/fasebj.11.6.9194524
- Ambs S, Hussain SP, Harris CC. Interactive effects of nitric oxide and the p53 tumor suppressor gene in carcinogenesis and tumor progression. *FASEB J*. 1997;11(6):443-448. doi:10.1096/fasebj.11.6.9194524
- Amiri KI, Ha HC, Smulson ME, et al. Differential regulation of CXCL1 transcription in melanoma cell lines by poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Oncogene*. 2006 Dec;25(59):7714-22. doi: 10.1038/sj.onc.1209751. PMID: 16799643; PMCID: PMC2665274.
- An Y, Ongkeko WM. ABCG2: the key to chemoresistance in cancer stem cells? *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2009 Dec;5(12):1529-42. doi: 10.1517/17425250903228834. PMID: 19708828.
- Baena R, Salinas P. Diet and colorectal cancer. *Maturitas*. 2015;80(3):258-64. doi: 10.1016/j.maturitas.2014.12.017. PMID: 25619144.
- Bai P, Virág L. Role of poly(ADP-ribose) polymerases in the regulation of inflammatory processes. *FEBS Lett*. 2012;586(21):3771-7. doi: 10.1016/j.febslet.2012.09.026. PMID: 23022557.
- Bardou M, Rouland A, Martel M, et al. Review article: obesity and colorectal cancer. *Aliment Pharmacol Ther*. 2022;56(3):407-18. doi: 10.1111/apt.17045. PMID: 35707910.
- Barker N, Ridgway RA, van Es JH, et al. Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature*. 2009;457(7229):608-11. doi: 10.1038/nature07602. PMID: 19092804.
- Bártek J, Bártková J, Vojtěšek B, et al. Aberrant expression of the p53 oncoprotein is a common feature of a wide spectrum of human malignancies. *Oncogene*. 1991;6(9):1699-703. PMID: 1923535.
- Batlle E, Clevers H. Cancer stem cells revisited. *Nat Med*. 2017;23(10):1124-34. doi: 10.1038/nm.4409. PMID: 28985214.
- Bauer PI, Chen HJ, Kenesi E, et al. Molecular interactions between poly(ADP-ribose) polymerase (PARP I) and topoisomerase I (Topo I). *FEBS Lett*. 2001;506(3):239-42. doi: 10.1016/S0014-5793(01)02919-2. PMID: 11602253.
- Becerra AZ, Probst CP, Tejani MA, et al. Evaluating the prognostic role of elevated preoperative carcinoembryonic antigen levels in colon cancer patients. *Ann Surg Oncol*. 2016;23(5):1554-61. doi: 10.1245/s10434-015-5014-1. PMID: 26759308.

- Beck B, Blanpain C. Unravelling cancer stem cell potential. *Nat Rev Cancer*. 2013;13(10):727-38. doi: 10.1038/nrc3597. PMID: 24060864.
- Bellio C, DiGloria C, Foster R, et al. PARP inhibition induces enrichment of DNA repair-proficient CD133 and CD117 positive ovarian cancer stem cells. *Mol Cancer Res*. 2019;17(2):431-45. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-18-0594. PMID: 30401718.
- Ben-Neriah Y, Karin M. Inflammation meets cancer, with NF- κ B as the matchmaker. *Nat Immunol*. 2011;12(8):715-723. Published 2011 Jul 19. doi:10.1038/ni.2060
- Bener A, Ozturk AE, Ustundag UV, et al. Assessing the impact of serum calcium, 25-hydroxy vitamin D, ferritin, and uric acid levels on colorectal cancer risk. *J Clin Med Res*. 2024;16(10):483-90. doi: 10.14740/jocmr5296. PMID: 39544331.
- Benson AB 3rd. Epidemiology, disease progression, and economic burden of colorectal cancer. *J Manag Care Pharm*. 2007;13(6 Suppl C):S5-18. doi: 10.18553/jmcp.2007.13.s6-c.5. PMID: 17713990.
- Bernstein AM, Song M, Zhang X, et al. Processed and unprocessed red meat and risk of colorectal cancer. *PLoS One*. 2015;10(8):e0135959. doi: 10.1371/journal.pone.0135959. PMID: 26305323.
- Betge J, Pollheimer MJ, Lindtner RA, et al. Intramural and extramural vascular invasion in colorectal cancer. *Cancer*. 2012;118(3):628-38. doi: 10.1002/cncr.26310. PMID: 21751188.
- Biegging KT, Mello SS, Attardi LD. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(5):359-70. doi: 10.1038/nrc3711. PMID: 24739573.
- Biondo S, Gálvez A, Ramírez E, et al. Emergency surgery for obstructing and perforated colon cancer. *Tech Coloproctol*. 2019;23(12):1141-61. doi: 10.1007/s10151-019-02110-x. PMID: 31728784.
- Böckelman C, Engelmann BE, Kaprio T, et al. Risk of recurrence in patients with colon cancer stage II and III. *Acta Oncol*. 2015;54(1):5-16. doi: 10.3109/0284186X.2014.975839. PMID: 25430983.
- Bolhuis K, Kos M, van Oijen MGH, et al. Conversion strategies with chemotherapy plus targeted agents for colorectal cancer liver-only metastases. *Eur J Cancer*. 2020;141:225-38. doi: 10.1016/j.ejca.2020.09.037. PMID: 33189037.
- Bonizzi G, Cicalese A, Insinga A, et al. The emerging role of p53 in stem cells. *Trends Mol Med*. 2012;18(1):6-12. doi: 10.1016/j.molmed.2011.08.002. PMID: 21907001.
- Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. 1997;3(7):730-7. doi: 10.1038/nm0797-730. PMID: 9212098.
- Botteri E, Borroni E, Sloan EK, et al. Smoking and colorectal cancer risk, overall and by molecular subtypes. *Am J Gastroenterol*. 2020;115(12):1940-9. doi: 10.14309/ajg.0000000000000803. PMID: 32773458.

- Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022. *CA Cancer J Clin*. 2024;74(3):229-63. doi: 10.3322/caac.21834. PMID: 38572751.
- Brosh R, Rotter V. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat Rev Cancer*. 2009 Oct;9(10):701-13. doi: 10.1038/nrc2693. PMID: 19693097.
- Bu P, Chen KY, Lipkin SM, et al. Asymmetric division: a marker for cancer stem cells in early stage tumors? *Oncotarget*. 2013 Jul;4(7):950-1. doi: 10.18632/oncotarget.1029. PMID: 23807730; PMCID: PMC3759670.
- Bu X, Kato J, Moss J, et al. Emerging roles of ADP-ribosyl-acceptor hydrolases (ARHs) in tumorigenesis and cell death pathways. *Biochem Pharmacol*. 2019 Sep;167:44-49. doi: 10.1016/j.bcp.2018.09.028. PMID: 30267646; PMCID: PMC8339914.
- Bürkle A. Poly(ADP-ribose). The most elaborate metabolite of NAD⁺. *FEBS J*. 2005 Sep;272(18):4576-89. doi: 10.1111/j.1742-4658.2005.04864.x. PMID: 16156780.
- Buzzo CL, Medina T, Branco LM, et al. Epigenetic regulation of nitric oxide synthase 2, inducible (Nos2) by NLRC4 inflammasomes involves PARP1 cleavage. *Sci Rep*. 2017 Feb 2;7:41686. doi: 10.1038/srep41686. PMID: 28150715; PMCID: PMC5288713.
- Caelles C, Helmberg A, Karin M, et al. p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature*. 1994 Jul 21;370(6486):220-3. doi: 10.1038/370220a0. PMID: 8028670.
- Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, et al. A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell*. 2007 Jan;11(1):69-82. doi: 10.1016/j.ccr.2006.11.020. PMID: 17222791.
- Cammareri P, Lombardo Y, Francipane MG, et al. Isolation and culture of colon cancer stem cells. *Methods Cell Biol*. 2008;86:311-24. doi: 10.1016/S0091-679X(08)00014-9. PMID: 18442654.
- Canavan C, Abrams KR, Mayberry J, et al. Meta-analysis: colorectal and small bowel cancer risk in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006 Apr 15;23(8):1097-104. doi: 10.1111/j.1365-2036.2006.02854.x. PMID: 16611269.
- Capp JP. Cancer Stem Cells: From Historical Roots to a New Perspective. *J Oncol*. 2019 Jun 11; 2019:5189232. doi: 10.1155/2019/5189232. PMID: 31308849; PMCID: PMC6594320.
- Cardoso R, Guo F, Heisser T, et al. Proportion and stage distribution of screen-detected and non-screen-detected colorectal cancer in nine European countries: an international, population-based study. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2022 Aug;7(8):711-723. doi: 10.1016/S2468-1253(22)00084-X. PMID: 35561739.
- Carey JPW, Karakas C, Bui T, et al. Synthetic Lethality of PARP Inhibitors in Combination with MYC Blockade Is Independent of BRCA Status in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Res*. 2018 Feb 1;78(3):742-757. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-1494. PMID: 29180466; PMCID: PMC5811386.

- Chaffer CL, Thompson EW, Williams ED, et al. Mesenchymal to epithelial transition in development and disease. *Cells Tissues Organs*. 2007;185(1-3):7-19. doi: 10.1159/000101298. PMID: 17587803.
- Chalmers A, Johnston P, Woodcock M, et al. PARP-1, PARP-2, and the cellular response to low doses of ionizing radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004 Feb 1;58(2):410-9. doi: 10.1016/j.ijrobp.2003.09.053. PMID: 14751510.
- Chambon P, Weill JD, Mandel P, et al. Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme. *Biochem Biophys Res Commun*. 1963 Apr 2;11:39-43. doi: 10.1016/0006-291x(63)90024-x. PMID: 14019961.
- Chan DS, Lau R, Aune D, et al. Red and processed meat and colorectal cancer incidence: meta-analysis of prospective studies. *PLoS One*. 2011;6(6):e20456. doi: 10.1371/journal.pone.0020456. PMID: 21674008; PMCID: PMC3108955.
- Chang CJ, Chao CH, Xia W, et al. p53 regulates epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties through modulating miRNAs. *Nat Cell Biol*. 2011 Mar;13(3):317-23. doi: 10.1038/ncb2173. PMID: 21336307; PMCID: PMC3075845.
- Chang JC. Cancer stem cells: Role in tumor growth, recurrence, metastasis, and treatment resistance. *Medicine (Baltimore)*. 2016 Sep;95(1 Suppl 1):S20-S25. doi: 10.1097/MD.0000000000004766. PMID: 27611935; PMCID: PMC5599212.
- Chaplin A, Rodriguez RM, Segura-Sampedro JJ, et al. Insights behind the Relationship between Colorectal Cancer and Obesity: Is Visceral Adipose Tissue the Missing Link? *Int J Mol Sci*. 2022 Oct 28;23(21):13128. doi: 10.3390/ijms232113128. PMID: 36361914; PMCID: PMC9655590.
- Chen R, Xie L, Fan Y, Hua X, Chung CY. Vesicular translocation of PARP-1 to cytoplasm causes ADP-ribosylation and disassembly of vimentin filaments during microglia activation induced by LPS. *Front Cell Neurosci*. 2024;18:1363154. Published 2024 Mar 25. doi:10.3389/fncel.2024.1363154
- Chin KV, Ueda K, Pastan I, et al. Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by Ras and p53. *Science*. 1992 Jan 24;255(5043):459-62. doi: 10.1126/science.1346476. PMID: 1346476.
- Cinelli MA, Do HT, Miley GP, et al. Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. *Med Res Rev*. 2020 Jan;40(1):158-189. doi: 10.1002/med.21599. Epub 2019 Jun 13. PMID: 31192483; PMCID: PMC6908786.
- Clevers H. Colon cancer--understanding how NSAIDs work. *N Engl J Med*. 2006 Feb 16;354(7):761-3. doi: 10.1056/NEJMcibr055457. PMID: 16481647.
- Clevers H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med*. 2011 Mar;17(3):313-9. doi: 10.1038/nm.2304. PMID: 21386835.
- Clevers H. The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment. *Cell*. 2013 Jul 18;154(2):274-84. doi: 10.1016/j.cell.2013.07.004. PMID: 23870119.

- Compton C, Fenoglio-Preiser CM, Pettigrew N, et al. American Joint Committee on Cancer Prognostic Factors Consensus Conference: Colorectal Working Group. *Cancer*. 2000 Apr 1;88(7):1739-57. doi: 10.1002/(sici)1097-0142(20000401)88:7<1739::aid-cncr30>3.0.co;2-t. PMID: 10738234.
- Cong YJ, Gan Y, Sun HL, et al. Association of sedentary behaviour with colon and rectal cancer: a meta-analysis of observational studies. *Br J Cancer*. 2014 Feb 4;110(3):817-26. doi: 10.1038/bjc.2013.709. Epub 2013 Nov 21. PMID: 24263062; PMCID: PMC3915109.
- Costas-Chavarri A, Nandakumar G, Temin S, et al. Treatment of Patients With Early-Stage Colorectal Cancer: ASCO Resource-Stratified Guideline. *J Glob Oncol*. 2019 Feb;5:1-19. doi: 10.1200/JGO.18.00214. PMID: 30802158; PMCID: PMC6426503.
- Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, et al. Colorectal cancer. *Lancet*. 2010 Mar 20;375(9719):1030-47. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60353-4. PMID: 20304247.
- Curtin NJ, Szabo C. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov*. 2020 Oct;19(10):711-736. doi: 10.1038/s41573-020-0076-6. Epub 2020 Sep 3. PMID: 32884152.
- D'Amours D, Desnoyers S, D'Silva I, et al. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J*. 1999 Sep 1;342 (Pt 2):249-68. PMID: 10455009; PMCID: PMC1220459.
- Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, et al. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jun 12;104(24):10158-63. doi: 10.1073/pnas.0703478104. Epub 2007 Jun 4. PMID: 17548814; PMCID: PMC1891215.
- Dandawate P, Padhye S, Ahmad A, et al. Novel strategies targeting cancer stem cells through phytochemicals and their analogs. *Drug Deliv Transl Res*. 2013 Apr 1;3(2):165-82. doi: 10.1007/s13346-012-0079-x. PMID: 24076568; PMCID: PMC3783342.
- Dantzer F, Nasheuer HP, Vonesch JL, et al. Functional association of poly(ADP-ribose) polymerase with DNA polymerase alpha-primase complex: a link between DNA strand break detection and DNA replication. *Nucleic Acids Res*. 1998 Apr 15;26(8):1891-8. doi: 10.1093/nar/26.8.1891. PMID: 9518481; PMCID: PMC147507.
- Das V, Bhattacharya S, Chikkaputtaiah C, et al. The basics of epithelial-mesenchymal transition (EMT): A study from a structure, dynamics, and functional perspective. *J Cell Physiol*. 2019 Feb 5. doi: 10.1002/jcp.28160. Epub ahead of print. PMID: 30723913.
- De Sousa E Melo F, Vermeulen L, Fessler E, et al. Cancer heterogeneity--a multifaceted view. *EMBO Rep*. 2013 Aug;14(8):686-95. doi: 10.1038/embor.2013.92. Epub 2013 Jul 12. PMID: 23846313; PMCID: PMC3736134.
- Demény MA, Virág L. The PARP Enzyme Family and the Hallmarks of Cancer Part 1. Cell Intrinsic Hallmarks. *Cancers (Basel)*. 2021;13(9):2042. Published 2021 Apr 23. doi:10.3390/cancers13092042
- Desmarais Y, Ménard L, Lagueux J, et al. Enzymological properties of poly(ADP-ribose)polymerase: characterization of automodification sites and NADase activity.

- Biochim Biophys Acta. 1991 Jun 24;1078(2):179-86. doi: 10.1016/0167-4838(91)99007-f. PMID: 1648406.
- Diefenbach J, Bürkle A. Introduction to poly(ADP-ribose) metabolism. Cell Mol Life Sci. 2005 Apr;62(7-8):721-30. doi: 10.1007/s00018-004-4503-3. PMID: 15868397.
- Dörsam B, Seiwert N, Foersch S, et al. PARP-1 protects against colorectal tumor induction, but promotes inflammation-driven colorectal tumor progression. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018 Apr 24;115(17):E4061-E4070. doi: 10.1073/pnas.1712345115. Epub 2018 Apr 9. PMID: 29632181; PMCID: PMC5924876.
- Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev. 2002 Jan;82(1):47-95. doi: 10.1152/physrev.00018.2001. PMID: 11773609.
- Droit A, Hunter JM, Rouleau M, et al. PARPs database: a LIMS systems for protein-protein interaction data mining or laboratory information management system. BMC Bioinformatics. 2007 Dec 19;8:483. doi: 10.1186/1471-2105-8-483. PMID: 18093328; PMCID: PMC2266781.
- Du Q, Liu S, Dong K, et al. Downregulation of iNOS/NO Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis in Colorectal Cancer. Mol Cancer Res. 2023 Feb 1;21(2):102-114. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-22-0509. PMID: 36306210; PMCID: PMC9890133.
- Du Q, Zhang X, Cardinal J, et al. Wnt/beta-catenin signaling regulates cytokine-induced human inducible nitric oxide synthase expression by inhibiting nuclear factor-kappaB activation in cancer cells. *Cancer Res*. 2009;69(9):3764-3771. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-0014
- Duan J, Nilsson L. Effect of Zn²⁺ on DNA recognition and stability of the p53 DNA-binding domain. Biochemistry. 2006 Jun 20;45(24):7483-92. doi: 10.1021/bi0603165. PMID: 16768444.
- Duffy MJ, van Dalen A, Haglund C, et al. Clinical utility of biochemical markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines. Eur J Cancer. 2003 Apr;39(6):718-27. doi: 10.1016/s0959-8049(02)00811-0. PMID: 12651195.
- Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. Gut. 2001 Apr;48(4):526-35. doi: 10.1136/gut.48.4.526. PMID: 11247898; PMCID: PMC1728259.
- Edwards BK, Ward E, Kohler BA, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2006, featuring colorectal cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates. Cancer. 2010 Feb 1;116(3):544-73. doi: 10.1002/cncr.24760. PMID: 19998273; PMCID: PMC3619726.
- Effendi-Ys R. Cancer Stem Cells and Molecular Biology Test in Colorectal Cancer: Therapeutic Implications. Acta Med Indones. 2017 Oct;49(4):351-359. PMID: 29348387.
- Elamin MH, Shinwari Z, Hendrayani SF, et al. Curcumin inhibits the Sonic Hedgehog signaling pathway and triggers apoptosis in medulloblastoma cells. Mol Carcinog. 2010 Mar;49(3):302-14. doi: 10.1002/mc.20604. PMID: 20025076.

- Elkholi R, Chipuk JE. How do I kill thee? Let me count the ways: p53 regulates PARP-1 dependent necrosis. *Bioessays*. 2014 Jan;36(1):46-51. doi: 10.1002/bies.201300117. Epub 2013 Oct 24. PMID: 24323920; PMCID: PMC3914234.
- Elkholi R, Chipuk JE. How do I kill thee? Let me count the ways: p53 regulates PARP-1 dependent necrosis. *Bioessays*. 2014 Jan;36(1):46-51. doi: 10.1002/bies.201300117. Epub 2013 Oct 24. PMID: 24323920; PMCID: PMC3914234.
- Eyler CE, Wu Q, Yan K, et al. Glioma stem cell proliferation and tumor growth are promoted by nitric oxide synthase-2. *Cell*. 2011 Jul 8;146(1):53-66. doi: 10.1016/j.cell.2011.06.006. PMID: 21729780; PMCID: PMC3144745.
- Fan Y, Mao R, Yang J. NF- κ B and STAT3 signaling pathways collaboratively link inflammation to cancer. *Protein Cell*. 2013 Mar;4(3):176-85. doi: 10.1007/s13238-013-2084-3. Epub 2013 Mar 13. PMID: 23483479; PMCID: PMC4875500.
- Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990 Jun 1;61(5):759-67. doi: 10.1016/0092-8674(90)90186-i. PMID: 2188735.
- Fernández Montes A, Alonso V, Aranda E, et al. SEOM-GEMCAD-TTD clinical guidelines for the systemic treatment of metastatic colorectal cancer (2022). *Clin Transl Oncol*. 2023 Sep;25(9):2718-2731. doi: 10.1007/s12094-023-03199-1. Epub 2023 May 3. PMID: 37133732; PMCID: PMC10425293.
- Forrester K, Ambs S, Lupold SE, et al. Nitric oxide-induced p53 accumulation and regulation of inducible nitric oxide synthase expression by wild-type p53. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(6):2442-2447. doi:10.1073/pnas.93.6.2442
- Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer*. 2003 May;3(5):362-74. doi: 10.1038/nrc1075. PMID: 12724734.
- Gallo O, Schiavone N, Papucci L, et al. Down-regulation of nitric oxide synthase-2 and cyclooxygenase-2 pathways by p53 in squamous cell carcinoma. *Am J Pathol*. 2003;163(2):723-732. doi:10.1016/S0002-9440(10)63699-1
- Geiersbach KB, Samowitz WS. Microsatellite instability and colorectal cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2011 Oct;135(10):1269-77. doi: 10.5858/arpa.2011-0035-RA. PMID: 21970482.
- Ghosh A, Chawla-Sarkar M, Stuehr DJ. Hsp90 interacts with inducible NO synthase client protein in its heme-free state and then drives heme insertion by an ATP-dependent process. *FASEB J*. 2011 Jun;25(6):2049-60. doi: 10.1096/fj.10-180554. Epub 2011 Feb 25. PMID: 21357526; PMCID: PMC3101027.
- Gibson BA, Kraus WL. New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012 Jun 20;13(7):411-24. doi: 10.1038/nrm3376. PMID: 22713970.
- Gilabert M, Launay S, Ginestier C, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) overexpression in human breast cancer stem cells and resistance to olaparib. *PLoS One*. 2014;9(8):e104302. Published 2014 Aug 21. doi:10.1371/journal.pone.0104302

- Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*. 2007 Nov;1(5):555-67. doi: 10.1016/j.stem.2007.08.014. PMID: 18371393; PMCID: PMC2423808.
- Gini A, Jansen EEL, Zielonke N, et al. Impact of colorectal cancer screening on cancer-specific mortality in Europe: A systematic review. *Eur J Cancer*. 2020 Mar;127:224-35. doi: 10.1016/j.ejca.2019.12.014. Epub 2020 Jan 10. PMID: 31932176.
- Goel A, Arnold CN, Niedzwiecki D, et al. Characterization of sporadic colon cancer by patterns of genomic instability. *Cancer Res*. 2003 Apr 1;63(7):1608-14. PMID: 12670912.
- Gonzalez-Flores A, Aguilar-Quesada R, Siles E, et al. Interaction between PARP-1 and HIF-2 α in the hypoxic response. *Oncogene*. 2014 Feb 13;33(7):891-8. doi: 10.1038/onc.2013.9. Epub 2013 Mar 4. PMID: 23455322.
- González-Flores E, Garcia-Carbonero R, Élez E, et al. Gender and sex differences in colorectal cancer screening, diagnosis and treatment. *Clin Transl Oncol*. 2025 Jan 17. doi: 10.1007/s12094-024-03801-0. Epub ahead of print. PMID: 39821481.
- Goodman JE, Hofseth LJ, Hussain SP, et al. Nitric oxide and p53 in cancer-prone chronic inflammation and oxyradical overload disease. *Environ Mol Mutagen*. 2004;44(1):3-9. doi: 10.1002/em.20024. PMID: 15199542.
- Gujral TS, Chan M, Peshkin L, et al. A noncanonical Frizzled2 pathway regulates epithelial-mesenchymal transition and metastasis. *Cell*. 2014 Nov 6;159(4):844-56. doi: 10.1016/j.cell.2014.10.032. PMID: 25417160; PMCID: PMC4243058.
- Gupta PB, Pastushenko I, Skibinski A, et al. Phenotypic Plasticity: Driver of Cancer Initiation, Progression, and Therapy Resistance. *Cell Stem Cell*. 2019 Jan 3;24(1):65-78. doi: 10.1016/j.stem.2018.11.011. Epub 2018 Dec 13. PMID: 30554963; PMCID: PMC7297507.
- Gustavsson B, Carlsson G, Machover D, et al. A review of the evolution of systemic chemotherapy in the management of colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer*. 2015;14(1):1-10. doi:10.1016/j.clcc.2014.11.002
- Ha KS, Kim KM, Kwon YG, et al. Nitric oxide prevents 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in PC12 cells through cGMP-dependent PI3 kinase/Akt activation. *FASEB J*. 2003;17(9):1036-1047. doi:10.1096/fj.02-0738com
- Hadjimichael C, Chanoumidou K, Papadopoulou N, et al. Common stemness regulators of embryonic and cancer stem cells. *World J Stem Cells*. 2015 Oct 26;7(9):1150-84. doi: 10.4252/wjsc.v7.i9.1150. PMID: 26516408; PMCID: PMC4620423.
- Halligan S, Wooldrage K, Dadswell E, et al. Computed tomographic colonography versus barium enema for diagnosis of colorectal cancer or large polyps in symptomatic patients (SIGGAR): a multicentre randomised trial. *Lancet*. 2013 Apr 6;381(9873):1185-93. doi: 10.1016/S0140-6736(12)62124-2. Epub 2013 Feb 14. PMID: 23414648.

- Harper JW, Elledge SJ, Keyomarsi K, et al. Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol Biol Cell*. 1995 Apr;6(4):387-400. doi: 10.1091/mbc.6.4.387. PMID: 7626805; PMCID: PMC301199.
- Hashimoto N, Tsunedomi R, Yoshimura K, et al. Cancer stem-like sphere cells induced from de-differentiated hepatocellular carcinoma-derived cell lines possess the resistance to anti-cancer drugs. *BMC Cancer*. 2014 Sep 27;14:722. doi: 10.1186/1471-2407-14-722. PMID: 25260650; PMCID: PMC4190290.
- Hassa PO, Hottiger MO. The diverse biological roles of mammalian PARPs, a small but powerful family of poly-ADP-ribose polymerases. *Front Biosci*. 2008 Jan 1;13:3046-82. doi: 10.2741/2909. PMID: 17981777.
- Hassa PO, Hottiger MO. The functional role of poly(ADP-ribose)polymerase 1 as novel coactivator of NF-kappaB in inflammatory disorders. *Cell Mol Life Sci*. 2002 Sep;59(9):1534-53. doi: 10.1007/s00018-002-8527-2. PMID: 12440774; PMCID: PMC11337477.
- Hay ED. The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Dev Dyn*. 2005 Jul;233(3):706-20. doi: 10.1002/dvdy.20345. PMID: 15937929.
- Herceg Z, Wang ZQ. Failure of poly(ADP-ribose) polymerase cleavage by caspases leads to induction of necrosis and enhanced apoptosis. *Mol Cell Biol*. 1999 Jul;19(7):5124-33. doi: 10.1128/MCB.19.7.5124. PMID: 10373561; PMCID: PMC84355.
- Hernández-Camarero P, Jiménez G, López-Ruiz E, et al. Revisiting the dynamic cancer stem cell model: Importance of tumour edges. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2018 Nov;131:35-45. doi: 10.1016/j.critrevonc.2018.08.004. Epub 2018 Aug 28. PMID: 30293704.
- Hinoi T. Cancer Genomic Profiling in Colorectal Cancer: Current Challenges in Subtyping Colorectal Cancers Based on Somatic and Germline Variants. *J Anus Rectum Colon*. 2021 Jul 29;5(3):213-28. doi:10.23922/jarc.2021-009.
- Hiraga T, Ito S, Nakamura H. Cancer stem-like cell marker CD44 promotes bone metastases by enhancing tumorigenicity, cell motility, and hyaluronan production. *Cancer Res*. 2013 Jul 1;73(13):4112-22. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3801. Epub 2013 Apr 30. PMID: 23633482.
- Hoffmeyer K, Raggioli A, Rudloff S, et al. Wnt/ β -catenin signaling regulates telomerase in stem cells and cancer cells. *Science*. 2012 Jun 22;336(6088):1549-54. doi: 10.1126/science.1218370. PMID: 22723415.
- Homann N, Tillonen J, Salaspuro M. Microbially produced acetaldehyde from ethanol may increase the risk of colon cancer via folate deficiency. *Int J Cancer*. 2000 Apr 15;86(2):169-73. doi: 10.1002/(sici)1097-0215(20000415)86:2<169::aid-ijc4>3.0.co;2-3. PMID: 10738242.

- Howren A, Sayre EC, Loree JM, et al. Trends in the Incidence of Young-Onset Colorectal Cancer With a Focus on Years Approaching Screening Age: A Population-Based Longitudinal Study. *J Natl Cancer Inst.* 2021 Jul 1;113(7):863-8. doi: 10.1093/jnci/djaa220. PMID: 33492399; PMCID: PMC8246802.
- Hu G, Li L, Hu K. Clinical implications of perineural invasion in patients with colorectal cancer. *Medicine (Baltimore).* 2020 Apr;99(17):e19860. doi: 10.1097/MD.00000000000019860. PMID: 32332645; PMCID: PMC7220534.
- Hu Y, Xiang J, Su L, et al. The regulation of nitric oxide in tumor progression and therapy. *J Int Med Res.* 2020 Feb;48(2):300060520905985. doi: 10.1177/0300060520905985. PMID: 32090657; PMCID: PMC7110915.
- Iurlaro R, Muñoz-Pinedo C. Cell death induced by endoplasmic reticulum stress. *FEBS J.* 2016 Jul;283(14):2640-52. doi: 10.1111/febs.13598. Epub 2015 Dec 19. PMID: 26587781.
- Jagtap P, Szabó C. Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. *Nat Rev Drug Discov.* 2005 May;4(5):421-40. doi: 10.1038/nrd1718. PMID: 15864271.
- Jahanafrooz Z, Mosafer J, Akbari M, et al. Colon cancer therapy by focusing on colon cancer stem cells and their tumor microenvironment. *J Cell Physiol.* 2020 May;235(5):4153-66. doi: 10.1002/jcp.29337. Epub 2019 Oct 24. PMID: 31647128.
- Jaiswal AS, Marlow BP, Gupta N, et al. Beta-catenin-mediated transactivation and cell-cell adhesion pathways are important in curcumin (diferuylmethane)-induced growth arrest and apoptosis in colon cancer cells. *Oncogene.* 2002 Dec 5;21(55):8414-27. doi: 10.1038/sj.onc.1205947. PMID: 12466962.
- Jarrar A, Lotti F, DeVecchio J, et al. Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibition Sensitizes Colorectal Cancer-Initiating Cells to Chemotherapy. *Stem Cells.* 2019 Jan;37(1):42-53. doi: 10.1002/stem.2929. Epub 2018 Nov 12. PMID: 30353615.
- Jarrar A, Lotti F, DeVecchio J, et al. Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibition Sensitizes Colorectal Cancer-Initiating Cells to Chemotherapy. *Stem Cells.* 2019;37(1):42-53. doi:10.1002/stem.2929
- Junttila MR, de Sauvage FJ. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature.* 2013 Sep 19;501(7467):346-54. doi: 10.1038/nature12626. PMID: 24048067.
- Jyoti A, Singh AK, Dubey M, et al. Interaction of inducible nitric oxide synthase with rac2 regulates reactive oxygen and nitrogen species generation in the human neutrophil phagosomes: implication in microbial killing. *Antioxid Redox Signal.* 2014 Jan 20;20(3):417-31. doi: 10.1089/ars.2012.4970. Epub 2013 Sep 17. PMID: 23875749.
- Kaczmarek A, Vandenabeele P, Krysko DV. Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity.* 2013 Feb 21;38(2):209-23. doi: 10.1016/j.immuni.2013.02.003. PMID: 23438821.

- Kameshita I, Matsuda Z, Taniguchi T, et al. Poly (ADP-Ribose) synthetase. Separation and identification of three proteolytic fragments as the substrate-binding domain, the DNA-binding domain, and the automodification domain. *J Biol Chem*. 1984 Apr 25;259(8):4770-6. PMID: 6325408.
- Kanai M, Hanashiro K, Kim SH, et al. Inhibition of Crm1-p53 interaction and nuclear export of p53 by poly(ADP-ribosyl)ation. *Nat Cell Biol*. 2007 Oct;9(10):1175-83. doi: 10.1038/ncb1638. Epub 2007 Sep 23. PMID: 17891139.
- Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*. 2013 Oct 17;502(7471):333-39. doi: 10.1038/nature12634. PMID: 24132290; PMCID: PMC3927368.
- Kanemitsu Y, Shitara K, Mizusawa J, et al. Primary Tumor Resection Plus Chemotherapy Versus Chemotherapy Alone for Colorectal Cancer Patients With Asymptomatic, Synchronous Unresectable Metastases (JCOG1007; iPACS): A Randomized Clinical Trial. *J Clin Oncol*. 2021 Apr 1;39(10):1098-1107. doi: 10.1200/JCO.20.02447. Epub 2021 Feb 9. PMID: 33560877; PMCID: PMC8078424.
- Kannan S, Fang W, Song G, et al. Notch/HES1-mediated PARP1 activation: a cell type-specific mechanism for tumor suppression. *Blood*. 2011;117(10):2891-2900. doi:10.1182/blood-2009-12-253419
- Kanwar SS, Yu Y, Nautiyal J, Patel BB, Majumdar AP. The Wnt/beta-catenin pathway regulates growth and maintenance of colonospheres. *Mol Cancer*. 2010 Aug 6;9:212. doi: 10.1186/1476-4598-9-212. PMID: 20691072; PMCID: PMC2924313.
- Kashfi K, Kannikal J, Nath N. Macrophage Reprogramming and Cancer Therapeutics: Role of iNOS-Derived NO. *Cells*. 2021 Nov 16;10(11):3194. doi: 10.3390/cells10113194. PMID: 34831416; PMCID: PMC8624911.
- Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, et al. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res*. 1991 Dec 1;51(23 Pt 1):6304-11. PMID: 1933891.
- Katona BW, Weiss JM. Chemoprevention of Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2020 Jan;158(2):368-388. doi: 10.1053/j.gastro.2019.06.047. Epub 2019 Sep 26. PMID: 31563626; PMCID: PMC6981249.
- Kaufman B, Shapira-Frommer R, Schmutzler RK, et al. Olaparib monotherapy in patients with advanced cancer and a germline BRCA1/2 mutation. *J Clin Oncol*. 2015 Jan 20;33(3):244-50. doi: 10.1200/JCO.2014.56.2728. Epub 2014 Nov 3. PMID: 25366685; PMCID: PMC6057749.
- Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, et al. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res*. 1993 Sep 1;53(17):3976-85. PMID: 8358726.
- Kawanishi S, Ohnishi S, Ma N, et al. Nitrate and oxidative DNA damage in infection-related carcinogenesis in relation to cancer stem cells. *Genes Environ*. 2017 Jan 1;38:26. doi: 10.1186/s41021-016-0055-7. PMID: 28050219; PMCID: PMC5203929.

- Kemp CJ, Donehower LA, Bradley A, et al. Reduction of p53 gene dosage does not increase initiation or promotion but enhances malignant progression of chemically induced skin tumors. *Cell*. 1993 Sep 10;74(5):813-22. doi: 10.1016/0092-8674(93)90461-x. PMID: 8374952.
- Khan FH, Dervan E, Bhattacharyya DD, McAuliffe JD, Miranda KM, Glynn SA. The Role of Nitric Oxide in Cancer: Master Regulator or NOT? *Int J Mol Sci*. 2020 Dec 10;21(24):9393. doi: 10.3390/ijms21249393. PMID: 33321789; PMCID: PMC7763974.
- Kim JW, Kim K, Kang K, Joe CO. Inhibition of homodimerization of poly(ADP-ribose) polymerase by its C-terminal cleavage products produced during apoptosis. *J Biol Chem*. 2000 Mar 17;275(11):8121-5. doi: 10.1074/jbc.275.11.8121. PMID: 10713134.
- Kim MY, Zhang T, Kraus WL. Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1: 'PAR-laying' NAD⁺ into a nuclear signal. *Genes Dev*. 2005 Sep 1;19(17):1951-67. doi: 10.1101/gad.1331805. PMID: 16140981.
- Kinzler KW, Vogelstein B. Colorectal tumors. *Genetic Basis of Human Cancer*. 2002;2:583-612.
- Kirsch DG, Kastan MB. Tumor-suppressor p53: implications for tumor development and prognosis. *J Clin Oncol*. 1998 Sep;16(9):3158-68. doi: 10.1200/JCO.1998.16.9.3158. PMID: 9738588.
- Kleinert H, Schwarz PM, Förstermann U. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biol Chem*. 2003 Oct-Nov;384(10-11):1343-64. doi: 10.1515/BC.2003.152. PMID: 14669979.
- Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J*. 1994 Mar 1;298(Pt 2):249-58. doi: 10.1042/bj2980249. PMID: 7510950; PMCID: PMC1137932.
- Konishi T, Shimada Y, Hsu M, et al. Association of Preoperative and Postoperative Serum Carcinoembryonic Antigen and Colon Cancer Outcome. *JAMA Oncol*. 2018 Mar 1;4(3):309-315. doi: 10.1001/jamaoncol.2017.4420. PMID: 29270608; PMCID: PMC5885834.
- Kumar M, Jaiswal RK, Prasad R, et al. PARP-1 induces EMT in non-small cell lung carcinoma cells via modulating the transcription factors Smad4, p65 and ZEB1. *Life Sci*. 2021; 269:118994. doi:10.1016/j.lfs.2020.118994
- Kummar S, Chen A, Ji J, et al. Phase I study of PARP inhibitor ABT-888 in combination with topotecan in adults with refractory solid tumors and lymphomas. *Cancer Res*. 2011 Sep 1;71(17):5626-34. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1227. Epub 2011 Jul 27. PMID: 21795476; PMCID: PMC3166628.
- Lala PK, Chakraborty C. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression. *Lancet Oncol*. 2001;2(3):149-156. doi:10.1016/S1470-2045(00)00256-4
- Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*. 1992 Jul 2;358(6381):15-6. doi: 10.1038/358015a0. PMID: 1614522.

- Langelier MF, Planck JL, Roy S, Pascal JM. Structural basis for DNA damage-dependent poly(ADP-ribose)ation by human PARP-1. *Science*. 2012 May 11;336(6082):728-32. doi: 10.1126/science.1216338. PMID: 22582261; PMCID: PMC3532513.
- Langelier MF, Servent KM, Rogers EE, Pascal JM. A third zinc-binding domain of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 coordinates DNA-dependent enzyme activation. *J Biol Chem*. 2008 Feb 15;283(7):4105-14. doi: 10.1074/jbc.M708558200. Epub 2007 Nov 30. Erratum in: *J Biol Chem*. 2008 Aug 15;283(33):22884. PMID: 18055453.
- Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. 1994 Feb 17;367(6464):645-8. doi: 10.1038/367645a0. PMID: 7509044.
- Le Page C, Sanceau J, Drapier JC, et al. Inhibitors of ADP-ribosylation impair inducible nitric oxide synthase gene transcription through inhibition of NF kappa B activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Feb 13;243(2):451-7. doi: 10.1006/bbrc.1998.8113. PMID: 9480829.
- Leggett B, Whitehall V. Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology*. 2010 Jun;138(6):2088-100. doi: 10.1053/j.gastro.2009.12.066. PMID: 20420948.
- Leichman L, Groshen S, O'Neil BH, et al. Phase II Study of Olaparib (AZD-2281) After Standard Systemic Therapies for Disseminated Colorectal Cancer. *Oncologist*. 2016 Feb;21(2):172-7. doi: 10.1634/theoncologist.2015-0319. Epub 2016 Jan 19. PMID: 26786262; PMCID: PMC4746089.
- Lenkiewicz M, Li N, Singh SK. Culture and isolation of brain tumor initiating cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol*. 2009 Oct;Chapter 3:Unit3.3. doi: 10.1002/9780470151808.sc0303s11. PMID: 19816962.
- Lenos KJ, Miedema DM, Lodestijn SC, et al. Stem cell functionality is microenvironmentally defined during tumour expansion and therapy response in colon cancer. *Nat Cell Biol*. 2018 Oct;20(10):1193-1202. doi: 10.1038/s41556-018-0179-z. Epub 2018 Sep 3. PMID: 30177776; PMCID: PMC6163039.
- Leppard JB, Dong Z, Mackey ZB, et al. Physical and functional interaction between DNA ligase IIIalpha and poly(ADP-Ribose) polymerase 1 in DNA single-strand break repair. *Mol Cell Biol*. 2003 Aug;23(16):5919-27. doi: 10.1128/MCB.23.16.5919-5927.2003. PMID: 12897160; PMCID: PMC166336.
- Levine AJ, Oren M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer*. 2009 Oct;9(10):749-58. doi: 10.1038/nrc2723. PMID: 19776744; PMCID: PMC2771725.
- Li H, Boakye D, Chen X, et al. Associations of Body Mass Index at Different Ages With Early-Onset Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2022 Apr;162(4):1088-1097.e3. doi: 10.1053/j.gastro.2021.12.239. Epub 2021 Dec 13. PMID: 34914944.
- Li HJ, Reinhardt F, Herschman HR, Weinberg RA. Cancer-stimulated mesenchymal stem cells create a carcinoma stem cell niche via prostaglandin E2 signaling. *Cancer Discov*. 2012 Sep;2(9):840-55. doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0101. Epub 2012 Jul 3. PMID: 22763855; PMCID: PMC3833451.

- Liu G, Park YJ, Tsuruta Y, et al. p53 Attenuates lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation and acute lung injury. *J Immunol.* 2009 Apr 15;182(8):5063-71. doi: 10.4049/jimmunol.0803526. PMID: 19342686.
- Liu G, Yuan X, Zeng Z, et al. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer.* 2006 Dec 2;5:67. doi: 10.1186/1476-4598-5-67. PMID: 17140455; PMCID: PMC1697823.
- Liu L, Zhuang W, Wang RQ, et al. Is dietary fat associated with the risk of colorectal cancer? A meta-analysis of 13 prospective cohort studies. *Eur J Nutr.* 2011 Apr;50(3):173-84. doi: 10.1007/s00394-010-0128-5. Epub 2010 Aug 10. PMID: 20697723.
- Liu YC, Yeh CT, Lin KH. Cancer Stem Cell Functions in Hepatocellular Carcinoma and Comprehensive Therapeutic Strategies. *Cells.* 2020 May 26;9(6):1331. doi: 10.3390/cells9061331. PMID: 32466488; PMCID: PMC7349579.
- López-Sánchez LM, Mena R, Guil-Luna S, et al. Nitric oxide-targeted therapy inhibits stemness and increases the efficacy of tamoxifen in estrogen receptor-positive breast cancer cells. *Lab Invest.* 2021;101(3):292-303. doi:10.1038/s41374-020-00507-z
- Lucena-Cacace A, Otero-Albiol D, Jiménez-García MP, et al. NAMPT Is a Potent Oncogene in Colon Cancer Progression that Modulates Cancer Stem Cell Properties and Resistance to Therapy through Sirt1 and PARP. *Clin Cancer Res.* 2018 Mar 1;24(5):1202-1215. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-2575. Epub 2017 Dec 4. PMID: 29203587.
- Luo S, Li JY, Zhao LN, et al. Diabetes mellitus increases the risk of colorectal neoplasia: An updated meta-analysis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2016 Feb;40(1):110-23. doi: 10.1016/j.clinre.2015.05.021. Epub 2015 Jul 7. PMID: 26162991.
- Lupo B, Trusolino L. Inhibition of poly(ADP-ribosyl)ation in cancer: old and new paradigms revisited. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Aug;1846(1):201-15. doi: 10.1016/j.bbcan.2014.07.004. Epub 2014 Jul 12. PMID: 25026313.
- Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2003 Mar 6;348(10):919-32. doi: 10.1056/NEJMra012242. PMID: 12621137.
- Ma B, Hottiger MO. Crosstalk between Wnt/ β -Catenin and NF- κ B Signaling Pathway during Inflammation. *Front Immunol.* 2016;7:378. Published 2016 Sep 22. doi:10.3389/fimmu.2016.00378
- Ma S, Lee TK, Zheng BJ, et al. CD133+ HCC cancer stem cells confer chemoresistance by preferential expression of the Akt/PKB survival pathway. *Oncogene.* 2008 Mar 13;27(12):1749-58. doi: 10.1038/sj.onc.1210811. Epub 2007 Sep 24. PMID: 17891174.
- Malanga M, Pleschke JM, Kleczkowska HE, et al. Poly(ADP-ribose) binds to specific domains of p53 and alters its DNA binding functions. *J Biol Chem.* 1998 May 8;273(19):11839-43. doi: 10.1074/jbc.273.19.11839. PMID: 9565608.
- Maluchenko NV, Nilov DK, Pushkarev SV, et al. Mechanisms of Nucleosome Reorganization by PARP1. *Int J Mol Sci.* 2021 Nov 9;22(22):12127. doi: 10.3390/ijms222212127. PMID: 34830005; PMCID: PMC8620739.

- Mao J, Fan S, Ma W, et al. Roles of Wnt/ β -catenin signaling in the gastric cancer stem cells proliferation and salinomycin treatment. *Cell Death Dis.* 2014 Jan 30;5(1):e1039. doi: 10.1038/cddis.2013.515. PMID: 24481453; PMCID: PMC4040703.
- Martin-Oliva D, Aguilar-Quesada R, O'valle F, et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase modulates tumor-related gene expression, including hypoxia-inducible factor-1 activation, during skin carcinogenesis. *Cancer Res.* 2006 Jun 1;66(11):5744-56. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3050. PMID: 16740713.
- Matsumoto M, Furihata M, Kurabayashi A, Araki K, Sasaguri S, Ohtsuki Y. Association between inducible nitric oxide synthase expression and p53 status in human esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology.* 2003;64(1):90-96. doi:10.1159/000066519
- McGinity CL, Palmieri EM, Somasundaram V, et al. Nitric Oxide Modulates Metabolic Processes in the Tumor Immune Microenvironment. *Int J Mol Sci.* 2021 Jun 30;22(13):7068. doi: 10.3390/ijms22137068. PMID: 34209132; PMCID: PMC8268115.
- Meyer-Ficca ML, Meyer RG, Coyle DL, et al. Human poly(ADP-ribose) glycohydrolase is expressed in alternative splice variants yielding isoforms that localize to different cell compartments. *Exp Cell Res.* 2004 Jul 15;297(2):521-32. doi: 10.1016/j.yexcr.2004.03.050. PMID: 15212953.
- Meyer-Ficca ML, Meyer RG, Jacobson EL, Jacobson MK. Poly(ADP-ribose) polymerases: managing genome stability. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005 May;37(5):920-6. doi: 10.1016/j.biocel.2004.09.011. Epub 2004 Dec 15. PMID: 15743666.
- Min A, Im SA. PARP Inhibitors as Therapeutics: Beyond Modulation of PARylation. *Cancers (Basel).* 2020 Feb 8;12(2):394. doi: 10.3390/cancers12020394. PMID: 32046300; PMCID: PMC7072193.
- Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell.* 1995 Jan 27;80(2):293-9. doi: 10.1016/0092-8674(95)90412-3. PMID: 7834749.
- Mohd Suan MA, Tan WL, Soelar SA, et al. Intestinal obstruction: predictor of poor prognosis in colorectal carcinoma? *Epidemiol Health.* 2015 Mar 30;37:e2015017. doi: 10.4178/epih/e2015017. PMID: 25868638; PMCID: PMC4459110.
- Molina-Barceló A, Moreno Salas J, Peiró-Pérez R, et al. Desigualdades de acceso a los programas de cribado del cáncer en España y cómo reducirlas: datos de 2013 y 2020. *Rev Esp Salud Publica.* 2021 Jan 26;95:e202101017. PMID: 33496270.
- Montero J, Dutta C, van Bodegom D, Weinstock D, Letai A. p53 regulates a non-apoptotic death induced by ROS. *Cell Death Differ.* 2013;20(11):1465-1474. doi:10.1038/cdd.2013.52
- Morgan E, Arnold M, Gini A, et al. Global burden of colorectal cancer in 2020 and 2040: incidence and mortality estimates from GLOBOCAN. *Gut.* 2023 Feb;72(2):338-344. doi: 10.1136/gutjnl-2022-327736. Epub 2022 Sep 8. PMID: 36604116.

- Mori M, Gotoh T. Regulation of nitric oxide production by arginine metabolic enzymes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Sep 7;275(3):715-9. doi: 10.1006/bbrc.2000.3169. PMID: 10973788.
- Müller MF, Ibrahim AE, Arends MJ. Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Arch*. 2016 Aug;469(2):125-34. doi: 10.1007/s00428-016-1956-3. Epub 2016 Jun 20. PMID: 27325016; PMCID: PMC4978761.
- Mundade R, Imperiale TF, Prabhu L, Loehrer PJ, Lu T. Genetic pathways, prevention, and treatment of sporadic colorectal cancer. *Oncoscience*. 2014 Jun 30;1(6):400-6. doi: 10.18632/oncoscience.59. PMID: 25594038; PMCID: PMC4284625.
- Muñoz-Gámez JA, Rodríguez-Vargas JM, Quiles-Pérez R, et al. PARP-1 is involved in autophagy induced by DNA damage. *Autophagy*. 2009 Jan;5(1):61-74. doi: 10.4161/auto.5.1.7272. Epub 2009 Jan 27. PMID: 19001878.
- Nakayama M, Oshima M. Mutant p53 in colon cancer. *J Mol Cell Biol*. 2019 Apr 1;11(4):267-276. doi: 10.1093/jmcb/mjy075. PMID: 30496442; PMCID: PMC6487790.
- Nasseri Y, Langenfeld SJ. Imaging for Colorectal Cancer. *Surg Clin North Am*. 2017 Jun;97(3):503-513. doi: 10.1016/j.suc.2017.01.002. PMID: 28501243.
- Naura AS, Datta R, Hans CP, et al. Reciprocal regulation of iNOS and PARP-1 during allergen-induced eosinophilia. *Eur Respir J*. 2009 Feb;33(2):252-62. doi: 10.1183/09031936.00089008. Epub 2008 Oct 1. PMID: 18829681.
- Nawras Y, Merza N, Beier K, et al. Temporal Trends in Racial and Gender Disparities of Early Onset Colorectal Cancer in the United States: An Analysis of the CDC WONDER Database. *J Gastrointest Cancer*. 2024 Dec;55(4):1511-1519. doi: 10.1007/s12029-024-01096-6. Epub 2024 Oct 1. PMID: 39352432; PMCID: PMC11464567.
- Nguyen D, Liao W, Zeng SX, Lu H. Reviving the guardian of the genome: Small molecule activators of p53. *Pharmacol Ther*. 2017 Oct;178:92-108. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.03.013. Epub 2017 Mar 27. PMID: 28351719; PMCID: PMC5601031.
- Nguyen L, Shanmugan S. A Review Article: The Relationship Between Obesity and Colorectal Cancer. *Curr Diab Rep*. 2024 Dec 2;25(1):8. doi: 10.1007/s11892-024-01556-0. PMID: 39621160; PMCID: PMC11611961.
- Nieto MA. Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancer cells. *Science*. 2013 Nov 8;342(6159):1234850. doi: 10.1126/science.1234850. PMID: 24202173.
- Niu M, Gu Y. An in silico protocol for identifying potential poly(ADP-ribose)polymerase-1 (PARP-1) inhibitors from chemical databases. *New Journal of Chemistry*. 2015;39(4):1060-1066. doi: 10.1039/C4NJ01387E.
- Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 1976 Oct 1;194(4260):23-8. doi: 10.1126/science.959840. PMID: 959840.

- O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*. 2007 Jan 4;445(7123):106-10. doi: 10.1038/nature05372. Epub 2006 Nov 19. PMID: 17122772.
- Oda E, Ohki R, Murasawa H, et al. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*. 2000 May 12;288(5468):1053-8. doi: 10.1126/science.288.5468.1053. PMID: 10807576.
- Oei SL, Shi Y. Transcription factor Yin Yang 1 stimulates poly(ADP-ribosyl)ation and DNA repair. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Jun 8;284(2):450-4. doi: 10.1006/bbrc.2001.4985. PMID: 11394900.
- Oh BY, Noh GT, Hong KS, et al. The availability of computed tomography for pulmonary staging in colorectal cancer. *Ann Surg Treat Res*. 2014 Apr;86(4):212-6. doi: 10.4174/astr.2014.86.4.212. Epub 2014 Mar 25. PMID: 24783181; PMCID: PMC3996719.
- Ohmoto A, Yachida S. Current status of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors and future directions. *Onco Targets Ther*. 2017 Oct 26;10:5195-5208. doi: 10.2147/OTT.S139336. PMID: 29138572; PMCID: PMC5667784.
- Ohnishi S, Ma N, Thanan R, et al. DNA damage in inflammation-related carcinogenesis and cancer stem cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:387014. doi: 10.1155/2013/387014. Epub 2013 Dec 5. PMID: 24382987; PMCID: PMC3870134.
- Oliver FJ, de la Rubia G, Rolli V, Ruiz-Ruiz MC, de Murcia G, Murcia JM. Importance of poly(ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant. *J Biol Chem*. 1998 Dec 11;273(50):33533-9. doi: 10.1074/jbc.273.50.33533. PMID: 9837934.
- Oliver FJ, Ménissier-de Murcia J, Nacci C, et al. Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF-kappaB activation in poly(ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice. *EMBO J*. 1999 Aug 16;18(16):4446-54. doi: 10.1093/emboj/18.16.4446. PMID: 10449410; PMCID: PMC1171519.
- Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010 Jan;2(1):a001008. doi: 10.1101/cshperspect.a001008. PMID: 20182602; PMCID: PMC2827900.
- Otchy D, Hyman NH, Simmang C, et al. Practice parameters for colon cancer. *Dis Colon Rectum*. 2004 Aug;47(8):1269-84. doi: 10.1007/s10350-004-0598-8. PMID: 15484340.
- Park EM, Cho S, Frys K, et al. Interaction between inducible nitric oxide synthase and poly(ADP-ribose) polymerase in focal ischemic brain injury. *Stroke*. 2004 Dec;35(12):2896-901. doi: 10.1161/01.STR.0000147042.53659.6c. Epub 2004 Oct 28. PMID: 15514191.
- Park TS, Donnenberg VS, Donnenberg AD, et al. Dynamic Interactions Between Cancer Stem Cells and Their Stromal Partners. *Curr Pathobiol Rep*. 2014 Mar 1;2(1):41-52. doi: 10.1007/s40139-013-0036-5. PMID: 24660130; PMCID: PMC3956651.

- Pazzaglia S, Pioli C. Multifaceted Role of PARP-1 in DNA Repair and Inflammation: Pathological and Therapeutic Implications in Cancer and Non-Cancer Diseases. *Cells*. 2019 Dec 22;9(1):41. doi: 10.3390/cells9010041. PMID: 31877876; PMCID: PMC7017201.
- Peluffo RD. Cationic amino acid transporters and their modulation by nitric oxide in cardiac muscle cells. *Biophys Rev*. 2021 Nov 10;13(6):1071-1079. doi: 10.1007/s12551-021-00870-1. PMID: 35059028; PMCID: PMC8724503.
- Perea J, Lomas M, Hidalgo M. Molecular basis of colorectal cancer: towards an individualized management? *Rev Esp Enferm Dig*. 2011 Jan;103(1):29-35. doi: 10.4321/s1130-01082011000100006. PMID: 21341935.
- Pericay C, Montagut C, Reina JJ, et al. SEOM-GEMCAD-TTD clinical guidelines for the adjuvant treatment of colon cancer (2023). *Clin Transl Oncol*. 2024 Nov;26(11):2812-2825. doi: 10.1007/s12094-024-03559-5. Epub 2024 Jun 24. PMID: 38914755; PMCID: PMC11467085.
- Petermann E, Keil C, Oei SL. Importance of poly(ADP-ribose) polymerases in the regulation of DNA-dependent processes. *Cell Mol Life Sci*. 2005 Apr;62(7-8):731-8. doi: 10.1007/s00018-004-4504-2. PMID: 15868398.
- Pierce GB. Neoplasms, differentiations and mutations. *Am J Pathol*. 1974 Oct;77(1):103-118. PMID: 4447121; PMCID: PMC1910714.
- Plaks V, Kong N, Werb Z. The cancer stem cell niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cells? *Cell Stem Cell*. 2015 Mar 5;16(3):225-38. doi: 10.1016/j.stem.2015.02.015. PMID: 25748930; PMCID: PMC4355577.
- Podberezin M, Wen J, Chang CC. Cancer stem cells: a review of potential clinical applications. *Arch Pathol Lab Med*. 2013 Aug;137(8):1111-6. doi: 10.5858/arpa.2012-0494-RA. Epub 2012 Nov 15. PMID: 23153183.
- Prager BC, Xie Q, Bao S, Rich JN. Cancer Stem Cells: The Architects of the Tumor Ecosystem. *Cell Stem Cell*. 2019 Jan 3;24(1):41-53. doi: 10.1016/j.stem.2018.12.009. PMID: 30609398; PMCID: PMC6350931.
- Puentes-Pardo JD, Moreno-SanJuan S, Casado J, et al. PARP-1 Expression Influences Cancer Stem Cell Phenotype in Colorectal Cancer Depending on p53. *Int J Mol Sci*. 2023 Mar 1;24(5):4787. doi: 10.3390/ijms24054787. PMID: 36902215; PMCID: PMC10002521.
- Puglisi MA, Cenciarelli C, Tesori V, et al. High nitric oxide production, secondary to inducible nitric oxide synthase expression, is essential for regulation of the tumour-initiating properties of colon cancer stem cells. *J Pathol*. 2015 Aug;236(4):479-90. doi: 10.1002/path.4545. Epub 2015 May 12. PMID: 25875314.
- Puglisi MA, Cenciarelli C, Tesori V, et al. High nitric oxide production, secondary to inducible nitric oxide synthase expression, is essential for regulation of the tumour-initiating properties of colon cancer stem cells. *J Pathol*. 2015;236(4):479-490. doi:10.1002/path.4545.
- Rajakulendran N, Rowland KJ, Selvadurai HJ, et al. Wnt and Notch signaling govern self-renewal and differentiation in a subset of human glioblastoma stem cells. *Genes Dev*. 2019 May

1;33(9-10):498-510. doi: 10.1101/gad.321968.118. Epub 2019 Mar 6. PMID: 30842215; PMCID: PMC6499328.

Rashed AT, Bakhamees BH, Abdulla AA, et al. A Systematic Review of the Impact of Dietary and Lifestyle Factors on Colorectal Cancer Prevention in Gulf Cooperation Council Countries. *Cureus*. 2024 Sep 15;16(9):e69439. doi: 10.7759/cureus.69439. PMID: 39411590; PMCID: PMC11474415.

Ratovitski EA, Bao C, Quick RA, et al. An inducible nitric-oxide synthase (NOS)-associated protein inhibits NOS dimerization and activity. *J Biol Chem*. 1999 Oct 15;274(42):30250-7. doi: 10.1074/jbc.274.42.30250. PMID: 10514518.

Raut CP, Pawlik TM, Rodriguez-Bigas MA. Clinicopathologic features in colorectal cancer patients with microsatellite instability. *Mutat Res*. 2004 Dec 21;568(2):275-82. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2004.05.025. PMID: 15542114.

Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*. 2007 Jan 4;445(7123):111-5. doi: 10.1038/nature05384. Epub 2006 Nov 19. PMID: 17122771.

Ríos-Arrabal S, Puentes-Pardo JD, Moreno-SanJuan S, et al. Endothelin-1 as a Mediator of Heme Oxygenase-1-Induced Stemness in Colorectal Cancer: Influence of p53. *J Pers Med*. 2021 Jun 4;11(6):509. doi: 10.3390/jpm11060509. PMID: 34199777; PMCID: PMC8227293.

Rodríguez MI, González-Flores A, Dantzer F, et al. Poly(ADP-ribose)-dependent regulation of Snail1 protein stability. *Oncogene*. 2011 Oct 20;30(42):4365-72. doi: 10.1038/onc.2011.153. Epub 2011 May 16. PMID: 21577210.

Romeo MA, Gilardini Montani MS, Benedetti R, et al. Anticancer effect of AZD2461 PARP inhibitor against colon cancer cells carrying wt or dysfunctional p53. *Exp Cell Res*. 2021;408(2):112879. doi:10.1016/j.yexcr.2021.112879

Rosenfeldt MT, O'Prey J, Morton JP, et al. p53 status determines the role of autophagy in pancreatic tumour development. *Nature*. 2013 Dec 12;504(7479):296-300. doi: 10.1038/nature12865. Epub 2013 Dec 4. PMID: 24305049.

Rothwell PM, Wilson M, Elwin CE, et al. Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials. *Lancet*. 2010 Nov 20;376(9754):1741-50. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61543-7. Epub 2010 Oct 21. PMID: 20970847.

Russo A, Bazan V, Iacopetta B, et al.; TP53-CRC Collaborative Study Group. The TP53 colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of p53 mutation: influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment. *J Clin Oncol*. 2005 Oct 20;23(30):7518-28. doi: 10.1200/JCO.2005.00.471. Epub 2005 Sep 19. PMID: 16172461.

Sahebnaasagh A, Saghafi F, Negintaji S, et al. Nitric Oxide and Immune Responses in Cancer: Searching for New Therapeutic Strategies. *Curr Med Chem*. 2022;29(9):1561-1595. doi: 10.2174/0929867328666210707194543. PMID: 34238142.

- Samadder NJ, Curtin K, Tuohy TM, et al. Increased risk of colorectal neoplasia among family members of patients with colorectal cancer: a population-based study in Utah. *Gastroenterology*. 2014 Oct;147(4):814-821.e5; quiz e15-6. doi: 10.1053/j.gastro.2014.07.006. Epub 2014 Jul 17. PMID: 25042087.
- Sarig R, Rivlin N, Brosh R, et al. Mutant p53 facilitates somatic cell reprogramming and augments the malignant potential of reprogrammed cells. *J Exp Med*. 2010 Sep 27;207(10):2127-40. doi: 10.1084/jem.20100797. Epub 2010 Aug 9. PMID: 20696700; PMCID: PMC2947075.
- Schiewer MJ, Knudsen KE. Transcriptional roles of PARP1 in cancer. *Mol Cancer Res*. 2014;12(8):1069-1080. doi:10.1158/1541-7786.MCR-13-0672
- Schoedon G, Blau N, Schneemann M, et al. Nitric oxide production depends on preceding tetrahydrobiopterin synthesis by endothelial cells: selective suppression of induced nitric oxide production by sepiapterin reductase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994 Mar 15;199(2):504-10. doi: 10.1006/bbrc.1994.1257. PMID: 7510954.
- Schreiber V, Dantzer F, Ame JC, de Murcia G. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006 Jul;7(7):517-28. doi: 10.1038/nrm1963. PMID: 16829982.
- Shah SC, Itzkowitz SH. Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Disease: Mechanisms and Management. *Gastroenterology*. 2022;162(3):715-730.e3. doi:10.1053/j.gastro.2021.10.035
- Shall S, de Murcia G. Poly(ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model? *Mutat Res*. 2000 Jun 30;460(1):1-15. doi: 10.1016/s0921-8777(00)00016-1. PMID: 10856830.
- Shih IM, Wang TL, Traverso G, et al. Top-down morphogenesis of colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Feb 27;98(5):2640-5. doi: 10.1073/pnas.051629398. Epub 2001 Feb 20. PMID: 11226292; PMCID: PMC30191.
- Siemens H, Jackstadt R, Hüntten S, et al. miR-34 and SNAIL form a double-negative feedback loop to regulate epithelial-mesenchymal transitions. *Cell Cycle*. 2011 Dec 15;10(24):4256-71. doi: 10.4161/cc.10.24.18552. Epub 2011 Dec 15. PMID: 22134354.
- Siemens H, Jackstadt R, Kaller M, et al. Repression of c-Kit by p53 is mediated by miR-34 and is associated with reduced chemoresistance, migration and stemness. *Oncotarget*. 2013 Sep;4(9):1399-415. doi: 10.18632/oncotarget.1202. PMID: 24009080; PMCID: PMC3824539.
- Simbulan-Rosenthal CM, Rosenthal DS, Luo R, Smulson ME. Poly(ADP-ribosyl)ation of p53 during apoptosis in human osteosarcoma cells. *Cancer Res*. 1999 May 1;59(9):2190-4. PMID: 10232607.
- Sistigu A, Musella M, Galassi C, et al. Tuning Cancer Fate: Tumor Microenvironment's Role in Cancer Stem Cell Quiescence and Reawakening. *Front Immunol*. 2020 Oct 21;11:2166. doi: 10.3389/fimmu.2020.02166. PMID: 33193295; PMCID: PMC7609361.

- Slattery ML, Fitzpatrick FA. Convergence of hormones, inflammation, and energy-related factors: a novel pathway of cancer etiology. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2009 Nov;2(11):922-30. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-08-0191. PMID: 19892662; PMCID: PMC2895421.
- Soldani C, Lazzè MC, Bottone MG, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase cleavage during apoptosis: when and where?. *Exp Cell Res*. 2001;269(2):193-201. doi:10.1006/excr.2001.5293
- Soldatenkov VA, Chasovskikh S, Potaman VN, et al. Transcriptional repression by binding of poly(ADP-ribose) polymerase to promoter sequences. *J Biol Chem*. 2002 Jan 4;277(1):665-70. doi: 10.1074/jbc.M108551200. Epub 2001 Oct 29. PMID: 11684688.
- Solimando DA Jr, Waddell JA. Drug Monographs: Olaratumab and Rucaparib. *Hosp Pharm*. 2017 Apr;52(4):258-263. doi: 10.1310/hpj5203-258. PMID: 28515503; PMCID: PMC5424828.
- Sphyris N, Hodder MC, Sansom OJ. Subversion of Niche-Signalling Pathways in Colorectal Cancer: What Makes and Breaks the Intestinal Stem Cell. *Cancers (Basel)*. 2021 Feb 27;13(5):1000. doi: 10.3390/cancers13051000. PMID: 33673710; PMCID: PMC7957493.
- Squadrito GL, Pryor WA. Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxyxynitrite, and carbon dioxide. *Free Radic Biol Med*. 1998 Sep;25(4-5):392-403. doi: 10.1016/s0891-5849(98)00095-1. PMID: 9741578.
- Stempel M, Kedinger M, Augenlicht L, Klampfer L. Essential role of the JAK/STAT1 signaling pathway in the expression of inducible nitric-oxide synthase in intestinal epithelial cells and its regulation by butyrate. *J Biol Chem*. 2007;282(13):9797-9804. doi:10.1074/jbc.M609426200
- Stoffel EM, Kastrinos F. Familial colorectal cancer, beyond Lynch syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2014 Jul;12(7):1059-68. doi: 10.1016/j.cgh.2013.08.015. Epub 2013 Aug 17. PMID: 23962553; PMCID: PMC3926911.
- Strickfaden H, McDonald D, Kruhlak MJ, et al. Poly(ADP-ribosyl)ation-dependent Transient Chromatin Decondensation and Histone Displacement following Laser Microirradiation. *J Biol Chem*. 2016 Jan 22;291(4):1789-1802. doi: 10.1074/jbc.M115.694992. Epub 2015 Nov 11. PMID: 26559976; PMCID: PMC4722458.
- Stuehr DJ, Haque MM. Nitric oxide synthase enzymology in the 20 years after the Nobel Prize. *Br J Pharmacol*. 2019 Jan;176(2):177-188. doi: 10.1111/bph.14533. Epub 2018 Dec 9. PMID: 30402946; PMCID: PMC6295403.
- Stuelten CH, Mertins SD, Busch JI, et al. Complex display of putative tumor stem cell markers in the NCI60 tumor cell line panel. *Stem Cells*. 2010 Apr;28(4):649-60. doi: 10.1002/stem.324. PMID: 20178109; PMCID: PMC7444750.
- Sun BL. Current Microsatellite Instability Testing in Management of Colorectal Cancer. *Clin Colorectal Cancer*. 2021 Mar;20(1):e12-e20. doi: 10.1016/j.clcc.2020.08.001. Epub 2020 Aug 10. PMID: 32888812.
- Sung H, Siegel RL, Laversanne M, et al. Colorectal cancer incidence trends in younger versus older adults: an analysis of population-based cancer registry data. *Lancet Oncol*. 2025

Jan;26(1):51-63. doi: 10.1016/S1470-2045(24)00600-4. Epub 2024 Dec 12. PMID: 39674189; PMCID: PMC11695264.

Takahashi-Yanaga F, Kahn M. Targeting Wnt signaling: can we safely eradicate cancer stem cells? Clin Cancer Res. 2010 Jun 15;16(12):3153-62. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2943. Epub 2010 Jun 8. PMID: 20530697.

Takebe N, Harris PJ, Warren RQ, Ivy SP. Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog pathways. Nat Rev Clin Oncol. 2011 Feb;8(2):97-106. doi: 10.1038/nrclinonc.2010.196. Epub 2010 Dec 14. PMID: 21151206.

Tan YS, Mhoumadi Y, Verma CS. Roles of computational modelling in understanding p53 structure, biology, and its therapeutic targeting. J Mol Cell Biol. 2019 Apr 1;11(4):306-316. doi: 10.1093/jmcb/mjz009. PMID: 30726928; PMCID: PMC6487789.

Tanaka H, Arakawa H, Yamaguchi T, et al. A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. Nature. 2000 Mar 2;404(6773):42-9. doi: 10.1038/35003506. PMID: 10716435.

Tang DG. Understanding cancer stem cell heterogeneity and plasticity. Cell Res. 2012 Mar;22(3):457-72. doi: 10.1038/cr.2012.13. Epub 2012 Jan 17. PMID: 22357481; PMCID: PMC3292302.

Tárraga López PJ, Albero JS, Rodríguez-Montes JA. Primary and secondary prevention of colorectal cancer. Clin Med Insights Gastroenterol. 2014 Jul 14;7:33-46. doi: 10.4137/CGast.S14039. PMID: 25093007; PMCID: PMC4116379.

Tirino V, Desiderio V, Paino F, et al. Cancer stem cells in solid tumors: an overview and new approaches for their isolation and characterization. FASEB J. 2013 Jan;27(1):13-24. doi: 10.1096/fj.12-218222. Epub 2012 Sep 28. PMID: 23024375.

Tomasetti C, Vogelstein B. Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. Science. 2015 Jan 2;347(6217):78-81. doi: 10.1126/science.1260825. PMID: 25554788; PMCID: PMC4446723.

Tomuleasa C, Soritau O, Rus-Ciucă D, et al. Functional and molecular characterization of glioblastoma multiforme-derived cancer stem cells. J BUON. 2010 Jul-Sep;15(3):583-91. PMID: 20941832.

Uchida K, Uchida M, Hanai S, et al. Isolation of the poly(ADP-ribose) polymerase-encoding cDNA from *Xenopus laevis*: phylogenetic conservation of the functional domains. Gene. 1993 Dec 31;137(2):293-7. doi: 10.1016/0378-1119(93)90023-v. PMID: 8299962.

Ummarino S, Hausman C, Di Ruscio A. The PARP Way to Epigenetic Changes. Genes (Basel). 2021 Mar 20;12(3):446. doi: 10.3390/genes12030446. PMID: 33804735; PMCID: PMC8003872.

US Preventive Services Task Force, Davidson KW, Barry MJ, et al. Screening for Colorectal Cancer: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement. JAMA. 2021 May 18;325(19):1965-1977. doi: 10.1001/jama.2021.6238. Erratum in: JAMA. 2021 Aug 24;326(8):773. doi: 10.1001/jama.2021.12404. PMID: 34003218.

- Valenzuela MT, Guerrero R, Núñez MI, et al. PARP-1 modifies the effectiveness of p53-mediated DNA damage response. *Oncogene*. 2002 Feb 7;21(7):1108-16. doi: 10.1038/sj.onc.1205169. PMID: 11850828.
- Valls C, Andía E, Sánchez A, et al. Hepatic metastases from colorectal cancer: preoperative detection and assessment of resectability with helical CT. *Radiology*. 2001 Jan;218(1):55-60. doi: 10.1148/radiology.218.1.r01dc1155. PMID: 11152779.
- Vaziri H, West MD, Allsopp RC, et al. ATM-dependent telomere loss in aging human diploid fibroblasts and DNA damage lead to the post-translational activation of p53 protein involving poly(ADP-ribose) polymerase. *EMBO J*. 1997 Oct 1;16(19):6018-33. doi: 10.1093/emboj/16.19.6018. PMID: 9312059; PMCID: PMC1170232.
- Venere M, Hamerlik P, Wu Q, et al. Therapeutic targeting of constitutive PARP activation compromises stem cell phenotype and survival of glioblastoma-initiating cells. *Cell Death Differ*. 2014;21(2):258-269. doi:10.1038/cdd.2013.136
- Vera R, González-Flores E, Rubio C, et al. Multidisciplinary management of liver metastases in patients with colorectal cancer: a consensus of SEOM, AEC, SEOR, SERVEI, and SEMNIM. *Clin Transl Oncol*. 2020 May;22(5):647-662. doi: 10.1007/s12094-019-02182-z. Epub 2019 Jul 29. PMID: 31359336.
- Vermeulen L, de Sousa e Melo F, Richel DJ, et al. The developing cancer stem-cell model: clinical challenges and opportunities. *Lancet Oncol*. 2012 Feb;13(2):e83-9. doi: 10.1016/S1470-2045(11)70257-1. PMID: 22300863.
- Vermeulen L, De Sousa E Melo F, van der Heijden M, et al. Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat Cell Biol*. 2010 May;12(5):468-76. doi: 10.1038/ncb2048. Epub 2010 Apr 25. PMID: 20418870.
- Vieira AR, Abar L, Chan DSM, et al. Foods and beverages and colorectal cancer risk: a systematic review and meta-analysis of cohort studies, an update of the evidence of the WCRF-AICR Continuous Update Project. *Ann Oncol*. 2017 Aug 1;28(8):1788-1802. doi: 10.1093/annonc/mdx171. PMID: 28407090.
- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*. 1988 Sep 1;319(9):525-32. doi: 10.1056/NEJM198809013190901. PMID: 2841597.
- von Minckwitz G, Müller BM, Loibl S, et al. Cytoplasmic poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase expression is predictive and prognostic in patients with breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2011;29(16):2150-2157. doi:10.1200/JCO.2010.31.9079
- Wainwright EN, Scaffidi P. Epigenetics and Cancer Stem Cells: Unleashing, Hijacking, and Restricting Cellular Plasticity. *Trends Cancer*. 2017 May;3(5):372-386. doi: 10.1016/j.trecan.2017.04.004. Epub 2017 May 5. PMID: 28718414; PMCID: PMC5506260.
- Wang C, Jette N, Moussienko D, et al. ATM-Deficient Colorectal Cancer Cells Are Sensitive to the PARP Inhibitor Olaparib. *Transl Oncol*. 2017 Apr;10(2):190-196. doi:

10.1016/j.tranon.2017.01.007. Epub 2017 Feb 6. PMID: 28182994; PMCID: PMC5299208.

Wang H, Wang L, Xie Z, et al. Nitric Oxide (NO) and NO Synthases (NOS)-Based Targeted Therapy for Colon Cancer. *Cancers (Basel)*. 2020 Jul 13;12(7):1881. doi: 10.3390/cancers12071881. PMID: 32668616; PMCID: PMC7408898.

Wang L, Liang C, Li F, et al. PARP1 in Carcinomas and PARP1 Inhibitors as Antineoplastic Drugs. *Int J Mol Sci*. 2017 Oct 8;18(10):2111. doi: 10.3390/ijms18102111. PMID: 28991194; PMCID: PMC5666793.

Wang YZ, Cao YQ, Wu JN, Chen M, Cha XY. Expression of nitric oxide synthase in human gastric carcinoma and its relation to p53, PCNA. *World J Gastroenterol*. 2005;11(1):46-50. doi:10.3748/wjg.v11.i1.46

Weiswald LB, Bellet D, Dangles-Marie V. Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia*. 2015 Jan;17(1):1-15. doi: 10.1016/j.neo.2014.12.004. PMID: 25622895; PMCID: PMC4309685.

Whitacre CM, Hashimoto H, Tsai ML, et al. Involvement of NAD-poly(ADP-ribose) metabolism in p53 regulation and its consequences. *Cancer Res*. 1995 Sep 1;55(17):3697-701. PMID: 7641178.

Wiratkapun S, Kraemer M, Seow-Choen F, et al. High preoperative serum carcinoembryonic antigen predicts metastatic recurrence in potentially curative colonic cancer: results of a five-year study. *Dis Colon Rectum*. 2001 Feb;44(2):231-5. doi: 10.1007/BF02234298. PMID: 11227940.

Wolin KY, Yan Y, Colditz GA, et al. Physical activity and colon cancer prevention: a meta-analysis. *Br J Cancer*. 2009 Feb 24;100(4):611-6. doi: 10.1038/sj.bjc.6604917. Epub 2009 Feb 10. PMID: 19209175; PMCID: PMC2653744.

World Health Organization (WHO). Cancer Prevention. Accessed 14/01/2025; disponible en <http://www.who.int/cancer/prevention/en/>.

Xu F, Sun Y, Yang SZ, et al. Cytoplasmic PARP-1 promotes pancreatic cancer tumorigenesis and resistance. *Int J Cancer*. 2019;145(2):474-483. doi:10.1002/ijc.32108

Xu X, Chai S, Wang P, et al. Aldehyde dehydrogenases and cancer stem cells. *Cancer Lett*. 2015 Dec 1;369(1):50-7. doi: 10.1016/j.canlet.2015.08.018. Epub 2015 Aug 28. PMID: 26319899.

Yang XD, Kong FE, Qi L, et al. PARP inhibitor Olaparib overcomes Sorafenib resistance through reshaping the pluripotent transcriptome in hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer*. 2021 Jan 23;20(1):20. doi: 10.1186/s12943-021-01315-9. PMID: 33485358; PMCID: PMC7824946.

Yelamos J, Farres J, Llacuna L, et al. PARP-1 and PARP-2: New players in tumour development. *Am J Cancer Res*. 2011;1(3):328-346. Epub 2011 Jan 8. PMID: 21968702; PMCID: PMC3180065.

- Yoo YM, Jung EM, Ahn C, Jeung EB. Nitric oxide prevents H₂O₂-induced apoptosis in SK-N-MC human neuroblastoma cells. *Int J Biol Sci*. 2018;14(14):1974-1984. Published 2018 Nov 2. doi:10.7150/ijbs.28050
- Yoon KW, Byun S, Kwon E, et al. Control of signaling-mediated clearance of apoptotic cells by the tumor suppressor p53. *Science*. 2015 Jul 31;349(6247):1261669. doi: 10.1126/science.1261669. PMID: 26228159; PMCID: PMC5215039.
- Youn H, Ji I, Ji HP, et al. Under-expression of Kalirin-7 Increases iNOS activity in cultured cells and correlates to elevated iNOS activity in Alzheimer's disease hippocampus. *J Alzheimers Dis*. 2007 Nov;12(3):271-81. doi: 10.3233/jad-2007-12309. PMID: 18057561.
- Yu Z, Kuncewicz T, Dubinsky WP, et al. Nitric oxide-dependent negative feedback of PARP-1 trans-activation of the inducible nitric-oxide synthase gene. *J Biol Chem*. 2006 Apr 7;281(14):9101-9. doi: 10.1074/jbc.M511049200. Epub 2006 Feb 7. PMID: 16464859.
- Yuan S, Norgard RJ, Stanger BZ. Cellular Plasticity in Cancer. *Cancer Discov*. 2019 Jul;9(7):837-851. doi: 10.1158/2159-8290.CD-19-0015. Epub 2019 Apr 16. PMID: 30992279; PMCID: PMC6606363.
- Zaniolo K, Desnoyers S, Leclerc S, et al. Regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) gene expression through the post-translational modification of Sp1: a nuclear target protein of PARP-1. *BMC Mol Biol*. 2007 Oct 25;8:96. doi: 10.1186/1471-2199-8-96. PMID: 17961220; PMCID: PMC2175517.
- Zhang M, Atkinson RL, Rosen JM. Selective targeting of radiation-resistant tumor-initiating cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Feb 23;107(8):3522-7. doi: 10.1073/pnas.0910179107. Epub 2010 Feb 3. PMID: 20133717; PMCID: PMC2840501.
- Zhang Y, Wang J, Ding M, et al. Site-specific characterization of the Asp- and Glu-ADP-ribosylated proteome. *Nat Methods*. 2013 Oct;10(10):981-4. doi: 10.1038/nmeth.2603. Epub 2013 Aug 18. PMID: 23955771.
- Zhao K, Chai X, Johnston K, et al. Crystal structure of the mouse p53 core DNA-binding domain at 2.7 Å resolution. *J Biol Chem*. 2001 Apr 13;276(15):12120-7. doi: 10.1074/jbc.M011644200. Epub 2001 Jan 4. PMID: 11152481.
- Zhou Y, Xia L, Wang H, et al. Cancer stem cells in progression of colorectal cancer. *Oncotarget*. 2017 Dec 22;9(70):33403-33415. doi: 10.18632/oncotarget.23607. PMID: 30279970; PMCID: PMC6161799.

ANEXOS

1. CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA DONACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS



Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía
CONSEJERÍA DE SALUD

FORMULARIO DE INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO INFORMADO ESCRITO Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía

DOCUMENTO DE INFORMACIÓN PARA DONACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS AL BIOBANCO PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

Este documento sirve para que usted otorgue su consentimiento para donar sus muestras biológicas, o las del sujeto al que representa, al Biobanco indicado, establecimiento público, sin ánimo de lucro, dependiente de la Consejería de Salud/del Servicio Andaluz de Salud, que acoge colecciones de muestras biológicas concebidas con fines diagnósticos o de investigación biomédica y organizadas como una unidad técnica con criterios de calidad, orden y destino, donde serán conservadas hasta que se agoten por su uso, salvo que usted solicitara su eliminación. Las muestras biológicas son un excelente elemento para la investigación de enfermedades. A través de dichas investigaciones se podrán obtener datos que permitirán mejorar el conocimiento sobre la aparición, desarrollo y tratamiento de multitud de enfermedades.

Esta hoja de información puede contener palabras que usted no entienda. Por favor, pídale al profesional sanitario que le explique la información que no comprenda. Tómese el tiempo necesario para decidir si quiere o no donar su muestra biológica y consulte a personas de su confianza si lo desea. Para consultas que desee plantear posteriormente, podrá dirigirse al Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía Nodo Hospital Regional de Málaga. Dirección: Hospital Civil, Pabellón 5, sótano, Plaza del Hospital Civil s/n 29009 Málaga, España. Correo electrónico: biobancomalaga.fps@juntadeandalucia.es

Las muestras biológicas donadas y sus datos clínicos asociados se utilizarán de conformidad con lo establecido en la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica (en adelante Ley de Investigación biomédica). Es posible que la información obtenida de las investigaciones en las que se utilicen sus muestras no le genere un beneficio directo, pero habrá contribuido al avance de la medicina y del conocimiento de diversas enfermedades, lo que supondrá, sin duda, un beneficio para la sociedad.

La donación es voluntaria y altruista, por lo que usted no tendrá derecho alguno sobre los resultados que pudieran derivarse de las investigaciones que se lleven a cabo con dichas muestras, de conformidad con la normativa vigente. Su decisión de donar o no, no afectará negativamente a su asistencia sanitaria.

Existe un apartado en el consentimiento en el que podrá decidir si quiere que sus muestras se conserven de forma codificada (en cuyo caso se identifican con un código que protege su identidad) o anonimizada (eliminándose de forma irreversible toda vinculación con su identidad).

Sus muestras y los datos asociados a las mismas sólo se cederán a terceros que las utilicen en investigación biomédica de manera anónima o disociada. Si, por la naturaleza del proyecto de investigación en el que se utilizara su muestra se necesitaran datos clínicos adicionales, el Biobanco coordinaría la obtención de los mismos, siempre que la muestra no hubiera sido anonimizada.

1. LO QUE USTED DEBE SABER:

1.1. Obtención de las muestras

Las muestras serán obtenidas durante el procedimiento médico-quirúrgico al que va a someterse o se ha sometido durante su proceso asistencial, o a través de un procedimiento expreso para obtenerla, según lo indicado en el apartado del consentimiento referente a la obtención de muestras.

En el caso de que usted done las muestras obtenidas durante un procedimiento médico-quirúrgico asistencial, no existe ningún inconveniente adicional derivado de la donación de las mismas.

Si, por el contrario, las muestras fueran extraídas expresamente para la donación para investigación biomédica podrían existir inconvenientes vinculados con la obtención de las mismas, de las que será convenientemente informado en la hoja de información del procedimiento correspondiente.

1.2. Utilización de las muestras

Usted autoriza a que las muestras donadas sean utilizadas en investigación biomédica, pudiendo establecer restricciones a su utilización.

Las muestras sólo podrán ser utilizadas en proyectos de investigación científicamente avalados, que cumplan las exigencias legales y los principios éticos que rigen la investigación en salud y que sean autorizados por los órganos competentes, de conformidad con lo establecido en la normativa vigente.

Cuando, por razones de salud, usted o su familia lo necesiten, podrán hacer uso de las muestras, siempre que no se hayan agotado o eliminado y no se encuentren anonimizadas.

1.3. Información relacionada con las muestras

Si lo solicita, el Biobanco le facilitará la información sobre los proyectos de investigación en los que se utilicen las muestras donadas, si éstas no hubieran sido anonimizadas.

Al donar sus muestras al Biobanco, en este momento puede no saberse el lugar de realización de los análisis. El Biobanco mantiene un registro detallado del lugar de realización de los análisis realizados.

La información que se obtenga puede tener implicaciones para sus familiares, por lo que debe transmitirles dicha información.

1.4. Posibilidad de ponerse nuevamente en contacto

Puede que sea necesario ponerse en contacto nuevamente con usted, con el fin de recabar datos o muestras adicionales, o proporcionarle la información relevante para su salud, salvo que haya solicitado que las muestras sean anonimizadas.

1.5. Protección de datos y confidencialidad de la información

La información proporcionada en este apartado será aplicable siempre que sus muestras no se encuentren anonimizadas.

Los datos personales recabados serán confidenciales y tratados de acuerdo con la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, y su normativa de desarrollo, y la Ley de Investigación biomédica.

Sus datos de carácter personal serán incorporados a un fichero automatizado, debidamente inscrito en la Agencia Española de Protección de Datos, cuya titularidad corresponde al Servicio

Andaluz de Salud. Sólo los responsables del Biobanco podrán identificar a quién corresponde cada muestra o dato, si no está anonimizada.

Podrá ejercer los derechos de acceso, rectificación, oposición y cancelación de sus datos personales, reconocidos en la citada Ley Orgánica 15/1999, con las limitaciones establecidas en dicha Ley. Para ello, deberá dirigirse a la Dirección General de Asistencia Sanitaria del Servicio Andaluz de Salud, Avenida de la Constitución, núm. 18, de Sevilla.

1.6. Derecho de revocación del consentimiento

Salvo que sus muestras se encuentren anonimizadas, podrá revocar o retirar, en cualquier momento, el consentimiento prestado. Para ello, deberá dirigirse al Biobanco, pudiendo solicitar la eliminación o la anonimización de las muestras.

Los efectos de la revocación no se extenderán a los resultados de las investigaciones llevadas a cabo con anterioridad.

1.7. Información relativa a análisis genéticos

Salvo que usted manifieste lo contrario en el apartado dedicado al consentimiento, se podrán realizar análisis genéticos.

Excepto si sus muestras son anonimizadas, tiene derecho a conocer los datos genéticos que se obtengan a partir del análisis de las muestras donadas, así como de la información relativa a su salud derivada de dichos análisis.

Si no desea recibir dicha información y ésta fuera necesaria para evitar un grave perjuicio para su salud o la de sus familiares biológicos, se informará a un familiar o a un representante. La comunicación se limitará exclusivamente a los datos necesarios para evitar tal perjuicio.

1.8. Otras consideraciones

Una vez informado/a de los aspectos relacionados anteriormente en este documento, si decide donar dichas muestras deberá firmar el consentimiento informado para la donación.

DATOS DEL/DE LA DONANTE Y DE SU REPRESENTANTE (éste último sólo en caso de incapacidad del/de la donante):

Apellidos y nombre del/de la Donante:

..... DNI / NIE:
nuhsa:

Apellidos y nombre del/de la representante legal:

..... DNI / NIE:

PROFESIONALES QUE INTERVIENEN EN EL PROCESO DE INFORMACIÓN Y/O CONSENTIMIENTO:

Los siguientes profesionales declaran que se ha explicado la información relativa a la donación de muestras biológicas al Biobanco:

Apellidos y nombre

Fecha

Firma

.....

CONSENTIMIENTO:

Yo, D./Dña. declaro bajo mi responsabilidad que **he leído y comprendido el Formulario de Información**, del que se me ha entregado un ejemplar.

He **recibido suficiente información** sobre la donación de muestras biológicas de..... al Biobanco y sobre la posible realización de análisis genéticos sobre las mismas. He podido hacer preguntas sobre la información recibida y hablar con el profesional indicado, quien me ha resuelto todas las dudas que le he planteado.

Dichas muestras son:

- Excedentes del procedimiento médico-quirúrgico asistencia al que va a someterse o se ha sometido.....
- Tomadas mediante el procedimiento expreso.....

Asimismo, consiento el **tratamiento de los datos clínicos asociados** a las muestras.

Deseo que dichas muestras y los datos clínicos asociados sean tratados de forma:

☐ **Codificada** (serán identificadas con un código que protege mi identidad, siendo posible volver a ligarlas conmigo) o

☐ **Anonimizada** (no se podrán asociar las muestras conmigo, por haberse eliminado de forma irreversible la vinculación entre las mismas y mi identidad).

Deseo **establecer restricciones** respecto al uso de la muestra, para que no sea utilizada en

Autorizo que se pueda **contactar conmigo posteriormente**: SI NO
En caso afirmativo, por favor, indique el medio de hacerlo:

Autorizo **recibir información** sobre datos genéticos y datos relevantes para mi salud (Si solicita que las muestras sean anonimizadas, no podrá recibir esta información)

Marque lo que proceda: SI NO

Sé que puedo **revocar**, en cualquier momento, el consentimiento otorgado en este documento.

En,a.....de..... De.....

EL/LA DONANTE

EL/LA REPRESENTANTE LEGAL
(sólo en caso de incapacidad del/de la donante)

Fdo.:

Fdo.:

2. TABLA DE MUTACIONES DE P53.

Tabla suplementaria 1. Mutaciones p53.

Tipo de mutación TP53	Nº de pacientes con la mutación	Exón
c.375G>A (p?)	1	4
c.404G>T (p.C135F)	2	5
c.422G>A (p.C141Y)	1	5
c.423C>G (p.C141W)	1	5
c.438G>A (p.W146X)	1	5
c.455C>T (p.P152L)	2	5
c.481G>T (p.A161S)	1	5
c.488A>G (p.Y163C)	4	5
c.510G> (p.T170X)	1	5
c.517G>T (p.V173L)	2	5
c.515T>G (p.V172G)	1	5
c.520A>T (p.R174W)	1	5
c.524G>A (p.R175H)	8	5
c.526_52del (p.C176X)	1	5
c.527G>T (p.C176F)	1	5
c.536A>G (p.H179R)	1	5
c.584T>C (p.I195T)	1	6
c.632C>T (p.T211I)	1	6
c.637C>T (p.R213X)	5	6
c.659A>G (p.Y220C)	1	6
c.672+2T (p ?)	1	Intrón 6
c.713G>A (p.C238Y)	2	7
c.733G>A (p.G245S)	4	7
c.734G>A (p.G245D)	2	7
c.742C>T (p.R248W)	2	7
c.743G>A (p.R248Q)	4	7
c.745A>T p.R249W	1	7
c.757_75del (p.T253X)	1	7
c.775G>T (p.D259Y)	1	7
c.783-1G (p?)	1	Intrón 7
c.797G>A (p.G266E)	1	8
c.811G>A (p.E271K)	2	8
c.814G>A (p.V272M)	2	8
c.817C>T (p.R273C)	4	8
c.818G>A (p.R273H)	5	8
c.818G>C (p.R273P)	1	8
c.844C>T (p.R282W)	2	8
c.853G>A (p.E285K)	1	8
c.919+1G (p?)	1	Intrón 8
c.904G>T (p.G302W) ^a	1	8

^aSe consideró y calculó la mutación como tipo salvaje debido a una actividad de transactivación superior al 75%.

3. ARTÍCULOS Y COMUNICACIONES

Hasta la fecha, derivados de este proyecto de investigación han sido presentados los siguientes artículos y comunicaciones:

Artículos:

del Moral-Martinez M, Sánchez-Uceta P, Clemente-Gonzalez R, Moreno-SanJuan S, Puentes-Pardo JD, Khaldy H, Lopez-Perez D, Arnedo J, Casado J, Martínez-Heredia L, et al. iNOS-Produced Nitric Oxide from Cancer Cells as an Intermediate of Stemness Regulation by PARP-1 in Colorectal Cancer. *Biomolecules*. 2025; 15(1):125. <https://doi.org/10.3390/biom15010125>

Comunicaciones:

del Moral Martínez M, Íñigo Chaves A, Casado Ruiz J, Muñoz Gámez JA, León López J, Berenguer Guirado R, Delgado Maroto A, Jiménez Ruiz SM, González Puga C, Salmerón Escobar FJ. *Relación de la expresión de Poli (ADP-ribosa) polymerasa-1 (PARP-1) y el estatus del gen p53 en el cáncer colorrectal (CCR)*. XLVI Reunión de la Sociedad Andaluza de Patología Digestiva. 17 de octubre de 2015. Marbella. Comunicación oral.

Iñigo Chaves AM, del Moral Martínez M, Casado Ruiz J, León López J, Jiménez Ruiz SM, González Puga C, Berenguer Guirado R, Delgado Maroto A, Salmerón Escobar J. *Relación de la expresión de los genes de síntesis y señalización de melatonina en el cáncer colorrectal con el estatus de p53*. XLVI Reunión de la Sociedad Andaluza de Patología Digestiva. 17 de octubre de 2015. Marbella. Comunicación oral.

Iñigo Chaves, A; del Moral Martinez, M; Casado Ruiz, J; Jiménez Ruiz, SM; León López, J; Muñoz, JA; Salmerón, J. Interacción entre las vías de síntesis y señalización de la melatonina y la expresión de marcadores de células madre tumorales en el cáncer colorrectal: influencia del estado del gen p53. LXXV Congreso de la Sociedad Española de Patología Digestiva. 17 de junio de 2016. Santiago de Compostela. Comunicación póster.

del Moral-Martínez, M; Muñoz-Gámez, JA; Íñigo-Chaves, AM; Casado-Ruiz, J; Martín-Garrido, SM; Jiménez-Ruiz, SM; González-Puga, C; Salmerón-Escobar, J; León-López, J. *Relación de la Poli (ADP-ribosa) polymerasa-1 (PARP-1) y el estatus del gen p53 con la progresión y la supervivencia en el cáncer colorrectal (CCR)*. LXXVI Congreso de la Sociedad Española de Patología Digestiva. 10 de junio de 2017. Madrid. Comunicación oral.

Íñigo Chaves, A; Casado Ruiz, J; Del Moral Martínez, M; Muñoz Gámez, JA; Martín Garrido, SM; Jiménez Ruiz, SM; González Puga, C; Salmerón, J; León López, J. *Regulación de las células madre tumorales por la melatonina en el cáncer colorrectal*. LXXVI Congreso de la Sociedad Española de Patología Digestiva. 10 de junio de 2017. Madrid. Comunicación oral.

