

UNIVERSIDAD DE GRANADA



**PROGRAMA DE DOCTORADO EN
MEDICINA CLÍNICA Y SALUD PÚBLICA (B12.56.1)**

TESIS DOCTORAL

**REGULACIÓN CIRCADIANA DE LOS MARCADORES
DE CÉLULAS MADRE TUMORALES EN EL CÁNCER
COLORRECTAL**

Memoria presentada por **Dña. MARÍA INÉS AROCA SIENDONES**
para optar a la mención de Doctor por la Universidad de Granada

Directora: **Dra. JOSEFA LEÓN LÓPEZ**

Granada, 2022

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: María Inés Aroca Siendones
ISBN: 978-84-1117-621-7
URI: <https://hdl.handle.net/10481/79140>

INDICE DE CONTENIDO

Índice de tablas e ilustraciones	- 2 -
RESUMEN	- 5 -
SUMMARY	- 6 -
1 INTRODUCCIÓN	- 7 -
1.1 Cáncer colorrectal (CCR)	- 7 -
1.1.1 Epidemiología	- 7 -
1.1.2 Factores de riesgo.....	- 11 -
1.1.3 Patogénesis.....	- 13 -
1.1.4 Diagnóstico y tratamiento	- 15 -
1.1.5 Recurrencia y metástasis	- 22 -
1.2 Reloj circadiano	- 24 -
1.2.1 Reloj circadiano y efectos fisiológicos	- 30 -
1.2.2 Reloj circadiano y cáncer	- 33 -
1.3 Reloj circadiano y células madre	- 42 -
1.3.1 Células madre cancerígenas	- 44 -
1.3.2 Marcadores de células madre cancerígenas en CCR	- 45 -
1.3.3 Células madre cancerígenas y ritmo circadiano	- 48 -
2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	- 53 -
3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	- 55 -
3.1 Pacientes y muestras	- 55 -
3.2 Estudio inmunohistoquímico.....	- 57 -
3.3 Evaluación de la tinción	- 59 -
3.4 Análisis estadístico.....	- 60 -
4 RESULTADOS.....	- 62 -
4.1 Descripción de la población de estudio.....	- 62 -
4.2 Expresión de las proteínas del reloj circadiano en tejido sano y tejido tumoral de CCR	- 64 -
4.2.1 Valoración inmunohistoquímica.....	- 64 -
4.2.2 Análisis descriptivo	- 66 -
4.2.3 Curvas ROC	- 69 -
4.2.4 Correlaciones entre las proteínas estudiadas. Diferencia entre tejido normal y tumoral.....	- 71 -
4.2.5 Correlaciones entre las proteínas estudiadas. Diferencia entre tejido tumoral de colon y recto.	- 73 -
4.2.6 Relación entre las proteínas centrales del reloj y los marcadores de células madre en CCR.	- 74 -
4.3 Relación proteínas del reloj circadiano y los marcadores de CMCs y las variables en CCR.....	- 75 -
4.3.1 Relación de la expresión de las proteínas con las variables clínicas en CCR.....	- 76 -
4.3.2 Relación de la expresión de las proteínas con las variables clínicas. Diferencias colon y recto.	- 79 -
4.3.3 Relación de la expresión de las proteínas con la metástasis al diagnóstico	- 83 -
4.4 Relación con la progresión de la enfermedad	- 86 -
4.4.1 Probabilidad aparición de metástasis o recidivas locales tras el diagnóstico.	- 86 -
4.4.2 Regresión logística binaria aparición de metástasis 3 y 5 años	- 90 -
4.4.3 Regresión logística binaria aparición de recidivas 3 y 5 años	- 92 -
4.4.4 Tiempo de supervivencia libre de enfermedad	- 94 -
4.4.5 Tiempo de supervivencia libre de enfermedad. Regresión de Cox.....	- 94 -
4.5 Relación con la supervivencia global.....	- 96 -
4.5.1 Curva de supervivencia global acumulada específica por cáncer 3 y 5 años	- 97 -
4.5.2 Tiempo de supervivencia global (específica por cáncer). Regresión de Cox.....	- 99 -
5 DISCUSIÓN	- 101 -
6 CONCLUSIONES.....	- 115 -
7 BIBLIOGRAFÍA	117

ÍNDICE DE TABLAS E ILUSTRACIONES

Tabla 1: Clasificación histológica de los tumores de colon y recto	55 -
Tabla 2: Clasificación TNM de tumores de colon y recto	56 -
Tabla 3: Condiciones de la tinción inmunohistoquímica para cada una de las proteínas estudiadas	58 -
Tabla 4: Porcentaje, intensidades de la tinción y puntuaciones, para determinar la inmunoreactividad	59 -
Tabla 5: Puntos de corte óptimos en tejido tumoral para cada una de las proteínas estudiadas.	61 -
Tabla 6: Características de los pacientes incluidos en el estudio	62 -
Tabla 7: Descriptivos progresión de la enfermedad al final del seguimiento	63 -
Tabla 8: Descriptivos supervivencia específica por enfermedad al final del seguimiento	63 -
Tabla 9: Patrón de localización celular de la expresión de las proteínas estudiadas	66 -
Tabla 10: Estadísticos descriptivos de la expresión de las proteínas en tejidos normales y tejidos tumorales	67 -
Tabla 11: Diferencias de expresión (porcentaje e intensidad) entre tejidos normales y tumorales	68 -
Tabla 12: Puntos de corte determinados por curva ROC para diferenciar tejido normal de tejido tumoral.	70 -
Tabla 13: Correlación de la expresión de proteínas en tejido normal	71 -
Tabla 14: Correlación de la expresión de proteínas en tejido tumoral	71 -
Tabla 15: Correlación de la expresión de proteínas en tejido tumoral de colon	74 -
Tabla 16: Correlación de la expresión de proteínas en tejido tumoral de recto	74 -
Tabla 17: Relación entre las proteínas centrales del reloj circadiano y los marcadores y CD44 y CD133	75 -
Tabla 18: Relación entre la expresión de las proteínas PER1, PER2 y PER3, y las características clínico-patológicas en tumores colorrectales	76 -
Tabla 19: Relación entre la expresión de las proteínas CRY1, CRY2 y BMAL1, y las características clínico-patológicas en tumores colorrectales	77 -
Tabla 20: Relación entre la expresión de las proteínas NR1D2, CD44 y CD133, y las características clínico-patológicas en tumores colorrectales	78 -
Tabla 21: Relación entre la expresión de las proteínas PER1 y PER2 con las características clínico-patológicas. Diferencia entre tumores de colon y recto	80 -
Tabla 22: Relación entre la expresión de las proteínas PER3 y CRY1 con las características clínico-patológicas. Diferencia entre tumores de colon y recto	81 -
Tabla 23: Relación entre la expresión de las proteínas BMAL1 y NR1D2 con las características clínico-patológicas. Diferencia entre tumores de colon y recto.	82 -
Tabla 24: Relación entre la expresión de las proteínas CD44 y CD133 con las características clínico-patológicas. Diferencia entre tumores de colon y recto	83 -
Tabla 25: Regresión logística binaria metástasis al diagnóstico en todos los tumores	84 -
Tabla 27: Regresión logística binaria metástasis al diagnóstico. Tumores de colon	84 -
Tabla 28: Regresión logística binaria metástasis al diagnóstico. Tumores de recto	85 -
Tabla 29: Relación entre la expresión de proteínas PER1, PER2, PER3 CRY1 y CRY2, y la aparición de metástasis y recidivas locales tras el diagnóstico	87 -
Tabla 30: Relación entre la expresión de proteínas BMAL1, NR1D2, CD44 y CD133, y la aparición de metástasis y recidivas locales tras el diagnóstico	87 -
Tabla 31: Relación entre la expresión de proteínas PER1 y CRY1 con la aparición de metástasis y recidivas locales tras el diagnóstico. Diferencia entre tumores de colon y recto	88 -
Tabla 32: Relación entre la expresión de proteínas BMAL1 y NR1D2 con la aparición de metástasis y recidivas locales tras el diagnóstico. Diferencia entre tumores de colon y recto	89 -
Tabla 33: Regresión logística binaria aparición de metástasis 3 y 5 años	90 -
Tabla 34: Regresión logística binaria aparición de metástasis 3 y 5 años. Tumores colon.	91 -
Tabla 35: Regresión logística binaria aparición de recidivas locales a 3 y 5 años	92 -
Tabla 36: Regresión logística binaria aparición de recidivas locales a 3 y 5 años. Tumores colon	93 -
Tabla 37: Regresión de Cox: Tiempo libre de enfermedad a 3 y 5 años	95 -
Tabla 38: Relación expresión de PER1, PER2, BMAL1 y CD44 con la supervivencia a 3 y 5 años.	96 -
Tabla 39: Relación expresión de PER1, BMAL1 y CD44 con la supervivencia a 3 y 5 años. Diferencias colon y recto ...	97 -
Tabla 40: Supervivencia global a 3 y 5 años. Regresión de Cox	99 -

Figura 1: Tumores más frecuentes diagnosticados en el mundo.	7 -
Figura 2: Clasificación tasas estimadas de mortalidad estandarizadas por edad en cada país en 2020, de CCR	8 -
Figura 3: Defunciones según causa de muerte por capítulos de la CIE-10 y sexo. Año 2020.	9 -
Figura 4: Vías de desarrollo del CCR.	13 -
Figura 5: En los mamíferos, el reloj maestro está situado en el núcleo supraquiasmático (SCN) del hipotálamo.	25 -
Figura 6: Tipos de sincronización dentro del reloj circadiano y vías paralelas de sincronización en tejidos.	25 -
Figura 7: Regulación del reloj circadiano a través de la regulación del tiempo de alimentación y de la temperatura. .	26 -
Figura 8: Bucles de retroalimentación transcripcional que constituyen en reloj circadiano en mamíferos	27 -
Figura 9: Regulación circadiana en diferentes sistemas fisiológicos.	30 -
Figura 10: “Características principales” del cancer y el reloj circadiano.	34 -
Figura 11: Expresión de los genes del reloj circadiano en células madre embrionarias y células diferenciadas.	43 -
Figura 12: Regulacion de la regeneración del epitelio intestinal por genes del reloj circadiano.	44 -
Figura 13: Reprogramación iPS y ritmo circadiano	49 -
Figura 14: Imágenes de la tinción inmunohistoquímica de las proteínas estudiadas: PER1, PER2 y PER3	64 -
Figura 15: Imágenes de la tinción inmunohistoquímica de las proteínas estudiadas: CRY1, CRY2, BMAL1 y NR1D2	65 -
Figura 16: Imágenes de la tinción inmunohistoquímica de las proteínas estudiadas: CD44 y CD133.....	66 -
Figura 17: Diferencias de expresión de las proteínas entre tejido normal y tejido tumoral	67 -
Figura 18: Curvas ROC de cada una de las proteínas estudiadas para discriminar tejido normal y tejido tumoral	69 -
Figura 19: Curva de supervivencia específica de cáncer a 3 años	98 -
Figura 20: Curva de supervivencia específica de cáncer a 5 años	98 -
Figura 21: Curva de supervivencia específica de cáncer a 3 y 5 años. Diferencias entre colon y recto.	98 -

RESUMEN

El cáncer colorrectal (CCR) es uno de los tumores más frecuentes en los países desarrollados. Aunque su incidencia y mortalidad han disminuido, su pronóstico no ha cambiado, y un alto porcentaje de pacientes con CCR desarrollan recaídas, metástasis metacrónicas o recidivas locales, durante su enfermedad. Otra de las características que afectan a la progresión de la enfermedad es la existencia de metástasis distales en el momento del diagnóstico (metástasis sincrónica), y, además, algunas de ellas escapan a las técnicas de imagen actuales, las denominadas metástasis subclínicas. La identificación de estos pacientes es muy importante para su correcto manejo, pero la falta de marcadores pronósticos lo dificulta.

Las células madre cancerígenas (CMCs) parecen ser las responsables del desarrollo y progresión del tumor, y lo que parece más importante, de la resistencia a tratamientos y por tanto el pronóstico del paciente. Dada la conexión entre la alteración circadiana y el desarrollo y la progresión del cáncer, nos propusimos analizar la importancia pronóstica de las proteínas circadianas centrales en el CCR, así como su relación con los marcadores de CMCs.

Medimos la expresión de PER1-3, CRY1-2, BMAL1, NR1D2, CD44 y CD133 en una cohorte de pacientes con CCR mediante inmunohistoquímica (IHC) y analizamos su potencial pronóstico en esta enfermedad. Comparamos la expresión de la proteínas con tejidos normales, para identificar los patrones de alteración en los tumores, y a su vez los patrones de expresión entre tejidos tumorales de colon y recto.

Para todas las proteínas estudiadas a excepción de BMAL1, CD44 y CD133 se encontró menos expresión en tumores, y las relaciones entre ellas cambian, modificando así los bucles esenciales de regulación del reloj circadiano. En algunos casos se asoció la disminución de la expresión con variables clínico-patológicas de tumores más agresivos, y además se encontraron algunas diferencias de expresión entre tumores de colon y recto.

La baja expresión de PER2 y BMAL1 se asoció de forma significativa con la metástasis en el momento del diagnóstico de la enfermedad, mientras que la alta expresión de CRY1 apareció como un factor pronóstico independiente del desarrollo de metástasis distales tras el diagnóstico. La alta expresión de NR1D2 y baja expresión de CD44 apareció como factor pronóstico independiente del desarrollo de recidiva local tras el diagnóstico de la enfermedad. Los pacientes con baja expresión de CD44 y alta expresión de CRY1 mostraron una menor supervivencia libre de enfermedad. Además, los pacientes con baja expresión de CD44 y alta expresión de CRY1, así como alta expresión de CD133 y alta expresión de CRY1 mostraron una menor supervivencia global a tres y cinco años.

Aunque estos marcadores necesitan ser validados en cohortes más grandes y de diferentes etnias, la simplicidad de la IHC hace que estas proteínas sean candidatas para personalizar el tratamiento del CCR.

SUMMARY

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common tumours in developed countries. Although its incidence and mortality have decreased, its prognosis has not changed, and a high percentage of CRC patients develop relapses, metachronous metastases or local recurrences, during their disease. Another feature affecting disease progression is the existence of distal metastases at the time of diagnosis (synchronous metastases), and some of them escape current imaging techniques, the so-called subclinical metastases. The identification of these patients is very important for their correct management, but the lack of prognostic markers makes this difficult. Cancer stem cells (CSCs) appear to be responsible for tumour development and progression, and more importantly, for resistance to treatment and, therefore, the patient's prognosis. Given the connection between circadian disruption and cancer development and progression, we set out to analyse the prognostic significance of core circadian proteins in CRC, as well as their relationship with markers of CSCs.

We measured the expression of PER1-3, CRY1-2, BMAL1, NR1D2, CD44 and CD133 in a cohort of CRC patients by immunohistochemistry (IHC) and analysed their prognostic potential in this disease. We compared protein expression with normal tissues to identify patterns of alteration in tumours and patterns of expression between colon and rectal tumour tissues. All proteins studied except BMAL1, CD44 and CD133, were subexpressed in tumours, and the relationships between them changed, thus modifying the essential loops of circadian clock regulation. In some cases, decreased expression was associated with clinicopathological variables of more aggressive tumours, and some differences in expression were found between colon and rectal tumours.

Low expression of PER2 and BMAL1 was significantly associated with synchronous metastases, while high expression of CRY1 appeared as an independent prognostic factor for the development of distal metastases after diagnosis. High expression of NR1D2 and low expression of CD44 appeared as an independent prognostic factor for the development of local recurrence after diagnosis. Patients with low CD44 expression and high CRY1 expression showed lower 3-year and 5-year DFS. In addition, patients with low CD44 expression and high CRY1 expression as well as high CD133 expression and high CRY1 expression showed lower 3-year and 5-year OS.

Although these markers need to be validated in larger and ethnically diverse cohorts, the simplicity of IHC makes these proteins candidates for personalising CRC treatment.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 CÁNCER COLORRECTAL (CCR)

1.1.1 Epidemiología

El cáncer sigue constituyendo una de las principales causas de **morbi-mortalidad del mundo**, con aproximadamente 19.3 millones de casos nuevos. Las estimaciones poblacionales indican que el número de casos nuevos aumentará hasta los 30.2 millones al año en 2040 [1]–[4].

En la actualidad el cáncer colorrectal (CCR) supone aproximadamente el 10% de todos los cánceres diagnosticados y las muertes por esta causa, siendo el tercer tipo de tumor más frecuente en todo el mundo, después del cáncer de mama y pulmón, y el segundo en términos de mortalidad, con aproximadamente 9,96 millones de muertes relacionadas con cáncer en el año 2020 de acuerdo con los datos proporcionados por la International Agency for Research on Cancer (IARC). Al igual que con la incidencia, se espera un incremento de la mortalidad en los próximos años, estimándose la mortalidad en más de 16,3 millones en 2040 [5].

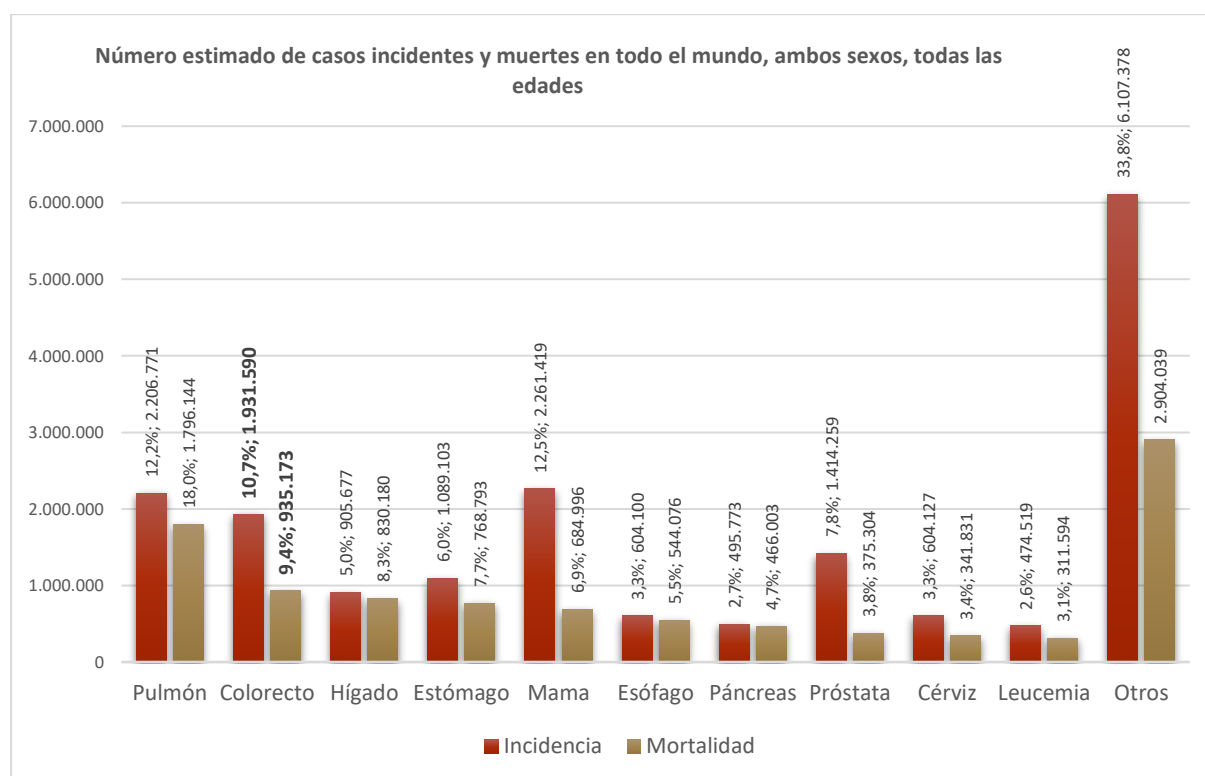


Figura 1. Tumores más frecuentes diagnosticados en el mundo.

Número de casos incidencia y mortalidad en todo el mundo, para ambos sexos y todas las edades. Fuente: GLOBOCAN 2020. Gráfico: Global Cancer Observatory (<http://gco.iarc.fr/>) © International Agency for Research on Cancer 2020.

La incidencia y mortalidad del CCR es mayor en **países desarrollados**, encontrándose España entre los 13 países con la mayor tasa de mortalidad, habiendo sido en nuestro país el tumor con mayor número de casos nuevos en 2020.

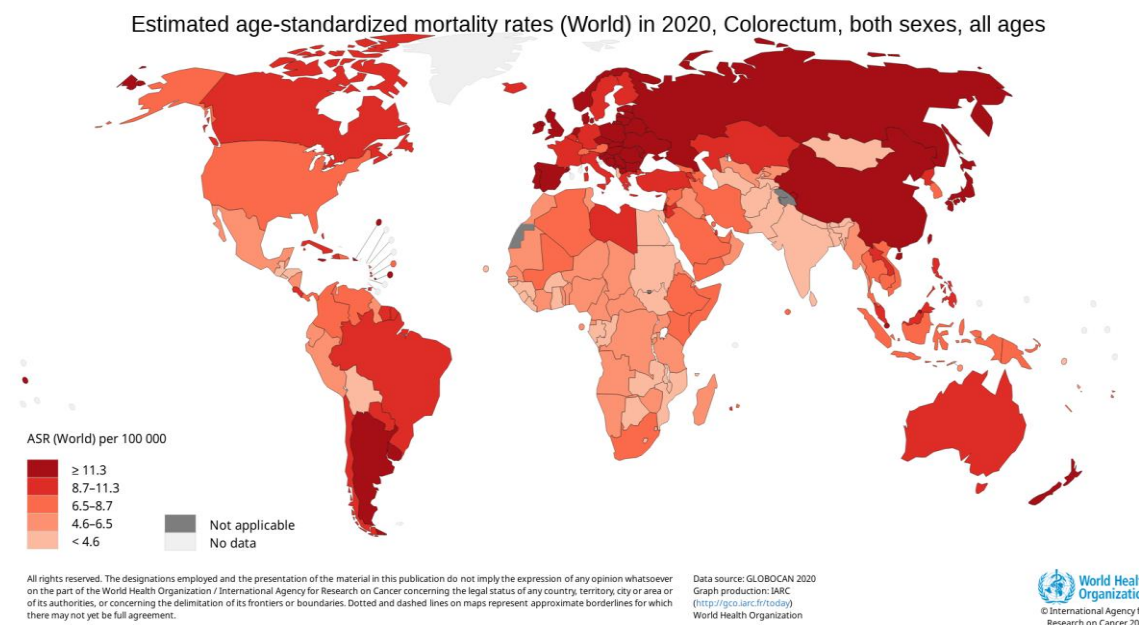


Figura 2: Clasificación tasas estimadas de mortalidad estandarizadas por edad en cada país en 2020, de CCR en ambos sexos y todas las edades

En España es también una de las principales causas de morbi-mortalidad; el número de casos de cáncer diagnosticados de cualquier tipo en 2022 alcanzará los 280.100 casos y unas 113.000 muertes, según cálculos de REDECAN, lo que supone un ligero incremento con respecto a los años anteriores. Aun así, los datos pueden estar infravalorados, al ser estimaciones que no han tenido en cuenta las consecuencias de la pandemia de la COVID19, y por la que se ha visto afectados los programas de cribado y detección precoz.

Al igual que con la incidencia, se espera un incremento de la mortalidad en los próximos años, y se estima que la incidencia alcance en España los 341.000 casos y 160.000 muertes en 2040.

Según los datos del INE, el cáncer continúa siendo en nuestro país la segunda causa de muerte tras las enfermedades del sistema circulatorio. Tan solo durante 2020, las enfermedades infecciosas (COVID-19) han relegado al cáncer a una tercera posición. Sin embargo, a pesar de las defunciones por COVID-19, en varones se han mantenido los tumores como primera causa de muerte (Instituto Nacional de Estadística (INE). Defunciones según la causa de muerte. Disponible en: <https://www.ine.es/>).

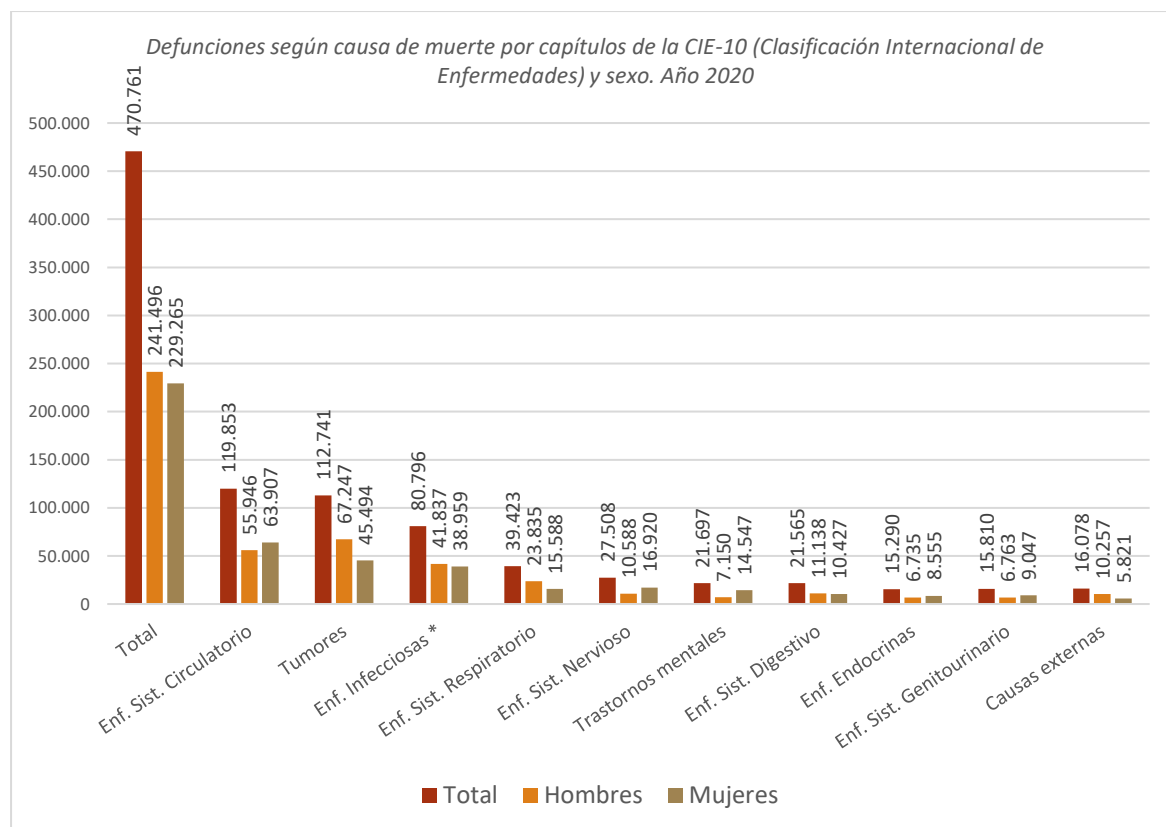


Figura 3: Defunciones según causa de muerte por capítulos de la CIE-10 (Clasificación Internacional de Enfermedades) y sexo. Año 2020.

* De las 80.793 muertes por enfermedades infecciosas, 74.837 fueron por COVID, 38.917 en varones y 35.922 en mujeres

Existen **diferencias entre sexos**: Los cánceres más frecuentes diagnosticados en varones en España en 2021 fueron los de **próstata, colon y recto, pulmón y vejiga urinaria**. Los cánceres más frecuentemente diagnosticados en mujeres en España en 2021 fueron los de **mama y los de colon y recto**.

En cuanto a tipos de cáncer, en **varones**, se estima que el cáncer de pulmón será el responsable de una cuarta parte de las **muertes** por cáncer (17.346 fallecimiento; 25,6%), seguido por los cánceres colorrectales (9.640; 14,2%), de próstata (5.798; 8,6%) y de vejiga urinaria (4.433; 6,5%). Y en **mujeres**, los tipos de cáncer responsables de una mayor **mortalidad** serán los cánceres colorrectales (6.830; 15,1%), y los de mama (6.606; 14,6%), seguidos de cerca por los de pulmón (5.584; 12,3%).

De forma general, la mortalidad por cáncer en España ha experimentado un fuerte descenso en las últimas décadas. Estas tendencias reflejan las mejoras en la **supervivencia** de los pacientes con tumores debido a las actividades preventivas, las campañas de diagnóstico precoz y los avances terapéuticos. Este descenso de la mortalidad no es uniforme en todos los tumores.

Globalmente, la supervivencia neta a 5 años del diagnóstico de los pacientes diagnosticados en el periodo 2008-2013 en España fue de 55,3% en los hombres y de 61,7% en las mujeres. Estas diferencias en la supervivencia global entre sexos se deben probablemente a que determinados tumores son más frecuentes en un sexo que en otro, ya que las diferencias más importantes en supervivencia se deben al tipo tumoral, junto con el estadio al diagnóstico [1]–[4].

Las tasas de supervivencia a 5 años en CCR han aumentado en los últimos años. En varones ha pasado de un 57.5% a 63.1% para colon y de un 64.3% a 68.2% para recto. Y en mujeres, se ha observado un aumento del 59.8% al 63.9% para colon y de un 58.1% a 62.7% para recto [1]–[4].

Es importante tener en cuenta que la mortalidad podría ser un mejor indicador de los avances terapéuticos que la supervivencia, ya que se ve menos afectada por algunos factores como los cambios en los programas de detección (si aumentan los casos detectados precozmente aumenta la supervivencia y la incidencia, aunque no disminuya necesariamente la mortalidad) [1]–[4].

1.1.2 Factores de riesgo

Son numerosos los factores hereditarios y medioambientales que incrementan el riesgo de padecer CCR. Entre ellos el incremento de edad y el género masculino han mostrado en numerosos estudios epidemiológicos que guardan una fuerte asociación con el aumento del riesgo de desarrollar CCR [4]

Existen otros factores de riesgo en los estilos de vida que son modificables como tabaquismo [6], ingesta excesiva de alcohol [7], consumo de alimentos procesados y carnes rojas [8], y el sobrepeso [9].

Además, estudios realizados sobre la microbiota intestinal sugieren que la infección con algunas especies de bacterias, como *Fusobacterium nucleatum* y *Bacteroides fragilis*, también podrían incrementar el riesgo de sufrir CCR [10], [11].

Por otro lado, los antecedentes familiares de CCR parecen influir en el 10-20% de los pacientes con CCR [12], aunque con un riesgo que varía dependiendo del número de familiares afectados y la edad al diagnóstico [13]. Estudios basados en familias y gemelos estiman para la heredabilidad del CCR un rango entre un 12% y un 35% [14]. Algunos análisis genómicos han identificado genes de susceptibilidad al cáncer (polimorfismos comunes en un solo nucleótido) asociados al riesgo de CCR, sin embargo, la mayoría de los factores que causan el CCR están no están claros y están sujetos a más estudios [15].

Un subgrupo de aproximadamente 5-7% de los pacientes con CCR están afectados por síndrome de CCR hereditario bien definido [16]. Además, los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal de larga duración y los que tienen una historia previa de CCR o adenomas tienen un mayor riesgo de CCR y requieren una vigilancia adecuada [17].

Los síndromes hereditarios de CCR pueden subdividirse en síndromes no polipósicos (síndrome de Lynch y CCR familiar) y síndromes polipósicos.

Los síndromes de poliposis son más fáciles de reconocer, ya que el médico se ve alertado por el número de pólipos. El tipo de pólipos puede conducir directamente al diagnóstico adecuado. El síndrome de Lynch, sin embargo, se pasa por alto con frecuencia, ya que esos pacientes tienen pocos adenomas y esos adenomas se parecen morfológicamente a las lesiones esporádicas [17].

El síndrome de Lynch es causado por una disfunción en el Sistema de Reparación del ADN (DNA Mismatch Repair System), caracterizado por la expansión o contracción de las regiones de microsatélites del ADN en tejidos tumorales en comparación con los tejidos sanos, denominado

Inestabilidad de Microsatélites (MSI, Microsatellite Instability). La inestabilidad de microsatélites puede ser identificada mediante análisis moleculares, o mediante inmunohistoquímica, ya que estos tumores también muestran deficiencias en las proteínas reparadoras [17].

Debido a la aceleración de la vía adenoma-carcinoma, se aconseja a los pacientes con síndrome de Lynch que se sometan a colonoscopias frecuentes, 1 o 2 veces al año, desde los 20 hasta los 25 años de edad [16].

La Inestabilidad de Microsatélites no es exclusiva del Síndrome de Lynch, ya que aparece en aproximadamente en un 15% de los casos de CCR esporádico [17].

1.1.3 Patogénesis

La mayoría de los cánceres surgen de un pólipo. Este proceso comienza con una cripta aberrante, que evoluciona hacia una lesión neoplásica precursora (un pólipo), y que finalmente progresa hacia el CCR. El periodo desde el inicio hasta el desarrollo del cáncer puede llevar entre 10 a 15 años.

En general, existen dos vías principales de lesiones precursoras distintas (**Figura 4**): la **vía tradicional del adenoma-carcinoma** (también denominada secuencia de inestabilidad cromosómica) que da lugar al **70-90%** de los cánceres colorrectales, y la **vía de la neoplasia serrada** que supone un **10-20%** de los cánceres colorrectales. Estas vías representan múltiples acontecimientos genéticos y epigenéticos, en un orden más o menos secuencial [18]. Los fenotipos de **inestabilidad cromosómica** suelen desarrollarse tras acontecimientos genómicos iniciados por una mutación de APC, seguida de la activación de RAS o la pérdida de función de TP53. Por el contrario, la vía de la **neoplasia serrada** se asocia a mutaciones de RAS y RAF, y a la inestabilidad epigenética, caracterizada por el fenotipo de metilación de islas CpG, que da lugar a cánceres con estabilidad e inestabilidad de microsatélites. Otros estudios del genoma completo también han identificado nuevos marcadores y subtipos fenotípicos sobre la base de las mutaciones presentes (por ejemplo, la presencia de mutaciones en la polimerasa-ε o POLE (DNA polymerase epsilon) o la deficiencia en genes reparadores ([dMMR], Mismatch Repair Deficiency) que dan lugar a un fenotipo hipermutado.

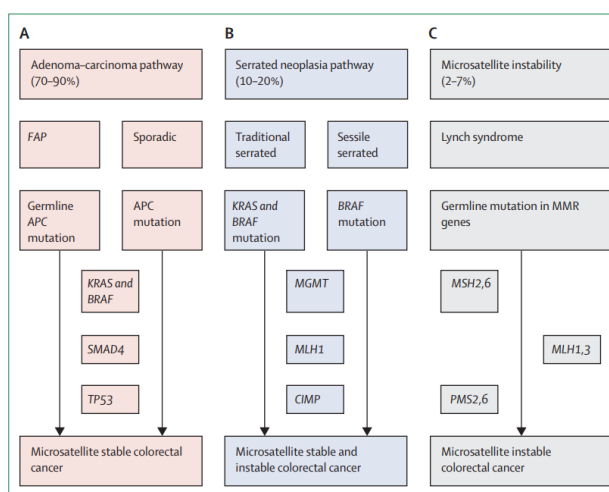


Figura 4: Vías de desarrollo del CCR.

Los adenomas convencionales progresan por la acumulación secuencial de mutaciones genéticas y la inestabilidad cromosómica, lo que provoca tumores de microsatélites estables (**A**). La vía de la neoplasia serrada suele iniciarse, aunque no siempre, por la mutación de los genes BRAF o KRAS, pero luego progresa por la metilación de los genes supresores de tumores CpG island methylator phenotype [CIMP]; (**B**). Dependiendo de los genes silenciados epigenéticamente a medida que las lesiones progresan, pueden resultar tanto tumores estables como inestables en cuanto a los microsatélites. La inestabilidad de los microsatélites es el resultado de una reparación defectuosa del ADN

a través de la inactivación de los genes MMR, y se caracteriza por la mutación de la línea germinal de los genes de reparación que también se observa en el síndrome de Lynch (C). Existe cierto solapamiento entre las vías de los microsatélites estables e inestables. Comparativamente, se sabe poco sobre la vía tradicional serrada, pero se están acumulando pruebas de que se trata de un subtipo molecular distinto. PAF=poliposis adenomatosa familiar. Imagen de (Dekker et al., 2019).

Diferencias con respecto a la localización del tumor

Las características moleculares de los cánceres de colon ascendente, derecho o proximal son diferentes a los de colon izquierdo, descendente o distal, y a su vez, diferentes de los de recto. Además de las diferencias moleculares, existen diferencias embriológicas, biológicas y anatómicas. La lateralidad desempeña un papel clave, especialmente en el contexto metastásico, y se reconoce cada vez más como un marcador predictivo de la respuesta a los fármacos antiEGFR [19], [20].

Subtipos moleculares

En 2014, sobre la base de la expresión genética, el CCR se clasificó en cuatro subtipos moleculares (consensus molecular subtypes [CMS 1–4] [21]. Los genes o vías implicados son únicos para cada CMS (MSI immune [CMS1], canonical [CMS2], metabolic [CMS3], and mesenchymal [CMS4]). El cáncer de colon ascendente suele ser MSI-inmune y tumores metabólicos [22]. Aunque la lateralidad y el estado de la mutación (RAS o RAF) de los tumores son factores que ayudan a elegir los tratamientos sistémicos, la clasificación CMS se está explorando en los ensayos clínicos como marcador pronóstico o predictivo.

1.1.4 Diagnóstico y tratamiento

1.1.4.1 Diagnóstico

La incidencia y mortalidad por CCR ha disminuido en las dos últimas décadas debido a los avances en el conocimiento de la historia natural de la enfermedad y a los avances en su detección y prevención [23].

El pronóstico de los pacientes con CCR ha mejorado gracias a la existencia de programas de cribado cuyo objetivo es detectar a individuos asintomáticos que presentan lesiones precancerosas (pólipos) o adenocarcinomas en una fase inicial de progresión tumoral, disminuyendo la incidencia y mortalidad por CCR [23].

El CCR es en gran medida una enfermedad asintomática hasta que alcanza una fase avanzada. Algunos pacientes pueden presentar una amplia gama de signos y síntomas, como cambios en los hábitos intestinales, anemia o dolor abdominal, pérdida de peso inexplicable o hemorragia rectal (oculta o manifiesta). La hemorragia rectal es un síntoma común tanto de causas benignas como malignas y, por lo tanto, podrían necesitarse factores de riesgo adicionales para ayudar a identificar a las personas que deberían someterse a una investigación más profunda mediante colonoscopia [24].

Para diagnosticar el CCR, la **colonoscopia** es el método de elección. La identificación mediante colonoscopia de las lesiones avanzadas es relativamente sencilla, pero los cánceres colorrectales tempranos pueden aparecer como lesiones muy sutiles de la mucosa [24]–[26].

Son muchos los estudios de cohortes y de casos y controles han demostrado la eficacia de la colonoscopia en la reducción de la incidencia y la mortalidad por CCR [23], [27], [28]. Los resultados de algunos de ellos muestran una reducción de riesgo de un **77%** de CCR de cualquier tipo, una reducción **del 56%** en cáncer de colon ascendente (derecho) y **del 84%** de cáncer de colon descendente (izquierdo) [23]. Sin embargo, aunque los estudios muestran una reducción de hasta un 67% en muertes por CCR del lado izquierdo, la reducción en CCR ascendente apenas llega al 27% [29].

Las diferencias entre la reducción del riesgo entre cáncer de colon ascendente y descendente es probable que esté relacionado con varios factores, como la colonoscopia incompleta (que tiene menos probabilidades de investigar el colon proximal), la difícil visualización en el colon proximal, la peor preparación del intestino y las posibles diferencias biológicas entre los CCR localizados proximalmente y distalmente [23].

La colonografía por **tomografía computerizada** (TC) se utiliza como método de imagen complementario para el diagnóstico de pólipos y CCR (por ejemplo, tras una colonoscopia incompleta o inadecuada). Sin embargo, los métodos de imagen se utilizan sobre todo para la estadificación locorregional y a distancia. En el cáncer de recto, la estadificación locorregional se realiza de forma rutinaria mediante **Resonancia Magnética (IRM)**, y guía las decisiones de tratamiento posteriores [30]. La estadificación locorregional del cáncer de colon ha adquirido mayor importancia, ya que la terapia sistémica neoadyuvante tiene el potencial de reducir el tamaño de los tumores localmente avanzados. La tomografía computerizada se utiliza de forma rutinaria para este fin, aunque con una precisión restrictiva [31]. La estadificación a distancia del hígado y los pulmones se realiza de forma rutinaria con **Tomografía Axial Computerizada (TAC)**, con un papel cada vez más importante que RM para la determinación adicional de las lesiones hepáticas. Cada vez se utilizan más las imágenes de **PET-TC**, pero su función exacta para la estadificación y la evaluación de la carga de la enfermedad en los casos avanzados sigue siendo objeto de debate [32].

Otras pruebas empleadas son las basadas en **análisis de sangre**. Además de obtener un recuento sanguíneo completo, todas las directrices recomiendan comprobar las concentraciones de antígeno carcinoembrionario en el momento del diagnóstico. Una concentración inicial elevada de antígeno carcinoembrionario se asocia a un peor pronóstico, y las concentraciones que no se normalizan en la fase postoperatoria podrían indicar enfermedad residual [33].

En los últimos años, un nuevo concepto de diagnóstico del cáncer, denominado "**biopsia líquida**", ha atraído cada vez más la atención [34]. La biopsia líquida se refiere al análisis de las células tumorales circulantes (CTC), el ADN tumoral libre (ctADN) y/o los marcadores de proteínas que son detectables en la sangre. Las aplicaciones potenciales de la biopsia líquida son amplias, e incluyen la detección precoz del cáncer, el seguimiento de la enfermedad mínima residual y la respuesta al tratamiento, así como la orientación del tratamiento [35], [36].

La primera prueba de suero aprobada por la FDA para el cribado del CCR es el ensayo de **ADN Septin9 metilado**. En un estudio en el que se utilizó la colonoscopia como estándar de referencia, la prueba Septin9 tuvo una sensibilidad del 48,2% y una especificidad del 91,5% [37]. La sensibilidad para los estadios I-IV del CCR fue del 35,0%, 63,0%, 46,0% y 77,4%, respectivamente, pero la sensibilidad para los adenomas avanzados fue sólo del 11,2%. Además, se carece de datos que evalúen la eficacia de Septin9 como prueba de cribado en la incidencia y mortalidad del CCR [37].

Otro ejemplo de los recientes avances en la investigación de la biopsia líquida es el desarrollo de un análisis de sangre (**CancerSEEK**) que fue capaz de detectar ocho tipos de cáncer comunes basándose en los niveles de proteínas circulantes y mutaciones en el ctDNA [38]. Aunque este estudio ha demostrado que el uso de la biopsia líquida como herramienta de cribado es muy prometedor en el futuro, la utilidad clínica de las pruebas de cribado basadas en la sangre dependerá de los resultados de los estudios prospectivos en grandes poblaciones para determinar su rendimiento (como la sensibilidad y la especificidad). Además, el manejo de los resultados falsos positivos puede ser un reto [23].

También ha sufrido un desarrollo importante en los últimos años las pruebas basadas en el **estudio de heces: gFOBT** (guaiac-based fecal occult blood test) and **FIT** (fecal immunochemical test) [23].

Múltiples ensayos clínicos aleatorios han demostrado que el cribado con gFOBT reduce la mortalidad relacionada con el CCR, hasta en un 32%. Esta prueba tiene una sensibilidad entre un 62-79% y una especificidad del 87-96%, aunque pueden dar falsos positivos por la presencia de sangre procedentes de carnes rojas o algunos otros alimentos [25], [39], [40]. El FIT utiliza la tecnología de anticuerpos para detectar la hemoglobina humana intacta, por lo que no interfiere con la dieta, y ha mostrado mayor sensibilidad y especificidad que el gFOBT [41]. La principal ventaja de las pruebas basadas en las heces es la comodidad para realizarlas. Estas pruebas no son invasivas, sin necesidad de preparar el intestino y pueden realizarse en casa.

Por último, la **histología** sigue siendo la base de la estadificación patológica y del tratamiento posterior. Además de la clásica estadificación TNM, la subtipificación histológica, la gradación y la evaluación histológica de la invasión linfática, perineural y venosa, cada vez se reconoce más el valor de una multitud de marcadores basados en el tumor (incluidas los MSI y el Immunoscore) [32], [42]–[44]. Las pruebas MSI se están adoptando no sólo para la identificación del síndrome de Lynch, sino también por las implicaciones para la terapia adyuvante basada en la fluoropirimidina, y el potencial de identificar a los pacientes con CCR metastásico que se beneficiarían de la inmunoterapia [44]. *Mismatch–repair testing* se realiza mediante inmunohistoquímica, y la mayoría de las instituciones recurren a la prueba MSI basada en la PCR sólo si los resultados son equívocos. Las mutaciones de RAS y RAF regulan la proliferación, la apoptosis y la angiogénesis y tienen un papel evolutivo como marcadores de pronóstico y predicción en el tratamiento del CCR [45]–[47].

En los últimos años, la disponibilidad de las pruebas de paneles multigénicos ha proporcionado una herramienta prometedora para estratificar con mayor precisión a los

pacientes en función de sus riesgos de CCR [48]. En un estudio de más de 10.000 individuos se descubrió que el 0,9% de ellos eran portadores de al menos una mutación patogénica o una variante probablemente patogénica. En diversos estudios se ha encontrado que entre un 10-25% de los individuos analizados tienen mutaciones en la **línea germinal** de los genes de susceptibilidad al cáncer, el **3,1%** con mutaciones del **síndrome de Lynch** y el **7,0%** con mutaciones **no relacionadas** con el síndrome de **Lynch** [49]–[51]. Estos resultados muestran que aproximadamente 1 de cada 5 individuos con CCR menores de 50 años es portador de una mutación en la línea germinal asociada al cáncer, lo que respalda la idea de que todos los pacientes jóvenes con CCR deberían someterse a pruebas de línea germinal [52].

Otro avance hacia la medicina de precisión es el desarrollo de **puntuaciones de riesgo de CCR individualizadas** basadas en factores de riesgo ambientales y genéticos. Un estudio realizado por Jeon et al. creó modelos para determinar el riesgo de CCR basados en los antecedentes familiares, 19 factores ambientales y de estilo de vida (**E-score**) y 63 polimorfismos de un solo nucleótido asociados al CCR (**G-score**). El modelo que combina ambas puntuaciones y los antecedentes familiares demostró una mayor precisión en la determinación del riesgo de CCR de un individuo en comparación con el uso de los antecedentes familiares únicamente. Estos sistemas de puntuación representan un paso importante hacia el desarrollo de estrategias individualizadas de prevención del CCR que sean más precisas que las basadas en las actuales directrices de cribado [23], [53].

1.1.4.2 Tratamiento

A la reducción de la mortalidad también han contribuido los avances en el abordaje y tratamiento de la enfermedad [4].

Debido a los programas de cribado, cada vez son más los casos de CCR diagnosticados en estadios precoces, donde es posible que en la misma **colonoscopia diagnóstica** puedan ser resecados los pólipos malignos endoscópicamente, lo que permite una evaluación precisa de las características de alto riesgo (profundidad de la invasión submucosa, diferenciación, invasión linfática y brotes tumorales) y de los márgenes profundos y laterales por parte del patólogo [4].

La **cirugía** es la piedra angular del tratamiento con intención curativa. La laparoscopia se ha convertido en la técnica estándar para el cáncer de colon. La cirugía del cáncer de recto es más compleja debido a la accesibilidad y a la intrincada anatomía de la pelvis, siendo la escisión mesorrectal el enfoque estándar, con mayor o menor extensión de la resección si afecta a esfínter y estructuras circundantes [4].

En tumores de recto, se ha demostrado el beneficio de la **radioterapia preoperatoria** en la reducción del riesgo de recidiva local, frente a la radioterapia postoperatoria [54]. La reducción del riesgo que se consigue con la radioterapia preoperatoria depende del estadio clínico y de la calidad de la cirugía. La **quimiorradioterapia** es la terapia más utilizada; en la mayoría de los pacientes se consigue una reducción del tamaño del tumor, y en un 15-20% se consigue una respuesta completa [55], [56].

Uno de los avances importantes en el CCR en estadio IV es el número creciente de terapias locales disponibles para el abordaje de las metástasis, con el objetivo de controlar la enfermedad a largo plazo y la posible curación. La cirugía hepática ha evolucionado hacia una cirugía de bajo riesgo incluso para la enfermedad extensa. La resección de las metástasis hepáticas se considera cada vez más dentro de un enfoque multimodal con tratamiento sistémico y otras técnicas de ablación local (por radiofrecuencia, por microondas o la radioterapia) [57]. El tratamiento local de las metástasis pulmonares es más controvertido, y se puede recurrir a la resección, la radioterapia estereotáctica y la ablación por radiofrecuencia. Las metástasis peritoneales se han considerado durante mucho tiempo como una condición intratable. La cirugía citorreductora y la quimioterapia intraperitoneal hipertérmica han permitido mejorar la supervivencia en un subconjunto de pacientes con enfermedad limitada [57].

Como **terapia adyuvante**, la quimioterapia basada en la fluoropirimidina mejora la supervivencia en los cánceres resecados en estadio III y en un subconjunto de cánceres de colon en estadio II (por ejemplo, T4 de alto riesgo, mal diferenciados). Varios estudios de referencia, incluido el estudio MOSAIC [57], establecieron la adición de oxaliplatino a una fluoropirimidina (**fluorouracilo o capecitabina**) como el nuevo estándar [58].

Los cánceres rectales se tratan de forma similar, aunque el valor de la quimioterapia adyuvante en pacientes que han recibido quimiorradioterapia preoperatoria es controvertido [59]. La adición de otros agentes que funcionan bien en entornos metastásicos (p. ej., irinotecán y biológicos) no ha funcionado en el entorno adyuvante del tratamiento del cáncer de recto [59]–[61].

La **terapia sistémica para el CCR metastásico** se adapta con marcadores predictivos específicos del paciente y de la enfermedad. Paralelamente a los avances en las especialidades quirúrgicas y afines, el creciente número de fármacos eficaces para el CCR ha permitido una mejora sustancial de la supervivencia global [62]–[64].

Decidir si la terapia va a ser curativa o paliativa es crucial y depende principalmente de la carga tumoral. Los pacientes pueden tener pocas (u oligo) metástasis que pueden ser resecadas y

curadas. Por otra parte, los pacientes con una enfermedad ampliamente metastásica podrían convertirse en candidatos adecuados para el tratamiento local a la espera de una gran respuesta a la terapia sistémica. Cada vez se recurre más a la reducción de estos tumores con terapias de conversión [62].

El tratamiento sistémico del CCR metastásico suele incluir una quimioterapia de base combinada con un fármaco biológico. Las quimioterapias con **fluoropirimidinas, oxaliplatino e irinotecán** forman la columna vertebral de la quimioterapia en varias iteraciones de regímenes de dos o tres fármacos. Al régimen de quimioterapia se le añade un biológico (anticuerpo anti-VEGF o anti-EGFR) dependiendo de factores específicos del tumor y del paciente. Los pacientes con CCR metastásico suelen recibir varias líneas de tratamiento dependiendo de la situación [62]–[64].

El **bevacizumab**, un anticuerpo monoclonal anti-VEGF dirigido a la angiogénesis, fue el primer agente biológico aprobado para el CCR metastásico y demostró beneficiar a todos los pacientes con este tipo de cáncer [63]. Posteriormente, la adición de bevacizumab a otros tratamientos de quimioterapia ha demostrado mejorar la supervivencia libre de progresión, pero no necesariamente la supervivencia global [64].

Los cánceres colorrectales del lado derecho no se benefician de las terapias antiEGFR en el contexto metastásico de primera línea, posiblemente debido a un origen embriológico diferente al de los tumores del lado izquierdo [20]. Más allá de la lateralidad, en el CCR debe comprobarse la existencia de mutaciones extendidas de RAS y RAF (KRAS, NRAS y BRAF) antes de considerar las terapias antiEGFR [65], [66]. En la actualidad, para el CCR metastásico de tipo RAS y RAF izquierdo en primera línea, pueden utilizarse agentes antiEGFR (cetuximab o panitumumab) o agentes anti-VEGF (bevacizumab) [67].

También es importante la identificación del CCR con mutación BRAF-V600E, ya que son tumores son agresivos y no responden bien a la terapia sistémica. Las estrategias combinatorias (inhibidores de BRAF y anticuerpos antiEGFR combinados con quimioterapia o inhibidores de MEK) han demostrado una mejora de los resultados en varios ensayos clínicos aleatorios y ahora se incluyen en las directrices de consenso [68].

Regorafenib (un inhibidor de la tirosina-cinasa) y TAS-102 (combinación de trifluridina y tipiracil, un antimetabolito oral) son fármacos más recientes, aprobados para todos los pacientes con CCR metastásico refractario que no hayan respondido a los tratamientos sistémicos iniciales [69]–[71].

Para el 4-5% de los tumores con dMMR o MSI alto (MSI-H), se ha aprobado el bloqueo de PD-1 con inmunoterapias como nivolumab o pembrolizumab e ipilimumab [44]. Las respuestas

con estos inhibidores han sido sin precedentes, duraderas y posiblemente curativas. Sin embargo, estas terapias no funcionan en los cánceres colorrectales con MMR funcional, que constituyen la gran mayoría. Un ensayo con un inhibidor de MEK junto con el bloqueo de PD-L1, sin embargo, no mostró ningún beneficio de supervivencia sobre el regorafenib [72].

1.1.5 Recurrencia y metástasis

A pesar de los importantes avances en el diagnóstico y el tratamiento de estos pacientes, el pronóstico del CCR se ha estancado en la actualidad y un alto porcentaje de pacientes con CCR sufrirá una recaída después del tratamiento. Esto podría deberse, al menos en parte, a la falta de un conocimiento completo de la biología que sustenta el proceso metastásico del CCR [73], [74].

La metástasis se produce cuando las células cancerosas del tumor original son capaces de proliferar en tejidos locales, regionales o distantes; en los ganglios linfáticos o en los órganos distantes a través de la diseminación linfática, sanguínea o incluso transcelómica. La recidiva del CCR se define como la recidiva metastásica local, regional y a distancia tras un periodo libre de enfermedad. La **recidiva local** se refiere a la recaída del CCR que se produce en el lugar de la resección quirúrgica original, mientras que la **recidiva regional** se produce en los ganglios linfáticos de drenaje y/o en los ganglios linfáticos pélvicos laterales. La **recidiva metastásica a distancia** afecta al hígado (representa el 40-50% de las metástasis), el pulmón (representa el 10-20% de las metástasis), el peritoneo, los ovarios, las glándulas suprarrenales, el hueso y el cerebro [75]–[79].

Hasta la fecha, la **tasa de supervivencia** a los cinco años tras el diagnóstico es de más del **90%** de los pacientes con CCR en fase inicial. Sin embargo, en caso de diseminación regional a órganos adyacentes o ganglios linfáticos, la tasa de supervivencia a los 5 años disminuye al **69%**, y cuando hay metástasis a distancia, desciende drásticamente a aproximadamente el **10%** representando la principal causa de morbilidad y mortalidad [74], [80].

Alrededor del 20-25% de los pacientes con CCR (CCR) presentan **metástasis en el momento del diagnóstico inicial**, mientras que los pacientes aparentemente libres de cáncer en el momento del diagnóstico desarrollan posteriormente una recidiva locorregional (18%), una recidiva a distancia (78%) o ambas (4%) [74], [75], [81].

Debido a la circulación entero-hepática, el hígado es el lugar de metástasis dominante en los pacientes con CCR [79]. De ahí que **más del 50%** de los pacientes desarrollen **metástasis hepáticas en los tres años** siguientes al diagnóstico, y aunque la mayoría de los pacientes afectados presentan una diseminación multiorgánica, en un tercio de los casos la enfermedad está aislada en el hígado. En estos pacientes, la resección de las metástasis hepáticas ofrece la mejor oportunidad de supervivencia a largo plazo como alternativa o en combinación con la quimioterapia sistémica [82], [83]. Lamentablemente, incluso cuando la resección se combina con regímenes sistémicos adyuvantes, sólo es curativa en el 20% de las metástasis hepáticas del CCR. Además, el número de pacientes elegibles para la resección hepática, aunque ha aumentado con

la introducción de las técnicas de embolización de la vena porta, sigue siendo relativamente bajo [84].

Hasta el **55-60%** de los pacientes desarrollarán **metástasis hepáticas recurrentes**, la mayoría en los primeros **2 años**. Incluso cuando la resección hepática se realiza con intención curativa, el 60%-70% de los pacientes desarrollarán una recidiva local, regional o a distancia [80]. El desarrollo de metástasis a distancia del CCR en el peritoneo, es decir, las metástasis peritoneales (MP) se observan en el 10%-25% de los pacientes con CCR [80].

Son muchos los **factores de riesgo** que aparecen estar asociados a la aparición de metástasis o recidivas, sin embargo, son muy pocos los factores pronóstico o predictores. Los factores de riesgo y variables predictivas más comúnmente empleadas son el estadiaje del tumor, la afectación de ganglios linfáticos, el grado de diferenciación, el subtipo histológico, tamaño del tumor, el género y el tratamiento [74].

En un metaanálisis se investigaron un total de 51 factores de riesgo (histopatológicos, biomarcadores, genéticos y demográficos), para recidivas y metástasis distales en CCR, así como 24 modelos predictivos. En el caso de metástasis, de 35 los factores de riesgo estudiados, sólo se encontraron pruebas convincentes de la asociación entre la invasión vascular y la metástasis en ganglios linfáticos (LNM, lymph node metástasis), e incluso se limitada a los tumores pT1 [74].

Muchos estudios han demostrado que la invasión de los vasos sanguíneos que conduce a la diseminación de las células tumorales y a la metástasis, es un fuerte factor de riesgo para el pronóstico de la enfermedad. Sin embargo, la invasión de vasos linfáticos es un indicador de metástasis en ganglios linfáticos, pero tiene menos valor predictivo sobre la evolución de la enfermedad [74].

En el cáncer de recto, el tamaño del tumor (>1 cm) está asociado a un riesgo mayor de LNM (lymph node metástasis) y el único factor que se ha encontrado asociado a metástasis a distancia es la invasión vascular extramural del tumor (más allá de la muscularis propia) (mrEMVI) [74]. Para recurrencia local de la enfermedad, no se encontraron evidencias convincentes para ningún factor; tan solo la extensión del tumor y la invasión perineural, parecen altamente sugestivos como factores de riesgo para la recurrencia en cáncer de recto [74].

El reto, por tanto, para aumentar la supervivencia de los pacientes, sigue estando en cómo abordar la aparición de metástasis y recidivas, mejorar la detección y tratamiento de metástasis al diagnóstico e identificar pacientes que desarrollarán metástasis a distancia o recidivas pasado un tiempo tras el diagnóstico de la enfermedad.

1.2 RELOJ CIRCADIANO

El reloj circadiano es un mecanismo molecular de regulación muy conservado a lo largo de la evolución, desarrollado por los organismos sensibles a la luz que proporciona capacidad para adaptarse y anticiparse a cambios ambientales relacionados con los ciclos de luz-oscuridad. En general, el reloj circadiano es vital para mantener la homeostasis fisiológica y la función normal de todos los organismos. Existe una regulación y sincronización circadiana de numerosos procesos moleculares, fisiológicos, bioquímicos y de comportamiento, como la ingesta de alimentos, el procesamiento de nutrientes, metabolismo, temperatura corporal, la desintoxicación de xenobióticos y muchos otros, con una periodicidad de "aproximadamente un día" (en latín "circa", alrededor; "diem", día) [85].

Los procesos fisiológicos están coordinados temporalmente por el sistema circadiano a todos los niveles, desde el organismo entero hasta las células individuales. Esta coordinación está garantizada por la organización jerárquica de la compleja red de osciladores. El reloj central está situado en el núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo constituido por aproximadamente 100.000 neuronas en los seres humanos [86] (**Figura 5**), pero también existen relojes subordinados autónomos en los tejidos periféricos (por ejemplo, el hígado, el riñón, la piel, el intestino, el pulmón, el páncreas, el ovario y el corazón), que funcionan individualmente, pero que se sincronizan entre sí y con el ciclo luz:oscuridad mediante señales enviadas desde el reloj del NSQ. El ciclo luz-oscuridad sincroniza diariamente el NSQ, aunque parecen existir otras señales y el modelo de control estrictamente centrado en el NSQ ha sido cuestionado. Existen otras vías que, mediante el ciclo de luz-oscuridad, pueden sincronizar los relojes periféricos sin mediación del reloj central [87] (**Figura 6**). Diversos factores humorales y del sistema nervioso periférico, están implicados en la sincronización; un ejemplo es la ingesta de alimentos rítmicamente programadas, que puede ajustar los relojes periféricos directamente sin afectar a los ritmos del reloj en el NSQ [88] (**Figura 7**). Nuevos hallazgos sugieren que la ritmicidad es el resultado de interacciones entre múltiples osciladores independientes [87].

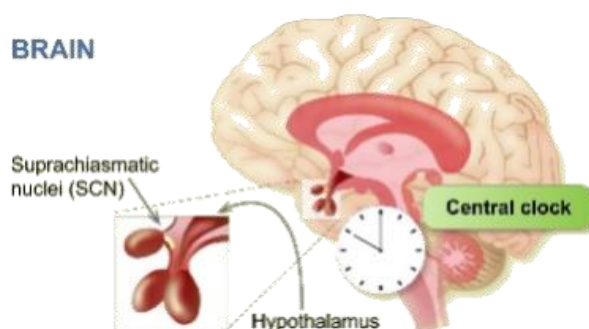


Figura 5: En los mamíferos, el reloj maestro está situado en el núcleo supraquiasmático (SCN) del hipotálamo. Figura de [88].

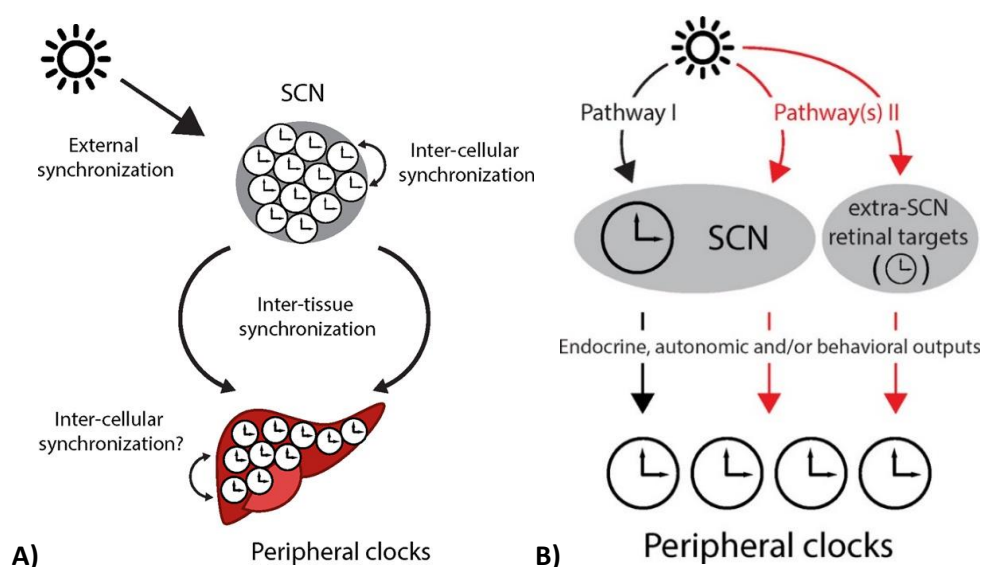


Figura 6: Tipos de sincronización dentro del reloj circadiano y vías paralelas de sincronización en tejidos.

A) Tipos de sincronización dentro del reloj circadiano. Se necesitan varios mecanismos de sincronización para garantizar la sincronía interna y externa de los numerosos relojes celulares presentes en los organismos superiores. Las células individuales dentro de un tejido tienen que estar sincronizadas entre sí (organización intercelular) para permitir la salida circadiana sincronizada de un reloj de tejido periférico particular. A su vez, los relojes de diferentes tejidos han de estar sincronizados entre sí, para mantener la sincronía interna sistémica. Por último, todo el organismo tiene que estar sincronizado con el ciclo luz-oscuridad externo de 24 horas para garantizar la adaptación temporal (sincronización externa). **B)** Las vías paralelas sincronizan los relojes periféricos con el ciclo luz-oscuridad. En la vía 1, la luz de la retina llega al NSQ a través del tracto retino-hipotalámico, sincroniza al reloj del NSQ que luego transmite la información a los relojes periféricos a través de vías neuronales y/o endocrinas. La vía 2 describe otras vías de transmisión de la información lumínica que eluden el reloj del NSQ y reajustan directa o indirectamente los relojes periféricos. Figura de [87].

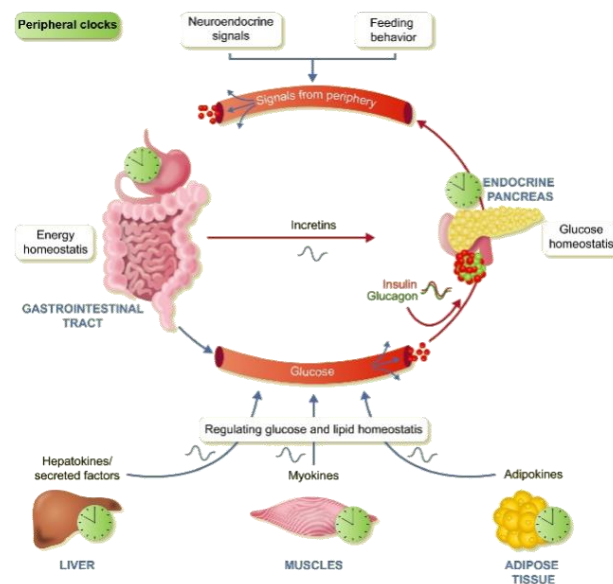


Figura 7: Regulación del reloj circadiano a través de la regulación del tiempo de alimentación y de la temperatura.

El control circadiano de la homeostasis de la glucosa y los lípidos implica una combinación de reguladores centrales y periféricos. Los relojes moleculares que operan en los tejidos metabólicos coordinan el metabolismo de la glucosa y los lípidos de forma específica para cada tejido mediante la regulación de la transcripción de genes y la síntesis de proteínas y lípidos. La utilización diurna de la glucosa ingerida depende de la interacción entre las hormonas secretadas por el páncreas endocrino, siendo las insulina y glucagón los principales reguladores, junto con las incretinas, que son liberadas al torrente sanguíneo por las células enteroendocrinas. La liberación circadiana de hepatoquinas, mioquinas y adipocinas por parte de los tejidos respectivos representa un nivel de regulación adicional para orquestar el metabolismo de la glucosa y los lípidos. Figura de [88].

A nivel celular, el mecanismo molecular responsable de impulsar las oscilaciones circadianas se basa en un bucle de retroalimentación de transcripción-traducción, positivos y negativos, que regula la expresión de los genes del reloj central (**Figura 8**), con una composición molecular similar observada en las neuronas del NSQ y en los órganos periféricos [89]–[92].

Los dos componentes centrales del reloj molecular son los factores de transcripción **CLOCK** (Circadian Locomotor Output Cycles Kaput) y **BMAL1** (Brain and Muscle ARNT-Like 1) que forman un complejo heterodimérico que impulsa la expresión rítmica de numerosos genes controlados por el reloj (CCGs; Core Clock Genes). El dímero **CLOCK-BMAL1** activa la transcripción de los genes **Period (Per)** y **Cryptocromo (Cry)**, que codifican las proteínas represoras **PER1**, **PER2**, **PER3**, **CRY1** y **CRY2** [93]. Cuando está presente en concentraciones suficientes, las proteínas PER y CRY forman un complejo que inhibe la actividad de CLOCK-BMAL1 [94]. En consecuencia, la transcripción de Per y Cry ya no es estimulada por los activadores de CLOCK-BMAL1, lo que resulta en una disminución de los niveles de las proteínas PER y CRY. Una vez que los niveles de PER y CRY disminuyen hasta un umbral críticamente bajo en el que dejan de inhibir su síntesis, comienza un nuevo ciclo de acumulación de proteínas PER y CRY, generando así cambios oscilantes en los

niveles de los transcritos y proteínas del reloj central que persisten durante aproximadamente 24 horas [89]. Las interacciones proteína-proteína entre los componentes del reloj central representan un nivel de regulación adicional de este bucle autorregulador, ya que la interacción entre las proteínas CRY1 y PER2 está modulada por la unión de zinc y la formación de enlaces disulfuro [94]. En un bucle secundario de retroalimentación, el complejo **CLOCK-BMAL1** controla la expresión rítmica de los genes que codifican los receptores hormonales nucleares **REV-ERB** (**REV-ERB α** y **REV-ERB β**) y **ROR α** (y **ROR β** en las neuronas) [95]. A su vez, REV-ERB α y ROR α compiten por los mismos elementos RORE dentro de las regiones promotoras de Clock y Bmal1, resultando en la represión o activación de la transcripción de Clock y Bmal1, respectivamente. La proteína **CHRONO**, recientemente identificada, se une a la región promotora de Bmal1 de forma circadiana y, por tanto, inhibe su función [96].

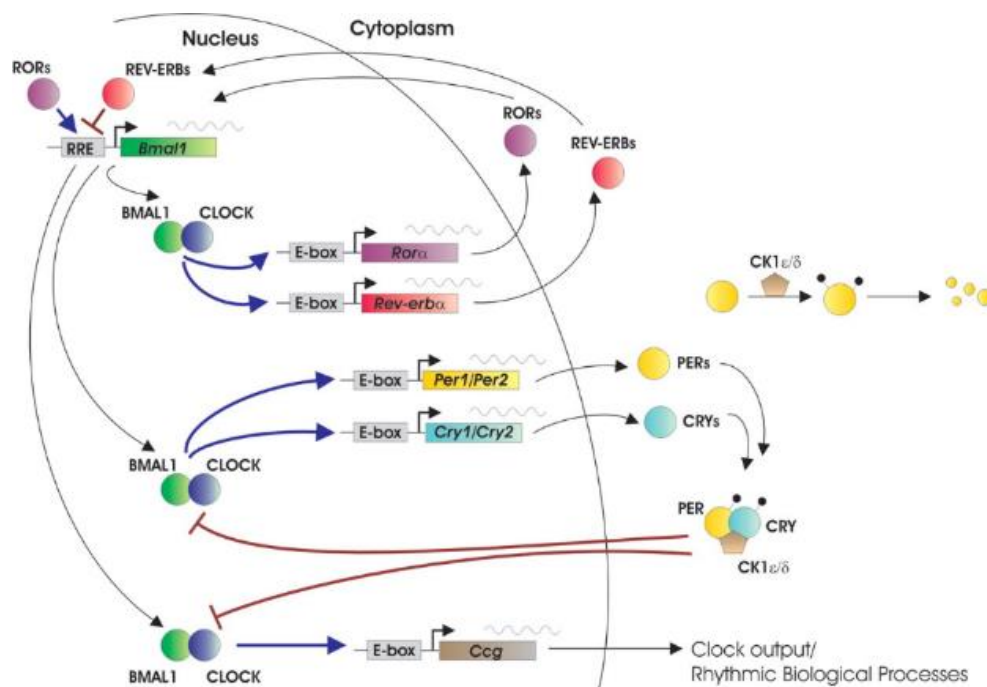


Figura 8: Bucle de retroalimentación transcripcional que constituyen en reloj circadiano en mamíferos

Figura de [97].

Además del bucle de retroalimentación negativa de transcripción-traducción, las **modificaciones postraduccionales** de las proteínas centrales del reloj proporcionan un nivel adicional de regulación [98]–[100]. La **fosforilación** es una de las modificaciones postraduccionales clave que interviene en la regulación del bucle central del reloj [101]. Además, la **acetilación** de las proteínas del reloj afecta directamente a su estabilidad y actividad. Otras modificaciones postraduccionales que participan en el ajuste del reloj molecular y de las proteínas controladas por el reloj comprenden la **ubiquitinación**, la **SUMOilación** o la **metilación** [100],

[102]. La **translocación nuclear a citoplasmática** de las proteínas centrales del reloj representa un nivel adicional de regulación del bucle molecular.

Mediante estudios del genoma completo ("*Genome-wide approach*") se ha encontrado que la ritmicidad de la transcripción va acompañada de una ritmicidad en los factores represores de transcripción ("*transcription factor binding*") y la modificación de las regiones de unión de histonas, así como un reclutamiento, también circadiano, de la RNA polimerasa II. Otras capas de regulación son las que implican la organización de los cromosomas y modulación de la conformación de la cromatina, con interacciones en los dominios activadores y represores, que también están sujetos a oscilaciones circadianas.

El solapamiento de estos mecanismos de regulación confiere una ritmicidad a las funciones celulares, metabólicas y fisiológicas para el mantenimiento de la homeostasis [97].

A pesar de que los avances de análisis genómicos, el conocimiento de la regulación circadiana a nivel de proteína continúa siendo muy limitado, debido a la dificultad para los análisis cuantitativos del proteoma. Los últimos estudios han revelado ritmicidad en más de 500 proteínas en el núcleo y más de 5000 sitios de fosforilación, por lo que queda mucho saber acerca del reloj molecular y su regulación [103].

A nivel tisular, hay estudios que han mostrado que el reloj circadiano es autónomo y se mantiene por sí mismo no solo en el NSQ, sino también en tejidos periféricos, e incluso en células cultivadas disociadas [104]. Por tanto, las contribuciones específicas de cada componente del reloj molecular, los bucles de retroalimentación y las interacciones entre los componentes del reloj pueden variar de forma específica para cada tejido [97], [105].

Algunos de estos componentes son, por ejemplo, el ARNm del CLOCK, que es cíclico en los tejidos periféricos, pero se expresa de forma constitutiva en el NSQ. Además, los miembros de la familia Ror (α , β y γ) presentan patrones de expresión sorprendentemente diferentes entre los tejidos. Los Ror- α muestran un ritmo circadiano robusto en el NSQ, pero sólo se observa una ligera oscilación en los tejidos periféricos. Ror- γ , sin embargo, no se expresa en el NSQ, pero muestra una expresión rítmica en los tejidos periféricos y participa en el reloj molecular periférico [106]–[109].

Los ratones que carecen de Ror- α funcional, tienen ritmos normales de genes de reloj en los tejidos periféricos, incluido el ritmo del ARNm de Bmal1; esto sugiere que las proteínas ROR (α , β y γ) pueden contribuir de forma diferente a la activación rítmica de Bmal1 de manera dependiente del tejido [106], [110]. Puede ser importante tener en cuenta la regulación tisular específica de Bmal1, ya que los ratones deficientes en Bmal1 (Bmal1-/-) presentan una serie de

fenotipos que incluyen la pérdida de ritmos circadianos, la disminución del peso corporal, la infertilidad, la artropatía progresiva y la reducción de la esperanza de vida [110]–[112]. Esto sugiere que Bmal1 puede desempeñar un papel en una variedad de funciones dependiendo del tipo de tejido en el que se exprese.

La ritmicidad de otros genes del reloj (por ejemplo, Per1 y Per2) también muestran una alteración específica de tejido, incluso en aquellos en los que existe un reloj molecular disfuncional. En efecto, los ARNm de Per1 y Per2 muestran niveles de expresión rítmicos en diferentes tejidos, incluso en ausencia o deficiencia de CLOCK, por lo que la actividad de los factores de transcripción que promueven los patrones de expresión génica circadiana, en ausencia del CLOCK, parecen ser específicos del gen diana y del tejido [113], [114].

1.2.1 Reloj circadiano y efectos fisiológicos

Los relojes circadianos influyen en casi todos los aspectos de la fisiología y el comportamiento, como el ciclo de descanso-vigilia, la actividad cardiovascular, la secreción hormonal, la temperatura corporal y el metabolismo; y son muchos los estudios que vinculan la alteración de los factores reguladores del reloj como una contribución a la aparición de numerosas patologías y a determinados fenotipos del cáncer [103], [115].

Estudios recientes han aportado más evidencias sobre cómo la alteración de los ritmos circadianos se asocia con los trastornos del sueño [116]–[118], la susceptibilidad a las infecciones [119], el síndrome metabólico [118] la enfermedad de Alzheimer [120], el envejecimiento [121] y el cáncer [122]–[124]. También hay indicios de que, además de controlar la expresión genética circadiana, los genes del reloj pueden influir en otras funciones celulares de forma no circadiana [125].

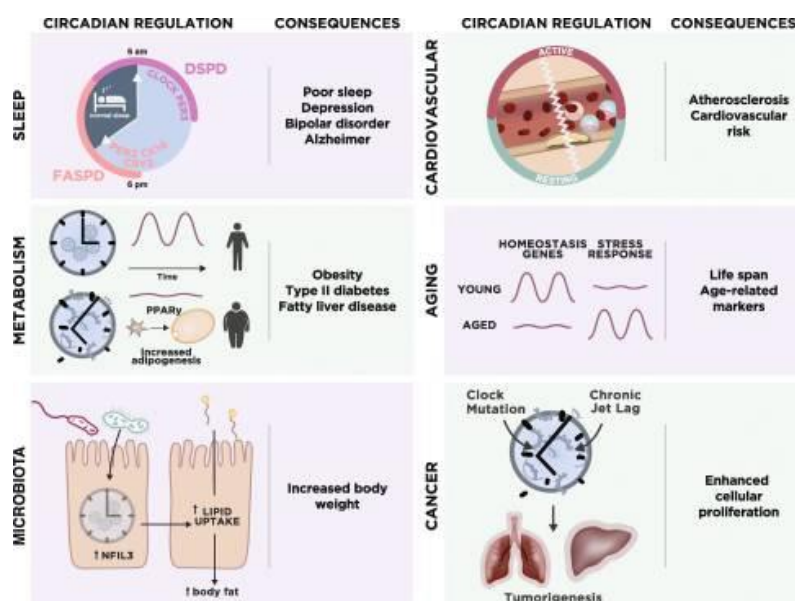


Figura 9: Regulación circadiana en diferentes sistemas fisiológicos.

Figura de [103] donde se muestra una visión general de cómo los circadianos afectan directamente al tiempo y la calidad del sueño en los seres humanos, a la regulación del metabolismo, la microbiota intestinal, el sistema cardiovascular, envejecimiento celular y proliferación celular, y las consecuencias en las alteraciones de dichos ritmos.

En cuanto a la **regulación del sueño-vigilia**, se han asociado mutaciones en el reloj circadiano en determinados trastornos del sueño. Por un lado, se han encontrado mutaciones en PER2, CK1 δ (Casein Kinasa 1 δ) y CRY2, y se han descrito casos familiares, lo que surge una herencia mendeliana, asociada a polimorfismos en CLOCK, PER3 y mutaciones en CRY1. Estas alteraciones conducen a una mayor afinidad de este represor por las proteínas activadoras

circadianas CLOCK y BMAL1, lo que alarga el periodo de los ritmos moleculares circadianos [103], [116], [118], [126].

El **patrón diario de alimentación y ayuno** es regulado por el reloj circadiano. Alteraciones de estos ritmos diarios de actividad y descanso, y por tanto de los patrones de alimentación, como ocurre en los trabajadores por turnos, están asociados a la aparición de síndromes metabólicos [127]. El reloj controla el metabolismo directamente al impulsar programas transcripcionales de ciertas rutas metabólicas. Por ejemplo, CRY1 suprime la gluconeogénesis hepática durante el ayuno, PER2 controla el metabolismo de los lípidos, y los receptores nucleares, REV-ERB regulan la transcripción de enzimas del metabolismo de los ácidos grasos y colesterol. Alteraciones en CLOCK y BMAL1 se asocian a obesidad, hiperinsulinemia y diabetes [128].

Además de la **modulación directa del metabolismo** de los mamíferos, el reloj ejerce un control indirecto a través de su regulación del comportamiento, la ingesta de alimentos y la oscilación de hormonas como la insulina, el glucagón, el péptido YY, GLP-1 (Glucagon like-peptide 1), la corticosterona, la leptina y la grelina [129].

Por otro lado, los glucocorticoides y otras hormonas adipogénicas se secretan en los mamíferos de forma circadiana, y la pérdida de las oscilaciones circadianas de los glucocorticoides se correlaciona con la obesidad en los seres humanos. Se ha demostrado que la **diferenciación de los adipocitos** no progresa bajo los ciclos hormonales circadianos normales. Esta diferenciación de los adipocitos parece estar vinculada a PPAR γ , que actúa como filtro de los estímulos hormonales circadianos [130]. Como trataremos más adelante, el reloj circadiano también guarda relación con la diferenciación diversos tipos de células madre.

Las células del **sistema inmune**, como neutrófilos y monocitos, exhiben un patrón circadiano de migración desde la sangre a los tejidos. Los linfocitos B y T, también muestran una fuerte oscilación circadiana en la sangre, aumentando su presencia en ella durante las fases de sueño. La variación diurna en la distribución de las células T mejora la respuesta inmune a antígenos solubles e infecciones sistémicas bacterianas durante la noche. Todos estos hallazgos sugieren que el sistema inmune es capaz de responder a las señales circadianas para maximizar su respuesta a infecciones [119], [131], [132].

Por otro lado, son también conocidos los **efectos** de algunas proteínas del reloj circadiano, BMAL1 y REV-ERB α , como **antiinflamatorios**. La ablación de Bmal1 en macrófagos, las células efectoras primarias de la respuesta innata, elimina la ritmicidad de la tormenta de citoquinas en respuesta a endotoxinas [133]. También existen relación entre las proteínas del reloj y la

regulación de los niveles de antioxidantes, factores que protegen frente a daño oxidativo y factores proinflamatorios [134].

Las interacciones metabólicas entre el **intestino y su microbioma** han sido uno de los principales focos de investigación en la última década, y tanto el ritmo del huésped como el de la microbiota parecen afectarse mutuamente. La alteración de los genes del reloj en el huésped disminuye la abundancia de cierta microbiota, y, por otro lado, la ausencia de microbios intestinales perturba la expresión de los genes del reloj circadiano en el hígado del ratón [135], [136].

Un estudio reciente también demostró que el reloj circadiano de las células intestinales es importante para regular la susceptibilidad a la infección intestinal y el metabolismo de los lípidos [137].

Los ritmos circadianos decaen con la edad [138], [139], y los ritmos de actividad neuronal muestran un declive dependiente de la edad en el reloj maestro del NSQ [140]. Además, la interrupción de los ritmos circadianos mediante la ablación de *Bmal1* conduce al **envejecimiento prematuro** en ratones [141]. Sin embargo, el envejecimiento no provoca simplemente una disminución del ritmo circadiano en la expresión de los genes del reloj central en animales jóvenes, sino que, aparecen ritmos en un nuevo conjunto de genes en los ratones envejecidos [142], [143]. Las células madre del músculo epidérmico y del músculo esquelético envejecidas muestran una reprogramación de la expresión génica hacia una respuesta al estrés, la inflamación y el daño del ADN, mientras que los genes centrales del reloj mantienen sus ritmos [143]. Así, este estudio apoya la idea de que las células madre envejecidas conservan un reloj funcional, pero que este reloj reorienta la célula hacia nuevas funciones circadianas con el envejecimiento. Tal vez esta reprogramación esté asociada a la metilación diferencial del ADN que se produce con el envejecimiento [144].

Dado que el reloj circadiano afecta directa o indirectamente a todos los procesos metabólicos, las vías de señalización y los sistemas y/o redes intracelulares, cabría esperar que la alteración del reloj tuviera un efecto sobre el desarrollo y la progresión del cáncer [145].

1.2.2 Reloj circadiano y cáncer

Durante las últimas décadas, se ha investigado ampliamente la asociación de los genes del reloj circadiano con el desarrollo del cáncer [146].

Como resultado tanto en estudios poblacionales como en laboratorio, la Organización Mundial de la Salud designó la alteración circadiana como un probable carcinógeno, aumentando así el interés por comprender cómo la alteración de los patrones diurnos promueve el desarrollo de tumores. Los estudios epidemiológicos indican que las alteraciones del ritmo circadiano (por ejemplo, a través del jet-lag, el trabajo por turnos, la alteración del sueño y la exposición a la luz por la noche) se asocian con un mayor riesgo de cáncer, incluidos los cánceres de próstata, mama, colon, hígado, páncreas, ovario y pulmón [147], [148]. Además, la pérdida del control circadiano se asocia a una escasa eficacia de los tratamientos contra el cáncer y a una mortalidad temprana entre los pacientes con cáncer [145], [149]. Por otro lado, los individuos con deficiencias visuales que son insensibles a los cambios de luz en el entorno, y que por tanto dependen en gran medida de los relojes circadianos endógenos para sincronizar la fisiología diaria, tienen un menor riesgo general de cáncer [150].

Se ha demostrado que varios tipos de células cancerosas carecen de un reloj circadiano funcional, lo que implica la disfunción del reloj circadiano en la oncogénesis. Aunque muchos tipos de células cancerosas siguen mostrando oscilaciones del reloj circadiano, varios estudios han revelado una desregulación de los genes centrales del reloj Per1, Per2, Per3, Cry1, Cry2, Bmal1 y Clock en algunos cánceres humanos [151]. Por ejemplo, los niveles de expresión de Per1, Per2 y/o Per3 están alterados en los cánceres colorrectal, pancreático, gástrico, oral, de mama y de pulmón de células no pequeñas, así como en el glioma, el carcinoma hepatocelular, el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello y la leucemia mieloide, así como cánceres urológicos, incluidos los de riñón, vejiga y próstata [152]–[158].

En modelos animales, se han encontrado mutaciones en genes del reloj, incluidos Per1, Per2, Cry1, Cry2 y Bmal1, que conduce a una mayor formación de tumores [122], [123], [159].

Un reciente análisis genómico exhaustivo mostró una expresión diferencial de la mayoría de los genes del reloj y de los genes asociados al reloj en varios tipos de cáncer [160]. Aunque los mecanismos subyacentes son inciertos, se ha sugerido la regulación epigenética como una posibilidad, ya que las regiones promotoras de los genes del reloj principales, incluidos Per1, Per2, Cry1 y Bmal1, están hipermetiladas en algunos tipos de cáncer [161]–[163].

Los procesos circadianos influyen en las vías clave que afectan al desarrollo y la progresión del cáncer, incluyendo el control del ciclo celular, la apoptosis, la regulación metabólica y la respuesta al daño del ADN (**Figura 10**) [124]

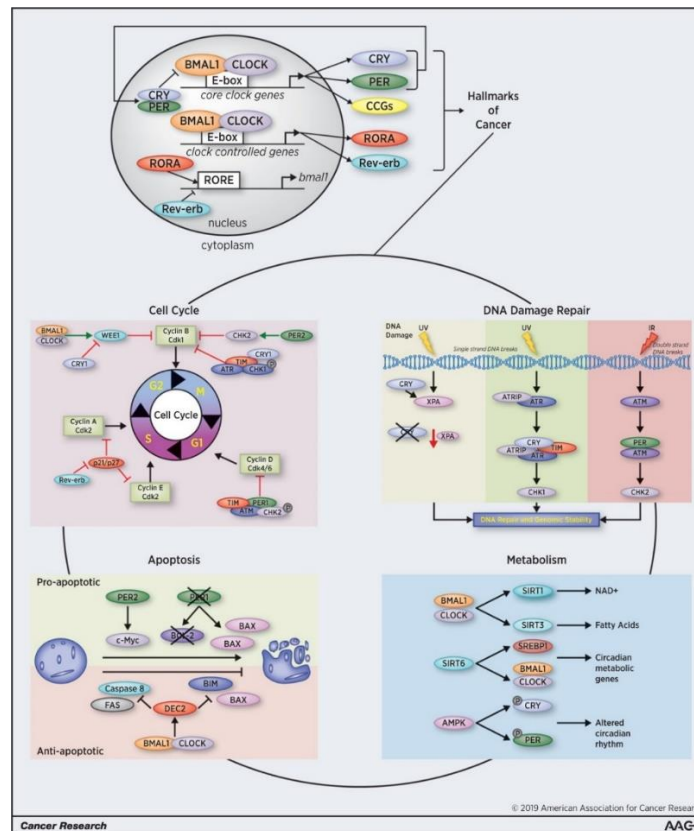


Figura 10: “Características principales” del cancer y el reloj circadiano.

Figura de [124] donde se esquematiza como los reguladores positivos (CLOCK y BMAL1) y negativos [Criptocromo (CRY) y Periodo (PER)] mantienen la ritmicidad diaria en todo el organismo mediante bucles de retroalimentación, controlando numerosos procesos, entre ellos, el ciclo celular, la apoptosis, la regulación metabólica y el DDR, todos ellos cruciales para la homeostasis fisiológica, y como la alteración de la homeostasis circadiana a través de diversos factores se asocia con una mayor incidencia del cáncer y es un factor de riesgo importante e independiente del desarrollo del cáncer en los seres humanos.

1.2.2.1 Control circadiano del ciclo celular.

El ciclo celular mitótico y el reloj circadiano comparten muchas similitudes como osciladores biológicos en las células en división, ya que cada uno muestra fases periódicas de activación y represión. En organismos que van desde las cianobacterias hasta los eucariotas unicelulares, existe un acoplamiento molecular de los procesos, en el que el reloj molecular sirve como un "punto de control" adicional para la mitosis que restringe la división celular a fases circadianas específicas [164], [165].

El efecto del ritmo circadiano sobre el ciclo celular en los tejidos epidérmicos y gastrointestinales estaba bien documentado mucho antes del descubrimiento de los genes del reloj y del desarrollo del modelo molecular actual [92], [166].

Los estudios han demostrado que los componentes del reloj circadiano pueden inducir o reprimir la progresión del ciclo celular dependiendo de la hora del día, induciendo un control rítmico transcripcional y postranscripcional del ciclo celular. Así, cada fase del ciclo celular tiene el potencial de ser influenciada por el reloj circadiano. Por ejemplo, en la fase G1, **Rev-erba** y **RORa/γ** reprimen la transcripción del regulador de la quinasa dependiente de ciclina (CDK) p21cip1, promoviendo así la **progresión del ciclo celular** [167]–[171]. A la inversa, el gen controlado por el reloj, **NONO**, regula la expresión del inhibidor de CDKs p16ink4a de forma dependiente de **PER** en la transición G1-S provocando la **senescencia celular** [167]–[171]. Además, **PER1** y el gen circadiano Timeless (TIM) inhiben la transición G1-S, causando la **detención del ciclo celular**. **CRY1** promueve la **progresión del ciclo celular** inhibiendo a WEE1, la quinasa reguladora de G2-M, e **induciendo así la entrada mitótica**. **CLOCK/BMAL1** también regula la transcripción rítmica de WEE1 controlando la de WEE2 de manera suficiente para controlar la **detención del ciclo celular** [167]–[171]. A la inversa, en diferentes análisis se demostró que **CRY1 restringe la mitosis modulando la transición G2-M** [172], [173]. Por último, la expresión de varios oncogenes conocidos (β -catenina, c-Myc y Mdm2), ciclinas (CCND1, CCNB y CCN1) y otros reguladores del ciclo celular (Cdk4, Wnt3 y Tcf4) están controlados por el reloj [174], [175]. En conjunto, estas observaciones indican que los factores circadianos influyen significativamente tanto en la transición G1-S como en la G2-M, pero provocan efectos distintos, que dependen del contexto y de la fase del ritmo circadiano [124].

A la inversa, existe una interrelación en la que la maquinaria reguladora del ciclo celular afecta a la función del reloj circadiano, especialmente en lo que respecta al silenciamiento transcripcional que se produce durante la mitosis. Como se ha observado, la proteína supresora de tumores p53 es fundamental para el acoplamiento de los osciladores circadianos y del ciclo celular [176].

1.2.2.2 Regulación de la señalización de las células cancerosas.

El mantenimiento de la señalización proliferativa sigue siendo un factor clave entre las características del cáncer [177], [178], y existen pruebas preliminares que relacionan los factores circadianos con la regulación de los procesos del factor de crecimiento en el cáncer [179], [180].

Tanto la **eliminación de CRY1** in vitro como los ratones **mutantes de PER** demostraron que la expresión circadiana de GADD45 α (*growth arrest and DNA damage-inducible protein 45 alpha*) se ve afectada, **aumentando la proliferación celular** [159], [181]. Varios componentes de diferentes vías de señalización (ERK1/2, ERK2 y MKK2), también muestran una rítmica circadiana significativa, lo que implica la conectividad con las respuestas específicas del factor de crecimiento en el cáncer [179], [180].

A nivel tisular, el reloj central controla la proliferación celular en los tejidos periféricos a través del sistema nervioso simpático (SNS), que inerva todos los órganos periféricos para controlar la señalización intracelular. Los estudios han demostrado que la desregulación de la señalización del SNS, ya sea por ablación quirúrgica o en modelos de ratón con desfase horario, suprime la oscilación circadiana y promueve la iniciación de tumores [159]. La desregulación de la señalización del SNS provoca la pérdida de función del reloj periférico, aboliendo la activación de CLOCK/BMAL y conduciendo a la activación oncogénica de Myc [159]. En conjunto, el control circadiano equilibrado de la proliferación celular mediante el control transcripcional y la regulación de las quinasas es clave para la homeostasis celular y la prevención del desarrollo de tumores [124].

1.2.2.3 Influencia del reloj circadiano en la muerte celular.

Estudios recientes han establecido una relación directa entre el reloj circadiano central y la apoptosis. De forma similar a lo observado con la regulación del ciclo celular, los factores circadianos pueden tanto promover como restringir la apoptosis, dependiendo del contexto celular y del estado del reloj. Con respecto a la promoción de la muerte celular, CRY1/2 y PER1 influyen en la vía extrínseca dependiente del TNF α y en las vías apoptóticas intrínsecas, respectivamente [182]. Mecánicamente, PER2 sensibiliza a las células cancerosas a la apoptosis inducida por la radiación mediante la activación de las vías proapoptóticas mediadas por Myc. Además, la supresión de PER1 provoca la regulación a la baja del antiapoptótico BCL-2 y la regulación al alza del proapoptótico BAX en las células de carcinoma hepatocelular, lo que aumenta la apoptosis. A la inversa, Clock puede inhibir la apoptosis. Así, los factores circadianos pueden promover la apoptosis a través de múltiples mecanismos. Además, los reguladores apoptóticos DEC1 (proapoptótico) y DEC2 (antiapoptótico) reprimen la transactivación del promotor de Per1 inducida por CLOCK/BMAL, influyendo así en la regulación circadiana de la apoptosis [183], [184].

1.2.2.4 Reloj circadiano y reparación del ADN

La alteración de los mecanismos de reparación de ADN (*DDR, Damage DNA Repair*) dañado contribuye a la aparición de determinados fenotipos del cáncer [185], y una multitud de pruebas vinculan al reloj circadiano con la competencia de los DDRs. Es probable que el vínculo entre estos procesos esté conservado evolutivamente, ya que los criptocromos están estructuralmente relacionados con las fotoliasas del ADN que catalizan la reparación del ADN dependiente de la luz en plantas y *Drosophila*. El papel directo de los CRYs en el DDR en los mamíferos todavía tiene que ser completamente definido mecánicamente; sin embargo, varios estudios causales han mostrado la importancia del CRY1 y CRY2 en el DDR [186], [187]. Además, otros componentes del reloj molecular, como PER1, PER2 y TIM, desempeñan un papel fundamental en múltiples procesos de DDR. Por ejemplo, la sobreexpresión de PER1 activa la apoptosis mediada por Myc en respuesta a los daños en la doble cadena de ADN (*DSB, double strand breaks*) inducidos por la radiación, y a la inversa, la regulación a la baja de PER2 confiere resistencia a la apoptosis inducida por la radiación debido a la activación retardada de CHK2 [159], [188]. En conjunto, son necesarios distintos componentes circadianos para provocar el DDR canónico tanto para las roturas de ADN de cadena simple como de cadena doble [124].

Como complemento a estos hallazgos, el componente circadiano positivo Bmal1 se ha vinculado preliminarmente a la DDR. **La supresión de Bmal1 suprime la activación de p53 inducida por la radiación, liberando a las células de la detención del ciclo celular** [189]. Entender el momento específico y la regulación de la vía por cada gen circadiano será fundamental para discernir los regímenes terapéuticos adecuados para inducir respuestas sostenidas a las terapias genotóxicas [124].

1.2.2.5 Reloj circadiano y el metabolismo de las células cancerosas.

La interacción coordinada entre el reloj circadiano molecular y la intrincada red de vías metabólicas es necesaria para el mantenimiento de la homeostasis fisiológica en las células sanas. El reloj circadiano metabólico es independiente de la actividad transcripcional y se mantiene a través del ciclo redox de las enzimas peroxiredoxina/tiorredoxina/NADPH, que muestra una fluctuación redox de 24 horas metabolizando el H₂O₂ en varios tejidos de todo el cuerpo [180], [190], [191].

La reprogramación del metabolismo energético asociada al cáncer para utilizar predominantemente la actividad glucolítica, a pesar de las condiciones aeróbicas (efecto Warburg), se caracteriza por una mayor formación de NADPH, una disminución de la actividad del

ciclo TCA (*TCA, tricarboxylic acid*) y un aumento de la síntesis de ácidos grasos, y estudios recientes han establecido una relación entre este proceso y el reloj circadiano. Por ejemplo, la elevación de la melatonina debida a cambios en la exposición a la luz conduce a la disminución del crecimiento de xenoinjertos de cáncer de próstata y de mama debido a la interrupción del efecto Warburg [192], [193]. Además, las alteraciones en la vía de las pentosas fosfato, que genera NADPH, están estrechamente controladas de forma circadiana [194]. Por otro lado, la remodelación de la cromatina y el rendimiento metabólico también está controlado por proteínas dependientes de NAD⁺, reguladas por CLOCK/BMAL y PER2 [195], [196].

Sobre la base de estos hallazgos, hay pruebas sólidas de que la alteración circadiana influye en las adaptaciones metabólicas a favor del desarrollo del cáncer [124].

Por otro lado, es importante destacar que las pruebas también sugieren que los residuos derivados de los tumores pueden reutilizarse como combustible para los mismos. Por ejemplo, en NSCLC utiliza lactato como fuente de carbono, y en cáncer de mama reutiliza residuos de amoníaco como fuente de nitrógeno [197], [198]. Estos estudios sugieren un mecanismo por el cual el microambiente derivado del tumor puede ser reciclado como fuentes de combustible alternativas para las células que proliferan rápidamente. Dado el papel fundamental del reloj circadiano en la regulación del metabolismo, incluidas las vías implicadas en el metabolismo de los carbohidratos, los aminoácidos y los ácidos grasos y los lípidos [199], [200], es plausible que el reloj circadiano pueda estar implicado en la regulación de estos procesos en el contexto del cáncer. También, es posible que los residuos metabólicos dependientes de los tumores se segreguen de forma temporal, lo que sugiere momentos álgidos del día en los que estas vías metabólicas podrían ser objeto de tratamiento farmacológico [91].

Por otro lado, también parece importante el metabolismo en el macroentorno tumoral, compuesto por citocinas inflamatorias, quimiocinas, subproductos glucolíticos y otros residuos derivados del tumor que son segregados a la sangre. Se ha descrito la capacidad del macroambiente tumoral circulante para reconfigurar el metabolismo circadiano a distancia [201], [202]. Los tejidos metabólicos diana incluyen el hígado, pero probablemente se extiendan al páncreas, el tejido adiposo y el músculo esquelético, como se ha demostrado. Además, el papel de los tejidos periféricos en el impulso de la tumorigénesis al suministrar potencialmente combustible metabólico enfatiza la importancia de la interacción entre el tumor y el huésped [91].

1.2.2.6 Reloj circadiano y metástasis.

La plasticidad celular a través del proceso de TEM se ha relacionado con la reprogramación metabólica [203]. Teniendo en cuenta su relación con el metabolismo celular, no sería de extrañar que los ritmos circadianos ejerciesen un importante papel regulador del proceso de metástasis. De hecho, la generación espontánea de células tumorales circulantes (CTC) con una alta propensión a la metástasis no se produce de forma continua, sino que se concentra en el tiempo dentro de la fase de reposo del individuo afectado, lo que proporciona una nueva justificación para la investigación y el tratamiento controlados por el tiempo de los cánceres con tendencia a la metástasis [204].

1.2.2.7 Influencia del ritmo circadiano en la respuesta al tratamiento del cáncer (cronoterapia)

Dados los importantes datos que relacionan la disfunción del reloj circadiano con las vías del cáncer, es razonable considerar cómo podría modularse este proceso para influir en el crecimiento y la supervivencia de los tumores. El concepto de cronoterapia, que tiene en cuenta los ritmos y ciclos naturales del organismo para tratar una enfermedad o trastorno, y se utilizó incluso antes de que se definiera el mecanismo molecular del reloj circadiano central [205].

La cronoterapia en cáncer está siendo objeto de numerosos estudios. Por un lado, las pruebas apoyan firmemente la idea de que las enzimas metabólicas y de desintoxicación de xenobióticos presentan picos temporales de actividad y, por tanto, deberían ser objeto de tratamiento farmacológico en función de la hora óptima del día [206].

Por ejemplo, el agente quimioterapéutico cisplatino presenta una diferencia significativa en los resultados de los pacientes con cáncer de próstata, mama, cuello uterino y ovario cuando se comparan las dosis matutinas y vespertinas, lo que indica que la cronoterapia mejora la proporción terapéutica tóxica del cisplatino y aumenta su eficacia. Además, otros fármacos quimioterapéuticos mostraron horarios de dosificación óptimos para mejorar el resultado en el cáncer de vejiga, colorrectal, endometrial y renal [207]–[210].

Otras vías relacionadas con el reloj circadiano que están siendo objeto de terapias contra el cáncer, la intervención sobre vías metabólicas controladas por el reloj, como son entre otras, la inhibición de la acetil-CoA carboxilasa y la consiguiente disminución de la síntesis de ácidos grasos que en modelos de ratón de adenocarcinoma de pulmón que amortiguó eficazmente el crecimiento del tumor [211]. Otras pruebas recientes también sugieren que los agonistas farmacológicos de REV-ERB son selectivamente letales para las células cancerosas y perjudican el

crecimiento del glioblastoma in vivo [212]. Por otro lado, la hormona circadiana melatonina se ha utilizado en combinación con la terapia del cáncer para minimizar la toxicidad o mejorar la viabilidad quimioterapéutica en entornos clínicos y de laboratorio. Por ejemplo, la melatonina protege contra la producción de ROS inducida por el cisplatino y el daño mitocondrial [213]. La melatonina también se ha utilizado en combinación con el 5-fluorouracilo (5-FU) para potenciar el efecto inhibidor sobre la proliferación de las células de cáncer de colon [214]. Por último, se ha demostrado que la melatonina inhibe la transición epitelial a mesenquimal (TEM) al aumentar la expresión de E-cadherina y disminuir la capacidad migratoria e invasiva de las células de cáncer de mama en cultivo [215] y al inhibir la TEM a través de un mecanismo dependiente de la glucógeno sintasa quinasa-3 β (GSK-3 β) in vivo [216]. Las pruebas clínicas sugieren igualmente una mejora en la tasa de supervivencia a los 5 años de los pacientes metastásicos con CPNM (Carcinoma de pulmón no microcítico) tratados con melatonina en combinación con cisplatino y etopósido [217].

También se ha evaluado el papel del reloj circadiano en la administración de quimioterapia utilizando ratones de tipo salvaje y circadiano mutante. Los ratones con mutación del reloj y *Bmal1* son sensibles a la quimioterapia independientemente del momento de la administración del tratamiento [218]–[220].

En consecuencia, los exitosos resultados preclínicos cronoterapéuticos se utilizaron como justificación para varios ensayos clínicos aleatorios para cánceres avanzados, que revelaron que la cronoterapia anticancerosa es más beneficiosa para los pacientes que mantienen su reloj y ritmo circadianos endógenos [221]. Esto pone de relieve la intrincada conexión de la eficacia terapéutica con la función circadiana innata individual para obtener un resultado ideal. Sin embargo, un reloj circadiano desregulado podría alterar la eficacia de los fármacos contra el cáncer [124].

La actividad de varios fármacos contra el cáncer puede verse limitada por sus efectos secundarios y su toxicidad para las células sanas. Por lo tanto, la cronoterapia tiene como objetivo maximizar los efectos antitumorales de la quimioterapia contra el cáncer minimizando la toxicidad y los efectos secundarios indeseables, al tiempo que aumenta la tolerabilidad para mejorar la tasa de supervivencia de los pacientes con cáncer [124].

Por último, los análisis circadianos del macroentorno tumoral podrían tener un valor clínico único. Teniendo en cuenta la complejidad de la relación entre el tumor y el huésped y la posibilidad de que esta comunicación cambie constantemente, el secretoma dependiente del tumor tiene valor como herramienta pronóstica no invasiva. En este sentido, cabe destacar que

un aumento de los aminoácidos de cadena ramificada en plasma se asocia a un mayor riesgo de diagnóstico de cáncer de páncreas [222]. También se ha documentado el uso de metabolitos en sangre secretados por el tumor en el caso del cáncer colorrectal [223], cáncer de mama avanzado [224] y cáncer de páncreas [225]. Curiosamente, el perfil del metaboloma también puede utilizarse para medir la eficacia del tratamiento. De hecho, el análisis del metaboloma del suero de pacientes con cáncer de mama tratados con quimioterapia neoadyuvante identificó metabolitos que responden al tratamiento [224], aunque se necesitaría el estudio a lo largo del ciclo día-noche para determinar si la disponibilidad de estos metabolitos es rítmica [91].

En relación al microentorno tumoral, el reloj circadiano controla muchos aspectos de las funciones inmunitarias relacionadas con el cáncer, incluida la liberación y presentación de antígenos a células cancerosas, la activación, transporte e infiltración de células inmunitarias efectoras, y la eliminación de células tumorales por células inmunitarias [226]. Esto ha llevado a intentar controlar la efectividad de la inmunoterapia contra el cáncer mediante su manipulación temporal.

Actualmente, la aplicación del reloj circadiano en la inmunoterapia del cáncer implica principalmente dos aspectos: desarrollo de fármacos para dianas de reloj biológico destinadas a terapia combinada y cronoinmunoterapia. En el primer caso, se ha demostrado que un aumento de la expresión de los genes del ciclo circadiano se ha relacionado con un aumento en los niveles de puntos de control inmunitarios y de células efectoras en diferentes tipos de cáncer. Por ejemplo, muchos tipos diferentes de cáncer disminuyen la expresión de PD-L1 al regular a la baja la expresión de los genes del ciclo circadiano, que a su vez tiene un efecto inmunosupresor sobre el fenotipo tumoral [227]. El tipo de cáncer afecta a la naturaleza y dirección de estas conexiones, lo que sugiere que la enfermedad y el microambiente tumoral pueden influir en ellas [227]. El tratamiento con agonistas de ROR, como LYC-53772 y LYC-54143, aumenta la expresión de PD-L1, y la efectividad de células CAR Type 17 [228].

La cronoinmunoterapia es una subcategoría de la cronoterapia lógicamente relacionada con el tratamiento basado en citoquinas en un momento determinado del día con el objetivo de aumentar su efectividad y disminuir su toxicidad asociada. Esto se ha demostrado en el tratamiento de animales con IFN γ [229] o en el tratamiento de cáncer renal metastásico en humanos [230].

1.3 RELOJ CIRCADIANO Y CÉLULAS MADRE

Las células madre embrionarias (ES) son células pluripotentes, derivadas de la masa celular interna del blastocisto y pueden formar todas las células del embrión propiamente dicho. In vitro, estas células proliferan indefinidamente y pueden dar lugar a derivados de las tres capas germinales (ecto, meso y endodermo). A diferencia de las células madre embrionarias, las células madre adultas son células multipotentes que sólo pueden proliferar y diferenciarse en linajes específicos, y están presente en órganos como la médula ósea (células madre hematopoyéticas), el intestino (células madre intestinales), la piel (células madre epidérmicas), el corazón (células madre cardíacas) y entre otros [231]. Estas células constituyen una reserva para la renovación celular, garantizando así la homeostasis de los tejidos, pero también pueden activarse específicamente en caso de daño [232].

Estudios recientes han demostrado que el reloj circadiano se desarrolla gradualmente durante la embriogénesis. Las células madre embrionarias y las células madre pluripotentes inducidas no muestran oscilaciones circadianas de expresión génica, pero desarrollan gradualmente la oscilación del reloj circadiano durante la diferenciación; así, el programa de desarrollo de la aparición del reloj circadiano parece estar estrechamente asociado a la diferenciación celular [233].

Uno de los mecanismos que permite la aparición del reloj es el control post-transcripcional de la proteína CLOCK, que está suprimida en células madre embrionarias indiferenciadas y aumentan gradualmente durante la diferenciación coincidiendo con la aparición de ritmos circadianos en la expresión de otros genes. [233].

Por otro lado, la mayoría de los factores centrales del reloj se expresan a niveles más bajos en las células madre pluripotentes en comparación con las células diferenciadas, **pero Cry1 es una excepción**, ya que los niveles de expresión son más altos en las células madre (**Figura 11**) [232]–[234].

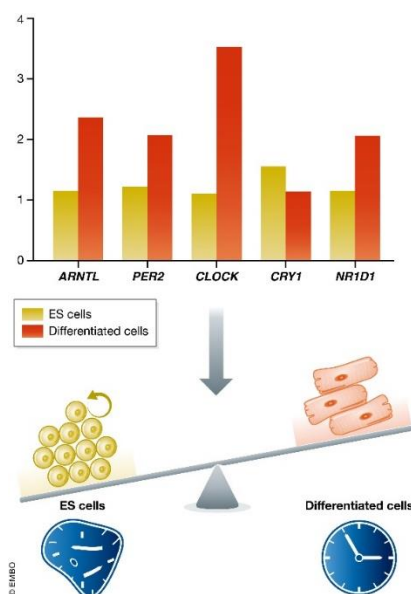


Figura 11: Diferencias de expresión de los genes del reloj circadiano en células madre embrionarias y células diferenciadas.

La alteración de la estequiometría de los factores de reloj podría desplazar la función de los genes centrales del reloj hacia la modulación de la proliferación. Las células madre embrionarias expresan los factores de reloj centrales (ARNTL, PER2, CLOCK, CRY1 y NR1D1) a un nivel diferente del de las células diferenciadas. Estos factores pueden ejercer funciones no circadianas en las células madre embrionarias proliferativas, distintas al papel a su función circadiana y relacionada con el reloj de división celular en las células diferenciadas. Figura de [232]

Por último, la localización aberrante de las proteínas centrales del reloj, como la acumulación de PER1 y PER2 fuera del núcleo, también podría contribuir a un reloj no funcional en las células madre embrionarias [235].

Algunos hallazgos indican que la regulación de los genes del reloj en las células madre es diferente o incluso opuesta a la de las células diferenciadas [232].

Las células madre adultas tienen la capacidad de proliferar y diferenciarse y, a diferencia de las células madre embrionarias, contienen un reloj circadiano funcional [236]. Se ha confirmado que la ritmicidad contribuye a las propiedades de estas células multipotentes que aseguran una renovación constante de las células en (algunos) órganos humanos y pueden activarse en caso de lesión. [232].

En el epitelio intestinal y colónico, encontramos pequeñas células indiferenciadas, células columnares de la base de la cripta (CBC), que se cree que son las verdaderas células madre intestinales que dan lugar a los linajes epiteliales. Estas células madre poseen la capacidad de dividirse asimétricamente, dando lugar a células hijas idénticas y también a células “amplificadoras de tránsito” que proliferan y se diferencian en enterocitos, células caliciformes y células endocrinas durante su movimiento ascendente a través de la cripta. Estos tres tipos de

células epiteliales ocupan la mitad superior de la cripta, así como la superficie epitelial luminal [237]–[239] [240].

En el epitelio intestinal sus células madre renuevan constantemente la capa epitelial que recubre el intestino y facilitan la regeneración mediante la proliferación y la diferenciación en caso de daño [241]. Se ha demostrado que esto último depende de la expresión de genes del reloj como *Bmal*, *Per* y *Cycle* (**Figura 12**), que influyen en la transcripción de más de 100 CCG que participan en la respuesta a la inflamación, estrés y la regeneración [242], [243].

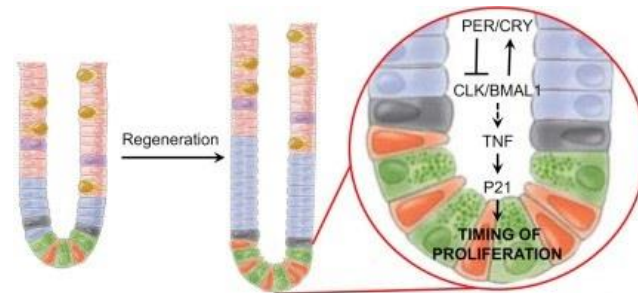


Figura 12: Regulación de la regeneración del epitelio intestinal por genes del reloj circadiano.

Modelo propuesto de la función del reloj circadiano en el intestino delgado en el que las dianas TNF y P21 cooperan para impulsar los ritmos diurnos en la producción celular. El reloj circadiano está activo en el epitelio intestinal durante estados normales y patológicos. Sin embargo, estos estados fisiológicos distintos muestran diferencias en la expresión génica circadiana. La regeneración epitelial durante el síndrome gastrointestinal muestra ritmos circadianos en la proliferación, y las citoquinas y los reguladores del ciclo celular están regulados por el gen del reloj central BMAL1. Estos resultados no están presentes en el estado no dañado, lo que sugiere que este programa se inicia dinámicamente durante la regeneración. Figura de [242].

Como trataremos más adelante, al igual que las células madre embrionarias, algunos tipos de células cancerosas también carecen de reloj circadiano, y comparten características como proliferación ilimitada, requisitos metabólicos, y firmas epigenéticas. Dada esta similitud entre las células madre embrionarias y las células madre cancerígenas, está creciendo el interés por las contribuciones de la disfunción del reloj circadiano a la dediferenciación y al desarrollo del cáncer. Los estudios además sugieren que la pérdida del reloj circadiano está asociada a un estado poco diferenciado, proliferativo y altamente metastásico, aunque no en todos los casos [233].

1.3.1 Células madre cancerígenas

El concepto de células madre cancerígenas (CMCs) plantea la hipótesis de que el crecimiento de los tumores está impulsado por las CMCs, una pequeña subpoblación de células con características de células madre embrionarias (ESC) [237], [244]–[246]. Estas células se dividen asimétricamente para producir células cancerosas diferenciadas, así como células hijas idénticas, una característica compartida con las ESC normales. Sin embargo, las CMCs han perdido el control

de la replicación y la diferenciación, lo que conduce a la tumorigénesis [237], [239]. Las CMCs se definen por su capacidad para autorrenovarse y además producir células cancerosas diferenciadas cuando se dividen de forma asimétrica, iniciar el crecimiento del tumor y proliferar sin regulación, lo que conduce a un crecimiento anormal y a un recambio celular de ciclo lento que las hace resistentes a las terapias dirigidas a las células de replicación rápida [237], [244], [245].

La pérdida del control replicativo da lugar a un mayor número de células tipo ESC, lo que contribuye aún más al crecimiento del tumor. Estas CMCs y sus progenies pueden albergar una sorprendente cantidad de variabilidad, posiblemente debida a mutaciones en los genes de reparación del ADN que pueden haber contribuido inicialmente a la carcinogénesis, lo que a su vez produce tumores heterogéneos. El grueso del tumor, resultado de la actividad no regulada de las CMCs, está formado por células cancerosas diferenciadas que no pueden iniciar la formación de tumores ni autorrenovarse, pero que han heredado la capacidad de proliferar de forma incontrolada [237], [245].

Se han propuesto dos teorías para explicar cómo surgen las CMCS: (1) las mutaciones oncogénicas que se acumulan en las células adultas normales o en las ESC, lo que conduce a su proliferación incontrolada; o (2) la dediferenciación celular hacia un estado similar al de las células madre, que en una célula cancerosa produciría las CMCs [237], [244].

La teoría inicial de las CMCs que establece que se trata de un pequeño número de células que mantiene el crecimiento tumoral, explica determinadas observaciones clínicas como la recurrencia que aparece tras el inicialmente exitoso tratamiento por quimio/radioterapia, la quiescencia tumoral o la metástasis. Sin embargo, este modelo canónico ha evolucionado hacia otro modelo dinámico que establece que las CMCs no tienen por qué ser necesariamente raras y/o quiescentes, sino que, por el contrario, pueden llegar a ser abundantes y altamente proliferativas. Además, las diferentes jerarquías de clones que se establecen en el tumor pueden presentar cierta plasticidad fenotípica determinada por las interacciones con el microentorno, un fenómeno que complica la identificación y erradicación de las CMCs [203].

1.3.2 Marcadores de células madre cancerígenas en CCR

Algunos de los marcadores clave que actualmente se sabe que están asociados a las células madre cancerígenas (CMCS) y, de forma específica a las células madre en el CCR son los factores de transcripción **OCT4**, **SOX2** y **NANOG** que desempeñan un papel dominante en la regulación de la pluripotencia [247]–[249]. Éstos llevan a cabo su propia regulación de la expresión uniéndose a sus propias regiones promotoras. También desempeñan un importante papel en la

pluripotencia los genes **KLF4** (Krüppel-like factor 4) y **SALL4** (Sal-like protein 4). Y se han documentado otros marcadores como **c-Myc**, **STAT3** (signal-transducer and activator of transcription 3), **ALDH** (aldehyde dehydrogenase), **ABCG2** (ATP binding cassette subfamily G member 2) y **CD133**, que aparecen tanto en células madre normales como en células cancerígenas en las que se ha asociado a quimiorresistencia. Algunos marcadores tienen una relevancia específica para el CCR, como el **CD44**, **LGR5** (leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5) y **EpCAM** (epithelial cell adhesion molecule) [240].

CD133 (prominin-1 glycoprotein o AC133) es una glicoproteína transmembrana de 120 kDa, que fue inicialmente identificada en células madre hematopoyéticas [250] y que está implicada en las interacciones intercelulares y la organización de la membrana celular, a través de su unión a fosfolípidos [251].

CD133 está relacionado con las propiedades de las células madre, ya que su inhibición altera la autorrenovación y capacidades tumorigénicas [252]. CD133 también se asocia con la metástasis y la capacidad de invasión a través de la disminución de la expresión de la metaloproteasa 2. Curiosamente, su expresión está positivamente correlacionada con la expresión de los transportadores de unión ATP (ABCG1 y ABCG2), asociando así las propiedades de los CMCS a la quimiorresistencia a través de la presencia de bombas de eflujo de múltiples fármacos [250]. CD133 se correlaciona con un mal pronóstico en numerosos cánceres, incluido el CCR [253].

CD133 es uno de los marcadores de células madre más documentados [252], [254]–[256]. Los estudios iniciales para caracterizar las CMCS del CCR empezaron por aislar las células CD133+. Cuando se aíslan de muestras de cáncer de colon primario, estas células son capaces de formar tumores en ratones, permanecen indiferenciadas cuando se cultivan en medios sin suero y se vuelven más agresivas con el paso de las generaciones [257]. Además, la mayoría de los tumores están compuestos por células CD133- que son incapaces de iniciar un tumor [257]. Un informe de Todaro et al [258] muestra que las células CD133+ producen IL-4 y la utilizan para evadir la apoptosis, lo que se confirma con la observación de que un anticuerpo neutralizador de α -IL-4 o el tratamiento con IL-4R α mejoraría en gran medida la sensibilidad de las células CD133+ a los fármacos quimioterapéuticos y aumentan su eficacia antitumoral.

CD44 es una glicoproteína transmembrana que interactúa con componentes de la matriz extracelular, como el ácido hialurónico, los colágenos, las fibronectinas, las integrinas y la laminina [259]. Estas interacciones inducen modificaciones en el citoesqueleto y la activación de vías de señalización implicadas en la adhesión y la migración celular [260]–[262]. La expresión de CD44 se

ha asociado con la progresión tumoral, la transición epitelio-mesénquima [263] y la supervivencia en los cánceres de colon [264]. Se han descrito mutaciones en tumores sólidos, lo que sugiere su implicación en la carcinogénesis [263]. El CD44 también ha surgido como un marcador importante de las CMCs del CCR [260], [265].

La transcripción de CD44 se activa, al menos en parte, por la señalización de β -catenina Wnt, y su sobreexpresión es un acontecimiento temprano en la transformación del adenoma colorrectal en carcinoma [261], [262], [266]. En la mucosa colónica se utiliza como marcador de diferenciación inmadura. La supresión de CD44 impide la tumorigénesis y la formación de clones. Además, la inyección de sólo 100 células CD44+ es suficiente para iniciar la formación de tumores en ratones inmunosuprimidos, y las células CD44+ individuales forman esferas tumorales con características de células madre que se convierten en tumores cuando se xenografían en ratones inmunosuprimidos [266]. La misma observación se ha hecho para las células CD44+/CD24+, así como su capacidad para diferenciarse en linajes de enterocitos, enteroendocrinos y células caliciformes in vitro [267].

En contraste con estudios anteriores, Shmelkov [268] muestran que las células CD44+/CD24-/CD133- forman los tumores de colon más agresivos, lo que elimina la necesidad de CD133 en la iniciación del tumor. Además, observaron que las poblaciones de células CD133+ son generalmente CD44low/CD24+, y que el CD133 está ocasionalmente presente en el epitelio colónico normal diferenciado. Plantean la hipótesis de que la población CD133+ puede dar lugar a un subconjunto CD133- más agresivo que conserva la capacidad de iniciar tumores. También se ha sugerido que la expresión de CD133 está correlacionada con las condiciones de cultivo celular y la hipoxia [247].

Un estudio clínico en el que se investigan los marcadores de las CMCs en cánceres de recto en estadio II y III muestra que CD44, LGR5 y CD166 están significativamente regulados tras la quimiorradiación, lo que sugiere que son marcadores de poblaciones de CMCs de CCR resistentes a la terapia [269].

Las células que expresan tanto CD44 como el antígeno epitelial específico generan tumores heterogéneos, se enriquecen tras la quimioterapia y tienen una expresión y actividad elevadas de ALDH1, que ha demostrado mediar en la resistencia a la quimioterapia con ciclofosfamida en estas CMCS [269].

La ALDH se ha utilizado para aclarar el papel de CD133 como marcador de células madre. Un estudio muestra que en el carcinoma hepatocelular la mayoría de las células ALDH+ son

también CD133+, pero hay muchas células CD133+/ALDH-. Además, las células CD133+/ALDH+ tienen el mayor potencial de formación de tumores, seguidas de las poblaciones CD133+/ALDH- y luego CD133-/ALDH- [270].

Numerosos estudios han aislado y caracterizado las células EpCAM+/CD44+ de los tumores colorrectales. Se descubrió que tanto el colon normal como los tumores de colon contienen dos poblaciones de células: EpCAMHigh/CD44+ y EpCAMLow/CD44-. Sólo la población EpCAMHigh/CD44+ es capaz de formar tumores cuando se inyecta en ratones inmunodeprimidos. Mantiene su fenotipo diferenciado y la heterogeneidad morfogénica y fenotípica de la lesión madre, y está enriquecida en los tumores en relación con el colon normal. Sin embargo, cada tumor contiene una proporción única y constante de la población celular EpCAMHigh/CD44+ a pesar de la heterogeneidad intratumoral. Además, los distintos tumores de un mismo paciente presentan una morfología tisular, mutaciones somáticas, expresión de proteínas supresoras de tumores e inmunomoduladoras y un perfil de transcripción general similares. Este hallazgo no es inesperado, ya que es probable que las lesiones de un mismo paciente compartan un fondo genético con un conjunto específico de mutaciones somáticas [262].

1.3.3 Células madre cancerígenas y ritmo circadiano

La relevancia clínica de las CMCs está bien establecida gracias a varios estudios que han acumulado pruebas que demuestran el potencial de las CMCs para iniciar tumores recurrentes evadiendo la vigilancia inmunológica y los enfoques terapéuticos y quirúrgicos estándar contra el cáncer. También disponen de mayores propiedades invasivas y migratorias para iniciar metástasis secundarias a través de la autorrenovación y la diferenciación en células progenitoras, y una mayor resistencia a la radiación y la quimioterapia [271]. Las CMCs presentan una mitosis más lenta y a menudo quiescencia, seguida de diferenciación en células de rápida proliferación que se asemejan a las células progenitoras adultas [272].

Los estudios indican una aparente ausencia de funciones de reloj circadiano en las células madre embrionarias (Kowalska et al., 2010), quizás porque la regulación de los eventos del ciclo celular por el reloj circadiano, puede ralentizar la rápida proliferación celular necesaria durante las primeras etapas del desarrollo. La falta de maquinaria de reloj circadiano en las células madre hasta que se diferencian en células progenitoras [274], [275] sugiere que la ritmicidad circadiana de las células cancerígenas podría debilitarse o perderse en aquellas desdiferenciadas que generan CMCs tras la TEM (transición epitelio-mesenquima) [272].

El reloj circadiano podría tener un papel importante durante varios eventos de diferenciación y desdiferenciación y, por tanto, en el desarrollo del cáncer, como ya se ha demostrado. Se desconoce si las células en estado precanceroso expresan ritmos circadianos y si se parecen a los ritmos del tejido circundante. Parece probable que, si carecen de una capacidad de sincronización interna adecuada, seguirán siendo impulsadas por los ritmos endocrinos o neuronales de su entorno [272].

La reprogramación de células diferenciadas en células iPS interrumpe las oscilaciones circadianas en la expresión de los genes del reloj, por lo que es importante saber si el reloj circadiano se ve afectado durante la carcinogénesis mediada por la desdiferenciación (**Figura 13**) [272].

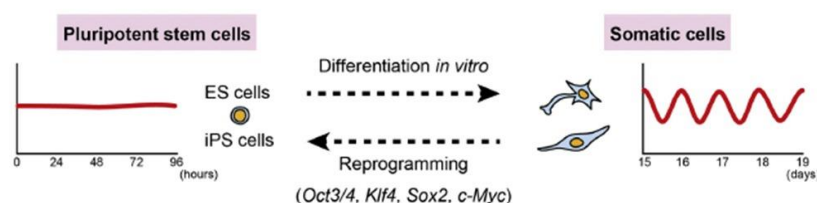


Figura 13: Reprogramación iPS y ritmo circadiano

La transición epitelio-mesénquima (EMT) es un acontecimiento clave que precede a la metástasis de las células tumorales y que aumenta la capacidad de invasión de las células y las poblaciones de CMCs. Los estudios sugieren que los genes utilizados para generar los ritmos circadianos también sirven para regular la TEM. La inducción de la generación de CMCs a través de la TEM en cultivos celulares ha revelado oscilaciones circadianas, confirmando que los ritmos circadianos son procesos adicionales que controlan esta etapa de la progresión del cáncer [276]

Es la agregación de algunas CMCS en esferas tumorales lo que parece permitir sus ritmos circadianos [277]. Del mismo modo, el acoplamiento celular o ritmos circadianos dependientes de la densidad se han observado en cultivos de fibroblastos [278]. Otros factores rítmicos podrían ayudar a las CMCS a seguir siendo rítmicas y a someterse a la tumorigénesis. Por ejemplo, las cascadas de señalización del VEGF y los componentes que regulan la angiogénesis están bajo control del reloj [279].

Por otro lado, algunos estudios parecen mostrar que las CMCs y CTCs tienen un reloj circadiano intrínseco, por lo que las propiedades circadianas de los tejidos donde se localizan podrían influir en su supervivencia, especialmente si el funcionamiento del reloj de las células cancerígenas es débil. La fuerza de los ritmos circadianos en un órgano o tejido concreto puede determinar si es un "terreno fértil" para la formación de tumores secundarios, como se indica para otros factores microambientales. Las vesículas extracelulares liberadas por las CTCs parecen

alterar las células normales circundantes, aumentando las posibilidades de formación de tumores secundarios [280]. Las vesículas extracelulares también podrían transmitir señales de tiempo circadiano entre las células [281]. En resumen, múltiples propiedades pueden determinar si los ritmos circadianos pueden persistir en las células cancerígenas metastatizadas y si sus componentes del reloj molecular y los CCG serán objetivos viables para los tratamientos terapéuticos [272].

Sin embargo, muchas suposiciones sobre las células madre normales o las CMCs que carecen de relojes circadianos robustos se han basado en enfoques experimentales que a menudo estaban limitados a la detección de la ritmicidad circadiana de la expresión de los genes del reloj en poblaciones celulares heterogéneas, como las de los tumores [272].

Algunos estudios han mostrado que tanto las células hematopoyéticas normales como las malignas albergan un reloj intacto con robustas oscilaciones circadianas. Otras pruebas revelan que Clock y Bmal1, son genes necesarios para el crecimiento de las células de la Leucemia Mieloide Aguda en ensayos in vitro e in vivo, y que la interrupción de los componentes canónicos de la vía circadiana produce efectos antileucémicos, incluyendo una proliferación deteriorada, una diferenciación mieloide mejorada y una reducción de las células madre de leucemia (LSC) [282].

También estudios con células de glioblastoma diferenciadas (DGC) y los cultivos cerebrales no malignos han mostrado ritmos circadianos robustos, aunque las células madre de glioblastoma (GSC) por sí solas mostraban una dependencia de los factores de transcripción del reloj central, BMAL1 y CLOCK, para un crecimiento celular óptimo. La regulación a la baja de BMAL1 o CLOCK en las GSC indujo la detención del ciclo celular y la apoptosis. Además de la relevancia clínica, se mostró que la intervención farmacológica en las redes circadianas interrumpió específicamente el crecimiento y la autorrenovación de las células madre cancerígenas [283].

Por último, las células del cáncer de próstata se ha descubierto que PER3, está significativamente regulado a la baja en las células que no expresan marcadores de células madre (CD44-), y la sobreexpresión de PER3 en las células CD44+ suprimió significativamente sus capacidades de formación de esferas y colonias, así como su tumorigenicidad en huéspedes inmunodeficientes. Por el contrario, la supresión de PER3 en las células CD44- fomentó drásticamente su capacidad de formación de colonias y de iniciación de tumores [284].

PER3, un gen del reloj circadiano, desempeña un papel importante en el CCR, pero su acción y el mecanismo subyacente en las células similares a las células madre del cáncer colorrectal (CMCs) siguen sin estar claros. En un estudio, comparando cultivos resistentes a fármacos de HCT-166 normales y enriquecidos con células con baja expresión de los marcadores

de células madre CD133, CD44, LGR5 y SOX2, se demostró que la sobreexpresión de PER3 en las CMCs colorrectales dio lugar a una reducción de la eficiencia de formación de colonias, y redujo la expresión de marcadores Notcht1, β -catenina, c-Myc y LGR5 en las CMCs colorrectales. Por el contrario, el silenciamiento de PER3 mejoró la autorrenovación de las CMCs colorrectales, confirmando que PER3 puede reducir la quimiorresistencia y la capacidad de autorrenovación de las CMCs colorrectales a través de la inhibición de la señalización de Notch y β -catenina. Esto revela que PER3 desempeña un papel crítico en el mantenimiento de la capacidad de crecimiento de las CMCs colorrectales y puede ser un objetivo prometedor para la eliminación de las CMCs [285].

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Las tasas de incidencia y mortalidad por CCR han disminuido en las últimas dos décadas debido a los avances recientes en su prevención y detección. Sin embargo, el pronóstico del CCR actualmente no ha cambiado y, aproximadamente, el 50% de los pacientes desarrollarán metástasis durante el curso de su enfermedad, lo que representa la principal causa de morbimortalidad. La recurrencia local (LR) en el primer sitio de la enfermedad es mucho menos común y constituye del 10% al 20% de todas las recurrencias. Por otro lado, en la mayoría de estudios se ha considerado conjuntamente el cáncer de colon y recto como una única entidad, estos tumores difieren en diversas características clínico-patológicas y moleculares que van cambiando progresivamente a lo largo del epitelio colónico.

Aunque se ha hecho un gran esfuerzo para identificar a los pacientes de CCR con pronóstico desfavorable que puedan beneficiarse de la terapia adyuvante, la mayoría de métodos se han centrado principalmente en enfoques "ómicos" y masivos que enmascaran la heterogeneidad intratumoral e interpaciente e implican altos costos, lo que impide la aplicación clínica a gran escala. Debido a todo esto, en los últimos años, se han desarrollado estrategias prometedoras que se han centrado en el estudio del microambiente del tumor o las características principales del cáncer, que están presentes en casi todos los tumores, independientemente de los cambios moleculares subyacentes.

Gran parte de los procesos biológicos están regulados por ritmos circadianos, y se ha demostrado ampliamente que las alteraciones de dichos ritmos están implicadas en la aparición de numerosas patologías, entre ellas, el desarrollo de algunos tipos de tumores. Además, la eficacia de los tratamientos en varios tipos de cáncer depende del reloj circadiano, lo que ha dado lugar a la cronoterapia. Por lo tanto, la integración de la biología circadiana en la investigación del cáncer ofrece nuevas opciones para la prevención, el diagnóstico y el tratamiento de esta enfermedad. Específicamente, la conexión entre la interrupción circadiana y el desarrollo, la progresión, la incidencia y la resistencia a los tratamientos del CCR se ha estudiado ampliamente. Sin embargo, estos resultados aún no se han trasladado a la clínica, ya que esta relación es, en algunos casos, controvertida.

Algunos estudios sugieren que los cambios en la ritmicidad del sistema circadiano están asociados a un estado poco diferenciado, proliferativo y altamente metastásico, propio de la subpoblación de células madre cancerígenas.

En este contexto, nos hemos planteado los siguientes objetivos para este estudio:

- Estudiar las alteraciones en la expresión de las proteínas del reloj circadiano en cáncer colorrectal.
 - Analizar las diferencias que puedan existir en la expresión de las proteínas del reloj circadiano central en tejidos normales y tumorales de CCR.
 - Dado que el reloj circadiano está regulado por bucles de retroalimentación negativa, estudiar si existen cambios en la relación entre las proteínas del reloj, para ello se analizará la correlación existente entre las proteínas y si existen cambios en dichas correlaciones en los tumores colorrectales.
 - Analizar si existen diferencias entre los tejidos tumorales de colon y recto.
- Determinar si existe relación entre la variación de la expresión de los genes del reloj circadiano y la expresión de marcadores de células madre en las muestras procedentes de pacientes con cáncer colorrectal.
- Estudiar el valor pronóstico que puedan tener la relación entre las proteínas del reloj circadiano, marcadores de células madre y el CCR.
 - Analizar la relación con la progresión de la enfermedad.
 - Analizar la relación con el tiempo libre de enfermedad y tiempo de supervivencia.
 - Analizar si además existen diferencias no solo con la progresión de la enfermedad y tiempo libre de enfermedad sino con el tipo de progresión (metástasis distales o recidivas locales).

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 PACIENTES Y MUESTRAS

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación de Granada (Andalucía, España) (PI-0677-2013) y se ha llevado a cabo de acuerdo con las directrices de la Declaración de Helsinki. Todos los pacientes dieron su consentimiento informado para participar en el estudio. Los tejidos tumorales se obtuvieron en la intervención quirúrgica del tumor primario entre las 9.00 y las 13.00 horas y fueron facilitados por el Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía.

De cada paciente se recogieron los siguientes datos clínico-patológicos edad, sexo, localización general (rectal o colónica), localización específica (colon ascendente, flexura hepática, colon transversal, flexura esplénica, colon descendente, colon sigmoide y recto), número de ganglios extirpados/número de ganglios con metástasis, fecha y tipo de tratamiento (cirugía, quimioterapia y/o radioterapia), evaluación de la respuesta al tratamiento (recaída local o metástasis distal) y, por último, se registraron los datos relativos a la supervivencia global (SG) y a la supervivencia libre de enfermedad (SLE) al final del estudio.

Las muestras de tejido tumoral se clasificaron de acuerdo con el diagnóstico y grado de diferenciación, basándose en los criterios de la World Health Organization (Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System; International Agency for Research on Cancer (IARC), 2000) [286] (ver **Tabla 1**)

El estadio del tumor se determinó de acuerdo con los criterios del American Joint Committee on Cancer Staging System [286] (ver **Tabla 2**).

Tabla 1: Clasificación histológica de los tumores de colon y recto

Carcinoma	
Adenocarcinoma	8140/3
Mucinous Adenocarcinoma	8480/3
Signet-ring cell carcinoma	8490/3
Small cell carcinoma	8041/3
Squamous cell carcinoma	8070/3
Adenosquamous carcinoma	8560/3
Medullary carcinoma	8510/3
Undifferentiated carcinoma	8020/3

Tabla 2: Clasificación TNM de tumores de colon y recto

T- Tumor primario	Estadios
Tx tumor primario que no se puede valorar	Estadio 0
T0 no hay evidencia de tumor primario	Tis N0 M0
Tis carcinoma in situ; intraepitelial o invasión de la lámina propia	Estadio I
T1 tumor que invade submucosa	T1 N0 M0
T2 tumor que invade muscularis propia	T2 N0 M0
T3 tumor que invade serosa, grasa	Estadio II
T4 tumor que perfora el peritoneo visceral y/o invade directamente otros órganos o estructuras	T3 N0 M0
	T4 N0 M0
N- Nódulos linfáticos regionales	Estadio III
Nx no se pueden valorar	Cualquier T (T1-4) N1 M0
N0 sin afección ganglionar	Cualquier T (T1-4) N2 M0
N1 entre 1 y 3 ganglios linfáticos regionales afectados por metástasis	Estadio IV
N2 metástasis en 4 o más ganglios linfáticos regionales	Cualquier T (T1-4) cualquier N (N0-2) M1
M- Metástasis a distancia	
Mx no se pueden estimar	
M0 sin evidencia de metástasis a distancia (no se asigna por el anatomopatólogo)	
M1 metástasis en uno o más órganos a distancia o en el peritoneo.	

Los pacientes se reclutaron entre 2004 y 2014 y seguidos hasta noviembre de 2018 (un mínimo de 5 años y hasta 14,2 años). Se incluyeron todos los pacientes mayores de 18 años operados de carcinoma o adenocarcinoma colorrectal, independientemente del sexo y el estadio de la enfermedad. Todas las intervenciones quirúrgicas para la extirpación del tumor o tejido sano se llevaron a cabo entre las 9.00 a.m. y 1.00 p.m. Se descartaron los pacientes tratados con terapias neoadyuvantes, diagnosticados de cáncer hereditario o de un cáncer previo, tratado o no. Bajo estos criterios de exclusión, se consideraron para el estudio 258 casos de muestras de tejido fijado e incluido en parafina de cáncer colorrectal de origen epitelial (carcinoma y adenocarcinoma) y 66 casos de tejido de colon normal utilizados como muestras de control. Las muestras de tejidos, tanto normales como tumorales, fueron cedidas por el Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía.

Se registró la recaída en la enfermedad por diferentes causas: aparición de metástasis en localizaciones distales, como hígado o pulmón, y las recidivas tumorales en la misma localización del tumor primario e independiente de la presencia de enfermedad metastásica [287]. Para ser considerados recaída en la enfermedad, en ambos casos se registraron cuando aparecieron transcurridos al menos dos meses tras la intervención quirúrgica. Si la metástasis se identificó en el mes posterior a la intervención quirúrgica y ligado a las pruebas complementarias y/o revisiones postoperatorias, se consideró metástasis al diagnóstico.

3.2 ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

Los diferentes casos de carcinoma colorrectal y tejidos normales fijados e incluidos en parafina fueron incluidos en varias matrices de tejidos (TMA, Tissue Micro Array) para facilitar su posterior tinción e interpretación. De cada caso, tanto tumor como normal, se incluyeron en los TMA al menos 3 cilindros (réplicas), y se añadieron tejidos conocidos como controles positivos y negativos para cada uno de los anticuerpos estudiados.

Se realizaron secciones de 3 μm de grosor de los TMA para su estudio inmunohistoquímico. Las secciones se calentaron durante 1 h a 60 °C, desparafinaron con xileno a 37 °C durante 20 minutos y se rehidrataron con una serie de alcohol graduado y agua destilada. A continuación, los portaobjetos se trataron con peróxido de hidrógeno al 3% en metanol durante 20 minutos a 37 °C para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena. Posteriormente, las secciones se sumergieron en tampón citrato 10 mM (pH 6,0), se sometieron a microondas para la recuperación antigénica y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. A este tratamiento le siguió la incubación con el anticuerpo primario correspondiente, **Anti-PER3** (Q-16; dilución 1:50) y **Anti-PER2** (19-J6; dilución 1:50) de Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA), **Anti-PER1** (ab3443; dilución 1:100), **Anti-CRY1** (ab54649; dilución 1:100), **Anti-CRY2** (ab38872; dilución 1:50) y **Anti-NR1D2** (ab41940; dilución 1:25) de Abcam (Cambridge, Reino Unido), y **Anti-BMAL1** (1C11; dilución 1:50) de Novus Biologicals (Centennial, CO, EE.UU.), **Anti-CD133** (AC133, dilución 1:50) de MACS® Antibodies (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA, USA), **Anti-CD 44** (DF1485; dilución 1:50) de DAKO (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) en un recipiente humidificado a 4 °C. Las condiciones específicas para cada anticuerpo se incluyen en la **Tabla 3**. Los portaobjetos de tejido se lavaron tres veces con PBS, se incubaron con los correspondientes anticuerpos secundarios, ya sea un anti-conejo (dilución 1:200) o un anti-ratón (dilución 1:200) de Roche (Basilea, Suiza), a 37 °C durante 30 minutos, y luego se lavaron a fondo tres veces con PBS. Las secciones se revelaron con tetrahidrocloruro de diaminobencidina (DAB), se contratiñeron con hematoxilina y se montaron con medio permanente (DPX). En cada ensayo se incluyeron controles negativos de segunda capa, omitiendo el anticuerpo primario, para descartar falsos positivos debidos a reacciones inespecíficas del anticuerpo secundario con el tejido.

Una vez determinado el protocolo óptimo para cada anticuerpo, la tinción inmunohistoquímica de todos los cortes y casos se llevó a cabo utilizando el inmunoteñidor automático "Discovery Ultra Benchmark" de ROCHE (Basilea, Suiza), a excepción del anticuerpo CD133 que se realizó con los equipos: PTLINK (desenmascaramiento antigénico) y AutostainerLink (tinción inmunohistoquímica) de DAKO.

Tabla 3: Condiciones de la tinción inmunohistoquímica para cada una de las proteínas estudiadas

Proteína	CONDICIONES		
	Desenmascaramiento antigénico	Dilución	Ab primario ^a
CRY-1	CC1 ^b (pH 8.4, 24 min)	1/100	30 min, 37 °C
CRY-2	CC1 ^b (pH 8.4, 1 h)	1/50	32 min, 37 °C
PER-1	CC1 ^b (pH 8.4, 48 min)	1/100	1 h, 37 °C
PER-2	Ribo CC o CC2 ^c (pH 6, 24 min)	1/50	1 h, 37 °C
PER-3	Ribo CC o CC2 ^c (pH 6, 24 min)	1/50	1 h, 37 °C
CD44	Ribo CC o CC2 ^c (pH 6, 16 min)	1/50	36 min, 37 °C
BMAL1	CC1 ^b (pH 8.4, 24 min)	1/50	30 min, 37 °C
NR1D2	CC1 ^b (pH 8.4, 24 min)	1/25	1 h, 37 °C
CD133	High (pH 9, 20 min)	1/50	30 h, 25 °C

^a**Ab primario.** Tiempo y temperatura de incubación del anticuerpo primario. ^b**CC1** Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-gases heat induced antigen retrieval, ^c**Ribo CC o CC2:** citrate-based heat-induced enzyme retrieval;

3.3 EVALUACIÓN DE LA TINCIÓN

Se realizó una evaluación manual mediante microscopio óptico y se determinó para cada marcador el porcentaje de expresión y la intensidad de la tinción. La intensidad de la expresión, así como el porcentaje de expresión de cada marcador, fueron evaluados de forma semicuantitativa e independiente por dos investigadores diferentes sin conocimiento de los parámetros clínicos y patológicos de los pacientes. Los casos en los que se produjeron desacuerdos entre observadores se discutieron con un tercer observador hasta que se llegó a un acuerdo sobre la puntuación final de la expresión.

Los resultados se informaron según el porcentaje de células teñidas como:

0 < 5% (solo algunas células teñidas)

1 = 6-25% de células teñidas

2 = 26-50% de células teñidas

3 = 51-75% de células teñidas

4 > 75% de células teñidas.

Del mismo modo, la intensidad de la tinción se puntuó como:

0 = sin tinción

1 = tinción débil

2 = tinción moderada

3 = fuerte tinción.

Las dos escalas de intensidad y porcentaje de la tinción se multiplicaron para obtener la escala final de puntuación inmunorreactiva (IRS; immunoreactive score o IHC score; immunohistochemistry score) de 0 a 12, como se ha descrito anteriormente [288]–[290] (ver **Tabla 4**). En cada portaobjetos se incluyeron y se evaluaron previamente las puntuaciones de tinción de diferentes tejidos (epitelio normal, amígdala, etc.) como control de calidad.

Tabla 4: Porcentaje, intensidades de la tinción y puntuaciones, para determinar la inmunoreactividad

Intensidad tinción		Porcentaje células teñidas		Combinaciones posibles Intensidad x Porcentaje	IHC score
No tinción	0	0%	0	0x0	0
				1x1	1
Débil	1	10%	1	1x2	2
				1x3	3
Moderado	2	25%	2	1x4 o 2x2	4
				2x3	6
Intenso	3	50%	3	2x4	8
				3x3	9
				3x4	12

3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para establecer la relación entre las proteínas estudiadas y las características clínico-patológicas de los pacientes, codificaron todas las variables y dicotomizaron las siguientes variables cualitativas: Grado de diferenciación bien diferenciado o, moderado y pobremente diferenciado, estadio T precoz (T1 + T2) o tardío (T3 + T4), estadio N (N0=sin afectación de ganglios linfáticos o >N0 =cualquier afectación de ganglios linfáticos)), estadio M (M0=sin presencia de metástasis o M1=cualquier presencia de metástasis), estadio TNM (precoz (I + II) o avanzado (III + IV)) y supervivencia (muerte por CCR o censurada (perdida de seguimiento, vivo o muerte por otras causas)).

Para la estadística descriptiva, las variables continuas se expresaron mediante la mediana y el rango intercuartílico (IQR) y las variables categóricas como números y porcentajes.

Se realizó un análisis bivalente mediante las pruebas de la χ^2 y estadístico exacto de Fisher. Para el análisis de correlación se utilizó la prueba de Pearson. Se utilizó el método de Kaplan-Meier para determinar la probabilidad acumulada de supervivencia específica por cáncer a 3 y 5 años, y supervivencia libre de enfermedad, y las diferencias se evaluaron mediante las pruebas de Log-rank. Los tiempos censurados por la derecha se eliminaron para no subestimar la verdadera curva de supervivencia y/o curva de aparición de metástasis/recidivas de la población del estudio [291], [292].

Los factores pronósticos se evaluaron mediante un análisis multivariante (regresión logística o modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox). Las pruebas se realizaron con un 95% de confianza, considerando significativas aquellas con un p valor inferior a 0,05. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa informático SPSS versión 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.) y según los criterios REMARK [293].

Para establecer los valores altos y bajos (Low/High) para la expresión de cada proteína se analizaron curvas ROC (Receiver Operating Characteristic) con los valores de IHC score (Immunoreactive score) [294]–[297] y las variables clínico-patológicas dicotomizadas, así como la progresión de la enfermedad a 3 y 5 años y la supervivencia específica por cáncer a 3 y 5 años. Se eligió como puntos de corte aquellos con el mayor índice de Youden. En los casos en que había dos o más puntos con mismo índice de Youden, se eligieron aquellos puntos donde se maximizaba la sensibilidad y especificidad. Los puntos de corte óptimos para cada proteína se recogen en la **Tabla 5**. De acuerdo dichos puntos se categorizaron las muestras como expresión baja, aquellas con menor expresión que el punto de corte establecido, y expresión alta, aquellas por encima del

punto de corte. Se incluye además en la **Tabla 5** la equivalencia en porcentaje e intensidad de la tinción de cada uno de los puntos de corte establecidos.

Tabla 5: Puntos de corte óptimos en tejido tumoral para cada una de las proteínas estudiadas.

	OCP ¹	Low ²	High ³	% células teñidas	Intensidad tinción
PER1	3	0-3	4-12	10%- 50%	Débil-Moderado
PER2	5	0-5	6-12	25%-75%	Débil-Moderado
PER3	1	0-1	2-12	0%-10%	Débil
CRY1	3	0-3	4-12	10%- 50%	Débil-Moderado
CRY2	2	0-2	3-12	25%-75%	Débil-Moderado
BMAL1	6	0-6	7-12	25%-50%	Moderado-Intenso
NR1D2	1	0-1	2-12	0%-10%	Débil
CD44	0	0-1	2-12	0%-10%	Débil
CD133	3	0-3	4-12	10%- 50%	Débil-Moderado

1: OCP, Optimal CutOff Point; punto de corte para expresión de la proteína en escala IRS (porcentaje e intensidad); 2: rango de valores considerado expresión baja; 3: rango de valores considerado expresión alta.

4 RESULTADOS

4.1 DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

Las características clínico-patológicas de los pacientes y las muestras tumorales se describen en **Tabla 6**.

Tabla 6. Características de los pacientes incluidos en el estudio

		Frecuencia (N)	Porcentaje (%)
Caso/Control	Tumor	258	79,6 %
	Normal	66	20,4 %
Género	Hombre	154	59,7%
	Mujer	114	40,3%
Edad (media)	< 71	144	55,8%
	> 71	114	44,2%
Órgano	Colon	213	82,6%
	Recto	45	17,4%
Localización	Colon proximal	112	43,4%
	Colon distal	101	39,1%
	Recto	45	17,4%
Clasificación histológica	Adenocarcinoma (M8140/3)	210	81,4%
	Adenocarcinoma mucinoso (M8140/3) & (M8480/3)	44	17,1%
	Otros: (M8260/3), (M8510/3), (M8490/3) & (M8070/3)	4	1,6%
Grado de diferenciación	Bien diferenciado	88	34,2%
	Moderadamente diferenciado	140	54,5%
	Pobremente diferenciado	29	11,3%
T (Clasificación TNM)	T1	4	1,6%
	T2	29	11,2%
	T3	183	70,9%
	T4	42	16,3%
N (Clasificación TNM)	N0	135	52,3%
	N1	79	30,6%
	N2	44	17,1%
M (Clasificación TNM)	M0	209	81,0%
	M1	45	17,4%
Estadio	Estadio I	26	10,2%
	Estadio II (IIA-IIIB)	98	38,3%
	Estadio III (IIIA-IIIB-IIIC)	87	34,0%
	Estadio IV	45	17,6%
Radioterapia	No	221	88,4%
	Si	29	11,6%
Quimioterapia	No	101	41,9%
	Si	140	58,1%
Metástasis a distancia tras el diagnóstico	No	166	74,1%
	Yes	58	25,9%
Recidiva local	No	187	87,0%
	Yes	28	13,0%
Recaída en enfermedad (metástasis distal o recidiva local)	No	161	71,9%
	Yes	63	28,1%

Al final del seguimiento el 54,5% de los pacientes seguía vivo y libre de enfermedad, un 6.3% vivo, aunque con enfermedad (recidivas locales o metástasis) y el 22,4% habían fallecido a consecuencia del cáncer.

El 19,5% de los pacientes desarrollaron metástasis a distancia en los siguientes tres años y el 24,1 % la desarrollaron antes de los cinco años. En cuanto al desarrollo de recidivas locales, el 9,3 % las desarrollaron antes de los 3 años y el 12,9 % a los 5 años. Teniendo en cuenta ambos tipos, bien recidivas locales o metástasis a distancia, el 21,6% de los pacientes sufrieron recaída en la enfermedad antes de los 3 años y el 26,4% antes de los 5 años (detalles en **Tabla 7**).

Tabla 7: Descriptivos progresión de la enfermedad al final del seguimiento

Metástasis 3 años			Recidiva local 3 años		Recaída 3 años (Metástasis o Recidiva)	
	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje
No	177	80,5%	194	90,7%	174	78,4%
Si	43	19,5%	20	9,3%	48	21,6%
Total	220		214		222	

Metástasis 5 años			Recidiva local 5 años		Recaída 5 años (Metástasis o Recidiva)	
	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje
No	161	75,9%	176	87,1%	159	73,6%
Si	51	24,1%	26	12,9%	57	26,4%
Total	212		202		216	

En cuanto a supervivencia específica por enfermedad, el 16,0% de los pacientes había fallecido por cáncer antes de los 3 años y el 21.5 % de los pacientes falleció por cáncer antes de 5 años (**Tabla 8**).

Tabla 8: Descriptivos supervivencia específica por enfermedad al final del seguimiento

Supervivencia específica cáncer 3 años			Supervivencia específica cáncer 5 años	
	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje
Censurados	200	84,0%	183	78,5%
Exitus	38	16,0%	50	21,5%
Total	238		233	

4.2 EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL RELOJ CIRCADIANO CENTRAL EN TEJIDO SANO Y TEJIDO TUMORAL DE CANCER COLORRECTAL

4.2.1 Valoración inmunohistoquímica

Como se ha descrito en metodología, se llevaron a cabo tinciones inmunohistoquímicas para las proteínas objeto de estudio, sobre los cortes de matrices de tejido normal y tejido de tumores colorrectales (**Figura 14**, **Figura 15** y **Figura 16**). Se llevó a cabo una valoración semicuantitativa, en base al porcentaje e intensidad de la tinción y se analizó el patrón de localización de cada una de las proteínas. En cuanto a la localización celular (núcleo, citoplasma y/o membrana) de la expresión de las proteínas estudiadas, no se encontraron diferencias entre tejidos normales y tumorales (**Tabla 9**).

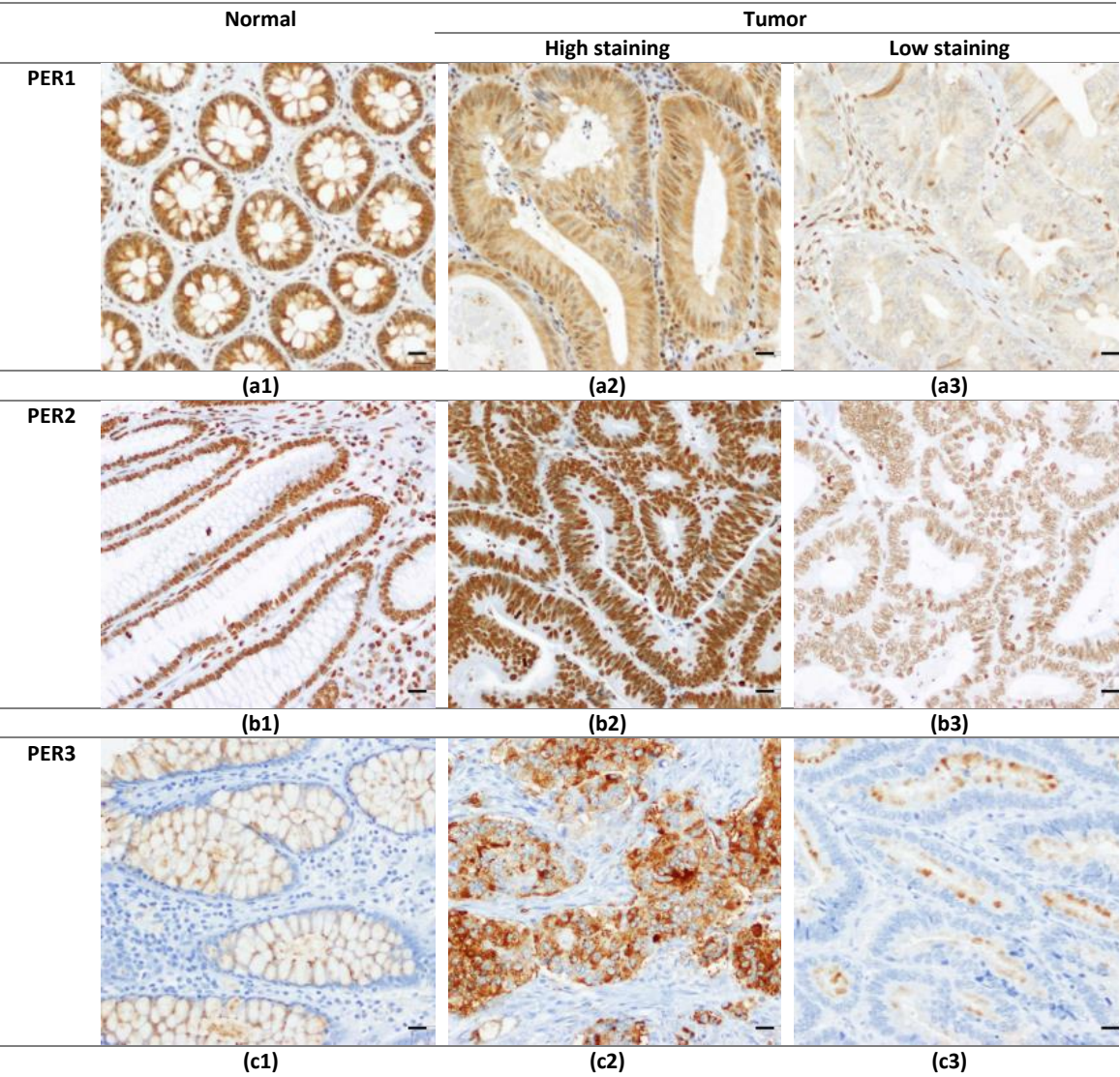


Figura 14: Imágenes de la tinción inmunohistoquímica de las proteínas estudiadas: PER1, PER2 y PER3

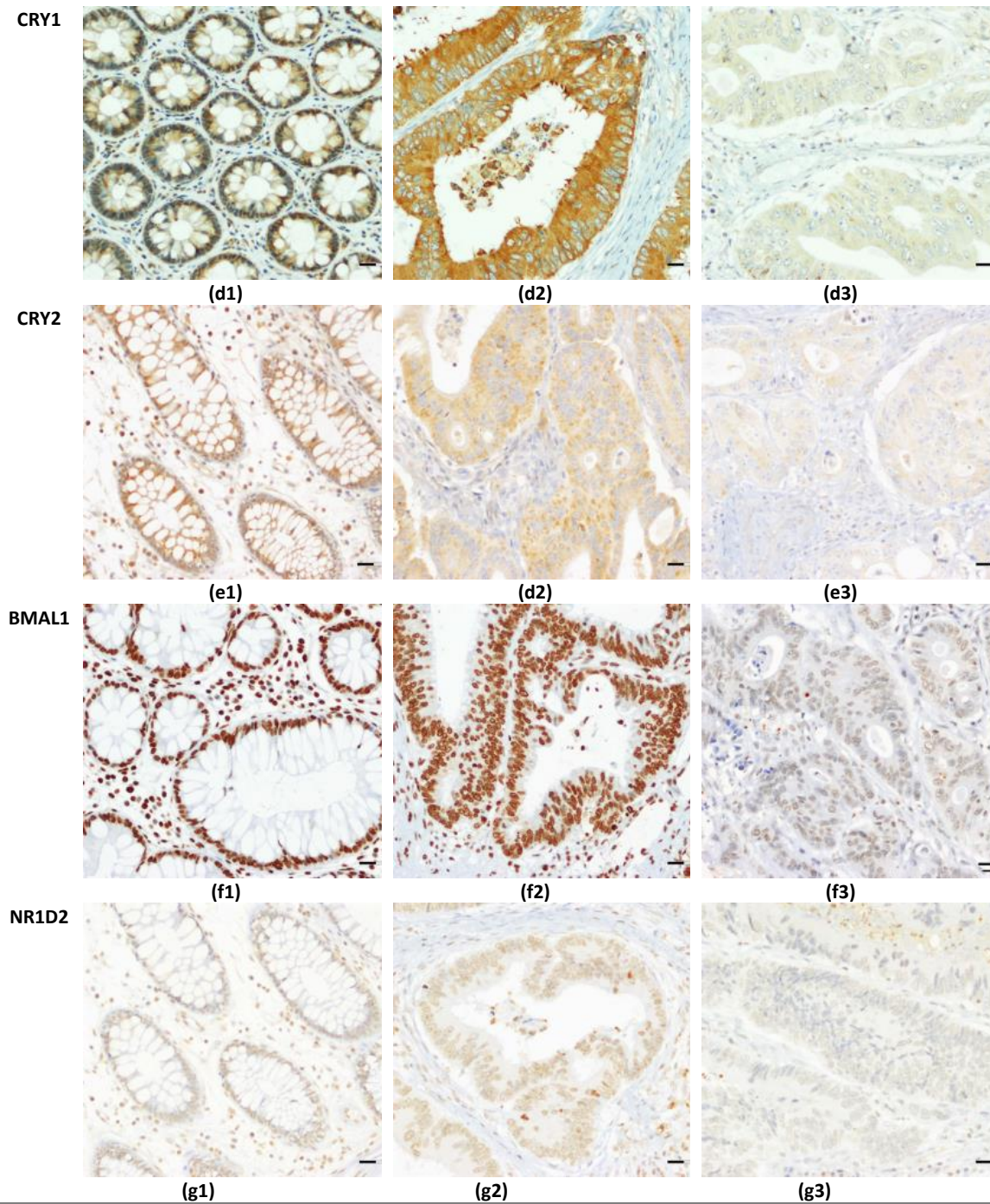


Figura 15: Imágenes de la tinción inmunohistoquímica de las proteínas estudiadas: CRY1, CRY2, BMAL1 y NR1D2

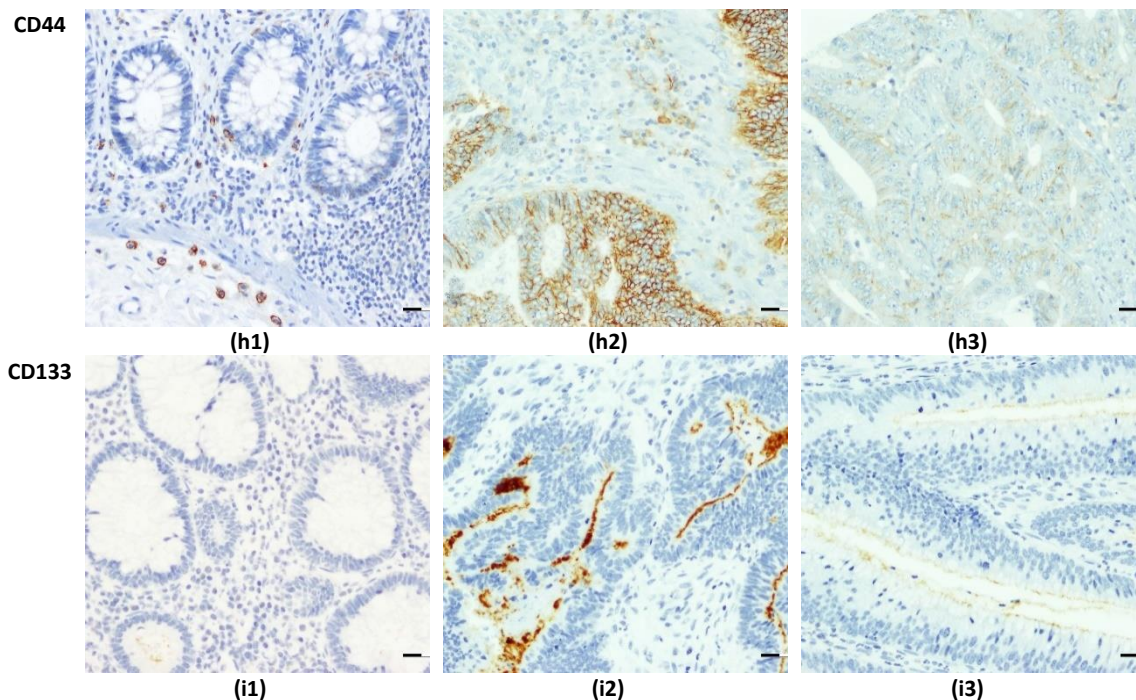


Figura 16: Imágenes de la tinción inmunohistoquímica de las proteínas estudiadas: CD44 y CD133

PER1 (a1, a2, a3), PER2 (b1, b2, b3), PER3 (c1, c2, c3), CRY1 (d1, d2, d3), CRY2 (e1, e2, e3), BMAL1 (f1, f2, f3), NR1D2 (g1, g2, g3), CD44 (h1, h2, h3) y CD133 (i1, i2, i3). En la primera columna se muestra un ejemplo de la expresión en mucosa de colon normal para cada una de las proteínas (a1, b1, c1, d1, e1, f1, g1, h1, i1). En la segunda y tercera columna se muestra ejemplos de la tinción para cada una de las proteínas en tejidos tumorales de cáncer colorrectal, con expresión alta (a2, b2, c2, d2, e2, f2, g2, h2, i2) y baja (a3, b3, c3, d3, e3, f3, g3, h3, i3). Magnificación: 200x.

Tabla 9: Patrón de localización celular de la expresión de las proteínas estudiadas

Proteína	Localización
PER1	Núcleo celular y ocasionalmente el citoplasma celular.
PER2	Núcleo celular.
PER3	Citoplasma celular siguiendo un patrón granular.
CRY1	Citoplasma celular
CRY2	Citoplasma celular y ocasionalmente el núcleo celular
NR1D2	Núcleo celular.
BMAL1	Núcleo celular.
CD44	Membrana celular.
CD133	Membrana celular.

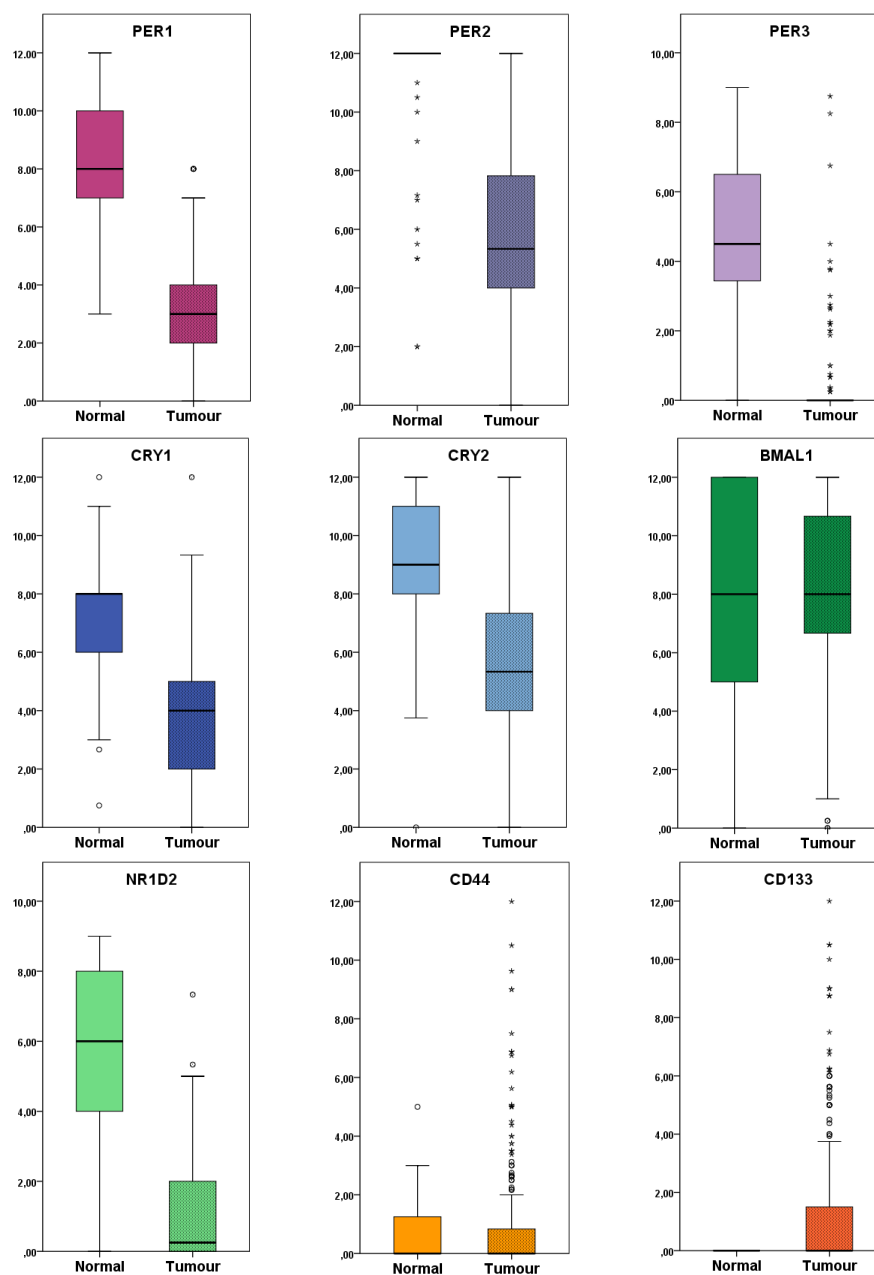
4.2.2 Análisis descriptivo

Como se muestra en la **Tabla 10**, todas las proteínas relacionadas con el reloj se expresaron significativamente más en la mucosa normal que en los tejidos tumorales, excepto BMAL1. En cuanto a los marcadores de CMCs, se encontró un aumento de expresión de CD133 en tumores, y ninguna diferencia en CD44 (**Figura 17**).

Tabla 10: Estadísticos descriptivos de la expresión de las proteínas en tejidos normales y tejidos tumorales

	Normal (N=66)				Tumor (N=258)				U de Mann-Whitney
	Mediana	Q1 ¹	Q3 ²	DQ ³	Mediana	Q1 ¹	Q3 ²	DQ ³	p
PER1	8.00	7.00	10.00	1.50	3.00	2.00	4.00	1.00	< 0.0001
PER2	12.00	12.00	12.00	0.00	5.33	4.00	7.85	1.95	< 0.0001
PER3	4.50	3.38	7.00	1.81	0.00	0.00	0.00	0.00	< 0.0001
CRY1	8.00	6.00	8.00	1.00	4.00	2.00	5.00	1.50	< 0.0001
CRY2	9.00	8.00	11.00	1.50	5.33	4.00	7.50	1.75	< 0.0001
BMAL1	8.00	5.00	12.00	3.50	8.00	6.67	10.67	2.00	0.663
NR1D2	6.00	4.00	8.00	2.00	0.25	0.00	2.00	1.00	< 0.0001
CD44	0.00	0.00	1.31	0.65	0.00	0.00	0.83	0.41	0.777
CD133	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.52	0.76	< 0.0001

1: Q1, cuartil 1, 2: Q3, cuartil 3; 3: DQ: Desviación cuartil

**Figura 17:** Diferencias de expresión de las proteínas entre tejido normal y tejido tumoral

En la **Tabla 11** se detalla la interpretación, en términos de porcentaje e intensidad de la tinción, de las diferencias de expresión encontradas entre tejidos normales y tumorales de las proteínas del reloj central y los marcadores de CMCs en CCR, al menos, en nuestra cohorte de estudio.

Tabla 11: Diferencias de expresión (porcentaje e intensidad) entre tejidos normales y tumorales

	Normal (N=66)			Tumor (N=258)		
	Mediana	% células teñidas	intensidad	Mediana	% células teñidas	intensidad
PER1	8.00	75%	Moderado	3.00	10%-25%	Débil-Moderado
PER2	12.00	75%-100%	Intenso	5.33	25%-50%	Débil-Moderado
PER3	4.50	25%-50%	Débil-Moderado	0.00	10%	Débil
CRY1	8.00	75%	Moderado	4.00	25%-50%	Débil-Moderado
CRY2	9.00	75%	Moderado	5.33	25%-50%	Débil-Moderado
BMAL1	8.00	75%-100%	Intenso	8.00	75%-100%	Intenso
NR1D2	6.00	75%	Moderado	0.25	10%	Débil
CD44	0.00	10%	Débil	0.00	10%	Débil
CD133	0.00	0%	No expresión	0.00	10%-25%	Débil

4.2.3 Curvas ROC

Los resultado de expresión para cada proteína, se analizaron mediante curvas ROC para establecer un punto de corte que permitiese diferenciar los tejidos normales y tumorales mediante inmunohistoquímica. Como se observa en la **Figura 18**, todas las curvas fueron significativas y se encontraron diferencias para todas las proteínas, excepto para BMAL1 y CD44. La curva especialmente acentuada de CD133 se debe a que en tejidos normales la proteína prácticamente no se expresa (IHC score = 0) mientras que en tumores sí (IHC score >0).

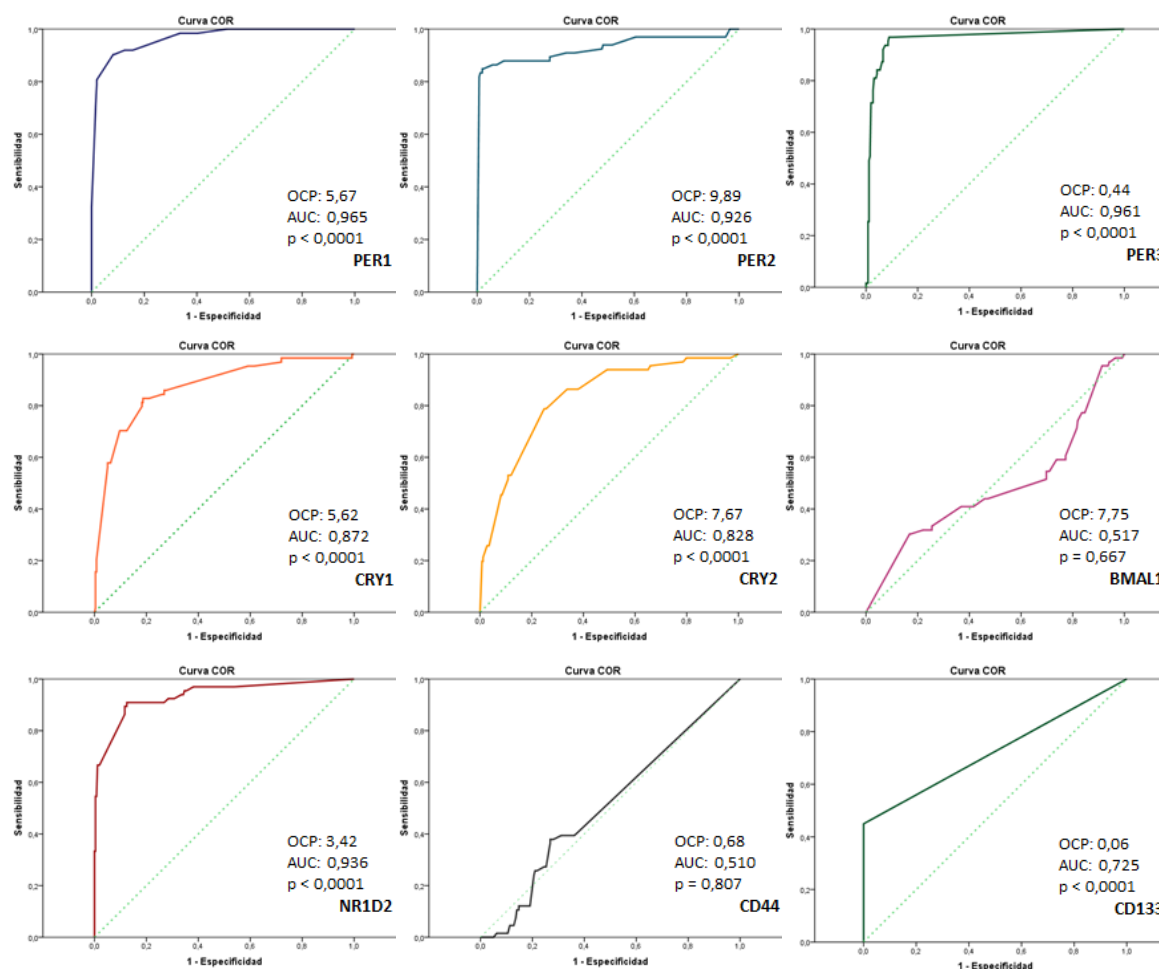


Figura 18: Curvas ROC de cada una de las proteínas estudiadas para discriminar entre tejido normal y tejido tumoral

OCP: Punto de corte óptimo (Optimal cutoff point); **AUC:** Área bajo la curva (Area under de curve); **p:** nivel de significación del estadístico de contraste.

Los puntos de corte óptimos encontrados se representan en la **Tabla 12**.

Tabla 12: Puntos de corte determinados por curva ROC para diferenciar tejido normal de tejido tumoral.

Puntos de corte curva ROC entre tejido Normal / Tumor					
	OCP ^a	Sensibilidad	Especificidad	AUC ^b	<i>p</i>
PER1	6	93.0%	92.0%	0.965	<0.0001
PER2	10	89.5%	94.0%	0.926	<0.0001
PER3	1	96.5%	91.2%	0.961	<0.0001
CRY1	6	84.2%	82.1%	0.872	<0.0001
CRY2	8	77.2%	76.1%	0.828	<0.0001
BMAL1	8	70.0%	50.9%	0.517	0.667
NR1D2	4	91.2%	88.8%	0.936	<0.0001
CD44	1	38.6%	73.3%	0.510	0.807
CD133	0	46.0%	100%	0.725	<0.0001

a: OCP: Punto de corte óptimo (Optimal cutoff point); b: AUC: Área bajo la curva (Area under the curve); *p* nivel de significación de la prueba.

4.2.4 Correlaciones entre las proteínas estudiadas. Diferencia entre tejido normal y tumoral.

Para determinar si hay alteraciones en la relación que establecen las proteínas del reloj circadiano y los ciclos retroalimentados de transcripción-traslación que las regulan, se analizó la correlación (prueba Pearson) de la expresión de las proteínas entre, tanto en tejidos normales como tejidos tumorales. Los resultados de dichos análisis se muestran en las **Tabla 13** y **Tabla 14**.

Tabla 13: Correlación de la expresión de proteínas en tejido normal

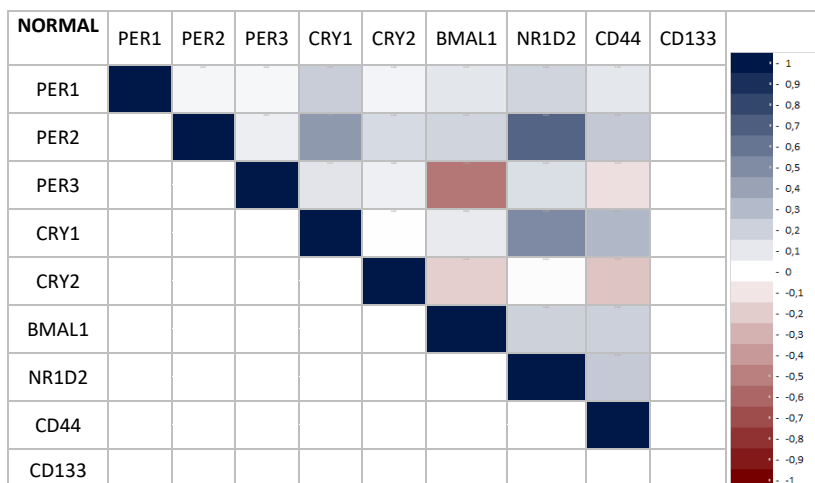
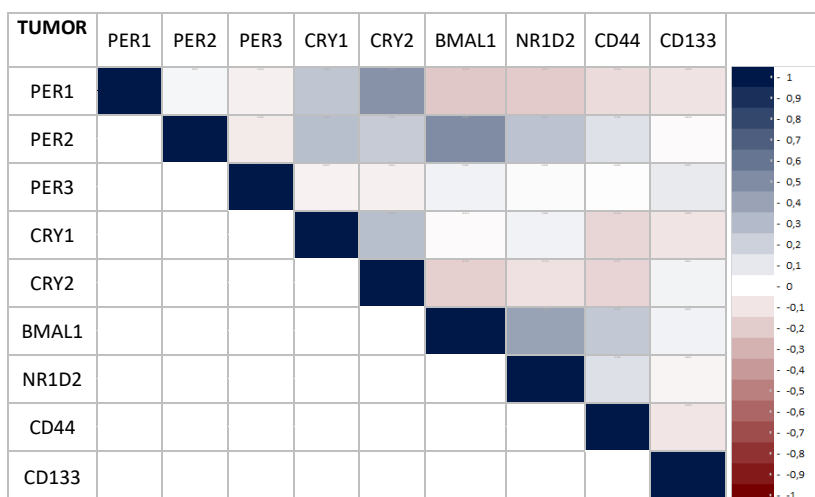


Tabla 14: Correlación de la expresión de proteínas en tejido tumoral



Se observan numerosas diferencias en cuanto a cómo se correlacionan las proteínas del reloj circadiano y los marcadores de CMCs en tejidos normales y tejidos tumorales.

En tejidos normales **PER1** no se correlaciona con ninguna de las otras proteínas analizadas. Sin embargo, en tumores esta relación es positiva con **CRY1** ($R=0.254$, $P<0.0001$) y **CRY2** ($R=0.474$, $P<0.0001$), es decir, cuando aumenta PER1 aumentan ambas. En cambio, la relación se invierte significativamente con **BMAL1** ($R= -0.214$, $P=0.001$), **NR1D2** ($R= -0.201$, $P<0.001$) y **CD44** ($R= -$

0.139, $P=0.026$), indicando que cuando PER1 aumenta BMAL1, NR1D2 y CD44 disminuyen, y viceversa.

En el caso de **PER2** en tejidos normales su relación es positiva con **CRY1** ($R=0.443$, $P<0.0001$), **NR1D2** ($R=0.674$, $P<0.0001$) y **CD44** ($R=0.239$, aunque con un $P=0.054$), y en tejidos tumorales, se mantiene la relación positiva y además aparece correlación con **CRY2** ($R=0.226$, $P<0.0001$) y **BMAL1** ($R=0.499$, $P<0.0001$). En todos los casos cuando aumenta PER2 aumentan las demás, encontrando además un coeficiente de correlación elevado entre PER2 y BMAL1.

PER3 tiene una **correlación negativa** elevada con **BMAL1** ($R= - 0.535$, $P<0.0001$) en tejidos normales, mientras que en tejidos tumorales dicha correlación se pierde.

CRY1 en tejidos normales presenta una correlación positiva con todas las proteínas, siendo esta correlación significativa y con un coeficiente que indica relación de moderada a fuerte para **PER2** (ya descrito), **NR1D2** ($R=0.508$, $P<0.0001$) y **CD44** ($R=0.312$, $P=0.012$). Sin embargo, en tejidos tumorales, aparece correlación positiva con **PER1** (ya descrito) y **CRY2** ($R=0.279$, $P<0.0001$), disminuye el efecto de la correlación con PER2, y cambia el sentido de la correlación con CD44 ($R= - 0.162$, $P=0.007$), es decir, en tejidos normales cuando **aumenta CRY1** lo hace también **CD44** ($R=0.312$), y en tejidos tumorales cuando **aumenta CRY1 disminuye CD44** ($R= - 0.162$).

CRY2 en tejidos normales no se correlaciona significativamente con ninguna de las proteínas analizadas. Sin embargo, en tejidos tumorales, se correlaciona con **PER1** ($R=0.474$, $P<0.000$), **PER2** ($R=0.226$, $P<0.000$) y **CRY1** ($R=0.279$, $P<0.000$), así como con **BMAL1** ($R= - 0.187$, $P=0.003$) y **CD44** ($R= - 0.167$, $P=0.007$).

En tejidos normales encontramos que **BMAL1** presenta correlación negativa con **PER3** ($R= - 0.535$ y $P<0.0001$). En cambio, al analizar tejidos tumorales encontramos bastantes diferencias, entre ellas destaca que aparece correlación positiva con **PER2** ($R=0.499$, $P<0.000$), **NR1D2** ($R=0.402$, $P<0.000$) y **CD44** ($R=0.236$, $P<0.000$). Por otro lado, aparece correlación negativa con **PER1** ($R= - 0.214$, $P=0.001$) y **CRY2** ($R= - 0.187$, $P=0.003$). Y, por último, desaparece su relación con **PER3** ($R=0.058$, $P>0.05$).

En el caso de **NR1D2** existe una fuerte correlación positiva con **PER2** ($R=0.674$, $P<0.0001$) y **CRY1** ($R=0.508$, $P<0.0001$) en tejidos normales. Sin embargo, en tejidos tumorales aparece asociación con **BMAL1** ($R=0.402$, $P<0.000$), y además cambia el sentido de la correlación con **PER1** ($R= - 0.201$, $P<0.001$) y con **CRY2** ($R= - 0.402$, $P<0.000$, de modo que cuando NR1D2 sube en tumores, BMAL1 aumenta, y PER1 y CRY2 bajan su expresión.

Con **CD44** también encontramos diferencias entre tejidos normales y tumorales. En tejidos normales CD44 guarda relación positiva con **CRY1** ($R=0.312$, $P=0.012$). En tejidos tumorales, aparece correlación negativa con **CRY2** ($R= - 0.167$, $P<0.007$) y se invierte la correlación con **PER1** ($R= - 0.139$, $P<0.023$). Se mantiene su asociación positiva con PER2 (ya descrito) y NR1D2 (ya descrito), y es significativa su asociación con BMAL1 (ya descrito). De entre todas las diferencias encontradas destaca el cambio en la relación que se produce entre **CD44 y CRY1** en tejidos normales y tumorales; en tejidos normales existe correlación positiva significativa ($R=0.312$; $P=0.012$) y en tejidos tumorales se invierte la relación y aparece una correlación negativa significativa ($R= - 0.162$; $P=0.009$).

4.2.5 Correlaciones entre las proteínas estudiadas. Diferencia entre tejido tumoral de colon y recto.

Por otro lado, se comparó también si existían diferencias en las **correlaciones entre las proteínas** estudiadas en los **tejidos tumorales de colon y tejidos tumorales de recto** (Tabla 15 y Tabla 16).

La mayoría de las correlaciones encontradas cuando analizamos ambos tipos de tumores juntos, se mantienen cuando analizamos el tejido tumoral de colon y tejido tumoral de recto por separado. Esto puede deberse al número de casos de cada tipo de tejido, 213 casos de colon frente a 45 casos de recto, por lo que los datos estarán muy condicionados por la expresión de las proteínas en colon. Aun así, encontramos ciertas diferencias entre las que destacaría la expresión de CD44.

En tejido tumoral de recto, CD44 deja de ser significativa su correlación con PER1, CRY1, CRY2, BMAL1 y NR1D2, y, sin embargo, la correlación que encontramos en el análisis de ambos tejidos entre **CD44 y PER2** ($R=0.133$, $P=0.033$) parece deberse solo a los casos de recto ($R=0.363$, $P=0.015$), ya que en los casos de tumores de colon deja de ser significativa.

Cuando analizamos PER1 solo tejido de colon, encontramos resultados similares al análisis de ambos tejidos juntos; la diferencia en tejido de recto es que deja de ser significativo la relación con BMAL1, NR1D2 y CD44, y, por el contrario, aparece como significativa la correlación negativa entre **PER1 y CD133** ($R= - 0.302$, $P=0.049$); es decir, cuando aumenta la expresión CD133 en tumores de recto, disminuye la expresión de PER1.

En el caso de PER3, no guardaba ninguna correlación significativa al analizar ambos tejidos, y tampoco lo hace al analizar solo colon, pero sí encontramos correlación negativa elevada entre **PER3 y CRY2** ($R= - 0.499$, $P=0.002$) en tumores de recto.

Con la expresión de CRY1 encontramos resultados similares en el análisis de tejido tumoral de colon y el análisis conjunto, pero desaparece la correlación negativa significativa con **CD44-CRY1** en tumores de recto.

Tabla 15: Correlación de la expresión de proteínas en tejido tumoral de colon

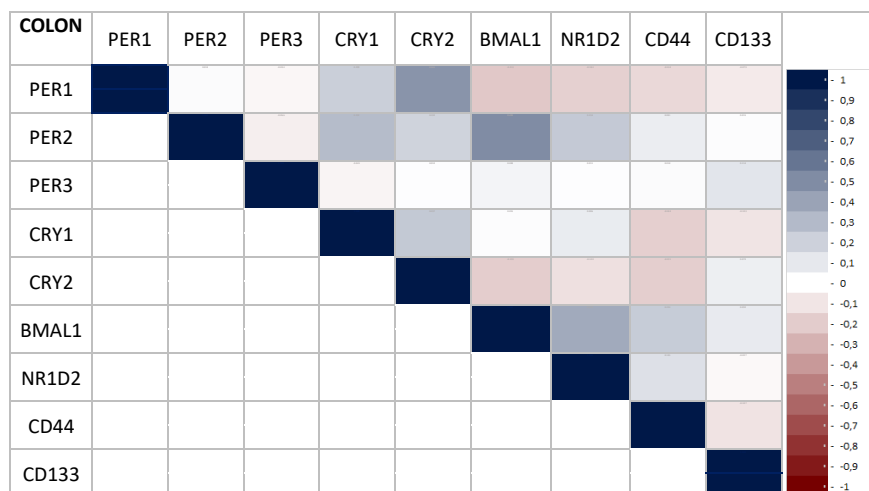
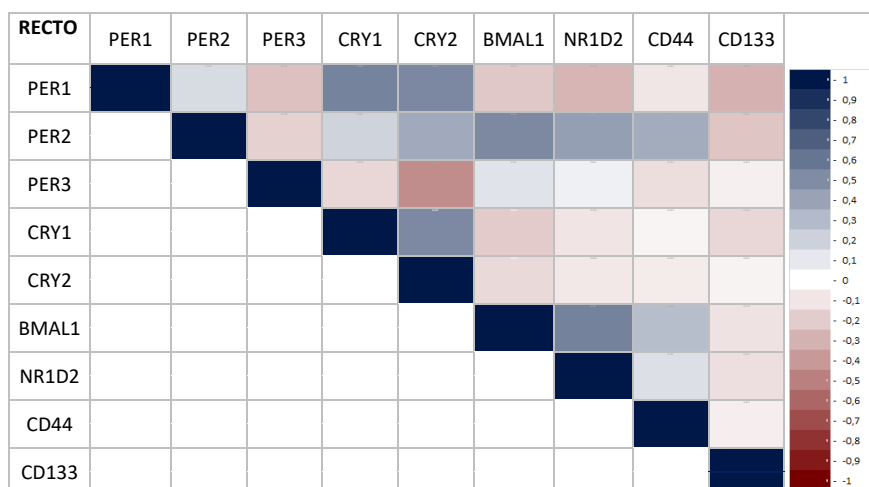


Tabla 16: Correlación de la expresión de proteínas en tejido tumoral de recto



4.2.6 Relación entre las proteínas centrales del reloj y los marcadores de células madre en CCR.

Para determinar si existe además relación entre las proteínas centrales del reloj y los marcadores de células madre en CCR, se analizaron mediante la χ^2 , la expresión alta o baja de cada proteína teniendo en cuenta los puntos de corte óptimos en tumores, teniendo en cuenta un nivel de significación del 95% para el ensayo (Chi-cuadrado de Pearson/ Estadístico exacto de Fisher). Los resultados detallados se muestran en **Tabla 17**.

Al analizar la relación entre las proteínas del reloj y los marcadores de CMCs encontramos relación entre PER3, BMAL1 y NR1D2 con CD44, y en todos los casos, cuando disminuyen las proteínas del reloj lo hace también CD44. Encontramos, sin embargo, que cuando hay un aumento de CD133 disminuye la expresión de CD44 ($P=0.009$). Ninguna de las proteínas del reloj está asociada a CD133, aunque parece observarse una relación entre CRY1 y CD133, sin llegar a ser significativa ($P=0.083$).

Al realizar el mismo análisis solo en tumores de colon encontramos la misma asociación y además aparece relacionado PER3 con CD44 ($P=0.026$), cuando aumenta PER3 aumenta CD44.

En el tejido de recto, no obtenemos resultados significativos, ya que hay muy pocos casos de tanto de CD133High y como CD44High los tumores de recto de nuestra cohorte.

Tabla 17: Relación entre las proteínas centrales del reloj circadiano y los marcadores y CD44 y CD133

	CD133			P^a	CD44			P^a
	Low / N (%)	High / N (%)			Low / N (%)	High / N (%)		
	218 (88.4)	39 (15.2)			164 (64.1)	92 (35.5)		
PER1								
Low	88 (83.0)	18 (17.0)	ns		67 (62.6)	40 (37.4)	ns	
High	127 (85.8)	21 (14.2)			95 (64.6)	52 (35.4)		
PER2								
Low	78 (81.3)	18 (18.8)	ns		73 (75.3)	24 (24.7)	0.003	
High	138 (86.8)	21 (13.2)			90 (56.6)	69 (43.4)		
PER3								
Low	197 (86.0)	32 (14.0)	ns		150 (65.5)	79 (34.5)	ns	
High	20 (74.1)	7 (25.9)			14 (51.9)	13 (48.1)		
CRY1								
Low	79 (79.8)	20 (20.2)	ns		60 (60.6)	39 (39.4)	ns	
High	137 (87.8)	19 (12.2)			104 (65.8)	54 (34.2)		
CRY2								
Low	78 (88.6))	10 (11.4)	ns		53 (60.2)	35 (39.8)	ns	
High	139 (82.7)	29 (17.3)			111 (65.7)	58 (34.3)		
BMAL1								
Low	50 (87.7)	7 (12.3)	ns		47 (82.4)	10 (17.5)	0.001	
High	165 (83.8)	32 (16.2)			113 (57.7)	83 (42.3)		
NR1D2								
Low	120 (82.2)	26 (17.8)	ns		100 (68.5)	46 (31.5)	0.049	
High	97 (88.2)	13 (11.8)			61 (56.5)	47 (43.5)		
CD44								
Low	130 (80.2)	32 (19.8)	0.009					
High	8 (95.2)	7 (7.5)						

4.3 RELACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL RELOJ CIRCADIANO CENTRAL Y LOS MARCADORES DE CMCs CON LAS VARIABLES CLINICOPATOLÓGICAS EN PACIENTES CON CCR.

Se estudió la relación de las proteínas del reloj y los marcadores de células madre con las variables clínico-patológicas conocidas de los pacientes. Se dicotomizaron las variables como expresión alta o baja de las proteínas, de acuerdo a los puntos de corte determinados por la curva

ROC, como se ha descrito en metodología. También de categorizaron y dicotomizaron las variables clínico-patológicas: grado de diferenciación, estadio del tumor T, N, M y estadio de la enfermedad (TNM), como se detalla en la metodología.

Se analizó la χ^2 para cada proteína del reloj con las variables clínico-patológicas, teniendo en cuenta un nivel de significación del 95% para el ensayo (Chi-cuadrado de Pearson/ Estadístico exacto de Fisher). Los resultados detallados se muestran en **Tabla 18**, **Tabla 19** y **Tabla 20**.

4.3.1 Relación de la expresión de las proteínas con las variables clinicopatológicas en los tumores colorrectales

Al analizar la expresión de las proteínas en los tejidos de tumores colorrectales, se encontró que la expresión de **PER1** disminuye significativamente ($P=0.020$) en **estadios** avanzados de la enfermedad (estadio III y IV) frente a estadios tempranos de la misma (estadios I y II).

La expresión baja de **PER2** parece estar ligeramente asociado a la localización del tumor, expresándose menos en colon proximal que en colon distal y recto, aunque las diferencias no llegan a ser significativas ($P=0.062$); su expresión es también menor en adenocarcinomas tipo mucinoso, papilares y anillo de sello ($P=0.001$) y en tumores moderada y pobremente diferenciados ($P=0.008$). Esta proteína se expresa con presencia de metástasis al diagnóstico ($P=0.047$). También disminuye la expresión de PER2 en mujeres ($P=0.004$).

La proteína **PER3** solo aparece asociada al diagnóstico ($P=0.009$), aumentando su expresión en adenocarcinomas tipo mucinoso, papilares y anillo de sello.

Tabla 18: Relación entre la expresión de las proteínas PER1, PER2 y PER3, y las características clínico-patológicas en tumores colorrectales

	PER 1			PER2			PER3		
	Low / N (%)	High / N (%)	P^a	Low / N (%)	High / N (%)	P^a	Low / N (%)	High / N (%)	P^a
	108(42.2)	148 (57.8)		97 (37.9)	159 (62.1)		231 (89.5)	27 (10.5)	
Edad									
< 71 años	63 (44.1)	80 (55.9)	ns	57 (39.9)	86 (60.1)	ns	127 (88.2)	17 (11.8)	ns
> 71 años	45 (39.8)	68 (60.2)		40 (35.4)	73 (64.6)		104 (91.2)	10 (8.8)	
Sexo									
Hombre	60 (39.0)	94 (61.0)	ns	47 (30.7)	106 (69.3)	0.004	136 (88.3)	18 (11.7)	ns
Mujer	48 (47.1)	54 (52.9)		50 (48.5)	53 (51.5)		95 (91.3)	9 (8.7)	
Órgano									
Colon	84 (39.8)	127 (60.2)	ns	82 (38.7)	130 (61.3)	ns	189 (89.2)	23 (10.8)	ns
Recto	24 (53.3)	21 (46.7)		15 (34.1)	29 (65.9)		42 (91.3)	4 (8.7)	
Localización									
C. Proximal	39 (35.1)	72 (64.9)	ns	51 (45.9)	60 (54.1)	0.062	99 (89.2)	12 (10.8)	ns
C. Distal	45 (45.0)	55 (55.0)		31 (30.7)	70 (69.3)		90 (89.1)	11 (10.9)	
Recto	24 (53.3)	51 (46.7)		15 (34.1)	29 (65.9)		42 (91.3)	4 (8.7)	
Diagnóstico									
Adenoc. ^c	91 (43.8)	117 (56.3)	ns	69 (33.0)	140 (67.0)	0.001	193 (91.9)	17 (8.1)	0.009
Otros ^d	17 (35.4)	31 (64.6)		28 (59.6)	19 (40.4)		38 (79.2)	10 (20.8)	
G.D. ^b									

	Bien	41 (46.6)	47 (53.4)	ns	23 (26.4)	64 (73.6)	0.008	79 (89.8)	9 (10.2)	ns
	Mod-Pobre	67 (40.1)	100 (59.9)		73 (43.5)	95 (56.5)		151 (89.3)	18 (10.7)	
T										
	T1-T2	11 (33.3)	22 (66.7)	ns	10 (30.3)	23 (69.7)	ns	32 (97.0)	1 (3.0)	ns
	T3-T4	97 (43.5)	126 (56.5)		87 (39.0)	136 (61.0)		199 (88.4)	26 (11.6)	
N										
	N0	50 (37.0)	85 (63.0)	ns	46 (34.1)	89 (65.9)	ns	123 (90.4)	13 (9.6)	ns
	N1-N2	58 (47.9)	63 (52.1)		51 (42.1)	70 (57.9)		108 (88.5)	14 (11.5)	
M										
	M0	81 (39.3)	125 (60.7)	ns	73 (35.3)	134 (64.7)	0.047	185 (88.5)	24 (11.5)	ns
	M1	24 (52.2)	22 (47.8)		23 (51.1)	22 (48.9)		42 (93.3)	3 (6.7)	
Estadio										
	Estadio I - II	42 (34.4)	80 (65.6)	0.020	41 (33.3)	82 (66.7)	ns	111 (89.5)	13 (10.5)	ns
	Estadio III - IV	64 (48.9)	67 (51.1)		55 (42.3)	75 (57.7)		117 (89.3)	14 (10.7)	

α : χ^2 Pearson o estadístico exacto de Fisher; **b**: Grado de diferenciación. **c**: Adenocarcinoma (M8140/3); **d**: Adenocarcinoma con componente mucinoso. papilar. medular (M8140/3; M8480/3; M8260/3; M8510/3); ns: no significativo

No se ha encontrado asociación de **CRY1** con ninguna variable clínico-patológica. Y en el caso de **CRY2** solo guarda relación con el sexo, con menor expresión en mujeres ($P=0.044$) que en hombres.

BMAL1 guarda relación con el sexo, se expresa menos en mujeres ($P=0.045$), así como con el diagnóstico, donde su expresión también disminuye en adenocarcinomas tipo mucinoso, papilares y anillo de sello ($P=0.001$). Esta proteína también se relaciona con el estadio tumoral, así como con el TNM, reduciéndose su expresión conforme aumenta la invasividad del tumor (T4) ($P<0.0001$), discriminando la presencia de metástasis al diagnóstico ($P=0.010$). Está por tanto asociado, al estadio de la enfermedad ($P=0.034$).

Tabla 19: Relación entre la expresión de las proteínas CRY1, CRY2 y BMAL1, y las características clínico-patológicas en tumores colorrectales

	CRY1			CRY2			BMAL 1		
	Low / N (%)	High / N (%)	P^a	Low / N (%)	High / N (%)	P^a	Low / N (%)	High / N (%)	P^a
	99 (38.5)	158 (61.5)		88 (34.1)	170 (65.9)		58 (22.7)	197 (77.3)	
Edad									
< 71 años	61 (42.4)	83 (57.6)	ns	53 (36.8)	91 (63.2)	ns	38 (26.6)	105 (73.5)	ns
> 71 años	38 (33.6)	75 (66.4)		35 (30.7)	79 (69.3)		20 (17.9)	92 (82.1)	
Sexo									
Hombre	57 (30.0)	97 (63.0)	ns	45 (29.2)	109 (70.8)	0.004	28 (18.4)	124 (81.6)	0.045
Mujer	42 (40.8)	61 (59.2)		43 (41.3)	61 (58.7)		30 (29.1)	73 (70.9)	
Órgano									
Colon	82 (38.7)	130 (61.3)	ns	71 (33.3)	142 (66.7)	ns	48 (22.9)	162 (77.1)	ns
Recto	17 (37.8)	28 (62.2)		17 (37.8)	28 (62.2)		10 (22.2)	35 (77.8)	
Localización									
C. Proximal	41 (36.9)	70 (63.1)	ns	40 (35.7)	72 (64.3)	ns	30 (27.0)	81 (73.0)	ns
C. Distal	41 (40.6)	60 (59.4)		31 (30.7)	70 (69.3)		18 (18.2)	81 (81.8)	
Recto	17 (37.8)	28 (62.2)		17 (37.8)	28 (62.2)		10 (22.2)	35 (77.8)	
Diagnóstico									
Adenoc. ^c	77 (36.7)	133 (63.3)	ns	74 (35.2)	136 (64.8)	ns	38 (18.4)	169 (81.6)	0.001
Otros ^d	22 (46.8)	25 (53.2)		14 (29.2)	34 (70.8)		20 (41.7)	28 (58.3)	
G.D. ^b									
Bien	32 (36.4)	56 (63.6)	ns	28 (31.8)	60 (68.2)	ns	18 (20.9)	68 (79.1)	ns
Mod-Pobre	67 (36.9)	101 (60.1)		60 (35.5)	109 (64.5)		39 (23.2)	129 (76.8)	
T									
T1-T2	11 (33.3)	22 (66.7)	ns	13 (39.4)	20 (60.6)	ns	4 (12.1)	29 (87.9)	ns
T3-T4	88 (39.3)	136 (60.7)		75 (33.3)	150 (66.7)		54 (24.3)	168 (75.7)	
N									
N0	47 (34.8)	88 (65.2)	ns	41 (30.4)	94 (69.6)	ns	25 (18.7)	109 (81.3)	ns
N1-N2	52 (42.6)	70 (57.4)		47 (38.2)	76 (61.8)		33 (27.3)	88 (72.7)	

M										
	M0	75 (36.1)	133 (63.9)	ns	69 (33.0)	140 (67.0)	ns	41 (19.9)	165 (80.1)	0.010
	M1	21 (46.7)	24 (53.3)		17 (37.8)	28 (62.2)		17 (37.8)	28 (62.2)	
Estadio										
	Estadio I - II	41 (33.3)	82 (66.7)	ns	36 (29.3)	87 (70.7)	ns	21 (17.2)	101 (82.8)	0.034
	Estadio III - IV	55 (40.2)	76 (58.0)		51 (38.6)	81 (61.4)		37 (28.5)	93 (71.5)	

α : χ^2 Pearson o estadístico exacto de Fisher; **b**: Grado de diferenciación. **c**: Adenocarcinoma (M8140/3); **d**: Adenocarcinoma con componente mucinoso. papilar. medular (M8140/3; M8480/3; M8260/3; M8510/3); **ns**: no significativo

También encontramos que, **NR1D2** parece estar ligeramente asociado al diagnóstico del tumor, expresándose menos en adenocarcinomas tipo mucinoso, papilares y anillo de sello, aunque sin llegar a ser significativo ($P=0.073$).

Finalmente, la expresión de **CD44** no se encuentra asociado a ninguna variable clínico-patológica, y **CD133** se encuentra relacionado con el sexo, disminuyendo su expresión en mujeres ($P=0.017$) y con el grado de diferenciación del tumor, expresándose menos en tumores moderada y pobremente diferenciados ($P=0.013$).

Tabla 20: Relación entre la expresión de las proteínas NR1D2, CD44 y CD133, y las características clínico-patológicas en tumores colorrectales

	NR1D2			p^a	CD44			p^a	CD133			p^a
	Low / N (%)	High / N (%)			Low / N (%)	High / N (%)			Low / N (%)	High / N (%)		
	157 (52.7)	110 (42.8)			164 (63.8)	93 (36.2)			219 (84.9)	39 (15.1)		
Edad												
< 71 años	85 (59.4)	58 (40.6)	ns		91 (63.2)	53 (36.8)	ns		124 (86.7)	19 (13.3)	ns	
> 71 años	62 (54.4)	52 (45.6)			73 (64.6)	40 (35.4)			95 (82.6)	20 (17.4)		
Sexo												
Hombre	88 (57.1)	66 (42.9)	ns		101 (65.6)	53 (34.4)	ns		124 (80.5)	30 (19.5)	0.017	
Mujer	59 (57.3)	44 (42.7)			63 (61.2)	40 (38.8)			95 (91.3)	9 (8.7)		
Órgano												
Colon	122 (57.5)	90 (42.5)	ns		136 (64.2)	76 (35.8)	ns		179 (83.6)	35 (16.4)	ns	
Recto	25 (55.6)	20 (44.4)			28 (62.2)	17 (37.8)			40 (90.9)	4 (9.1)		
Localización												
C. Proximal	69 (61.6)	43 (34.8)	ns		73 (65.8)	38 (34.2)	ns		90 (79.6)	23 (20.4)	ns	
C. Distal	53 (53.0)	47 (47.0)			63 (62.4)	38 (37.6)			89 (88.1)	12 (11.9)		
Recto	25 (55.6)	20 (44.4)			28 (62.2)	17 (37.8)			40 (90.9)	4 (9.1)		
Diagnóstico												
Adenoc. ^c	114 (54.5)	95 (45.5)	ns		130 (61.9)	80 (38.1)	ns		177 (84.3)	33 (15.7)	ns	
Otros ^d	33 (68.8)	15 (31.3)			34 (72.3)	13 (27.7)			42 (87.5)	6 (12.5)		
G.D. ^b												
Bien	44 (50.0)	44 (50.0)	ns		54 (61.4)	34 (38.6)	ns		67 (77.0)	20 (23.0)	0.013	
Mod-Pobre	102 (60.7)	66 (39.3)			109 (64.9)	59 (35.1)			151 (88.8)	19 (11.2)		
T												
T1-T2	17 (51.5)	16 (48.5)	ns		19 (57.6)	14 (42.4)	ns		30 (90.9)	3 (9.1)	ns	
T3-T4	130 (58.0)	94 (42.0)			145 (64.7)	79 (35.3)			189 (84.0)	36 (16.0)		
N												
N0	79 (58.1)	57 (41.9)	ns		81 (60.0)	54 (40.0)	ns		112 (81.8)	25 (18.2)	ns	
N1-N2	68 (56.2)	53 (43.8)			83 (68.0)	39 (32.0)			107 (88.4)	14 (11.6)		
M												
M0	120 (58.0)	87 (42.0)	ns		128 (61.5)	80 (38.5)	ns		177 (85.1)	31 (14.9)	ns	
M1	26 (56.5)	20 (43.5)			34 (75.6)	11 (24.4)			40 (87.0)	6 (13.0)		
Estadio												
Estadio I - II	73 (59.3)	50 (40.7)	ns		73 (59.3)	50 (40.7)	ns		102 (82.3)	22 (17.7)	ns	
Estadio III - IV	73 (55.7)	58 (44.3)			89 (67.9)	42 (32.1)			116 (88.5)	15 (11.5)		

α : χ^2 Pearson o estadístico exacto de Fisher; **b**: Grado de diferenciación. **c**: Adenocarcinoma (M8140/3); **d**: Adenocarcinoma con componente mucinoso. papilar. medular (M8140/3; M8480/3; M8260/3; M8510/3); **ns**: no significativo

4.3.2 Relación de la expresión de las proteínas con las variables clinicopatológicas. Diferencias entre tumores de colon y recto.

Se ha estudiado también la expresión de las proteínas y su relación con las variables clínico-patológicas cuando se analizan por separado tumores de colon y tumores de recto, encontrando diferencias para la expresión de algunas proteínas entre ambos tejidos (**Tabla 21, Tabla 22, Tabla 23 y Tabla 24**).

Aunque algunos resultados podrían ser explicados por el menor número de casos de tumores de recto en la cohorte de estudio, para algunas proteínas se encuentran diferencias que hacen pensar que si se hiciese el análisis con una N similar se obtendrían resultados más significativos.

Destaca la diferencia que encontramos en cuanto a la expresión de PER1 en este análisis, ya que, cuando se analizaron ambos tipos de tumores juntos, no se encontró relación de PER1 con las variables clínico-patológicas, y, sin embargo, al analizar por separado los tumores de colon y recto, se observan diferencias significativas en cuanto la presencia de **metástasis al diagnóstico**. Además, encontramos que, en los tumores de colon la expresión de PER1 disminuye en presencia de metástasis ($P=0.003$) mientras que en los tumores de recto la expresión de PER1 aumenta ($P=0.022$). Observamos lo mismo cuando analizamos el estadio de la enfermedad: la expresión de PER1 disminuye a medida que avanza el estadio del tumor en colon cuando analizamos T1+2 frente a T3+4 ($P=0.027$), y, por el contrario, su expresión aumenta en estadios avanzados de recto ($P=0.055$), así como cuando estudiamos la invasión del tumor, T1+2+3 frente a T4 ($P=0.022$).

En el caso de **PER2** encontramos diferencias en su relación con el sexo, disminuye la expresión en mujeres con tumores de colon ($P=0.002$), mientras que no lo hace cuando presentan tumores de recto ($P=0.908$); analizados ambos tejidos la significación era similar ($P=0.004$). También existen diferencias en la localización del tumor, siendo mayor la expresión en tumores de colon distal, frente a tumores en colon proximal ($P=0.023$), con unos porcentajes de expresión en colon distal similares al recto, lo que indica que PER2 discrimina entre colon proximal frente a colon distal y recto. Se observan también diferencias en cuanto a diagnóstico; su expresión disminuye en carcinomas mucinosos ($P=0.006$) en colon y en recto ($P=0.039$). La expresión de PER2 disminuye con el grado de diferenciación en colon, expresándose menos tumores moderados y pobremente diferenciados ($P=0.020$), mientras que en tumores de recto no hay diferencias en este sentido. Y en cuanto a su relación con las metástasis es más significativo analizando solo colon ($P=0.017$) que ambos tipos de tumores ($P=0.047$) puesto que en recto no

guarda ningún tipo de relación ($P=1.000$). Es decir, la relación que se observa con **baja expresión de PER2 con sexo, grado de diferenciación y presencia de metástasis al diagnóstico**, solo aparece o se debe a **los tumores de colon** incluidos en el análisis.

Tabla 21: Relación entre la expresión de las proteínas PER1 y PER2 con las características clínico-patológicas. Diferencia entre tumores de colon y recto.

	PER 1 Colon			PER 1 Recto			PER 2 Colon			PER 2 Recto		
	Low / N (%)	High / N (%)	P^a	Low / N (%)	High / N (%)	P^a	Low / N (%)	High / N (%)	P^a	Low / N (%)	High / N (%)	P^a
	84 (39.8)	127 (60.2)		24 (53.3)	21 (46.7)		82 (38.7)	130 (61.3)		15 (34.1)	29 (65.9)	
Edad												
< 71 años	47 (40.5)	69 (59.5)	ns	16 (59.3)	11 (40.7)	ns	49 (41.9)	68 (58.1)	ns	8 (30.8)	18 (69.2)	ns
> 71 años	37 (38.9)	58 (61.1)		8 (44.4)	10 (55.6)		33 (34.7)	62 (65.3)		7 (38.9)	11 (61.1)	
Sexo												
Hombre	46 (35.7)	83 (64.3)	ns	14 (56.0)	11 (44.0)	ns	39 (30.2)	90 (69.8)	0.002	8 (33.3)	16 (66.7)	ns
Mujer	38 (46.3)	44 (53.7)		10 (50)	10 (50)		43 (51.8)	40 (48.2)		7 (35.0)	13 (65.0)	
Diagnóstico												
Adenoc. ^c	69 (41.1)	99 (58.9)	ns	22 (55.0)	18 (45.0)	ns	58 (34.1)	112 (65.9)	0.006	11 (28.2)	28 (71.8)	0.039
Otros ^d	15 (34.9)	28 (65.1)		2 (40.0)	3 (60.0)		24 (57.1)	18 (42.9)		4 (80.0)	1 (20.0)	
G.D. ^b												
Bien	32 (45.1)	39 (54.9)	ns	9 (52.9)	8 (47.1)	ns	18 (25.4)	53 (74.6)	0.006	5 (31.3)	11 (68.8)	ns
Mod-Pobre	52 (37.4)	87 (62.6)		15 (53.6)	13 (46.4)		63 (45.0)	77 (55.0)		10 (35.7)	18 (64.3)	
T												
T1-T2	7 (26.9)	19 (73.1)	ns	4 (57.1)	3 (42.9)	ns	8 (30.8)	18 (69.2)	ns	2 (28.6)	5 (71.4)	ns
T3-T4	77 (41.6)	108 (58.4)		20 (52.6)	18 (47.4)		74 (39.8)	112 (60.2)		13 (35.1)	24 (64.9)	
N												
N0	42 (36.5)	73 (63.5)	ns	8 (40.0)	16 (60.0)	ns	43 (37.4)	72 (62.6)	ns	3 (15.0)	17 (85.0)	0.015
N1-N2	42 (43.8)	54 (56.3)		16 (64.0)	9 (36.0)		39 (40.2)	58 (59.8)		12 (50.0)	12 (50.0)	
M												
M0	60 (34.7)	113 (65.3)	0.003	21 (63.6)	12 (36.4)	0.022	62 (35.4)	113 (64.6)	0.017	11 (34.4)	21 (65.6)	ns
M1	21 (61.8)	13 (38.2)		3 (25.0)	9 (75.0)		19 (57.6)	14 (42.4)		4 (33.3)	8 (66.7)	
T												
Estadio I - II	34 (32.1)	72 (67.9)	0.027	8 (50)	8 (50)	ns	28 (35.5)	69 (64.5)	ns	3 (18.8)	13 (81.3)	ns
Estadio III - IV	48 (47.1)	54 (52.9)		16 (55.2)	13 (44.8)		43 (42.2)	59 (57.8)		12 (42.9)	16 (57.1)	

α : χ^2 Pearson o estadístico exacto de Fisher; **b**: Grado de diferenciación. **c**: Adenocarcinoma (M8140/3); **d**: Adenocarcinoma con componente mucinoso. papilar. medular (M8140/3; M8480/3; M8260/3; M8510/3); **ns**: no significativo

Para la proteína **PER3** encontramos pocas diferencias entre tumores de colon y tumores de recto; en colon aumenta la expresión con el diagnóstico adenocarcinoma mucinoso, papilar, medular y anillo de sello ($P=0.026$), mientras que, en recto, aunque la expresión aumenta ligeramente no es significativo. Se encuentran más expresión de esta proteína en relación al diagnóstico cuando se analizan los dos tejidos (colon y recto) juntos ($P=0.009$), pero no cuando se hace el análisis por separado.

En el caso de **CRY1** tampoco se encuentran diferencias significativas, y **CRY2** no se relaciona con las variables clínico-patológicas estudiadas, al analizar por separado tumores de colon y tumores de recto, al igual que en el estudio de ambos tumores juntos.

Tabla 22: Relación entre la expresión de las proteínas PER3 y CRY1 con las características clínico-patológicas. Diferencia entre tumores de colon y recto.

	PER3			PER3			CRY1			CRY1		
	Colon			Recto			Colon			Recto		
	Low / N (%)	High / N (%)	P ^a	Low / N (%)	High / N (%)	P ^a	Low / N (%)	High / N (%)	P ^a	Low / N (%)	High / N (%)	P ^a
Edad	189 (89.2)	23 (10.8)		42 (91.3)	4 (8.7)		82 (38.7)	130 (61.3)		17 (37.8)	28 (62.2)	
< 71 años	101 (87.1)	15 (12.9)	ns	26 (92.9)	2 (7.1)	ns	49 (41.9)	68 (51.8)	ns	12 (44.4)	15 (56.6)	ns
> 71 años	88 (91.7)	8 (8.3)		16 (88.9)	2 (11.1)		33 (34.7)	63 (65.3)		5 (27.8)	13 (72.2)	
Sexo												
Hombre	112 (87.5)	16 (12.5)	ns	24 (92.3)	2 (7.7)	ns	46 (35.7)	83 (64.3)	ns	11 (40.0)	14 (56.0)	ns
Mujer	77 (91.7)	7 (8.3)		18 (90.0)	2 (10.0)		36 (43.4)	47 (56.6)		6 (30.0)	14 (70.0)	
Diagnóstico												
Adenoc. ^c	155 (91.7)	14 (8.3)	0.026	38 (92.7)	3 (7.3)	ns	62 (36.5)	108 (63.5)	ns	15 (37.5)	25 (62.5)	ns
Otros ^d	34 (79.1)	9 (20.9)		4 (80.0)	1 (20.0)		20 (47.6)	22 (52.4)		2 (40.0)	6 (60.0)	
G.D. ^b												
Bien	62 (87.3)	9 (12.7)	ns	17 (100.0)	0 (0.0)	ns	25 (35.2)	46 (64.8)	ns	7 (41.2)	10 (58.8)	ns
Mod-Pobre	126 (90.0)	14 (10.0)		25 (86.2)	4 (13.8)		57 (40.7)	83 (59.3)		10 (35.7)	18 (64.3)	
T												
T1-T2	26 (100.0)	0 (0.0)	ns	6 (85.7)	1 (14.3)	ns	7 (26.9)	19 (73.1)	ns	4 (57.1)	3 (42.9)	ns
T3-T4	163 (87.6)	23 (12.4)		36 (92.3)	3 (7.7)		75 (40.3)	111 (59.7)		13 (34.2)	25 (65.8)	
N												
N0	104 (90.4)	11 (9.6)	ns	19 (90.5)	2 (9.5)	ns	39 (33.9)	76 (66.1)	ns	8 (40.0)	12 (60.0)	ns
N1-N2	85 (87.6)	12 (12.4)		23 (92.0)	2 (8.0)		43 (44.3)	54 (55.7)		9 (36.0)	16 (64.0)	
M												
M0	155 (88.6)	20 (11.4)	ns	30 (88.2)	4 (11.8)	ns	62 (35.4)	113 (64.6)	ns	13 (39.4)	20 (60.6)	ns
M1	30 (90.9)	3 (9.1)		12 (100.0)	0 (0.0)		17 (51.5)	16 (48.5)		4 (33.3)	8 (66.7)	
T												
Estadio I - II	96 (89.7)	11 (10.3)	ns	15 (88.2)	2 (11.8)	ns	35 (32.7)	77 (67.3)	ns	6 (37.5)	10 (62.5)	ns
Estadio III - IV	90 (88.2)	12 (11.8)		27 (93.1)	2 (6.9)		44 (43.1)	58 (56.9)		11 (37.9)	18 (62.1)	

a: χ^2 Pearson o estadístico exacto de Fisher; **b:** Grado de diferenciación. **c:** Adenocarcinoma (M8140/3); **d:** Adenocarcinoma con componente mucinoso. papilar. medular (M8140/3; M8480/3; M8260/3; M8510/3); **ns:** no significativo

BMAL1 se relaciona con el sexo cuando analizamos ambos tipos de tumores ($P=0.045$) pero esta relación es mayor cuando analizamos **solo tumores de colon ($P=0.002$)**, y, además, en tumores de recto parece que la relación se invierte, es decir, se expresa más en mujeres, aunque sin llegar a ser significativo ($P=0.147$). De igual forma, la relación que se observa con el **diagnóstico se debe a los casos con tumores de colon**, y, la expresión disminuye en adenocarcinomas mucinosos, papilares, medulares y anillo de sello ($P<0.0001$), **mientras que** no se observa relación en tumores de recto e incluso parece que la tendencia también se invierte, aumentando la expresión de BMAL1 tumores con peor pronóstico. Igualmente, la relación con el TNM, especialmente grado de invasión **T, desde T1 a T4 ($P<0.0001$)** (no mostrado en la tabla), **metástasis al diagnóstico M ($P=0.005$)** y **estadio de la enfermedad ($P=0.018$)** se observa **solo en colon**, desapareciendo en tumores de recto.

En **NR1D2** la asociación que encontramos entre una disminución de la expresión de la proteína y el grado de diferenciación, disminuyendo en los tumores menos diferenciados ($P=0.032$) y se pierde en tumores de recto. Otra diferencia es que, parece observarse, aunque sin llegar a ser significativo, que en colon la expresión de NR1D2 disminuye cuando hay metástasis y en recto aumenta.

Tabla 23: Relación entre la expresión de las proteínas BMAL1 y NR1D2 con las características clínico-patológicas. Diferencia entre tumores de colon y recto.

	BMAL1			BMAL1			NR1D2			NR1D2		
	Colon		<i>P</i> ^a	Recto		<i>P</i> ^a	Colon		<i>P</i> ^a	Recto		<i>P</i> ^a
	Low / N (%)	High / N (%)		Low / N (%)	High / N (%)		Low / N (%)	High / N (%)		Low / N (%)	High / N (%)	
	48 (22.9)	162 (77.1)		10 (22.2)	35 (77.5)		122 (57.5)	90 (42.5)		25 (55.6)	20 (44.4)	
Edad												
< 71 años	30 (25.9)	86 (74.1)	ns	8 (29.6)	19 (70.4)	ns	69 (59.5)	47 (40.5)	ns	16 (59.3)	11 (40.7)	ns
> 71 años	18 (19.1)	76 (80.9)		2 (11.1)	16 (88.9)		53 (55.2)	43 (44.8)		9 (50.0)	9 (50.0)	
Sexo												
Hombre	20 (15.7)	107 (84.3)	0.002	8 (32.0)	17 (68.0)	ns	74 (57.4)	55 (42.6)	ns	14 (56.0)	11 (44.0)	ns
Mujer	28 (33.7)	55 (66.3)		2 (10.0)	18 (90.0)		48 (57.8)	35 (42.2)		11 (55.0)	9 (54.0)	
Diagnóstico												
Adenoc. ^c	29 (17.4)	138 (82.6)	0.000	9 (22.5)	31 (77.5)	ns	92 (54.4)	77 (45.6)	ns	22 (55.0)	18 (45.0)	ns
Otros ^d	19 (44.2)	24 (55.8)		1 (20.0)	4 (80.0)		30 (69.8)	13 (30.2)		3 (60.0)	2 (40.0)	
G.D. ^b												
Bien	13 (18.6)	57 (81.4)	ns	5 (31.3)	11 (68.8)	ns	34 (47.2)	38 (52.8)	0.032	24 (56.0)	19 (44.0)	ns
Mod-Pobre	34 (24.5)	105 (75.5)		5 (17.2)	24 (82.8)		87 (62.6)	52 (37.4)		1 (50.0)	1 (50.0)	
T												
T1-T2	3 (11.5)	23 (88.5)	ns	1 (14.3)	6 (85.7)	ns	14 (53.8)	12 (46.2)	ns	3 (42.9)	4 (57.1)	ns
T3-T4	45 (24.5)	139 (75.5)		9 (23.7)	29 (76.3)		108 (58.1)	78 (41.9)		22 (57.9)	16 (42.1)	
N												
N0	21 (18.6)	92 (81.4)	ns	4 (19.0)	17 (81.0)	ns	67 (58.3)	48 (41.7)	ns	12 (57.1)	9 (42.9)	ns
N1-N2	27 (27.8)	70 (72.2)		6 (25.0)	18 (75.0)		55 (56.7)	42 (43.3)		13 (54.2)	11 (45.8)	
M												
M0	34 (19.7)	139 (80.3)	0.005	7 (21.2)	26 (78.8)	ns	100 (57.5)	74 (42.5)	ns	20 (60.6)	13 (39.4)	ns
M1	14 (42.4)	19 (57.6)		3 (25.0)	9 (75.0)		21 (61.8)	13 (38.2)		5 (41.7)	7 (58.3)	
T												
Estadio I - II	18 (17.1)	87 (82.9)	0.037	3 (17.6)	14 (82.4)	ns	62 (58.5)	44 (41.5)	ns	11 (64.7)	6 (35.5)	ns
Estadio III - IV	30 (29.4)	72 (70.6)		7 (25.0)	21 (75.0)		59 (57.3)	44 (42.7)		14 (50.0)	14 (50.0)	

a: χ^2 Pearson o estadístico exacto de Fisher; **b:** Grado de diferenciación. **c:** Adenocarcinoma (M8140/3); **d:** Adenocarcinoma con componente mucinoso. papilar. medular (M8140/3; M8480/3; M8260/3; M8510/3); **ns:** no significativo

En cuanto a **CD44** no encontramos muchas diferencias significativas cuando analizamos ambos tipos de tumores o cuando hacemos el análisis de cada uno de ellos por separado. Solo destacan diferencias entre el sexo en tumores rectales, donde encontramos que CD44 aumenta su expresión en mujeres ($P=0.033$), y la presencia de metástasis al diagnóstico en tumores de colon donde CD44 disminuye ($P=0.023$). Aunque no llega a ser significativo, también parece que, en los casos de colon, la expresión de CD44 disminuye en adenocarcinomas mucinosos, papilares y medulares ($P=0.069$), disminuye con el grado de invasión del tumor ($P=0.075$) y con el estadio avanzado de la enfermedad ($P=0.085$)

CD133 se expresa menos en mujeres con tumores de colon ($P=0.011$), disminuye en tumores menos diferenciados ($P=0.016$) y parece disminuir con la presencia de ganglios afectados en el momento del diagnóstico sin llegar a ser significativo ($P=0.062$). No es significativo para ninguna variable en tumores de recto.

Tabla 24: Relación entre la expresión de las proteínas CD44 y CD133 con las características clínico-patológicas. Diferencia entre tumores de colon y recto

	CD44			CD44			CD133			CD133		
	Colon		p ^a	Recto		p ^a	Colon		p ^a	Recto		p ^a
	Low / N (%)	High / N (%)		Low / N (%)	High / N (%)		Low / N (%)	High / N (%)		Low / N (%)	High / N (%)	
	136 (64.2)	76 (35.8)		28 (62.2)	17 (37.8)		179 (83.6)	35 (16.4)		40 (95.2)	2 (4.8)	
Edad												
< 71 años	72 (61.5)	45 (38.5)	ns	19 (70.4)	8 (29.6)	ns	100 (85.5)	17 (14.5)	ns	24 (92.3)	2 (7.7)	ns
> 71 años	64 (67.4)	31 (32.6)		9 (50.0)	9 (50.0)		79 (81.4)	18 (18.6)		16 (88.9)	2 (11.1)	
Sexo												
Hombre	82 (63.6)	47 (36.4)	ns	19 (76.0)	6 (24.0)	0.033	102 (78.5)	28 (21.5)	0.011	22 (91.7)	2 (8.3)	ns
Mujer	54 (65.4)	29 (34.9)		9 (45.0)	11 (55.0)		77 (91.7)	7 (8.3)		18 (90.0)	2 (10.0)	
Diagnóstico												
Adenoc. c	104 (61.2)	66 (38.8)	ns	26 (65.0)	14 (35.0)	ns	142 (83.0)	29 (17.0)	ns	35 (89.7)	4 (10.3)	ns
Otros d	32 (76.2)	10 (23.8)		2 (40.0)	3 (60.0)		37 (86.0)	6 (14.0)		5 (100.0)	0 (0.0)	
G.D. b												
Bien	44 (62.0)	27 (38.0)	ns	10 (58.8)	7 (41.2)	ns	54 (75.0)	18 (25.0)	ns	13 (86.7)	2 (13.3)	ns
Moderado	71 (62.8)	42 (37.2)		16 (61.5)	10 (38.5)		100 (87.7)	14 (12.3)		25 (92.6)	2 (7.4)	
Pobre	20 (74.1)	7 (25.9)		2 (100.0)	0 (0.0)		24 (88.9)	3 (11.1)		2 (100.0)	0 (0.0)	
G.D. b												
Bien	44 (62.0)	27 (38.0)	ns	10 (58.8)	7 (41.2)	ns	54 (75.0)	18 (25.0)	0.016	13 (86.7)	2 (13.3)	ns
Mod-Pobre	91 (65.0)	49 (35.0)		18 (64.3)	10 (35.7)		124 (87.9)	17 (12.1)		27 (93.1)	2 (6.9)	
T												
T1-T2	14 (53.8)	12 (46.2)	ns	5 (71.4)	2 (28.6)	ns	24 (92.3)	2 (7.7)	ns	6 (85.7)	1 (14.3)	ns
T3-T4	122 (65.5)	64 (34.4)		23 (60.5)	15 (39.5)		155 (82.4)	33 (17.6)		34 (91.9)	3 (8.1)	
N												
N0	69 (60.0)	46 (40.0)	ns	12 (60.0)	8 (40.0)	ns	92 (79.3)	24 (20.7)	0.062	20 (95.2)	1 (4.8)	
N1-N2	67 (69.1)	30 (30.9)		16 (64.0)	9 (36.0)		87 (88.8)	11 (11.2)		20 (87.0)	3 (13.0)	
M												
M0	107 (61.1)	68 (38.9)	0.023	21 (63.6)	12 (36.4)	ns	148 (84.1)	28 (15.9)	ns	29 (90.6)	3 (9.4)	ns
M1	27 (81.8)	6 (18.2)		7 (58.3)	5 (41.7)		29 (85.3)	5 (14.7)		11 (91.7)	1 (8.3)	
T												
Estadio I - II	64 (59.8)	43 (40.2)	ns	9 (56.3)	7 (43.8)	ns	86 (80.4)	21 (19.6)	ns	16 (94.1)	1 (5.9)	ns
Estadio III - IV	70 (68.6)	32 (31.4)		19 (65.5)	10 (34.5)		92 (88.5)	12 (11.5)		24 (88.9)	3 (11.1)	

a: χ^2 Pearson o estadístico exacto de Fisher; b: Grado de diferenciación. c: Adenocarcinoma (M8140/3); d: Adenocarcinoma con componente mucinoso. papilar. medular (M8140/3; M8480/3; M8260/3; M8510/3); ns: no significativo

4.3.3 Relación de la expresión de las proteínas con la metástasis al diagnóstico

Uno de los principales retos en el manejo de los pacientes diagnosticados de CCR es la detección de aquellos que sufrirán una recaída temprana y que podrían beneficiarse de un tratamiento quimioterápico adyuvante personalizado. Sin embargo, algunas de las metástasis en el momento del diagnóstico son difícilmente detectables mediante las herramientas de diagnóstico actuales (pruebas de imagen). Por ello, uno de los puntos de mayor interés puede ser disponer de marcadores que indiquen una mayor o menor probabilidad de que existan dichas metástasis en el momento del diagnóstico difícilmente detectables, también llamadas “metástasis subclínicas”.

El efecto que pueden tener las distintas variables con respecto a la aparición de metástasis en el momento del diagnóstico se determinó mediante un análisis de regresión logística binaria. De acuerdo al modelo generado (Tabla 25), las variables que más influyen en la aparición de

metástasis al diagnóstico son la presencia de ganglios linfáticos afectados ($N1+N2$, $OR= 4.3$, $P>0.0001$) y la pérdida de expresión de BMAL1 ($OR=0.44$, $P=0.032$), es decir, cuando disminuye la expresión de BMAL1 aumenta la probabilidad de que haya metástasis al diagnóstico ($OR=2.26$).

Tabla 25: Regresión logística binaria metástasis al diagnóstico en todos los tumores

Metástasis al diagnóstico			
Variables independientes		OR (95% CI)	p Valor
Intercepción			0.001
Edad	(>71 vs ≤71)	1.02 (0.50; 2.09)	0.948
Sexo	(hombre vs. mujer)	0.76 (0.38; 1.53)	0.445
Órgano	(recto vs. colon)	1.81 (0.80; 4.06)	0.153
Diagnóstico	(otros vs. Adenoca.)	0.84 (0.35; 2.05)	0.704
Grado diferenciación	(M+P vs B)	1.00 (0.47; 2.16)	0.995
N	(N1+N2 vs. N0)	4.30 (2.00; 9.25)	0.000
BMAL1	(high vs. low)	0.44 (0.21; 0.93)	0.032

* El modelo (conjunto de variables independientes) es significativo ($P=0.001$), explica entre el **0,097** (R cuadrado de Cox y Snell) y el **0,159** (R cuadrado de Nagelkerke) de la variable dependiente (metástasis al diagnóstico), y clasifica correctamente el **81.6%** de los casos.

Al realizar el mismo análisis diferenciando tumores de colon y tumores de recto, se observa que, en tumores de colon, además de la presencia de ganglios afectados ($OR=5.86$, $P>0.0001$) y la disminución de la expresión de BMAL1 ($OR=0.37$, $P=0.031$) también aumenta la probabilidad de existencia de metástasis al diagnóstico la pérdida de expresión de PER1 ($OR=0.38$, $P=0.038$).

Tabla 26: Regresión logística binaria metástasis al diagnóstico. Tumores de colon

Metástasis al diagnóstico			
COLON			
Variables independientes		OR (95% CI)	p Valor
Intercepción			<0.0001
Edad	(>71 vs ≤71)	1.67 (0.69;4.15)	0.254
Sexo	(hombre vs. mujer)	1.06 (0.44; 2.55)	0.901
Grado Difer.	(M+P vs B)	2.10 (0.77; 5.74)	0.148
N	(N1+N2 vs. N0)	5.86 (2.22; 15.21)	0.000
PER1	(high vs. Low)	0.26 (0.11; 0.63)	0.003
BMAL1	(high vs. low)	0.37 (0.15; 0.91)	0.031

* **COLON:** El modelo (conjunto de variables independientes) es significativo ($P=0.004$), explica entre el **0.157** (R cuadrado de Cox y Snell) y el **0.267** (R cuadrado de Nagelkerke) de la variable dependiente (metástasis al diagnóstico), y clasifica correctamente el **85.3%** de los casos.

Sin embargo, en el análisis de tumores de recto, deja de tener impacto sobre el riesgo de presentar metástasis al diagnóstico la expresión de BMAL1 y se incrementa la influencia de PER1 ($OR=12.47$, $P=0.009$), con un aumento de riesgo a medida aumenta la expresión de PER1. En tumores de colon ocurre lo contrario, de modo que la probabilidad de existencia de metástasis al

diagnóstico aumenta con PER1_{Low}, y en tumores de recto la probabilidad aumenta con PER1_{High}. El intervalo de confianza (IC) en tumores de recto es alto debido al número de casos. Si embargo, el resultado indica que la expresión de PER1 está relacionado con la presencia de metástasis al diagnóstico y de manera muy diferente en cada tejido.

Tabla 27: Regresión logística binaria metástasis al diagnóstico. Tumores de recto

Metástasis al diagnóstico		RECTO (modelo a)	
Variables independientes		OR (95% CI)	p Valor
Intercepción			0.003
Edad	(>71 vs ≤71)	0.27 (0.40;1.80)	0.175
Sexo	(hombre vs. mujer)	0.64 (0.12;3.59)	0.614
Grado Difer.	(M+P vs B)	0.31 (0.58;1.69)	0.176
N (TNM)	(N1+N2 vs. N0)	4.43 (0.70;28.10)	0.114
PER1	(high vs. Low)	12.47 (1.87;83.17)	0.009

* **RECTO:** El modelo (conjunto de variables independientes) es significativo ($P=0.003$), explica entre el **0.261** (R cuadrado de Cox y Snell) y el **0.380** (R cuadrado de Nagelkerke) de la variable dependiente (metástasis al diagnóstico), y clasifica correctamente el **82.2%** de los casos.

4.4 RELACIÓN CON LA PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD.

A la hora de implementar un tratamiento personalizado, no sólo es importante encontrar marcadores de metástasis en el momento del diagnóstico, sino que sería de gran utilidad en el manejo de los pacientes diagnosticados de CCR la detección de aquellos que sufrirán una recaída temprana, ya sea recidiva local o metástasis en órganos distales. Por ello, en nuestro estudio, tratamos de identificar si las proteínas de reloj central y los marcadores de células madre, están relacionados con la aparición de recidivas locales o metástasis distales tras el diagnóstico. Se analizaron cada uno de los eventos por separado y en conjunto (la variable recaída incluye la aparición de metástasis distales o recidivas locales tras el diagnóstico, bien solo una de ellas o ambas, la antes ocurriese en el periodo estudiado). Para los análisis, se tuvieron en cuenta las recaídas en la enfermedad a 3 años, que es el periodo de análisis habitual hasta el cual el riesgo de recaídas es alto, y a 5 años, que es el tiempo en que finaliza el seguimiento del paciente y se procede al alta diagnóstica, por entenderse muy bajo el riesgo de recaída [298].

4.4.1 Probabilidad aparición de metástasis o recidivas locales tras el diagnóstico.

Todos los casos de tumores colorrectales

En primer lugar, se llevó a cabo el análisis mediante un análisis bivalente para determinar la posible relación entre las proteínas del estudio y la progresión de la enfermedad, discriminando a su vez la aparición de metástasis y recidivas locales tras el diagnóstico, tanto antes de los 3 años como antes de los 5 años.

Con respecto a la progresión de la enfermedad encontramos que **PER1, PER2, PER3 y CRY2** no parecen guardar ninguna relación con la aparición de metástasis o recidivas tras el diagnóstico (**Tabla 28**).

Sí existen diferencias significativas con **CRY1**, que se encontró asociado a la aparición de metástasis tras el diagnóstico; **su expresión es mayor** en pacientes que desarrollan **metástasis antes de los 3** ($P=0.005$) **y 5 años** ($P=0.003$).

Aunque no llega a ser significativo, **CRY2** se relaciona con la aparición de **recidiva local tras el diagnóstico**, tanto a **3 años** ($P=0.062$) **como a 5 años** ($P=0.077$), de modo que su **expresión aumenta** en pacientes que desarrollan este tipo de recaída.

Tabla 28: Relación entre la expresión de proteínas PER1, PER2, PER3 CRY1 y CRY2, y la aparición de metástasis y recidivas locales tras el diagnóstico

	PER 1			PER2			PER3			CRY1			CRY2		
	Low /N (%)	High /N (%)	P ^a	Low /N (%)	High /N (%)	P ^a	Low /N (%)	High /N (%)	P ^a	Low /N (%)	High /N (%)	P ^a	Low /N (%)	High /N (%)	P ^a
Mx 3	98 (41.7)	137 (58.3)		89 (37.9)	146 (62.1)		207 (89.2)	25 (10.8)		163 (73.1)	60 (26.9)		75 (33.5)	149 (66.5)	
NO	65 (37.1)	110 (62.9)	ns	59 (33.5)	117 (66.5)	ns	158 (89.8)	18 (10.2)	ns	75 (42.6)	101 (57.4)	0.005	61 (34.5)	116 (65.5)	ns
SI	20 (48.8)	21 (51.2)		17 (41.5)	24 (58.5)		39 (90.7)	4 (9.3)		8 (19.0)	34 (81.0)		12 (28.6)	30 (71.4)	
Mx 5															
NO	61 (38.1)	99 (61.9)	ns	55 (34.4)	105 (65.6)	ns	142 (88.8)	18 (11.3)	ns	70 (43.8)	90 (56.3)	0.003	57 (35.4)	104 (64.6)	ns
SI	21 (43.8)	27 (56.3)		20 (40.8)	29 (59.2)		47 (92.2)	4 (7.8)		10 (20.0)	40 (80.0)		15 (30.0)	35 (70.0)	
Rec 3															
NO	75 (39.5)	115 (60.5)	ns	67 (34.9)	125 (65.1)	ns	172 (89.1)	21 (10.9)	ns	77 (40.1)	115 (59.9)	ns	69 (35.8)	124 (64.2)	ns
SI	8 (40.0)	12 (60.0)		8 (42.1)	11 (57.9)		18 (90.0)	2 (10.0)		6 (30.0)	14 (70.0)		3 (15.0)	17 (85.0)	
Rec 5															
NO	69 (39.7)	105 (60.3)	ns	62 (35.4)	113 (64.6)	ns	154 (88.0)	21 (12.0)	ns	72 (41.1)	103 (58.9)	ns	65 (36.9)	111 (63.1)	ns
SI	10 (40.0)	15 (60.0)		11 (44.0)	14 (56.0)		24 (92.3)	2 (7.7)		9 (34.6)	17 (65.4)		5 (19.2)	21 (80.8)	

Mx 3: Metástasis antes de los 3 años tras el diagnóstico; **Mx 5:** Metástasis antes de los 5 años tras el diagnóstico; **Rec 3:** Recidivas locales antes de los 3 años tras el diagnóstico; **Rec 5:** Recidivas locales antes de los 5 años tras el diagnóstico;

También encontramos diferencias significativas en relación a **NR1D2** y la progresión de la enfermedad, observando asociación entre un aumento de la expresión de NR1D2 y la aparición de **recidivas locales a 3 años** ($P=0.015$) y **5 años** ($P=0.016$). No se observa ninguna relación con la aparición de metástasis o recidivas tras el diagnóstico con las proteínas **BMAL1**.

En el caso de los marcadores de CMCs, **CD44** parece estar asociado a la aparición de metástasis ($P=0.030$), con menos expresión en aquellos pacientes que desarrollan metástasis antes de 5 años (**Tabla 29**). No se observó ningún tipo de relación con **CD133**.

Tabla 29: Relación entre la expresión de proteínas BMAL1, NR1D2, CD44 y CD133, y la aparición de metástasis y recidivas locales tras el diagnóstico

	BMAL 1			NR1D2			CD44			CD133		
	Low /N (%)	High /N (%)	P ^a	Low /N (%)	High /N (%)	P ^a	Low /N (%)	High /N (%)	P ^a	Low /N (%)	High /N (%)	P ^a
	45 (20.4)	176 (79.6)		127 (57.2)	95 (42.8)		137 (61.4)	86 (38.6)		192 (86.1)	31 (13.9)	
Mx 3												
NO	35 (20.0)	140 (80.0)	ns	103 (58.5)	73 (41.5)	ns	103 (58.5)	73 (41.5)	ns	153 (86.4)	24 (13.6)	ns
SI	9 (22.0)	32 (78.0)		21 (51.2)	20 (48.8)		31 (73.8)	11 (26.2)		35 (85.4)	6 (14.6)	
Mx 5												
NO	32 (20.0)	128 (80.0)	ns	96 (60.0)	64 (40.0)	ns	91 (56.9)	69 (43.1)	0.030	138 (85.7)	23 (14.3)	ns
SI	11 (22.4)	38 (77.6)		25 (51.0)	24 (49.0)		37 (74.0)	13 (26.0)		42 (85.7)	7 (14.3)	
Rec 3												
NO	36 (18.8)	155 (81.2)	ns	116 (60.4)	76 (39.6)	0.015	113 (58.9)	79 (41.1)	ns	169 (87.1)	25 (12.9)	ns
SI	5 (26.3)	14 (73.7)		6 (31.6)	13 (68.4)		16 (80.0)	4 (20.0)		16 (84.2)	3 (15.8)	
Rec 5												
NO	35 (20.1)	139 (79.9)	ns	107 (61.5)	67 (38.5)	0.016	101 (57.7)	74 (42.3)	ns	152 (86.4)	24 (13.6)	ns
SI	5 (20.0)	20 (80.0)		9 (36.0)	16 (64.0)		20 (76.9)	6 (23.1)		22 (88.0)	3 (12.0)	

Mx 3: Metástasis antes de los 3 años tras el diagnóstico; **Mx 5:** Metástasis antes de los 5 años tras el diagnóstico; **Rec 3:** Recidivas locales antes de los 3 años tras el diagnóstico; **Rec 5:** Recidivas locales antes de los 5 años tras el diagnóstico;

Diferencias entre tumores de colon y recto.

De nuevo, comparamos la expresión de las diferentes proteínas analizadas en este estudio y la progresión de la enfermedad en tumores de colon y recto por separado, diferenciando además entre la aparición de metástasis a distancia y la aparición de recidivas locales antes de 3 y 5 años. Las diferencias encontradas se detallan en **Tabla 30** y **Tabla 31**.

La **disminución de expresión de PER1** está asociada a la **aparición de metástasis** antes de **los 3 años** ($P=0.041$) **solo en tumores de colon**.

En cuanto a las diferencias que encontramos para **CRY1** en relación a la aparición de metástasis tras el diagnóstico tanto a 3 como a 5 años, es menos significativa cuando analizamos los tejidos por separado, siendo para colon ($P=0.030$ y $P=0.008$, significativamente) y para recto ($P=0.070$ y $P=0.053$, respectivamente). Esta diferencia sí podría ser explicada por el menor número de casos, ya que no se observa un cambio de tendencia en la expresión entre colon y recto, en ambos casos la expresión disminuye en pacientes que desarrollan metástasis.

Tabla 30: Relación entre la expresión de proteínas PER1 y CRY1 con la aparición de metástasis y recidivas locales tras el diagnóstico. Diferencia entre tumores de colon y recto

PER1 COLON				PER1 RECTO				CRY1 COLON				CRY1 RECTO		
	Low /N (%)	High /N (%)	<i>P</i> ^a	Low /N (%)	High /N (%)	<i>P</i> ^a	Low /N (%)	High /N (%)	<i>P</i> ^a	Low /N (%)	High /N (%)	<i>P</i> ^a		
	76 (38.6)	121 (61.4)		22 (57.9)	16 (42.1)		131 (70.8)	54 (29.2)		32 (84.2)	6 (15.8)			
Mx 3														
NO	48 (32.7)	99 (67.3)	0.041	17 (60.7)	11 (39.3)	ns	60 (40.5)	88 (59.5)	0.030	13 (52.0)	12 (48.0)	ns		
SI	17 (51.5)	16 (48.5)		3 (37.5)	5 (62.5)		7 (20.6)	27 (79.4)		4 (30.8)	9 (69.2)			
Mx 5														
NO	45 (33.3)	90 (66.7)	ns	16 (64.0)	9 (36.0)	ns	57 (42.2)	78 (57.8)	0.008	15 (53.6)	13 (46.4)	ns		
SI	18 (46.2)	21 (53.8)		3 (33.3)	6 (66.7)		8 (19.5)	33 (80.5)		1 (12.5)	7 (87.5)			
Rec 3														
NO	58 (36)	103 (64)	ns	17 (58.6)	12 (41.4)	ns	63 (38.7)	100 (61.3)	ns	13 (52.0)	12 (48.0)	ns		
SI	5 (31.3)	11 (68.8)		3 (75.0)	1 (25.0)		4 (25.0)	12 (75.0)		2 (22.2)	7 (77.8)			
Rec 5														
NO	53 (36.1)	94 (63.9)	ns	16 (59.3)	11 (40.7)	ns	59 (39.9)	89 (60.1)	ns	14 (48.3)	15 (51.7)	ns		
SI	6 (30)	14 (70)		4 (80.0)	1 (20.0)		6 (28.6)	15 (71.4)		2 (50.0)	2 (50.0)			

Mx 3: Metástasis antes de los 3 años tras el diagnóstico; **Mx 5:** Metástasis antes de los 5 años tras el diagnóstico; **Rec 3:** Recidivas locales antes de los 3 años tras el diagnóstico; **Rec 5:** Recidivas locales antes de los 5 años tras el diagnóstico.

Sin embargo, la asociación entre el aumento de expresión de **NR1D2** y la aparición de recidivas locales a 3 años y 5 años, es mayor cuando analizamos solo tejidos de colon ($P=0.021$ y $P=0.011$), y esta relación no es significativa en tumores de recto.

Por último, sí hay diferencias entre la expresión de **CD44** en tumores de colon y tumores de recto, encontrando que CD44 disminuye su expresión tanto en pacientes con tumores de colon que desarrollan metástasis a 3 años ($P=0.007$), metástasis a 5 años ($P=0.004$) así como recidivas locales a 3 años ($P=0.022$) y 5 años ($P=0.034$), mientras que en tumores de recto la asociación deja de ser significativa, y por los porcentajes de expresión parece que la relación de invierte,

aumentaría la expresión en los pacientes con recaída en la enfermedad. Para confirmar esta observación se requeriría el análisis de más casos de recto.

Para el resto de las proteínas estudiadas, PER2, PER3 y CRY2, no se aprecian diferencias significativas entre ambos tipos de tumores.

Tabla 31: Relación entre la expresión de proteínas BMAL1 y NR1D2 con la aparición de metástasis y recidivas locales tras el diagnóstico. Diferencia entre tumores de colon y recto

	NR1D2 COLON			NR1D2 RECTO			CD44 COLON			CD44 RECTO		
	Low /N (%)	High /N (%)	P ^a	Low /N (%)	High /N (%)	P ^a	Low /N (%)	High /N (%)	P ^a	Low /N (%)	High /N (%)	P ^a
	105 (57.1)	79 (42.9)		22 (57.9)	16 (42.1)		115 (62.2)	70 (37.8)		22 (57.9)	16 (42.1)	
Mx 3												
NO	87 (58.8)	61 (41.2)	ns	16 (57.1)	12 (42.9)	ns	85 (57.4)	63 (42.6)	0.007	18 (64.3)	10 (35.7)	ns
SI	17 (51.5)	16 (48.5)		4 (50.0)	4 (50.0)		28 (82.4)	6 (17.6)		3 (37.5)	5 (62.5)	
Mx 5												
NO	82 (60.7)	53 (39.3)	ns	14 (56.0)	11 (44.0)	ns	75 (55.6)	60 (44.4)	0.004	16 (64.0)	9 (36.0)	ns
SI	20 (50)	20 (50)		5 (55.6)	4 (44.4)		33 (80.5)	8 (19.5)		4 (44.4)	5 (55.6)	
Rec 3												
NO	99 (61.1)	63 (38.9)	0.021	17 (56.7)	13 (43.3)	ns	95 (58.3)	68 (41.7)	0.022	18 (62.1)	11 (37.9)	ns
SI	5 (31.3)	11 (68.8)		1 (33.3)	2 (66.7)		14 (87.5)	2 (12.5)		2 (50.0)	2 (50.0)	
Rec 5												
NO	92 (62.6)	55 (37.4)	0.011	15 (55.6)	12 (44.4)	ns	84 (56.8)	64 (43.2)	0.034	17 (63.0)	10 (37.0)	ns
SI	4 (19.0)	17 (81.0)		1 (25.0)	3 (75.0)		17 (81.0)	4 (19.0)		3 (60.0)	2 (40.0)	

Mx 3: Metástasis antes de los 3 años tras el diagnóstico; **Mx 5:** Metástasis antes de los 5 años tras el diagnóstico; **Rec 3:** Recidivas locales antes de los 3 años tras el diagnóstico; **Rec 5:** Recidivas locales antes de los 5 años tras el diagnóstico.

4.4.2 Regresión logística binaria aparición de metástasis 3 y 5 años

Para determinar el efecto que pueden tener las distintas variables con respecto a la progresión de la enfermedad, es decir, aparición de metástasis distales o recidivas locales tras el diagnóstico se realizó un análisis de regresión logística binaria. Se analizaron por un lado todos los tumores colorrectales (Tabla 32) y por otro lado se estudiaron casos de tumores de colon (Tabla 33). No se pudo llevar a cabo el estudio con tumores de recto por no disponer de un número suficiente de casos.

Todos los casos de tumores colorrectales

Para la aparición de metástasis distales, tanto a 3 como a 5 años, resultó que las variables que más afectaban a la progresión de la enfermedad son la presencia de metástasis al diagnóstico (OR=7.77, $P=0.0001$) y una expresión elevada de CRY1 (OR=5.06, $P=0.001$). Es decir, junto a la metástasis al diagnóstico, una expresión elevada de CRY1 aumenta la probabilidad de que aparezcan metástasis tanto a los 3 como a 5 años después del diagnóstico, independientemente del resto de variables clinicopatológicas.

Tabla 32: Regresión logística binaria aparición de metástasis 3 y 5 años

Variables independientes		Metástasis 3 años		Metástasis 5 años	
		OR (95% CI)	p Valor	OR (95% CI)	p Valor
Intercepción			<0.0001		<0.0001
Edad	(>71 vs ≤71)	0.78 (0.36;1.71)	0.537	0.89 (0.43;1.83)	0.742
Sexo	(hombre vs. mujer)	1.74 (0.78;3.91)	0.179	1.45 (0.70;3.03)	0.321
Órgano	(colon vs. recto)	0.98 (0.35;2.70)	0.964	0.95 (0.36;2.54)	0.920
Diagnóstico	(otros vs. adenoca.)	0.82 (0.30;2.25)	0.698	1.05 (0.41;2.69)	0.918
Grado Difer.	(M+P vs B)	1.01 (0.45;2.25)	0.978	0.80 (0.38;1.69)	0.566
T	(T3+T4 vs. T1+T2)	3.71 (0.79;17.30)	0.095	2.15 (0.66;6.97)	0.204
N	(N1+N2 vs. N0)	1.55 (0.71;3.38)	0.269	1.45 (0.70;3.02)	0.317
M	(M1 vs M0)	7.77 (2.71;22.25)	0.0001	6.55 (2.37;18.10)	0.0003
CRY1	(high vs. Low)	5.06 (1.93;13.28)	0.001	4.44 (1.87;10.56)	0.001

* **Metástasis a 3 años:** El modelo es significativo ($P<0.0001$), explica entre el **0.143** (R cuadrado de Cox y Snell) y el **0.229** (R cuadrado de Nagelkerke) de la variable dependiente (metástasis a 3 años), y clasifica correctamente el **84.9%** de los casos.

* **Metástasis a 5 años:** El modelo es significativo ($P<0.0001$), explica entre el **0.135** (R cuadrado de Cox y Snell) y el **0.203** (R cuadrado de Nagelkerke) de la variable dependiente (metástasis a 5 años), y clasifica correctamente el **80.5%** de los casos.

Solo tumores de colon.

Cuando analizamos solo tumores de colon encontramos varios modelos significativos, encontrando que las variables que más influyen en la aparición de metástasis distales son la presencia de metástasis al diagnóstico, una expresión elevada de CRY1, expresión baja de CD44 y expresión baja de PER1.

En el primer modelo las variables que incluyen en la aparición de metástasis distales son la presencia de metástasis al diagnóstico (M1) con una OR=7.4 ($P=0.001$) y elevada expresión de CRY1, con una OR=4.46 ($P=0.005$). En el segundo modelo encontramos como variables significativas la presencia de metástasis al diagnóstico (M0) con una OR=4.63 ($P=0.010$) y CD 44 con OR=0.30 ($P=0.016$). También es significativo un tercer modelo con las variables M (OR=6.65, $P=0.003$), CRY1 (OR=4.01, $P=0.012$) y CD44 (OR=0.34, $P=0.037$).

Y el modelo que incluye la variable metástasis al diagnóstico (M0) junto a expresión elevada de CRY, expresión baja de CD44 y expresión baja de PER1 es el que clasifica correctamente el mayor porcentaje de los casos (**Tabla 33**).

Tabla 33: Regresión logística binaria aparición de metástasis 3 y 5 años. Tumores colon.

		Metástasis 3 años		Metástasis 5 años	
Variables independientes		OR (95% CI)	p Valor	OR (95% CI)	p Valor
Intercepción			0.002		0.004
Edad	(>71 vs ≤71)	0.80 (0.32;2.01)	0.635	0.91 (0.39;2.14)	0.826
Sexo	(hombre vs. mujer)	1.58 (0.63;3.99)	0.328	1.34 (0.57;3.19)	0.504
Localización	(distal vs. proximal)	2.25 (0.92;5.55)	0.077	1.97 (0.84;4.61)	0.117
Diagnóstico	(otros vs. Adenoca.)	1.37 (0.43;4.32)	0.591	1.62 (0.56;4.76)	0.376
Grado Difer.	(M+P vs B)	1.30 (0.49;3.42)	0.601	1.10 (0.45;2.73)	0.829
T	(T3+T4 vs. T1+T2)	2.28 (0.45;11.51)	0.317	1.31 (0.37;4.65)	0.680
N	(N1+N2 vs. N0)	1.11 (0.43;2.86)	0.822	1.07 (0.44;2.64)	0.876
M	(M1 vs M0)	5.66 (1.52;21.13)	0.010	4.71 (1.28;17.32)	0.020
CRY1	(high vs. low)	5.43 (1.69;17.46)	0.004	6.75 (2.18;20.95)	0.001
CD44	(high vs. low)	0.31 (0.11;0.90)	0.031	0.29 (0.11;0.77)	0.013
PER1	(high vs. low)	0.38 (0.15;0.96)	0.041	0.44 (0.18;1.08)	0.073

* **Metástasis a 3 años:** El modelo es significativo ($P=0.002$), explica entre el **0.167** (R cuadrado de Cox y Snell) y el **0.272** (R cuadrado de Nagelkerke) de la variable dependiente (metástasis distales a 3 años), y clasifica correctamente el **82.7%** de los casos.

* **Metástasis a 5 años:** El modelo es significativo (0.004), explica entre el **0.175** (R cuadrado de Cox y Snell) y el **0.267** (R cuadrado de Nagelkerke) de la variable dependiente (metástasis distales a 5 años), y clasifica correctamente el **78.6%** de los casos.

4.4.3 Regresión logística binaria aparición de recidivas 3 y 5 años

Se determinó mediante un análisis de regresión logística binaria el efecto de las variables estudiadas sobre la aparición de recidivas locales a los 3 y 5 años. Se analizaron por un lado todos los tumores colorrectales (**Tabla 34**) y por otro lado se estudiaron casos de tumores de colon (**Tabla 35**). Al igual que para el análisis de metástasis distales, no se pudo llevar a cabo el estudio con tumores de recto por no disponer de un número suficiente de casos.

Todos los casos de tumores colorrectales

Para la aparición de recidivas locales tras el diagnóstico tanto antes de 3 años como 5 años, se encontró que las variables que más influyen sobre la aparición de dichas recidivas son la expresión elevada de NR1D2 y una expresión baja de CD44, independientemente del resto de variables clínico patológicas (**Tabla 34**). Se encontraron significativos varios modelos con CD44 y NR1D2 independientemente del resto de variables.

Tabla 34: Regresión logística binaria aparición de recidivas locales a 3 y 5 años

Variables independientes		Recidiva local 3 años		Recidiva local 5 años	
		OR (95% CI)	p Valor	OR (95% CI)	p Valor
Intercepción			0.003		0.003
Edad	(>71 vs ≤71)	0.20 (0.05;0.81)	0.024	0.31 (0.10;0.97)	0.044
Sexo	(hombre vs. mujer)	1.46 (0.47;4.50)	0.509	1.00 (0.38;2.60)	1.000
Órgano	(colon vs. recto)	1.81 (0.41;7.97)	0.433	1.55 (0.42;5.74)	0.515
Diagnóstico	(otros vs. Adenoca.)	3.50 (0.99;12.33)	0.052	2.94 (0.96;8.97)	0.058
Grado Difer.	(M+P vs B)	0.73 (0.21;2.59)	0.629	0.84 (0.28;2.52)	0.754
T	(T3+T4 vs. T1+T2)	5.30 (0.54;52.29)	0.154	6.24 (0.68;57.08)	0.105
N	(N1+N2 vs. N0)	0.62 (0.19;1.98)	0.416	0.81 (0.29;2.22)	0.677
M	(M1 vs M0)	0.59 (0.09;3.79)	0.576	1.37 (0.32;5.85)	0.673
NR1D2	(high vs. low)	5.33 (1.66;17.07)	0.005	4.83 (1.74;13.46)	0.003
CD44	(high vs. low)	0.18 (0.05;0.74)	0.017	0.26 (0.08;0.81)	0.020

* **Recidiva local a 3 años:** El modelo es significativo ($P=0.003$), explica entre el **0.116** (R cuadrado de Cox y Snell) y el **0.261** (R cuadrado de Nagelkerke) de la variable dependiente (recidiva local antes de 5 años), y clasifica correctamente el **91.8%** de los casos.

* **Recidiva local a 5 años:** El modelo es significativo ($P=0.003$), explica entre el **0.124** (R cuadrado de Cox y Snell) y el **0.238** (R cuadrado de Nagelkerke) de la variable dependiente (recidiva local antes de 5 años), y clasifica correctamente el **88.3%** de los casos.

Solo tumores de colon.

Los resultados al estudiar solo tumores de colon (**Tabla 35**) fueron muy similares a los obtenidos al analizar todos los tumores, colon y recto. Esto podría deberse al bajo número de casos de tumores de recto con recidivas locales, lo que haría que el resultado cuando estudiamos todos los casos fuese explicado casi íntegramente por los tumores de colon. La diferencia es que, al analizar tumores de colon, deja de ser significativo el CD44 como marcador si lo estudiamos por separado, es decir, se obtiene un modelo con NR1D2 significativo, un modelo con NR1D2 + CD44

significativo, pero no un modelo con solo CD44, como se obtenía al analizar los casos de colon y recto juntos.

Tabla 35: Regresión logística binaria aparición de recidivas locales a 3 y 5 años. Tumores colon.

Variables independientes		Recidiva local 3 años		Recidiva local 5 años	
		OR (95% CI)	p Valor	OR (95% CI)	p Valor
Intercepción			0.039		0.033
Edad	(>71 vs ≤71)	0.22 (0.05;1.01)	0.051	0.37 (0.10;1.31)	0.124
Sexo	(hombre vs. mujer)	1.16 (0.33;4.08)	0.814	0.63 (0.21;1.89)	0.409
Localización	(distal vs. proximal)	0.87 (0.23;3.30)	0.838	0.76 (0.23;2.47)	0.646
Diagnóstico	(otros vs. Adenoca.)	3.88 (0.92;16.25)	0.064	2.98 (0.87;10.20)	0.082
Grado Difer.	(M+P vs B)	0.69 (0.17;2.75)	0.602	0.68 (0.20;2.24)	0.523
T	(T3+T4 vs. T1+T2)	2.50 (0.25;24.55)	0.432	3.59 (0.38;33.59)	0.263
N	(N1+N2 vs. N0)	0.40 (0.09;1.74)	0.222	0.56 (0.16;1.96)	0.362
M	(M1 vs M0)	0.50 (0.04;5.86)	0.585	2.59 (0.48;14.08)	0.269
NR1D2	(high vs. low)	5.69 (1.54;21.02)	0.009	6.35 (1.92;21.05)	0.003
CD44	(high vs. low)	0.06 (0.01;0.54)	0.012	0.16 (0.04;0.64)	0.009

* **Recidiva local a 3 años:** El modelo es significativo ($P=0.039$), explica entre el **0.137** (R cuadrado de Cox y Snell) y el **0.309** (R cuadrado de Nagelkerke) de la variable dependiente (aparición de recidivas locales a los 3 años), y clasifica correctamente el **91.5%** de los casos.

* **Recidiva local a 5 años:** El modelo es significativo ($P=0.033$), explica entre el **0.145** (R cuadrado de Cox y Snell) y el **0.278** (R cuadrado de Nagelkerke) de la variable dependiente (aparición de recidivas locales a los 5 años), y clasifica correctamente el **89.8%** de los casos.

4.4.4 Tiempo de supervivencia libre de enfermedad

Para ver la consistencia de los resultados previos, se estudió la probabilidad de que un paciente desarrolle metástasis distales o recidivas locales antes de 3 o 5 años, mediante el análisis de Kaplan-Meier, y el estadístico Log-Rank (Mantel-Cox). Se analizó por separado la aparición de metástasis distales, aparición de recidivas locales, así como un análisis en todos casos de tumores colorrectales, y otro con los casos de tumores de colon y tumores de recto por separado.

4.4.5 Tiempo de supervivencia libre de enfermedad. Regresión de Cox

Dado que la expresión alta o baja de las proteínas estudiadas parecían incrementar o disminuir la probabilidad de aparición de metástasis distales y recidivas locales, se llevó a cabo un análisis mediante regresión de Cox, para comparar el efecto de cada una de ellas en relación al tiempo de aparición del evento, en términos de “Hazard ratio” (HR) (Modelo de Riesgos Proporcionales). En este caso se analizó la aparición de recaída en la enfermedad, es decir, cualquiera de los eventos: recidiva o metástasis, antes de los 3 y 5 años tras el diagnóstico. De nuevo se analizaron todos los casos de tumores colorrectales y además el estudio por separado en tumores de colon y tumores de recto.

Todos los casos de tumores colorrectales

Se obtuvieron varios modelos significativos, en los cuales las variables **metástasis al diagnóstico (M1)**, **CRY1 elevado y CD44 bajo**, son los que resultaron tener efecto sobre la recaída en la enfermedad tanto a los 3 como 5 años tras el diagnóstico.

Por un lado, resultaron significativas en un primer modelo las variables **presencia de metástasis al diagnóstico** (HR=4.31, $P<0.0001$) y expresión **elevada de CRY1** (HR=3.55, $P=0.001$) con respecto a la aparición de recidivas tanto a 3 años (prueba coeficientes del modelo $P=0.0003$), e igualmente para el estudio a 5 años (prueba coeficientes del modelo $P=0.0002$), con una HR=3.87 ($P<0.0001$) para M1 versus M0 y una HR=3.13 ($P=0.001$) de CRY1_{High} versus CRY1_{Low}.

En un segundo modelo resultaron significativas las variables **metástasis al diagnóstico** (HR=2.77, $P<0.004$) y **expresión baja de CD44** (HR=0.49, $P=0.042$) como marcadores de supervivencia libre de enfermedad a 3 años (prueba coeficientes del modelo $P=0.0003$), e igualmente, a 5 años con una HR=2.66 ($P<0.004$) para M1 versus M0 y una HR=0.47 ($P=0.020$) de CD44_{High} versus CD44_{Low} (prueba coeficientes del modelo $P=0.002$).

Y el modelo más significativo de acuerdo a la prueba Ómnibus sobre los coeficientes (con un $P=0.0001$ para aparición de recaídas a 3 años y $P<0.0001$ para recaídas a 5 años) mostró que las variables que más influyen en la aparición de los eventos son: la **presencia de metástasis en el momento del diagnóstico** (M1 versus M0) con una $HR=4.35$ ($P<0.0001$) y $HR=3.93$ ($P<0.0001$) a 3 y 5 años respectivamente, la **expresión elevada de CRY1** (CRY1High versus CRY1Low) con unas $HR=3.69$ y $HR=3.17$ a 3 y 5 años, que aumentan la probabilidad de aparición de recaídas. Y, por último, aumenta el riesgo o probabilidad de recaídas una **expresión baja de CD44** (CD44High versus CD44Low) con unas $HR=0.49$ ($P=0.044$) y $HR=0.49$ ($P=0.028$) a 3 y 5 años respectivamente, independientemente del resto de variables clinicopatológicas (**Tabla 36**).

Tabla 36: Regresión de Cox: Tiempo libre de enfermedad a 3 y 5 años

Tiempo libre de enfermedad		Recaída (Mx o Rec) 3 años		Recaída (Mx o Rec) 5 años	
Variables independientes		HR (95% CI)	P Valor	HR (95% CI)	P Valor
			0.0001		<0.0001
Edad	(>71 vs ≤71)	0.67 (0.36;1.27)	0.220	0.76 (0.43;1.34)	0.338
Sexo	(hombre vs. mujer)	1.25 (0.68;2.31)	0.468	1.25 (0.71;2.20)	0.438
Órgano	(recto vs. colon)	1.28 (0.60;2.73)	0.531	1.31 (0.65;2.63)	0.446
Diagnóstico	(otros vs. Adenoca.)	1.20 (0.56;2.56)	0.645	1.26 (0.62;2.53)	0.524
Grado Difer.	(M+P vs B)	0.92 (0.48;1.74)	0.794	0.85 (0.47;1.53)	0.578
T	(T3+T4 vs. T1+T2)	2.40 (0.73;7.95)	0.151	2.25 (0.79;6.37)	0.128
N	(N1+N2 vs. N0)	1.19 (0.64;2.20)	0.585	1.18 (0.67;2.08)	0.560
M	(M1 vs M0)	4.35 (2.08;9.10)	0.000	3.93 (1.96;7.90)	0.000
CRY1	(high vs. low)	3.69 (1.70;8.01)	0.001	3.17 (1.58;6.34)	0.001
CD44	(high vs. low)	0.49 (0.25;0.98)	0.044	0.49 (0.26;0.93)	0.028

P Valor de Pruebas ómnibus sobre los coeficientes del modelo

Diferencias entre tumores de colon y recto.

Al analizar los tumores de colon y recto por separado, encontramos para los tumores de colon el mismo resultado que, al analizar todos los casos juntos, fueron significativas las variables metástasis al diagnóstico, CRY1 y CD44, aunque menos significativo, tanto el HR como el p valor de la prueba. No se obtuvo ningún modelo en el caso de tumores de recto. El resultado se podría explicar por el menor número de casos de tumores de recto, y muchos menos en los que se ha dado el evento (metástasis, recidivas o ambos), de ahí que no obtengamos ningún resultado, y que el resultado al analizar todos los casos se corresponda casi íntegramente con los casos de tumores de colon.

4.5 RELACIÓN CON LA SUPERVIVENCIA GLOBAL

Para determinar si existe algún tipo de asociación entre la expresión de las proteínas estudiadas y la supervivencia global específica por cáncer se realizó un análisis de χ^2 , estudiando cada una de las proteínas con la supervivencia específica por cáncer a 3 y 5 años, y, además, estudiando por separado en pacientes con tumores de colon y tumores de recto.

Las proteínas que guardaban relación con la supervivencia global específica por cáncer fueron PER1, PER2, BMAL1 y CD44, aunque de nuevo se encontraron diferencias al comparar tumores de colon y recto, juntos o por separado.

Las proteínas son diferencias significativas al estudiar todos los tumores son **PER2**, cuya expresión disminuye en aquellos pacientes que han fallecido antes de 5 años ($P=0.027$), **BMAL1** que se expresa menos en pacientes que fallecen antes de 3 años ($P=0.046$) y antes de 5 años ($P=0.058$), y pacientes con una baja expresión de **CD44** que fallecen antes de 3 años ($P=0.001$) y 5 años ($P<0.0001$).

Tabla 37: Relación entre la expresión de PER1, PER2, BMAL1 y CD44 con la supervivencia a 3 y 5 años.

	PER2			BMAL1			CD44		
	Low/N (%)	High/N (%)	P^a	Low/N (%)	High/N (%)	P^a	Low/N (%)	High/N (%)	P^a
3 años	89 (37.9)	146 (62.1)		53 (22.6)	182 (77.4)		152 (64.4)	84 (35.6)	
Cens.	70 (35.4)	128 (64.6)	ns	40 (20.2)	158 (79.8)	0.046	119 (59.8)	80 (40.2)	0.001
Exitus	19 (51.4)	18 (48.6)		13 (35.1)	24 (65.9)		33 (89.2)	4 (10.8)	
5 años	88 (38.3)	142 (61.7)		52 (22.6)	178 (77.4)		148 (64.1)	83 (35.9)	
	63 (34.6)	119 (65.4)	0.027	36 (19.9)	145 (80.1)	ns	105 (57.7)	77 (42.3)	0.000
Exitus	25 (52.1)	23 (47.9)		16 (32.7)	33 (67.3)		43 (87.8)	6 (12.2)	

a : χ^2 Pearson o estadístico exacto de Fisher; **Cens.:** Casos censurados

De nuevo encontramos diferencias al realizar el análisis por tipos de tumor, y en especial PER1 que no se encuentra relación al analizar todos los casos, pero sí cuando analizamos solo tumores de colon, apuntando a que aquellos pacientes una baja expresión de PER1 está asociada con el fallecimiento por cáncer antes de 3 años. En tumores de recto, aunque no llega a ser significativo parece intuirse que la expresión aumenta en aquellos pacientes que fallecen antes de 3 años.

En el caso de PER2 desaparece la asociación, deja de ser estadísticamente significativo, tan solo podría intuirse que su expresión disminuye en pacientes con tumores de colon que fallecen antes de 5 años ($P=0.089$).

También encontramos diferencias en BMAL1 y CD44. Una expresión menor de BMAL1 parece más asociado a pacientes que fallecen antes de 5 años con tumores de recto, que con tumores de colon ($P=0.020$). Sin embargo, debido al número de casos de tumores de recto sería necesario ampliar la serie para confirmar dicho resultado.

Por el contrario, sí podría afirmar dada la significatividad de la prueba, que existe una relación entre una disminución de la expresión de CD44 y pacientes que fallecen antes de 3 años ($P<0.0001$) y 5 años ($P<0.0001$) con tumores de colon, mientras que no se da dicha asociación en tumores de recto.

Las proteínas que parecen tener mayor impacto en la supervivencia con BMAL1 y CD44. La expresión baja de ambas proteínas aumenta la probabilidad de fallecer por cáncer antes de 3 y 5 años. Esta relación es aún más significativa cuando analizamos CD44 solo en tejido de colon.

Tabla 38: Relación entre la expresión de PER1, BMAL1 y CD44 con la supervivencia a 3 y 5 años. Diferencias entre colon y recto

	PER1 COLON			PER1 RECTO			BMAL1 COLON			BMAL1 RECTO			CD44 COLON			CD44 RECTO		
	Low/N (%)	High/N (%)	P^a	Low/N (%)	High/N (%)	P^a	Low/N (%)	High/N (%)	P^a	Low/N (%)	High/N (%)	P^a	Low/N (%)	High/N (%)	P^a	Low/N (%)	High/N (%)	P^a
3 años	76 (38.6)	121 (61.4)		21 (56.8)	16 (43.2)		44 (22.3)	153 (77.7)		9 (23.7)	29 (76.3)		127 (64.1)	71 (35.9)		25 (65.8)	13 (64.2)	
Cens.	59 (35.5)	107 (64.5)	0.043	19 (61.3)	12 (38.7)	ns	34 (20.4)	133 (79.6)	ns	6 (19.4)	25 (80.6)	ns	99 (58.9)	69 (41.1)	0.000	20 (64.5)	11 (35.5)	ns
Exitus	17 (54.8)	14 (45.2)		3 (42.9)	4 (57.1)		10 (33.3)	20 (66.7)		3 (42.9)	4 (57.1)		28 (93.3)	2 (6.7)		5 (71.4)	2 (28.6)	
5 años	74 (38.4)	118 (61.5)		22 (57.9)	16 (42.1)		33 (18.1)	149 (81.9)		9 (23.7)	29 (76.3)		123 (63.7)	70 (36.3)		25 (65.8)	13 (64.2)	
Cens.	54 (35.8)	97 (64.2)	ns	17 (58.6)	12 (41.4)	ns	32 (21.1)	120 (78.9)	ns	4 (13.8)	25 (86.2)	0.020	87 (56.9)	66 (43.1)	0.000	18 (62.1)	11 (37.9)	ns
Exitus	20 (48.8)	21 (51.2)		5 (55.6)	4 (44.4)		11 (27.5)	29 (72.5)		5 (55.6)	4 (44.4)		36 (90.0)	4 (10.0)		7 (77.8)	2 (22.2)	

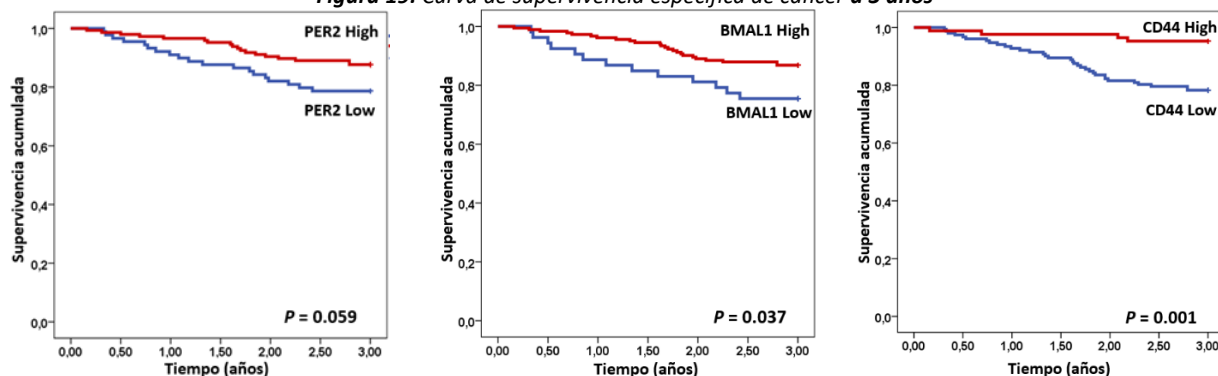
a : χ^2 Pearson o estadístico exacto de Fisher; **Cens.:** Casos censurados

4.5.1 Curva de supervivencia global acumulada específica por cáncer 3 y 5 años

Para ver la consistencia de los resultados previos, se estudió la supervivencia global acumulada, mediante el análisis de Kaplan-Meier, y el estadístico Log-Rank (Mantel-Cox), tanto supervivencia a 3 años como a 5 años. Como evento, solo se incluyen pacientes que haya fallecido a causa de la enfermedad (supervivencia específica por CCR); se censuraron todos los casos en los que se había perdido el contacto con el paciente, habían fallecido a consecuencia de la intervención quirúrgica (complicaciones postoperatorio), habían fallecido por cualquier otra causa y aquellos que seguían vivos (tanto con enfermedad como sin enfermedad).

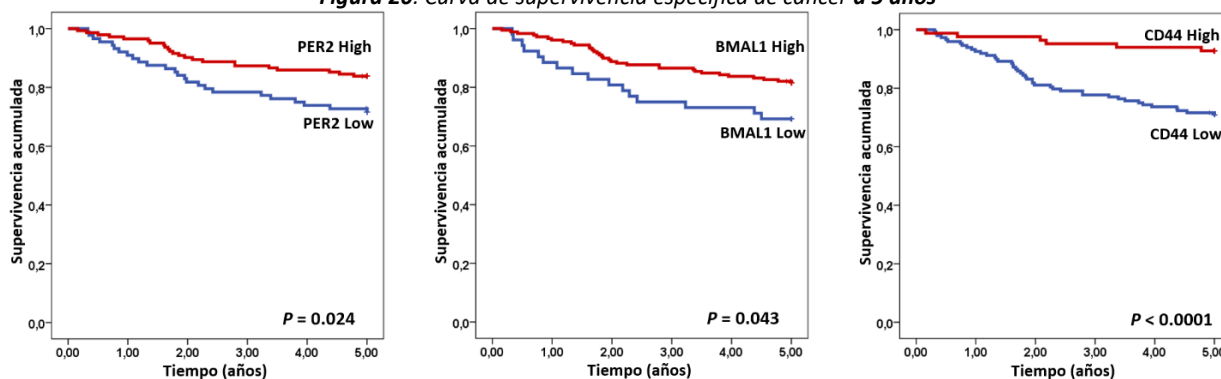
Se encontró que la supervivencia de los pacientes a 3 años era significativamente menor, cuando disminuye la expresión de BMAL1 ($P=0.037$) y CD44 ($P=0.001$) (Figura 19). En el estudio de la supervivencia a 5 años, además de **BMAL1**_{Low} ($P=0.043$) y **CD44**_{Low} ($P<0.0001$), también disminuye la supervivencia una expresión baja de **PER2** ($P=0.024$) (Figura 20).

Figura 19: Curva de supervivencia específica de cáncer a 3 años



P: Log Rank (Mantel-Cox)

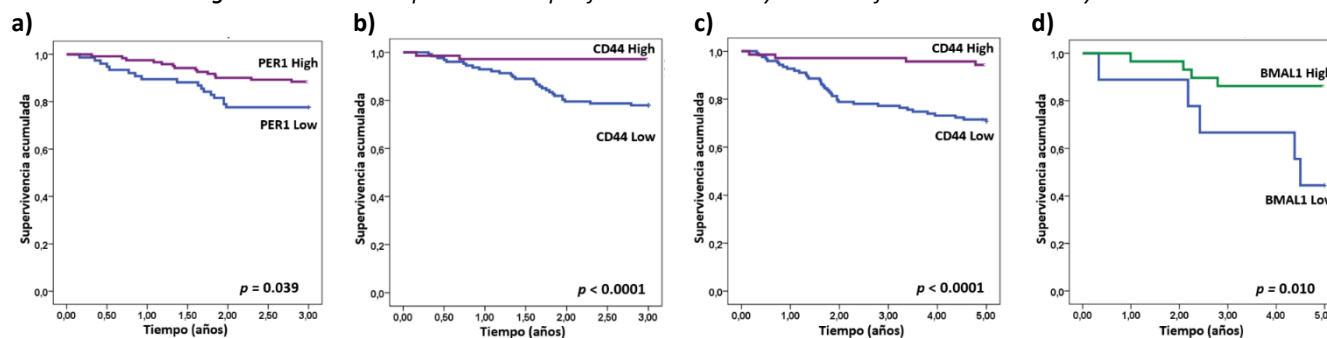
Figura 20: Curva de supervivencia específica de cáncer a 5 años



P: Log Rank (Mantel-Cox)

Analizando los casos de tumores de colon y recto por separado (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), solo encontramos que tienen impacto significativo en la supervivencia una expresión baja de las proteínas PER1 y CD44 ($P=0.0039$ y $P<0.0001$), y también parece tener relación una expresión baja de BMAL1 ($P=0.098$). En el caso de tumores de recto, la única proteína que guarda relación significativa con la supervivencia a 5 años es BMAL1 ($P=0.010$).

Figura 21: Curva de supervivencia específica de cáncer a 3 y 5 años. Diferencias entre colon y recto.



a) Tumores colon 3 años, b) tumores colon 3 años, c) tumores recto 5 años, d) tumores recto 5 años.

P: Log Rank (Mantel-Cox)

4.5.2 Tiempo de supervivencia global (específica por cáncer). Regresión de Cox

Dado que la expresión alta o baja de las proteínas estudiadas parecían tener impacto en la supervivencia global de la enfermedad, se llevó a cabo un análisis mediante regresión de Cox, para comparar el efecto de cada una de ellas en relación al tiempo supervivencia, en términos de “Hazard ratio” (HR) (Modelo de Riesgos Proporcionales), tanto a 3 años como a 5 años.

Se obtuvieron varios modelos significativos, en los que las variables que más afectaban a la supervivencia global acumulada son: sexo, grado de diferenciación, presencia de ganglios afectados (N) y metástasis en el momento del diagnóstico (M), y expresión alta o baja de **CRY1**, **CD44** y **CD133** (Tabla 39).

En la supervivencia global a 3 años las variables clinicopatológicas que muestran más riesgo proporcional son la presencia de metástasis al diagnóstico con una HR=29.50 ($P=0.0001$) y la presencia de ganglios afectados (HR=6.95, $P=0.002$). También mostró impacto significativo en la supervivencia grado de diferenciación, con más riesgo en tumores moderada y pobremente diferenciados, frente a tumores bien diferenciados (HR=4.61, $P=0.003$) así como el sexo, comportando más riesgo ser hombre frente a mujer (HR=3.27, $P=0.009$).

Por otro lado, de entre las proteínas estudiadas se encontró que una expresión elevada de **CRY1** frente a expresión baja (CRY1_{High} vs CRY1_{Low}) también tenía un impacto negativo en la supervivencia a 3 años con una **HR=3.93** ($P=0.003$), así como una expresión elevada de **CD133** (CD133_{High} vs CD133_{Low}) con una **HR=11.91** ($P<0.0001$).

En el análisis de supervivencia a 5 años, disminuye en impacto de las variables clinicopatológicas, **disminuye también el impacto de CD133_{High}**, y **aumenta el riesgo proporcional para CRY1_{High}** (HR=4.34, $P<0.0001$).

Tabla 39: Supervivencia global a 3 y 5 años. Regresión de Cox

Variables independientes		Supervivencia 3 años		Supervivencia 5 años	
		HR (95% CI)	p Valor	HR (95% CI)	p Valor
			<0.0001		<0.0001
Edad	(>71 vs ≤71)	1.29 (0.57;2.94)	0.539	1.24 (0.60;2.53)	0.563
Sexo	(hombre vs. mujer)	3.27 (1.34;7.99)	0.009	2.26 (1.11;4.60)	0.024
Órgano	(recto vs. colon)	2.02 (0.72;5.63)	0.181	1.17 (0.46;3.01)	0.739
Diagnóstico	(otros vs. Adenoca.)	1.71 (0.64;4.54)	0.286	2.03 (0.91;4.53)	0.085
Grado Difer.	(M+P vs B)	4.61 (1.68;12.66)	0.003	2.38 (1.06;5.37)	0.035
T	(T3+T4 vs. T1+T2)	3.57 (0.46;27.45)	0.222	1.41 (0.42;4.80)	0.582
N	(N1+N2 vs. N0)	6.95 (2.04;23.64)	0.002	3.93 (1.56;9.71)	0.003
M	(M1 vs M0)	29.50 (11.33;76.84)	0.000	20.12 (9.02;44.90)	0.000

Tratamiento	(si vs. no)	1.56 (0.39;6.15)	0.528	1.45 (0.47;4.50)	0.591
CRY1	(high vs. low)	3.93 (1.57;9.85)	0.003	4.34 (1.99;9.86)	0.000
CD133	(high vs. low)	11.91 (3.66;38.72)	0.000	6.31 (2.40;16.52)	0.000

En un segundo modelo para determinar el riesgo relativo sobre la supervivencia global a 3 años las variables clinicopatológicas que muestran un riesgo relativo significativo son las mismas que el modelo anterior (sexo, grado de diferenciación, ganglios afectados y metástasis al diagnóstico). Y, de entre las proteínas estudiadas se encontró que, igualmente, una expresión **elevada de CRY1** frente a expresión baja (CRY1_{High} vs CRY1_{Low}) también tenía un impacto negativo en la supervivencia con una **HR=4.33** ($P=0.002$), y además una **expresión baja de CD44** (CD44_{High} vs CD44_{Low}) con una **HR=0.25** ($P=0.003$).

En el análisis de supervivencia a 5 años, disminuye en impacto de las variables clinicopatológicas, y **aumenta el riesgo para CRY1_{High}** (**HR=4.77**, $P<0.0001$) y **CD44_{Low}** (**HR=0.27**, $P=0.009$).

Variables independientes		Supervivencia 3 años		Supervivencia 5 años	
		HR (95% CI)	p Valor	HR (95% CI)	p Valor
			<0.0001		<0.0001
Edad	(>71 vs ≤71)	1.22 (0.55;2.69)	0.631	1.17 (0.59;2.32)	0.663
Sexo	(hombre vs. mujer)	3.19 (1.29;7.87)	0.012	2.12 (1.04;4.35)	0.040
Órgano	(recto vs. colon)	1.91 (0.78;4.66)	0.157	1.36 (0.61;3.06)	0.456
Diagnóstico	(otros vs. Adenoca.)	1.52 (0.58;4.02)	0.399	1.79 (0.80;4.01)	0.157
Grado Difer.	(M+P vs B)	2.77 (1.11;6.90)	0.029	1.52 (0.72;3.21)	0.271
T	(T3+T4 vs. T1+T2)	4.23 (0.55;32.41)	0.165	1.54 (0.46;5.19)	0.484
N	(N1+N2 vs. N0)	4.04 (1.28;12.83)	0.018	2.94 (1.22;7.09)	0.016
M	(M1 vs M0)	22.21 (8.65;56.98)	0.000	15.27 (6.92;33.70)	0.000
Tratamiento	(si vs. no)	0.57 (0.15;2.23)	0.422	0.87 (0.27;2.79)	0.812
CRY1	(high vs. low)	4.33 (1.73;10.85)	0.002	4.77 (2.10;10.79)	0.000
CD44	(high vs. low)	0.25 (0.07;0.88)	0.030	0.27 (0.10;0.73)	0.009

5 DISCUSIÓN

Son muchos los estudios que relacionan las alteraciones del reloj circadiano con la carcinogénesis; la mayoría de ellos estudian mutaciones en los genes o cambios en la expresión mediante estudio de ARN. Sin embargo, son menos aquellos que lo hacen mediante técnicas habituales en los laboratorio de diagnóstico clínico, que permitan trasladar los resultados a la práctica clínica más rápidamente. Por ello, nuestro estudio se centra en el análisis de dichas proteínas mediante inmunohistoquímica, y con anticuerpos optimizados para su empleo con inmunoteñidores automáticos.

Existen pocos estudios que determinen la expresión de las proteínas del reloj mediante inmunohistoquímica, y, por la naturaleza del reloj, la expresión debería variar de forma cíclica; por ello, no está establecido qué porcentaje de señal o intensidad de la expresión es considerado alta o baja para cada una de ellas en tejido de colon. Por un lado, hay estudios que solo clasifican como positivo o negativo si la expresión es igual o menor a la observada en tejido normal [299], otros en cambio, consideran elevada una expresión por encima del 50% de las células tumorales, [299]–[303].

Nuestro abordaje con el establecimiento de puntos de corte determinados mediante curvas ROC, ha permitido establecer los puntos de corte que serían válidos independientemente de la cohorte [304]. Esta metodología, empleada hasta ahora solo para determinar la expresión de CRY1 [305] nos ha permitido determinar puntos de corte para discriminar la expresión entre tejidos normales y tumorales, y, además, puntos de corte dentro de los tejidos tumorales que indicarían una pérdida o sobreexpresión de cada proteína dentro del tumor, así como la sensibilidad y especificidad de cada una de las proteínas estudiadas para cada variable clínico-patológica.

Sin embargo, esto puede ser una limitación a la hora de comparar nuestros resultados con los estudios previos, ya que, existen pocas referencias de expresión de las proteínas del reloj mediante inmunohistoquímica en tejido tumoral colorrectal y mucosa colónica normal. La mayoría de los estudios centran su análisis en técnicas para determinar expresión mediante cuantificación de ARNm, y pocos validan la correspondencia con la expresión a nivel de proteína. De igual modo, hay importantes estudios de secuenciación para determinar mutaciones en los genes del reloj, aunque no se llega a determinar si las mutaciones encontradas en los genes del reloj implican la síntesis de proteínas truncadas, no funcionales o a qué epítomos afectan dichas mutaciones. Estos estudios, además, no suelen tener en cuenta las modificaciones

postraduccionales y los bucles de retroalimentación alternativos existentes en la regulación de reloj circadiano, por lo que no siempre una alteración ADN o ARNm se traduce en una alteración del ciclo, y de ahí, la importancia de analizar mediante inmunohistoquímica la expresión de las proteínas y su relación con las variables clínico-patológicas y el pronóstico de enfermedad.

En nuestra cohorte de estudio, encontramos un significativo descenso de la expresión de las proteínas **PER1/2/3**, **CRY1/2** y **NR1D1** en el CCR frente al tejido normal, a excepción de **BMAL1**; lo que sugiere que estos genes tienen un papel importante en la carcinogénesis colorrectal. Esto es concordante con otros muchos estudios realizados en diferentes tipos de cáncer, incluido el CCR. La mayoría coinciden con un descenso de expresión de PER1, PER2, PER3 en tejido tumoral. Otros estudios han encontrado algunas discrepancias en el caso de CRY1, CRY2 y BMAL1 [160], [301], [306]–[310].

En nuestro estudio no se encontró variación en la expresión de **CD44** entre el tejido normal y el tumoral, como se ha descrito previamente (Lugli et al., 2010), aunque también hay discrepancias con otros estudios. Únicamente hemos encontrado expresión de **CD133** en tejido tumoral, lo que coincide con la literatura, en la que se describe que empieza a expresarse en pólipos incipientes precancerosos y pólipos asociados al tumor, pero no en tejidos normales o pólipos no cancerosos [312]. Además, se dispone de estudios que correlacionan la expresión de ARNm con la expresión de la proteína mediante IHQ y con el anticuerpo empleado en nuestro estudio [313], [314].

En el caso de las proteínas del reloj circadiano central, no solo hemos encontrado diferencias de expresión entre tejido normal y tumoral, sino que algunas de ellas también mostraron diferente expresión entre los tumores de colon y recto, e incluso entre las distintas localizaciones en colon. Por ejemplo, la expresión de **PER1**, **CRY1** y **CD133** va desde el colon proximal, al colon distal y recto, y, mientras que, **PER2** va **aumentando** su expresión desde el colon ascendente hacia el colon descendente y recto. Se han descrito las mismas diferencias para algunas de las proteínas estudiadas como PER2 y CD133 [315], aunque para muchas de ellas no hay estudios o son discrepantes, por emplear diferentes técnicas de análisis, tipo y número de muestras.

Estas variaciones se deben no solo a las diferencias embriológicas, biológicas y anatómicas entre el colon y el recto [19], [20], sino también a la existencia de bucles de retroalimentación específicos de cada tejido [97], [105], y lo que podría indicar que cada proteína del reloj está más implicada en el desarrollo de carcinogénesis dependiendo del tejido.

Una aproximación para determinar los bucles de retroalimentación específicos en cada tejido es el análisis de la correlación en la expresión entre las proteínas. Si las proteínas del reloj central y marcadores de células madre, están desregulados en tumores, parece lógico que los bucles de retroalimentación y las interacciones entre ellos también lo estén, y que observemos cambios con respecto las interacciones en su expresión. De hecho, en tejido normal encontramos una correlación positiva entre la mayoría de las proteínas, especialmente entre **PER2-CRY1-NR1D2-CD44**, de forma que cuando aumenta la expresión de una lo hace la de otra y viceversa. Y solo encontramos correlaciones negativas en tejido normal entre las proteínas **PER3-BMAL1**.

Para algunos tejidos como riñón, glándulas adrenales, tejido nervioso e hígado, se ha determinado la existencia de bucles “esenciales” específicos (Pett et al., 2018), x que se caracterizan por disponer un represor o activador principal. De acuerdo a las interacciones identificadas en mucosa colónica normal, los bucles o reguladores esenciales podrían girar en torno a PER2, CRY1, NR1D2 y BMAL1. Al analizar el tejido de CCR encontramos que el coeficiente de muchas estas interacciones o correlaciones aumenta con respecto al tejido normal, y, además, algunas de ellas invierten su relación. Algunas diferencias encontradas son la interacciones **PER1-BMAL1**, **PER1-NR1D2** y **PER1-CD44**, en las que la interacción o correlación es negativa, es decir, cuanto la expresión de una proteína aumenta la otra disminuye; por otro lado, las relaciones entre **PER3-BMAL1** y **CRY1-NR1D2** desaparecen en tejido tumoral, y por último, destaca la interacción entre **CRY1-CD44** que en tejido normal era significativa positiva y en tejido tumoral encontramos que cuando aumenta la expresión de CRY1 disminuye significativamente la expresión de CD44, o viceversa.

También se encontraron diferencias entre la interacción de las proteínas entre colon y recto, como **PER3-CRY2** y **CD133-PER1** que se invierten la correlación significativamente. Por último, correlaciones de **CD44** con otras proteínas solo fue significativa en colon.

Hay que tener en cuenta que las células cancerígenas no sólo presentan una represión de los genes individuales del reloj circadiano, sino que también se ha demostrado que la co-expresión coordinada de los genes del reloj circadiano está comprometida [316]. En circunstancias normales, los genes CRY y PER muestran patrones de expresión temporal altamente coordinados, ya que sus productos proteicos se homo- y heterodimerizan y funcionan juntos en el bucle de retroalimentación reguladora negativa del reloj circadiano [317], [318]. Cadenas et al. encontraron que, cuanto más agresivo y metastásico es el tumor, menor es la correlación entre la expresión de los genes CRY y PER, en particular, entre CRY2 y PER3, o PER2 y PER3 [316]. De hecho, la ausencia de un coeficiente de correlación negativa entre los genes BMAL y PER, como el que observamos en nuestra cohorte, se ha descrito que en los tumores de alto grado en el cáncer

de mama más desdiferenciado, apoyando la idea de que el bucle de retroalimentación negativa del reloj circadiano es menos robusto [316]. Otro ejemplo similar al anterior, una menor expresión de PER2 en los tumores daría lugar a una reducción de los dímeros PER2-CRY en favor de los dímeros TIMELESS-CRY1. Esto podría antagonizar la capacidad de los heterodímeros PER-CRY para regular la expresión de genes clave implicados en la proliferación, como c-Myc y las ciclinas D1, B1 y A2 [319], [320]. Se ha mostrado que los tumores con poco tiempo hasta la metástasis en cáncer de mama mostraron coeficientes de correlación más bajos que los tumores sin metástasis [316].

No se dispone de estudios de correlación similares en CCR, salvo el de Huang et al. [321] en el que, analizando perfiles de expresión de ARNm procedente de la base de datos COAN, encontró correlación positiva entre todas las proteínas del reloj en tumores de colon. Tampoco hay estudios de correlación mediante inmunohistoquímica que identifiquen los cambios que se producen en la expresión a nivel de proteína, y sus diferencias entre tejidos normales y tumorales en colon y recto.

Las proteínas en las que hemos encontrado que cambian su correlación en tejido tumoral frente al tejido normal podrían explicar la asociación que hemos identificado entre estas proteínas con la progresión de la enfermedad y la supervivencia, como trataremos más adelante, lo que sugiere que éstas sean los osciladores (activadores-represores esenciales) alterados en el CCR, y, por tanto, los que desempeñan un papel dominante en el desarrollo de este tipo de cáncer.

Al analizar la expresión de cada una de las proteínas con las **características clínico-patológicas de los pacientes**, encontramos que todas ellas guardan relación con al menos una variable, y en general, se ha encontrado que la pérdida o disminución de la expresión de las proteínas del reloj circadiano central están asociadas a variables clínico-patológicas que apuntan a tumores con peor pronóstico, es decir, menor grado de diferenciación, más invasividad del tumor, estadios avanzados, presencia ganglios afectados o de metástasis al diagnóstico.

Este aspecto ha sido ampliamente estudiado en una amplia gama de cánceres, incluyendo el CCR [310], [322], [323]. Las variantes polimórficas de estos genes circadianos podrían contribuir al riesgo de un individuo de desarrollar cáncer [324]–[328]. Las interacciones entre las células del cáncer de colon y los fibroblastos asociados al tumor también pueden ser responsables de la alteración del reloj molecular, que potencia los fenotipos malignos de las células cancerígenas [329]. Otros estudios han demostrado la presencia de un bucle de retroalimentación entre el reloj circadiano y la maquinaria epigenética en el cáncer [305], [330], [331].

La única excepción a la descenso de la expresión de las proteínas del reloj en el CCR parece ser PER3, donde se ha demostrado que su expresión **elevada** se asocia al **diagnóstico** con peor pronóstico, adenocarcinomas tipo mucinoso, papilares y anillo de sello. Sin embargo, la expresión de PER3 es tan baja que en la mayoría de los tumores no se observa tinción. De hecho, el 90% de los tumores no expresa PER3 (n=231) y, por el contrario, en tejidos normales, el 90% tiene una expresión elevada. Diversos estudios relacionan PER3 con la diferenciación tumoral y la progresión del cáncer colorrectal [332]. Se ha descrito su papel como supresor tumoral en CCR, a través de su interacción ATM y Chk2 (checkpoint kinase 2) [302], [333], su papel pro-apoptótico [332], [334], y su relación en la regulación del fenotipo “stem” [284] mediante la inhibición de la autorenovación de las CMCs [285].

En el caso de **PER1** encontramos que su expresión disminuye significativamente en **estadios avanzados** de la enfermedad. También se encuentra **descenso de la expresión de PER2** en mujeres, y asociado a variables con peor pronóstico, como el **diagnóstico** (tipo mucinoso, papilares y anillo de sello), tumores moderada y **pobrementemente diferenciados**, y también disminuye su expresión con presencia de **metástasis al diagnóstico**. Esto concuerda con algunos estudios previos, aunque no todos encuentran relación con las mismas variables clínicas. En general coinciden en que menor expresión PER está ligado a mayor tamaño o invasión del tumor [321], [335], con la transición epitelio-mesénquima [153] y menos supervivencia global [336]. Y en algún caso se ha asociado baja expresión de PER1 con presencia de metástasis en hígado [315].

Son varios los estudios en los que asocian la baja expresión de CRY1 o de CRY2 con variables clínicas con peor pronóstico, como la localización del tumor; y relacionan elevada su elevada expresión a menos supervivencia global [305], [307], [337], coincidiendo también nuestros resultados, como trataremos más adelante; parecen además proteínas bastante relacionadas con la edad y sexo [336], [337]. En nuestra cohorte **CRY2** solo aparece asociado al sexo, con **menos expresión en mujeres**.

De igual modo, **BMAL1** se expresa menos en **mujeres**, y un descenso de su expresión se asocia al **diagnóstico** (adenocarcinomas tipo mucinoso, papilares y anillo de sello), presencia de **metástasis al diagnóstico** y **estadios avanzados** de la enfermedad (estadios III y IV). Por último, no se encontró ninguna asociación significativa de **NR1D2** con la variables clínico-patológicas.

Al analizar la asociación de expresión de las proteínas analizadas del reloj central con las **variables clínico-patológicas en tumores de colon y recto por separado**, se encontró que algunas de las asociaciones se perdían en tumores de recto, lo que quizás se explique por el menor número de casos con respecto a la cohorte global.

En el caso de PER2 aparecen algunas diferencias entre tejidos, pero en todos los casos es un descenso de la expresión de la proteína lo que está asociado a las variables con peor pronóstico. Sin embargo, al diferenciar tumores de colon y recto, encontramos asociación de **NR1D2_{Low}** con tumores pobremente diferenciados, pero solo en tumores de colon. Y destaca especialmente la diferencia encontrada para PER1, ya que, en tumores de colon **PER1_{Low}** está asociado a la metástasis al diagnóstico, mientras que en tumores de recto la presencia de metástasis está asociada a **PER1_{High}**. Como trataremos más adelante, encontramos que estas diferencias están relacionadas con la progresión de la enfermedad.

Está descrito que la sobreexpresión de genes circadianos específicos inhibe las características del cáncer, como la proliferación, la migración y la invasión y suprime el crecimiento tumoral [159], [285], [303], [338], [339], lo que pone de relieve la importancia de la desregulación del reloj circadiano en la biología del cáncer.

La regulación a la baja de los genes del reloj circadiano en las células cancerígenas se asocia con frecuencia a la **hipermetilación** de las regiones promotoras de estos genes. Se ha encontrado hipermetilación de los promotores de los genes del reloj circadiano PER1 PER2, CRY1 o BMAL1. Además, en tumores donde BMAL1 está silenciado epigenéticamente en determinados tipos de cáncer, el tratamiento mediante inhibidores de la metilación regenera los ritmos circadianos endógenos a través del restablecimiento de la expresión de BMAL1 [162], [340]–[342].

Otro factor que influye en la expresión de los genes del reloj es su relación con **p53**. p53 regula la expresión de PER2 bloqueando la unión de BMAL1/CLOCK al promotor de Per2, conduciendo a la represión de la expresión de Per2 [176], [343].

También se han identificado varios reguladores importantes del ciclo celular como genes controlados por el reloj y es probable que estos genes contribuyan a la alteración del ciclo celular tras la interrupción del reloj circadiano. Por un lado, la **expresión** de CICLINA D1 y la CICLINA E esenciales en la progresión del ciclo celular, **aumentan cuando se suprime la expresión de los genes del reloj circadiano**, facilitando una mayor proliferación celular. Por otro lado, los reguladores negativos del ciclo celular como WEE1, p21 o p16 muestran igualmente ritmos circadianos. El dímero CLOCK/BMAL1 induce la transcripción de **WEE1** (que actúa para inhibir CDK1 y CDK2)[344], y BMAL1 regula indirectamente la transcripción de p21, a través de su regulación de **REV-ERB α / β** y ROR α / γ [338], [345].

c-MYC es un gen clave controlado por el reloj que influye en la progresión del ciclo celular y desempeña un papel importante en el mantenimiento de los cambios que se producen con la transformación celular, a través de su control tanto del crecimiento celular como del metabolismo

[346]. Los tumores con menos expresión de PER2 y tumores mutantes para PER2 y BMAL1 presentan más expresión de c-MYC, que es un factor clave en la progresión del ciclo celular [122] y tumorigénesis [347]. Curiosamente, la expresión desregulada de MYC altera el reloj molecular al amortiguar las oscilaciones del gen BMAL1, lo que revela la regulación recíproca de c-MYC y el reloj circadiano [347].

Finalmente, en relación a la expresión de **marcadores de CMCs** y su relación con las **variables clínico patológicas** de los pacientes de la cohorte, no se encontró ninguna asociación con la expresión de **CD44**, y solo se encontró asociación entre la disminución de **CD133** con el sexo (menos expresión en mujeres), y pérdida de expresión en tumores moderada y **pobrementemente diferenciados**. Sin embargo, al diferenciar tumores de colon y recto, sí encontramos asociación de **CD44_{Low}** con la metástasis al diagnóstico, solo en tumores de colon, y la asociación de CD133 con el grado de diferenciación se pierde en tumores de recto.

A pesar de los numerosos estudios que se han publicado en los últimos años con respecto a marcadores de células madre en CCR, siguen existiendo controversias en cuanto a su expresión, su asociación con variables clínicas y su valor pronóstico. Muchos estudios coinciden en un aumento en la expresión de estos marcadores en tumores con peor pronóstico, en algunos casos se asocia con un menor grado de diferenciación, o con mayor invasión del tumor (T4), la localización en recto vs colon, y otros, con la progresión de la enfermedad [312]–[314]. Sin embargo, hay muchos otros estudios que no encuentran asociación con las variables clínico-patológicas, o, por el contrario, asocian la pérdida de expresión con la agresividad y/o progresión tumoral [268], [311], [348], [349].

Las discrepancias encontradas entre los estudios parecen deberse a que, la investigación del papel que desempeña CD133 y el CD44 en el cáncer se ha basado en el uso de métodos inmunohistoquímicos para detectar la expresión de la proteína y en la citometría de flujo para clasificar las células positivas, y una de las principales limitaciones de ambos métodos es que requieren el uso de anticuerpos para la identificación precisa de las células. CD133 es una glicoproteína con múltiples estructuras de N-glicanos, muy sensible a la modificación de la glicosilación, que puede influir en la unión de los anticuerpos, así como la aparición de epítopos inaccesibles debido al *splicing* alternativo [350]–[352]. Igualmente, CD44 es otra glicoproteína transmembrana con varias isoformas originadas mediante *splicing* alternativo. Los diferentes papeles funcionales de las isoformas CD44 estándar (CD44s) y las variantes específicas de CD44 (CD44v) no se comprenden del todo. Las CD44v contienen motivos peptídicos adicionales que pueden interactuar con factores de crecimiento y citoquinas y secuestrarlos en la superficie celular, funcionando, así como correceptores para facilitar la señalización celular. Además, los

CD44v se suelen expresar en los tumores con metástasis, mientras que el cambio entre CD44v y CD44s puede desempeñar un papel en la regulación de la transición epitelial a mesenquimal (EMT) y en la plasticidad adaptativa de las células cancerosas. Además de las diferentes isoformas, parece también importante tener en cuenta la localización de la expresión, membranosa o membranosa-citoplasmática, que también puede influir en su empleabilidad como marcador de CMCs o de TEM [263], [348].

Uno de los problemas más desafiantes en oncología es el proceso de toma de decisiones en relación con el tratamiento de los pacientes, ya que los resultados de supervivencia varían incluso en pacientes con características clínicas o patológicas similares. Una de las características más importantes para la aplicación de terapias adyuvantes es la extensión de la enfermedad, la presencia de **metástasis distales en el momento del diagnóstico**.

En este sentido, hemos encontrado que un **descenso de la expresión de BMAL1** no solo está asociado a tumores menos diferenciados, estadios avanzados de la enfermedad y a la presencia de metástasis distales al diagnóstico, sino que se ha determinado el efecto y encontrado que es un marcador independiente, junto a la presencia de ganglios afectados. Una disminución de la expresión de BMAL1 aumenta el riesgo proporcional en 2.26 veces de que haya **metástasis distales en el momento del diagnóstico**, y esto permite alertar de la presencia de **metástasis subclínicas**, y personalizar el abordaje de las terapias adyuvantes.

En algunos tumores, entre ellos algunos estudios en CCR y LMA, la expresión de Clock y Bmal1 elevada se ha mostrado necesaria para el crecimiento y proliferación celular [315], [353], [354]. Sin embargo, todos los datos sugieren que el dímero CLOCK/BMAL1 desempeñan funciones protectoras de los tumores, aunque estas funciones pueden ser específicas del contexto y de la enfermedad.

Se ha demostrado que Bmal1 regula las vías de las células madre intestinales, incluyendo la señalización de Hippo, aumenta la autorrenovación de manera dependiente de la proteína asociada a Yes, y la pérdida del ritmo circadiano potencia la iniciación del tumor [242], [355]. También existen pruebas significativas que sugieren que Bmal1 también sirve para restringir el desarrollo de ciertos tumores, y la supresión de la expresión de Bmal1 aumenta significativamente el potencial de metástasis. Estas cualidades supresoras de tumores de BMAL1 podrían producirse a través de la regulación del eje de señalización PI3K-AKT [356], [357], vía fosforilación de BMAL1, lo que permite que BMAL1 se asocie con la maquinaria de traducción y estimule la síntesis de proteínas para influir en la tumorigénesis [124], [358]. **BMAL1** regula la transcripción rítmica de

WEE1 controlando la de WEE2 de manera suficiente para controlar la **detención del ciclo celular**. [169]–[171].

Por otro lado, en CCR la sobreexpresión de BMAL1 aumenta la sensibilidad del cáncer a regímenes basados en OXA (FOLFOX o XELOX), aumenta la supervivencia sin progresión y la supervivencia global de los pacientes. Mecánicamente, el efecto de Bmal1 se asocia a su capacidad para regular la detención G2-M mediante la activación de la vía ATM aumentando la apoptosis y la necrosis en respuesta al OXALIPLATINO [303], y también se ha descrito mejor respuesta al IRINOTECAN [359]. La supresión de Bmal1 suprime la activación de p53 inducida por la radiación, liberando a las células de la detención del ciclo celular [189].

Las evidencias en relación a BMAL1 en cuanto a sus cualidades supresoras, regulación de la diferenciación y resistencia a los tratamientos quimioterápicos empleados en primera línea, lo hacen uno de los marcadores más interesantes a tener en cuenta para el manejo de los pacientes con CCR, por el riesgo de presencia de metástasis subclínicas.

Las diferencias que encontramos entre PER1Low y PER1High asociados a metástasis distales en el momento del diagnóstico en colon y recto, no se explican solo por diferencias de expresión en la localización, ya que pocos estudios encuentran diferencias significativas, y no hay estudios en los que se comparen ambos tejidos. Esta expresión diferencial de PER1 en colon y recto podría explicar a su vez, las diferencias que se observan cuando se estudia la expresión de proteínas después de tratamientos quimio y radioterápicos. Solo algunas proteínas modifican su expresión con respecto al tumor primario en recto tras tratamiento, PER2, CRY2 y Clock; y no se modifica la expresión PER1, CRY1 y BMAL1 [360], lo que de nuevo podría indicar qué proteínas son los reguladores principales en cada tipo de tejido. De hecho, los cánceres colorrectales del lado derecho no se benefician de las terapias antiEGFR [20].

También hemos encontrado importantes evidencias del papel de las proteínas del reloj en la **progresión de la enfermedad**, tanto en la aparición de **metástasis distales tras el diagnóstico**, como la **aparición de recidivas locales** y en el **tiempo de supervivencia libre de enfermedad**.

La **expresión elevada de CRY1** ha resultado un marcador específico de aparición de **metástasis distales tras el diagnóstico en CCR**, aumentando el riesgo de aparición de metástasis antes de los 3 años en 5.06 veces y en 4.44 veces antes de los 5 años.

Al analizar **recidivas locales tras el diagnóstico**, encontramos que **NR1D2 elevado** y una expresión **baja de CD44** también se ha mostrado como factor pronóstico para la aparición de recidivas locales.

Y, por último, al analizar el tiempo de aparición de cualquiera de los dos eventos, independientemente de que sean por metástasis distales o recidivas encontramos que **CRY1high y CD44low**, son factores que disminuyen **tiempo libre de enfermedad** a 3 y 5 años.

Y en tumores de colon se han encontrado tres marcadores de riesgo independientes, **CRY1High, CD44Low y PER1Low**. En nuestro estudio, la expresión de CD44Low está asociada a metástasis al diagnóstico solo en tumores de colon. Por otro lado, PER1 disminuía su expresión en tumores de colon y aumentaba en tumores de recto. De ahí que CD44 y PER1 aparezcan también como marcadores en tumores de colon y no en tumores de recto. Esto, por un lado, permite emplear CRY1 como marcador de progresión de la enfermedad ligada a la aparición de metástasis tras el diagnóstico en CCR independientemente del órgano o localización de tumor primario. En el caso de tumores de colon se pueden emplear solo o juntos a CD44low y PER1low, y hace necesario llevar a cabo estudios en cohortes de tumores colorrectales para confirmar si en tumores de recto es la sobreexpresión de PER1 también aumenta el riesgo de aparición de metástasis.

Al igual que otras proteínas centrales del reloj circadiano, existen discrepancias en la literatura sobre la expresión de CRY1 en el tejido tumoral frente a la mucosa normal. Estudios anteriores han demostrado una disminución de CRY1 en los tumores en comparación con la mucosa normal [337], lo que coincidiría con nuestros resultados. Sin embargo, otros autores han encontrado lo contrario [336] y asocian una expresión elevada con un TNM avanzado y ganglios afectados [305]. Es muy importante tener en cuenta que la expresión de CRY1 cambia a lo largo del tracto colónico [305], [337] y también está relacionada con la edad y el género [307], [330]. Por tanto, la expresión de CRY1 está condicionada por estos dos aspectos y explicaría las diferencias encontradas entre los diferentes estudios.

A nivel molecular, las mutaciones del gen Cry1 en ratones provocan una baja expresión de la proteína CRY1 y la regulación a la baja de c-MYC [361], que es esencial para la tumorigénesis colorrectal [362]. Otros estudios han demostrado que CRY1 modula la reparación del daño en el ADN mediada por ATR, aumentando la supervivencia de las células [172]. La expresión ectópica de CRY1 y CRY2 dio lugar a una reducción de la apoptosis, un aumento de la proliferación y una respuesta diferente al 5-fluorouracilo y al oxaliplatino [307]. También se ha demostrado resistencia al cisplatino en células con CRY1High en tumores de vejiga; desde un punto de vista mecanístico, CRY1 actúa promoviendo la degradación de p53, permitiendo a la célula escapar a la senescencia que induce el cisplatino [363].

Experimentalmente se ha demostrado que la sobreexpresión de CRY1 promueve la proliferación y migración, y, por el contrario, el descenso de la expresión inhibe la formación de colonias [305] por lo que podría ejercer un papel en la regulación de las CMCs.

Estudios previos sugieren que una vía mediada por Cry1-cAMP/PKA-RhoA está implicada en la migración y la metástasis del CCR, y se apuntaban que podía ser empleado como marcador para determinar la progresión del CCR, al encontrar relación con TNM, ganglios afectados y en algunos estudios también ligado a supervivencia global.

Nuestro estudio confirma que no solo puede ser un marcador de progresión, sino que es un marcador de riesgo de aparición de metástasis distales tras el diagnóstico.

Por otro lado, en nuestro estudio encontramos una fuerte correlación positiva entre CRY1 y CD44 en tejidos normales, que en los tejidos de CCR se invertía de forma significativa. Parece por tanto que pueda existir alguna relación entre la elevada expresión de CRY1 y la baja expresión de CD44 que encontramos asociada a la progresión de la enfermedad. Además de aparición de metástasis distales, encontramos CD44Low, asociado a la aparición de recidivas locales, y los pacientes con CRYHigh-CD44Low muestran menores tiempos de supervivencia libre de enfermedad. Hasta el momento se desconoce el mecanismo molecular que pueda estar detrás de esta asociación.

Un candidato podría ser p53. Se ha encontrado que la expresión de CD44 en mucosa normal y tumor es dependiente de estado de p53 (mutado o salvaje) encontrando además interacciones con las vías de síntesis de melatonina [364], [365]. P53 inhibe la expresión de la molécula de superficie celular CD44 mediante la unión a una secuencia no canónica de unión a p53 en el promotor de CD44 [365]. La expresión de CD44 también está relacionada con las vías de β -catenina y AKT en las células de cáncer de mama y de cuello de útero. La inhibición tanto de la expresión de β -catenina como de la vía AKT suprime la expresión de **CD44** [366]. Otros mecanismos descritos en la regulación de la expresión de CD44 son los miARN [367], [368], la hipermetilación [369] y la regulación postranscripcional. En este sentido, el cambio de isoformas de CD44 contribuye a la metástasis del cáncer. La isoforma CD44s promueve la EMT y su eliminación la inhibe. La proteína reguladora del splicing epitelial 1 (ESRP1) es esencial para promover la inclusión de exones de las isoformas de CD44 y necesaria para la expresión de las isoformas CD44v [370]. La disminución de la expresión de expresión de ESRP1 da lugar al cambio de expresión de CD44v a CD44s. La eliminación transitoria de CD44 en las células de cáncer de colon humano dio lugar a la regulación al alza de AKT, mientras que la sobreexpresión de isoformas variantes de CD44, como v3-10 o v8-10, provocó la desactivación de AKT [370]–[372].

La evidencia creciente sugiere también una asociación entre la regulación del splicing alternativo y el reloj circadiano en varios organismos, en particular en los mamíferos [117], [373]. Trabajos recientes apuntan a una compleja interacción entre el reloj circadiano y los eventos de splicing alternativo que subyacen a diferentes tipos de cáncer, incluido el CCR [374], [375]. El silenciamiento de BMAL1, NR1D1 y PER2 provocaron cambios en el espliceosoma de diversas proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular y la EMT, incluido CD44 que fue modificado por NR1D1 [376].

Por último, el microambiente tumoral desempeña un papel activo en la promoción de la progresión del tumor, ya que el factor de crecimiento o el ligando secretado por los CAF (cancer-associated fibroblasts), puede interactuar con CD44 causando un fenotipo maligno o desencadenando la señalización descendente que promueve el tumor y contribuye al mantenimiento de las poblaciones de células madre cancerígenas en el microambiente tumoral [377].

Aunque CD44 es un reconocido marcador de células madre tumorales, su expresión en tumores sigue siendo controvertida. Por un lado, se espera que como marcador de CMT solo esté presente en un pequeño porcentaje de la población tumoral, de hecho, muchos estudios refieren que la expresión de CD44 elevado se ciñe solo a células metastásicas, encontrando poca expresión en tumor [314], y, sin embargo, otros estudios observan expresión en elevada en tumores, pero no identifican a CD44 por sí solo como marcador ([349], [378], y por último, estudios para explicar el papel del CD44 en la progresión tumoral mediante análisis in vitro [379]. Como hemos comentado anteriormente, las discrepancias en cuanto a la expresión de CD44 y su relación con el pronóstico del CCR puede aún deberse a las distintas variables de CD44 y la diferentes técnicas determinación. No se dispone de muchos los estudios que mediante que inmunohistoquímica determinen la relación de las diferentes variantes de CD44 con progresión de la enfermedad en grandes cohortes de pacientes.

La **recidiva local** se ha asociado clásicamente con células tumorales viables que permanecen in situ tras la resección del tumor. Esto puede deberse a una técnica operatoria deficiente o a una biología más agresiva de los tumores en los que las células viables han escapado a los límites de la resecabilidad [287], [380]. Más recientemente, factores tumorales como la enfermedad localmente agresiva, la obstrucción o los múltiples ganglios linfáticos positivos se han relacionado con altas tasas de recidiva local, más que con la adhesión a los principios quirúrgicos oncológicos en la resección del cáncer de colon [287]. Hemos identificado una **alta expresión de NR1D2** en el tumor como un factor pronóstico independiente para el desarrollo de recidiva local. Al igual que en el caso de CRY1, aunque la expresión de NR1D2 estaba reducida en el tejido

tumoral en comparación con la mucosa normal, los pacientes con una mayor expresión de esta proteína también presentan un riesgo mayor, de desarrollar recidiva local. NR1D2 es una variante de NR1D1 y se han descrito funciones redundantes de ambas proteínas en la regulación del ritmo circadiano, el metabolismo y la respuesta inflamatoria [331]. Sin embargo, mientras que NR1D1 es más abundante en los tejidos normales, la NR1D2 es la variante principal en varias células cancerosas humanas y NR1D2 tiene un papel regulador dominante en la represión de sus genes diana; el silenciamiento de NR1D2 tiene efecto sobre la expresión de genes del reloj y otros genes relacionados con el metabolismo, mientras que el silenciamiento de NR1D1 no tiene ningún efecto en este sentido [381].

El NR1D2 regula la proliferación y la motilidad de las células del glioblastoma [382], acelera la progresión del carcinoma hepatocelular al impulsar la transición epitelial a mesenquimal [383], y está implicado en la proliferación y diferenciación de las células madre neuronales, regulando la expresión génica de las ciclinas [384].

Recientemente, también se ha implicado en los mecanismos de resistencia al tratamiento en el cáncer de próstata [385] y se está explorando como diana terapéutica por su importante papel en la regulación del metabolismo celular y la autofagia [212], [381].

NR1D2 se expresa de forma muy similar en muchos tejidos, lo que indica que es un componente crucial en el reloj molecular, que regula la transcripción de Bmal1. Su alteración no desencadena una disrupción del ritmo, pero sí una represión de BMAL1 [109], [386].

Al analizar la supervivencia global, encontramos que uno de los marcadores de menor supervivencia es la **expresión elevada de CD133**, para el que no se ha encontrado asociación con progresión de la enfermedad, y la única asociación encontrada con variables clínicas-patológicas es la diferenciación tumoral. Al igual que CD44 y otros marcadores descritos como CMCs, existe cierta controversia en su papel para la carcinogénesis y progresión, y ciertos análisis in vitro para determinar el potencial como marcador de CMCs se ha encontrado que en algunos casos los tumores más agresivos eran aquellos que no expresaban CD133 [387], [388]. Sin embargo, numerosos estudios clínicos recientes han indicado que CD133 presenta un valor pronóstico significativo para predecir la supervivencia de los pacientes con cáncer colorrectal [349], [389]–[393].

En nuestro estudio hemos encontrado, que **son marcadores de supervivencia global** tanto a 3 como a 5 años **CYR1^{High} y CD44^{Low}**, coherente los todos resultados previos, ya que CRY1^{High} ha mostrado una fuerte asociación con la aparición de metástasis tras el diagnóstico y

recaídas en la enfermedad. Por otro lado, CD44^{Low} también se encontró asociación con la recidiva local, las recaídas, y en el caso de tumores de colon también con la aparición de metástasis a los 3 y 5 años tras el diagnóstico, coincidiendo además ambos marcadores con los resultados de supervivencia libre de enfermedad. Hemos encontrado además que también son marcadores la expresión **CYR1^{High} y CD133^{High}**.

En nuestro estudio encontramos una interacciones entre las proteínas del reloj circadiano y los marcadores de células madre en relación a la progresión, supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global al CCR. Los estudios sugieren que los genes utilizados para generar los ritmos circadianos también sirven para regular la TEM así como los procesos de diferenciación, y desdiferenciación [276], [305], [307], [336]. La mayoría de los factores centrales del reloj se expresan a niveles más bajos en las células madre pluripotentes en comparación con las células diferenciadas, **pero Cry1 es una excepción**, ya que los niveles de expresión son más altos en las células madre (Dierickx et al., 2017; Umemura et al., 2017). Por otro lado, se ha encontrado relación entre la capacidad regenerativa y producción de células progenitoras CD24⁺ y CD133⁺, con el reloj circadiano [395] y el aumento de las células tumorales circulantes y metástasis durante la noche [204]. En estudios in vitro se ha demostrado un aumento de marcadores de células madre OCT4, nestina, MSI1 y CD133, condicionados al estado de PER2 [276], la inhibición de la capacidad autorrenovación de las CMC con sobreexpresión de PER3 [285], y la disminución de la expresión de CD44 y CD133 mediante la inhibición de CLOCK [396].

Los agonistas de moléculas pequeñas de dos reguladores negativos independientes de BMAL1-CLOCK, los criptocromos y los REV-ERB, regulan a la baja los factores de las células madre y reducen el crecimiento de las GSC. En estos estudios, además de la relevancia clínica, se mostró que la intervención farmacológica en las redes circadianas interrumpió específicamente el crecimiento y la autorrenovación de las células madre cancerígenas [283].

Aunque no se ha encontrado ningún estudio hasta el momento, que explique el mecanismo que subyace tras la relación entre CRY1, CD44 y CD133, nuestros resultados muestran que no solo existe relación entre los marcadores del reloj y los marcadores de células madres, sino que esta asociación es determinante para la progresión y pronóstico del cáncer colorrectal.

6 CONCLUSIONES

De este estudio pueden obtenerse las siguientes conclusiones:

1. Las proteínas del reloj circadiano central PER1-3, CRY1, NR1D2 Y CLOCK y el marcador de CMCs CD133 podrían utilizarse para discernir entre muestras normales y tumorales en el CCR, según se extrae de los datos obtenidos de las curvas ROC.
2. Las diferencias observadas en la correlación de la expresión entre las diferentes proteínas en tejido tumoral y tejido normal de colon indican cambios en la regulación de los ciclos retroalimentados de transcripción traslación que controlan su expresión, lo que lleva también a cambios en la regulación de los marcadores de CMCs y, por tanto, a su fenotipo.
3. Nuestros resultados demuestran que existen diferencias claras en la regulación de la progresión y el pronóstico de la enfermedad por parte de las proteínas del reloj circadiano y los marcadores de CMCs en colon y en recto.
4. La proteína BMAL1 podría considerarse como un marcador de metástasis al diagnóstico en cáncer de colon, mientras que en cáncer de recto el marcador sería la proteína PER1. Esto tendría aplicabilidad clínica en el manejo de estos pacientes permitiendo terapias personalizadas, ya que, permitiría detectar metástasis subclínicas (ocultas o microscópicas) que, mediante otras técnicas no sería posible.
5. La proteína CRY1 parece ser un marcador de pronóstico de desarrollo de metástasis a 3 y 5 años en CCR en general y específicamente en tumores de colon, junto a la proteína CD44.
6. Las proteínas NR1D2 y CD44 podrían considerarse marcadores de desarrollo de recidiva local a los 3 y 5 años del diagnóstico de la enfermedad, en el total de casos de CCR y específicamente en cáncer de colon, sin incluir casos de cáncer de recto.
7. CRY1 y CD44 podrían actuar como marcadores de supervivencia libre de enfermedad a los 3 y 5 años después del diagnóstico de la enfermedad en todos los casos y específicamente en cáncer de colon.
8. CRY1 y CD133 podrían considerarse marcadores de supervivencia global a los 3 y 5 años después del diagnóstico de la enfermedad en todos los casos y específicamente en cáncer de colon.
9. Los resultados obtenidos con los anticuerpos utilizados para los marcadores de CMCs, aunque son concordantes con la literatura al respecto en estudios de expresión realizados mediante IHQ, al menos en el caso de CD44, no podemos considerar que un aumento de la proteína sea indicativo de mayor probabilidad de aparición de metástasis y recidiva en estos pacientes, y, por tanto, de un cambio hacia un fenotipo más agresivo de las CMCs, al menos en nuestra cohorte.

7 BIBLIOGRAFÍA

- [1] S. E. de Oncología Médica, “Las cifras del cáncer en España 2021.” 2021. [Online]. Available: https://seom.org/images/Cifras_del_cancer_en_Espana_2021.pdf
- [2] J. Ferlay *et al.*, “Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods,” *Int J Cancer*, vol. 144, no. 8, pp. 1941–1953, Apr. 2019, doi: 10.1002/IJC.31937.
- [3] “Global Cancer Observatory.” [Online]. Available: <https://gco.iarc.fr/>
- [4] E. Dekker, P. J. Tanis, J. L. A. Vleugels, P. M. Kasi, and M. B. Wallace, “Colorectal cancer,” *The Lancet*, vol. 394, no. 10207, pp. 1467–1480, Oct. 2019, doi: 10.1016/S0140-6736(19)32319-0.
- [5] “Cancer Tomorrow.” https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype?types=1&single_unit=500000 (accessed Aug. 10, 2022).
- [6] E. Botteri, S. Iodice, V. Bagnardi, S. Raimondi, A. Lowenfels, and P. Maisonneuve, “Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis,” *JAMA*, vol. 300, pp. 2765–2778, 2008.
- [7] S. Cai, Y. Li, Y. Ding, K. Chen, and M. Jin, “Alcohol drinking and the risk of colorectal cancer death: A meta-analysis,” *European Journal of Cancer Prevention*, vol. 23, no. 6, pp. 532–539, Nov. 2014, doi: 10.1097/CEJ.0000000000000076.
- [8] D. Chan, R. Lau, D. Aune, and *et al.*, “Red and processed meat and colorectal cancer incidence: meta-analysis of prospective studies,” *PLoS One*, vol. 6, 2011.
- [9] M. Kyrgiou, I. Kalliala, G. Markozannes, and *et al.*, “Adiposity and cancer at major anatomical sites: umbrella review of the literature,” *BMJ*, vol. 356, p. j477, 2017.
- [10] G. Nakatsu, X. Li, H. Zhou, and *et al.*, “Gut mucosal microbiome across stages of colorectal carcinogenesis,” *Nat Commun*, vol. 6, 2015.
- [11] T. Kwong, X. Wang, G. Nakatsu, and *et al.*, “Association between bacteremia from specific microbes and subsequent diagnosis of colorectal cancer,” *Gastroenterology*, vol. 155, p. 383, 2018.
- [12] N. Henrikson, E. Webber, K. Goddard, and *et al.*, “Family history and the natural history of colorectal cancer: systematic review,” *Genet Med*, vol. 17, pp. 702–712, 2015.
- [13] R. Schoen, A. Razzak, K. Yu, and *et al.*, “Incidence and mortality of colorectal cancer in individuals with a family history of colorectal cancer,” *Gastroenterology*, vol. 149, p. 1438, 2015.
- [14] K. Czene, P. Lichtenstein, and K. Hemminki, “Environmental and heritable causes of cancer among 9.6 million individuals in the Swedish Family-Cancer Database,” *Int J Cancer*, vol. 99, pp. 260–266, 2002.
- [15] S. Jiao, U. Peters, S. Berndt, and *et al.*, “Estimating the heritability of colorectal cancer,” *Hum Mol Genet*, vol. 23, pp. 3898–3905, 2014.
- [16] S. Syngal, R. Brand, J. Church, and *et al.*, “ACG clinical guideline: genetic testing and management of hereditary gastrointestinal cancer syndromes,” *Am J Gastroenterol*, vol. 110, pp. 223–262, 2015.
- [17] V. Cottet, V. Jooste, I. Fournel, A. M. Bouvier, J. Faivre, and C. Bonithon-Kopp, “Long-term risk of colorectal cancer after adenoma removal: a population-based cohort study,” *Gut*, vol. 61, no. 8, pp. 1180–1186, Aug. 2012, doi: 10.1136/GUTJNL-2011-300295.
- [18] C. G. A. Network, “Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer,” *Nature*, vol. 487, pp. 330–337, 2012.
- [19] J. Loree, A. Pereira, M. Lam, and *et al.*, “Classifying colorectal cancer by tumor location rather than sidedness highlights a continuum in mutation profiles and consensus molecular subtypes,” *Clin Cancer Res*, vol. 24, pp. 1062–1072, 2018.
- [20] A. Venook, D. Niedzwiecki, F. Innocenti, and *et al.*, “Impact of primary (1°) tumor location on overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) in patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC): analysis of CALGB/SWOG 80405 (Alliance),” *J Clin Oncol*, vol. 34, 2016.
- [21] J. Guinney, R. Dienstmann, X. Wang, and *et al.*, “The consensus molecular subtypes of colorectal cancer,” *Nat Med*, vol. 21, pp. 1350–1356, 2015.
- [22] M. Lee, D. Menter, and S. Kopetz, “Right versus left colon cancer biology: integrating the consensus molecular subtypes,” *J Natl Compr Canc Netw*, vol. 15, pp. 411–419, 2017.
- [23] D. Li, “Recent advances in colorectal cancer screening,” *Chronic Dis Transl Med*, vol. 4, no. 3, pp. 139–147, Sep. 2018, doi: 10.1016/J.CDTM.2018.08.004.
- [24] G. Fijten, R. Starmans, J. Muris, H. Schouten, G. Blijham, and J. Knottnerus, “Predictive value of signs and symptoms for colorectal cancer in patients with rectal bleeding in general practice,” *Fam Pract*, vol. 12, pp. 279–286, 1995.

- [25] A. Shaikat, T. Rector, T. Church, and et al., "Longer withdrawal time is associated with a reduced incidence of interval cancer after screening colonoscopy," *Gastroenterology*, vol. 149, pp. 952–957, 2015.
- [26] M. Kaminski, J. Regula, E. Kraszewska, and et al., "Quality indicators for colonoscopy and the risk of interval cancer," *N Engl J Med*, vol. 362, pp. 1795–1803, 2010.
- [27] H. Brenner, J. Chang-Claude, L. Jansen, P. Knebel, C. Stock, and M. Hoffmeister, "Reduced risk of colorectal cancer up to 10 years after screening, surveillance, or diagnostic colonoscopy," *Gastroenterology*, vol. 146, no. 3, pp. 709–717, 2014, doi: 10.1053/j.gastro.2013.09.001.
- [28] C. J. Kahi, T. F. Imperiale, B. E. Juliar, and D. K. Rex, "Effect of Screening Colonoscopy on Colorectal Cancer Incidence and Mortality," *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, vol. 7, no. 7, pp. 770–775, Jul. 2009, doi: 10.1016/j.cgh.2008.12.030.
- [29] R. Nishihara *et al.*, "Long-Term Colorectal-Cancer Incidence and Mortality after Lower Endoscopy," *N Engl J Med*, vol. 369, no. 12, pp. 1095–1105, Sep. 2013, doi: 10.1056/NEJMOA1301969.
- [30] R. Beets-Tan, D. Lambregts, M. Maas, and et al., "Magnetic resonance imaging for clinical management of rectal cancer: updated recommendations from the 2016 European Society of Gastrointestinal and Abdominal Radiology (ESGAR) consensus meeting," *Eur Radiol*, vol. 28, pp. 1465–1475, 2018.
- [31] E. Nerad, M. Lahaye, M. Maas, and et al., "Diagnostic accuracy of CT for local staging of colon cancer: a systematic review and meta-analysis," *AJR Am J Roentgenol*, vol. 207, pp. 984–995, 2016.
- [32] A. Benson, A. Venook, M. Al-Hawary, and et al., "NCCN guidelines insights: colon cancer, version 2.2018," *J Natl Compr Canc Netw*, vol. 16, pp. 359–369, 2018.
- [33] R. Labianca, B. Nordlinger, G. Beretta, and et al., "Early colon cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up," *Ann Oncol*, vol. 24, pp. 64–72, 2013.
- [34] A. Bardelli and K. Pantel, "Liquid Biopsies, What We Do Not Know (Yet)," *Cancer Cell*, vol. 31, no. 2, pp. 172–179, Feb. 2017, doi: 10.1016/j.ccell.2017.01.002.
- [35] A. Babayan and K. Pantel, "Advances in liquid biopsy approaches for early detection and monitoring of cancer," *Genome Med*, vol. 10, no. 1, Mar. 2018, doi: 10.1186/S13073-018-0533-6.
- [36] J. Tie *et al.*, "Serial circulating tumour DNA analysis during multimodality treatment of locally advanced rectal cancer: a prospective biomarker study," *Gut*, vol. 68, no. 4, pp. 663–671, Apr. 2019, doi: 10.1136/GUTJNL-2017-315852.
- [37] T. R. Church *et al.*, "Prospective evaluation of methylated SEPT9 in plasma for detection of asymptomatic colorectal cancer," *Gut*, vol. 63, no. 2, pp. 317–325, Feb. 2014, doi: 10.1136/GUTJNL-2012-304149.
- [38] J. D. Cohen *et al.*, "Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test," *Science (1979)*, vol. 359, no. 6378, pp. 926–930, Feb. 2018, doi: 10.1126/SCIENCE.AAR3247.
- [39] J. H. Scholefield, S. M. Moss, C. M. Mangham, D. K. Whynes, and J. D. Hardcastle, "Nottingham trial of faecal occult blood testing for colorectal cancer: A 20-year follow-up," *Gut*, vol. 61, no. 7, pp. 1036–1040, Jul. 2012, doi: 10.1136/GUTJNL-2011-300774.
- [40] J. S. Lin *et al.*, "Screening for colorectal cancer: Updated evidence report and systematic review for the US preventive services task force," *JAMA - Journal of the American Medical Association*, vol. 315, no. 23, pp. 2576–2594, Jun. 2016, doi: 10.1001/JAMA.2016.3332.
- [41] H. Brenner and S. Tao, "Superior diagnostic performance of faecal immunochemical tests for haemoglobin in a head-to-head comparison with guaiac based faecal occult blood test among 2235 participants of screening colonoscopy," *Eur J Cancer*, vol. 49, no. 14, pp. 3049–3054, Sep. 2013, doi: 10.1016/j.ejca.2013.04.023.
- [42] F. Pagès, B. Mlecnik, F. Marliot, and et al., "International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study," *Lancet*, vol. 391, pp. 2128–2139, 2018.
- [43] D. Sargent, S. Marsoni, G. Monges, and et al., "Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer," *J Clin Oncol*, vol. 28, pp. 3219–3226, 2010.
- [44] D. Le, J. Durham, K. Smith, and et al., "Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade," *Science (1979)*, vol. 357, pp. 409–413, 2017.
- [45] J. Douillard, K. Oliner, S. Siena, and et al., "Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer," *N Engl J Med*, vol. 369, pp. 1023–1034, 2013.
- [46] M. Schirripa, S. Cohen, F. Battaglin, and H. Lenz, "Biomarker-driven and molecular targeted therapies for colorectal cancers," *Semin Oncol*, vol. 45, pp. 124–132, 2018.
- [47] J. Taieb, K. le Malicot, Q. Shi, and et al., "Prognostic value of BRAF and KRAS mutations in MSI and MSS stage III colon cancer," *J Nat Cancer Inst*, vol. 109, 2017.
- [48] V. Ballester and L. Boardman, "Next Generation Multigene Panel Testing: The Next Step for Identification of Hereditary Colorectal Cancer Syndromes?," *Gastroenterology*, vol. 149, no. 3, pp. 526–528, Sep. 2015, doi: 10.1053/j.gastro.2015.07.025.

- [49] L. R. Susswein *et al.*, "Pathogenic and likely pathogenic variant prevalence among the first 10,000 patients referred for next-generation cancer panel testing," *Genetics in Medicine*, vol. 18, no. 8, pp. 823–832, Aug. 2016, doi: 10.1038/gim.2015.166.
- [50] R. Pearlman *et al.*, "Prevalence and spectrum of germline cancer susceptibility gene mutations among patients with early-onset colorectal cancer," *JAMA Oncol*, vol. 3, no. 4, pp. 464–471, Apr. 2017, doi: 10.1001/JAMAONCOL.2016.5194.
- [51] M. B. Yurgelun *et al.*, "Cancer Susceptibility Gene Mutations in Individuals With Colorectal Cancer," *J Clin Oncol*, vol. 35, no. 10, pp. 1086–1095, Apr. 2017, doi: 10.1200/JCO.2016.71.0012.
- [52] E. M. Stoffel *et al.*, "Clinical and Molecular Characteristics of Post-Colonoscopy Colorectal Cancer: A Population-based Study," *Gastroenterology*, vol. 151, no. 5, pp. 870–878.e3, Nov. 2016, doi: 10.1053/j.gastro.2016.07.010.
- [53] J. Jeon *et al.*, "Determining Risk of Colorectal Cancer and Starting Age of Screening Based on Lifestyle, Environmental, and Genetic Factors," *Gastroenterology*, vol. 154, no. 8, pp. 2152–2164.e19, Jun. 2018, doi: 10.1053/J.GASTRO.2018.02.021.
- [54] B. Ma, P. Gao, H. Wang, and *et al.*, "What has preoperative radio(chemo)therapy brought to localized rectal cancer patients in terms of perioperative and long-term outcomes over the past decades? A systematic review and meta-analysis based on 41,121 patients," *Int J Cancer*, vol. 141, pp. 1052–1065, 2017.
- [55] R. Glynne-Jones, L. Wyrwicz, E. Tiret, and *et al.*, "Rectal cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up," *Ann Oncol*, vol. 29, pp. 22–40, 2018.
- [56] D. Du, Z. Su, D. Wang, W. Liu, and Z. Wei, "Optimal interval to surgery after neoadjuvant chemoradiotherapy in rectal cancer: a systematic review and meta-analysis," *Clin Colorectal Cancer*, vol. 17, pp. 13–24, 2018.
- [57] O. Abdel-Rahman and W. Cheung, "Integrating systemic therapies into the multimodality treatment of resectable colorectal liver metastases," *Gastroenterol Res Pract*, vol. 2018, 2018.
- [58] D. Haller, J. Tabernero, J. Maroun, and *et al.*, "Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer," *J Clin Oncol*, vol. 29, pp. 1465–1471, 2011.
- [59] A. Breugnot, M. Swets, J.-F. Bosset, and *et al.*, "Adjuvant chemotherapy after preoperative (chemo)radiotherapy and surgery for patients with rectal cancer: a systematic review and meta-analysis of individual patient data," *Lancet Oncol*, vol. 16, pp. 200–217, 2015.
- [60] S. Alberts, D. Sargent, S. Nair, and *et al.*, "Effect of oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin with or without cetuximab on survival among patients with resected stage III colon cancer: a randomized trial," *JAMA*, vol. 307, pp. 1383–1393, 2012.
- [61] J. Taieb, J. Tabernero, E. Mini, and *et al.*, "Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin with or without cetuximab in patients with resected stage III colon cancer (PETACC-8): an open-label, randomised phase 3 trial," *Lancet Oncol*, vol. 15, pp. 862–873, 2014.
- [62] A. Falcone, S. Ricci, I. Brunetti, and *et al.*, "Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the Gruppo Oncologico Nord Ovest," *J Clin Oncol*, vol. 25, pp. 1670–1716, 2007.
- [63] H. Hurwitz, L. Fehrenbacher, W. Novotny, and *et al.*, "Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer," *N Engl J Med*, vol. 350, pp. 2335–2342, 2004.
- [64] L. Saltz, S. Clarke, E. Diaz-Rubio, and *et al.*, "Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study," *J Clin Oncol*, vol. 26, pp. 2013–2019, 2008.
- [65] F. Pietrantonio *et al.*, "First-line anti-EGFR monoclonal antibodies in panRAS wild-type metastatic colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis," *Crit Rev Oncol Hematol*, vol. 96, no. 1, pp. 156–166, Oct. 2015, doi: 10.1016/J.CRITREVONC.2015.05.016.
- [66] F. Pietrantonio *et al.*, "Predictive role of BRAF mutations in patients with advanced colorectal cancer receiving cetuximab and panitumumab: a meta-analysis," *Eur J Cancer*, vol. 51, no. 5, pp. 587–594, 2015, doi: 10.1016/J.EJCA.2015.01.054.
- [67] A. P. Venook *et al.*, "Effect of First-Line Chemotherapy Combined With Cetuximab or Bevacizumab on Overall Survival in Patients With KRAS Wild-Type Advanced or Metastatic Colorectal Cancer: A Randomized Clinical Trial," *JAMA*, vol. 317, no. 23, pp. 2392–2401, Jun. 2017, doi: 10.1001/JAMA.2017.7105.
- [68] S. Kopetz *et al.*, "Encorafenib, Binimetinib, and Cetuximab in BRAF V600E–Mutated Colorectal Cancer," *New England Journal of Medicine*, vol. 381, no. 17, pp. 1632–1643, Oct. 2019, doi: 10.1056/NEJMOA1908075.
- [69] R. J. Mayer *et al.*, "Randomized trial of TAS-102 for refractory metastatic colorectal cancer," *N Engl J Med*, vol. 372, no. 20, pp. 1909–1919, May 2015, doi: 10.1056/NEJMOA1414325.
- [70] A. Grothey *et al.*, "Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial," *Lancet*, vol. 381, no. 9863, pp. 303–312, 2013, doi: 10.1016/S0140-6736(12)61900-X.

- [71] A. Adenis *et al.*, "Survival, safety, and prognostic factors for outcome with Regorafenib in patients with metastatic colorectal cancer refractory to standard therapies: results from a multicenter study (REBECCA) nested within a compassionate use program," *BMC Cancer*, vol. 16, no. 1, Jul. 2016, doi: 10.1186/S12885-016-2440-9.
- [72] C. Eng *et al.*, "Atezolizumab with or without cobimetinib versus regorafenib in previously treated metastatic colorectal cancer (IMblaze370): a multicentre, open-label, phase 3, randomised, controlled trial," *Lancet Oncol*, vol. 20, no. 6, pp. 849–861, Jun. 2019, doi: 10.1016/S1470-2045(19)30027-0.
- [73] G. Lopez, F. Boggio, S. Ferrero, N. Fusco, and A. del Gobbo, "Molecular and immunohistochemical markers with prognostic and predictive significance in liver metastases from colorectal carcinoma," *Int J Mol Sci*, vol. 19, no. 10, 2018, doi: 10.3390/IJMS19103014.
- [74] W. Xu *et al.*, "Risk factors and risk prediction models for colorectal cancer metastasis and recurrence: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses of observational studies," *BMC Med*, vol. 18, no. 1, p. 172, Dec. 2020, doi: 10.1186/S12916-020-01618-6.
- [75] M. Riihimäki, A. Hemminki, J. Sundquist, and K. Hemminki, "Patterns of metastasis in colon and rectal cancer," *Scientific Reports* 2016 6:1, vol. 6, no. 1, pp. 1–9, Dec. 2016, doi: 10.1038/srep29765.
- [76] L. J. M. Mekenkamp *et al.*, "Clinicopathological features and outcome in advanced colorectal cancer patients with synchronous vs metachronous metastases," *Br J Cancer*, vol. 103, no. 2, p. 159, Jul. 2010, doi: 10.1038/sj.bjc.6605737.
- [77] L. A. M. Duineveld *et al.*, "Symptomatic and asymptomatic colon cancer recurrence: a multicenter cohort study," *Ann Fam Med*, vol. 14, no. 3, pp. 215–220, May 2016, doi: 10.1370/afm.1919.
- [78] J. P. Ryuk *et al.*, "Predictive factors and the prognosis of recurrence of colorectal cancer within 2 years after curative resection," *Ann Surg Treatment Res*, vol. 86, no. 3, pp. 143–151, 2014, doi: 10.4174/astr.2014.86.3.143.
- [79] C. Dromain, C. Caramell, P. Dartigues, D. Goere, M. Ducreux, and F. Deschamps, "Liver, lung and peritoneal metastases in colorectal cancers: is the patient still curable? What should the radiologist know," *Diagnostic Interventional Imaging*, vol. 95, no. 5, pp. 513–523, 2014, doi: 10.1016/j.diii.2014.03.011.
- [80] Ö. Akgül, E. Çetinkaya, Ş. Ersöz, and M. Tez, "Role of surgery in colorectal cancer liver metastases," *World J Gastroenterol*, vol. 20, no. 20, pp. 6113–6122, May 2014, doi: 10.3748/wjg.v20.i20.6113.
- [81] T. E. Read *et al.*, "Locoregional recurrence and survival after curative resection of adenocarcinoma of the colon," *J Am Coll Surg*, vol. 195, no. 1, pp. 33–40, 2002, doi: 10.1016/S1072-7515(02)01224-3.
- [82] F. A. Haggard and R. P. Boushey, "Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors," *Clinics Colon Rectal Surg*, vol. 22, no. 04, pp. 191–197, 2009, doi: 10.1055/s-0029-1242458.
- [83] C. Beaton, C. P. Twine, G. L. Williams, and A. G. Radcliffe, "Systematic review and meta-analysis of histopathological factors influencing the risk of lymph node metastasis in early colorectal cancer," *Color Dis*, vol. 15, no. 7, pp. 788–797, Jul. 2013, doi: 10.1111/codi.12129.
- [84] G. W. Ha, J. H. Kim, and M. R. Lee, "Oncologic impact of anastomotic leakage following colorectal cancer surgery: a systematic review and meta-analysis," *Ann Surg Oncol*, vol. 24, no. 11, pp. 3289–3299, Oct. 2017, doi: 10.1245/s10434-017-5881-8.
- [85] F. Sinturel, V. Petrenko, and C. Dibner, "Circadian Clocks Make Metabolism Run," *J Mol Biol*, vol. 432, no. 12, pp. 3680–3699, May 2020, doi: 10.1016/J.JMB.2020.01.018.
- [86] A. P. Patton and M. H. Hastings, "The suprachiasmatic nucleus," *Current Biology*, vol. 28, no. 15, pp. R816–R822, Aug. 2018, doi: 10.1016/J.CUB.2018.06.052.
- [87] J. Husse, G. Eichele, and H. Oster, "Synchronization of the mammalian circadian timing system: Light can control peripheral clocks independently of the SCN clock," *BioEssays*, vol. 37, no. 10, pp. 1119–1128, Oct. 2015, doi: 10.1002/BIES.201500026.
- [88] C. Dibner, "The importance of being rhythmic: Living in harmony with your body clocks," *Acta Physiologica*, vol. 228, no. 1, Jan. 2020, doi: 10.1111/APHA.13281.
- [89] K. H. Cox and J. S. Takahashi, "Circadian clock genes and the transcriptional architecture of the clock mechanism," *J Mol Endocrinol*, vol. 63, no. 4, pp. R93–R102, Nov. 2019, doi: 10.1530/JME-19-0153.
- [90] U. Schibler *et al.*, "Clock-Talk: Interactions between central and peripheral circadian oscillators in mammals," *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, vol. 80, pp. 223–232, 2016, doi: 10.1101/SQB.2015.80.027490.
- [91] S. Masri and P. Sassone-Corsi, "The emerging link between cancer, metabolism, and circadian rhythms," *Nat Med*, vol. 24, no. 12, pp. 1795–1803, Dec. 2018, doi: 10.1038/S41591-018-0271-8.
- [92] C. L. Partch, C. B. Green, and J. S. Takahashi, "Molecular architecture of the mammalian circadian clock," *Trends Cell Biol*, vol. 24, no. 2, pp. 90–99, Feb. 2014, doi: 10.1016/J.TCB.2013.07.002.
- [93] P. L. Lowrey and J. S. Takahashi, "Genetics of the mammalian circadian system: Photoc entrainment, circadian pacemaker mechanisms, and posttranslational regulation," *Annu Rev Genet*, vol. 34, pp. 533–562, 2000, doi: 10.1146/ANNUREV.GENET.34.1.533.

- [94] I. Schmalen *et al.*, "Interaction of Circadian Clock Proteins CRY1 and PER2 Is Modulated by Zinc Binding and Disulfide Bond Formation," *Cell*, vol. 157, no. 5, pp. 1203–1215, May 2014, doi: 10.1016/J.CELL.2014.03.057.
- [95] N. Preitner *et al.*, "The Orphan Nuclear Receptor REV-ERB α Controls Circadian Transcription within the Positive Limb of the Mammalian Circadian Oscillator," *Cell*, vol. 110, no. 2, pp. 251–260, Jul. 2002, doi: 10.1016/S0092-8674(02)00825-5.
- [96] A. Goriki *et al.*, "A Novel Protein, CHRONO, Functions as a Core Component of the Mammalian Circadian Clock," *PLoS Biol*, vol. 12, no. 4, 2014, doi: 10.1371/JOURNAL.PBIO.1001839.
- [97] C. H. Ko and J. S. Takahashi, "Molecular components of the mammalian circadian clock," *Hum Mol Genet*, vol. 15, no. suppl_2, pp. R271–R277, Oct. 2006, doi: 10.1093/HMG/DDL207.
- [98] M. Vaughan, S. D. Jordan, D. Duglan, A. B. Chan, M. Afetian, and K. A. Lamia, "Phosphorylation of CRY1 Serine 71 Alters Voluntary Activity but Not Circadian Rhythms In Vivo," *J Biol Rhythms*, vol. 34, no. 4, pp. 401–409, Aug. 2019, doi: 10.1177/0748730419858525.
- [99] M. S. Robles and M. Mann, "Proteomic approaches in circadian biology," *Handb Exp Pharmacol*, vol. 217, pp. 389–407, 2013, doi: 10.1007/978-3-642-25950-0_17.
- [100] D. Mauvoisin, "Circadian rhythms and proteomics: It's all about posttranslational modifications!," *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, vol. 11, no. 5, p. e1450, Sep. 2019, doi: 10.1002/WSBM.1450.
- [101] S. Reischl and A. Kramer, "Kinases and phosphatases in the mammalian circadian clock," *FEBS Lett*, vol. 585, no. 10, pp. 1393–1399, May 2011, doi: 10.1016/J.FEBSLET.2011.02.038.
- [102] M. García-Costela *et al.*, "Circadian Genes as Therapeutic Targets in Pancreatic Cancer," *Front Endocrinol (Lausanne)*, vol. 11, Sep. 2020, doi: 10.3389/FENDO.2020.00638.
- [103] F. Rijo-Ferreira and J. S. Takahashi, "Genomics of circadian rhythms in health and disease," *Genome Med*, vol. 11, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1186/S13073-019-0704-0.
- [104] E. Nagoshi, C. Saini, C. Bauer, T. Laroche, F. Naef, and U. Schibler, "Circadian gene expression in individual fibroblasts: Cell-autonomous and self-sustained oscillators pass time to daughter cells," *Cell*, vol. 119, no. 5, pp. 693–705, Nov. 2004, doi: 10.1016/j.cell.2004.11.015.
- [105] J. P. Pett, M. Kondoff, G. Bordyugov, A. Kramer, and H. Herzl, "Co-existing feedback loops generate tissue-specific circadian rhythms," *Life Sci Alliance*, vol. 1, no. 3, 2018, doi: 10.26508/LSA.201800078.
- [106] T. K. Sato *et al.*, "A functional genomics strategy reveals rora as a component of the mammalian circadian clock," *Neuron*, vol. 43, no. 4, pp. 527–537, Aug. 2004, doi: 10.1016/j.neuron.2004.07.018.
- [107] G. Triqueneaux *et al.*, "The orphan receptor Rev-erb α gene is a target of the circadian clock pacemaker," *J Mol Endocrinol*, vol. 33, no. 3, pp. 585–608, Dec. 2004, doi: 10.1677/JME.1.01554.
- [108] M. Akashi and T. Takumi, "The orphan nuclear receptor ROR α regulates circadian transcription of the mammalian core-clock Bmal1," *Nat Struct Mol Biol*, vol. 12, no. 5, pp. 441–448, May 2005, doi: 10.1038/NSMB925.
- [109] F. Guillaumond, H. Dardente, V. Giguère, and N. Cermakian, "Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors," *J Biol Rhythms*, vol. 20, no. 5, pp. 391–403, Oct. 2005, doi: 10.1177/0748730405277232.
- [110] P. Emery and S. M. Reppert, "A rhythmic ror," *Neuron*, vol. 43, no. 4, pp. 443–446, Aug. 2004, doi: 10.1016/j.neuron.2004.08.009.
- [111] S. Shimba *et al.*, "Brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1), a component of the molecular clock, regulates adipogenesis," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 102, no. 34, pp. 12071–12076, Aug. 2005, doi: 10.1073/PNAS.0502383102/SUPPL_FILE/02383FIG11.PDF.
- [112] R. D. Rudic *et al.*, "BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis," *PLoS Biol*, vol. 2, no. 11, Nov. 2004, doi: 10.1371/JOURNAL.PBIO.0020377.
- [113] D. J. Kennaway, J. A. Owens, A. Voultsios, and T. J. Varcoe, "Functional central rhythmicity and light entrainment, but not liver and muscle rhythmicity, are Clock independent," *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, vol. 291, no. 4, 2006, doi: 10.1152/AJPREGU.00223.2006/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH60110654540006.JPEG.
- [114] J. P. DeBruyne, E. Noton, C. M. Lambert, E. S. Maywood, D. R. Weaver, and S. M. Reppert, "A clock shock: mouse CLOCK is not required for circadian oscillator function," *Neuron*, vol. 50, no. 3, pp. 465–477, May 2006, doi: 10.1016/J.NEURON.2006.03.041.
- [115] T. Roenneberg and M. Mellow, "The circadian clock and human health," *Current Biology*, vol. 26, no. 10, pp. R432–R443, May 2016, doi: 10.1016/J.CUB.2016.04.011/ATTACHMENT/621A2B98-58D7-4B4D-98D1-6CC0680C05B4/MMC1.PDF.
- [116] A. Hirano *et al.*, "A cryptochrome 2 mutation yields advanced sleep phase in humans," *Elife*, vol. 5, no. AUGUST, Aug. 2016, doi: 10.7554/ELIFE.16695.
- [117] A. Patke *et al.*, "Mutation of the Human Circadian Clock Gene CRY1 in Familial Delayed Sleep Phase Disorder," *Cell*, vol. 169, no. 2, pp. 203–215.e13, Apr. 2017, doi: 10.1016/J.CELL.2017.03.027.

- [118] A. Jagannath, L. Taylor, Z. Wakaf, S. R. Vasudevan, and R. G. Foster, "The genetics of circadian rhythms, sleep and health," *Hum Mol Genet*, vol. 26, no. R2, pp. R128–R138, Oct. 2017, doi: 10.1093/HMG/DDX240.
- [119] C. Scheiermann, J. Gibbs, L. Ince, and A. Loudon, "Clocking in to immunity," *Nat Rev Immunol*, vol. 18, no. 7, pp. 423–437, Jul. 2018, doi: 10.1038/S41577-018-0008-4.
- [120] J. K. Holth *et al.*, "The sleep-wake cycle regulates brain interstitial fluid tau in mice and CSF tau in humans," *Science*, vol. 363, no. 6429, pp. 80–884, 2019, doi: 10.1126/SCIENCE.AAV2546.
- [121] Z. Zwihaft *et al.*, "Circadian Clock Control by Polyamine Levels through a Mechanism that Declines with Age," *Cell Metab*, vol. 22, no. 5, pp. 874–885, Nov. 2015, doi: 10.1016/J.CMET.2015.09.011.
- [122] T. Papagiannakopoulos *et al.*, "Circadian Rhythm Disruption Promotes Lung Tumorigenesis," *Cell Metab*, vol. 24, no. 2, pp. 324–331, Aug. 2016, doi: 10.1016/J.CMET.2016.07.001.
- [123] N. M. Kettner *et al.*, "Circadian Homeostasis of Liver Metabolism Suppresses Hepatocarcinogenesis," *Cancer Cell*, vol. 30, no. 6, pp. 909–924, Dec. 2016, doi: 10.1016/J.CCELL.2016.10.007.
- [124] A. A. Shafi and K. E. Knudsen, "Cancer and the circadian clock," *Cancer Res*, vol. 79, no. 15, pp. 3806–3814, Aug. 2019, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-19-0566.
- [125] J. S. Takahashi, "Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock," *Nat Rev Genet*, vol. 18, no. 3, pp. 164–179, Mar. 2017, doi: 10.1038/NRG.2016.150.
- [126] A. Patke *et al.*, "Mutation of the Human Circadian Clock Gene CRY1 in Familial Delayed Sleep Phase Disorder," *Cell*, vol. 169, no. 2, pp. 203–215.e13, Apr. 2017, doi: 10.1016/J.CELL.2017.03.027.
- [127] B. Karlsson, A. Knutsson, and B. Lindahl, "Is there an association between shift work and having a metabolic syndrome? Results from a population based study of 27,485 people," *Occup Environ Med*, vol. 58, no. 11, pp. 747–752, 2001, doi: 10.1136/OEM.58.11.747.
- [128] S. Panda, "Circadian physiology of metabolism," *Science*, vol. 354, no. 6315, pp. 1008–1015, Nov. 2016, doi: 10.1126/SCIENCE.AAH4967.
- [129] O. Froy, "Metabolism and Circadian Rhythms—Implications for Obesity," *Endocr Rev*, vol. 31, no. 1, pp. 1–24, Feb. 2010, doi: 10.1210/ER.2009-0014.
- [130] Z. Bahrami-Nejad *et al.*, "A Transcriptional Circuit Filters Oscillating Circadian Hormonal Inputs to Regulate Fat Cell Differentiation," *Cell Metab*, vol. 27, no. 4, pp. 854–868.e8, Apr. 2018, doi: 10.1016/J.CMET.2018.03.012.
- [131] A. M. Curtis, M. M. Bellet, P. Sassone-Corsi, and L. A. J. O'Neill, "Circadian clock proteins and immunity," *Immunity*, vol. 40, no. 2, pp. 178–186, Feb. 2014, doi: 10.1016/J.IMMUNI.2014.02.002.
- [132] K. D. Nguyen, S. J. Fentress, Y. Qiu, K. Yun, J. S. Cox, and A. Chawla, "Circadian gene Bmal1 regulates diurnal oscillations of Ly6C(hi) inflammatory monocytes," *Science*, vol. 341, no. 6153, pp. 1483–1488, 2013, doi: 10.1126/SCIENCE.1240636.
- [133] J. E. Gibbs *et al.*, "The nuclear receptor REV-ERB α mediates circadian regulation of innate immunity through selective regulation of inflammatory cytokines," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 109, no. 2, pp. 582–587, Jan. 2012, doi: 10.1073/PNAS.1106750109.
- [134] J. O. Early *et al.*, "Circadian clock protein BMAL1 regulates IL-1 β in macrophages via NRF2," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 115, no. 36, pp. E8460–E8468, Sep. 2018, doi: 10.1073/PNAS.1800431115.
- [135] V. Leone *et al.*, "Effects of diurnal variation of gut microbes and high-fat feeding on host circadian clock function and metabolism," *Cell Host Microbe*, vol. 17, no. 5, pp. 681–689, May 2015, doi: 10.1016/J.CHOM.2015.03.006.
- [136] C. A. Thaïss *et al.*, "Microbiota Diurnal Rhythmicity Programs Host Transcriptome Oscillations," *Cell*, vol. 167, no. 6, pp. 1495–1510.e12, Dec. 2016, doi: 10.1016/J.CELL.2016.11.003.
- [137] C. Godinho-Silva *et al.*, "Light-entrained and brain-tuned circadian circuits regulate ILC3s and gut homeostasis," *Nature*, vol. 574, no. 7777, pp. 254–258, Oct. 2019, doi: 10.1038/S41586-019-1579-3.
- [138] A. A. Kondratova and R. v. Kondratov, "The circadian clock and pathology of the ageing brain," *Nat Rev Neurosci*, vol. 13, no. 5, pp. 325–335, May 2012, doi: 10.1038/NRN3208.
- [139] C. Y. Chen *et al.*, "Effects of aging on circadian patterns of gene expression in the human prefrontal cortex," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 113, no. 1, pp. 206–211, Jan. 2016, doi: 10.1073/PNAS.1508249112.
- [140] T. J. Nakamura *et al.*, "Age-related decline in circadian output," *J Neurosci*, vol. 31, no. 28, pp. 10201–10205, Jul. 2011, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0451-11.2011.
- [141] R. v. Kondratov, A. A. Kondratova, V. Y. Gorbacheva, O. v. Vykhovanets, and M. P. Antoch, "Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock," *Genes Dev*, vol. 20, no. 14, pp. 1868–1873, Jul. 2006, doi: 10.1101/GAD.1432206.
- [142] S. Sato *et al.*, "Circadian Reprogramming in the Liver Identifies Metabolic Pathways of Aging," *Cell*, vol. 170, no. 4, pp. 664–677.e11, Aug. 2017, doi: 10.1016/J.CELL.2017.07.042.
- [143] G. Solanas *et al.*, "Aged Stem Cells Reprogram Their Daily Rhythmic Functions to Adapt to Stress," *Cell*, vol. 170, no. 4, pp. 678–692.e20, Aug. 2017, doi: 10.1016/J.CELL.2017.07.035.

- [144] S. Horvath and K. Raj, "DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing," *Nat Rev Genet*, vol. 19, no. 6, pp. 371–384, Jun. 2018, doi: 10.1038/S41576-018-0004-3.
- [145] A. Sancar *et al.*, "Circadian Clock, Cancer, and Chemotherapy," *Biochemistry*, vol. 54, no. 2, p. 110, Jan. 2015, doi: 10.1021/BI5007354.
- [146] S. Razi Soofiyani *et al.*, "The role of circadian genes in the pathogenesis of colorectal cancer," *Gene*, vol. 804, p. 145894, Dec. 2021, doi: 10.1016/J.GENE.2021.145894.
- [147] R. G. Stevens *et al.*, "Considerations of circadian impact for defining 'shift work' in cancer studies: IARC Working Group Report," *Occup Environ Med*, vol. 68, no. 2, pp. 154–162, Feb. 2011, doi: 10.1136/OEM.2009.053512.
- [148] R. M. Lunn *et al.*, "Health consequences of electric lighting practices in the modern world: A report on the National Toxicology Program's workshop on shift work at night, artificial light at night, and circadian disruption," *Science of The Total Environment*, vol. 607–608, pp. 1073–1084, Dec. 2017, doi: 10.1016/J.SCITOTENV.2017.07.056.
- [149] A. Sancar and R. N. van Gelder, "Clocks, cancer, and chronochemotherapy," *Science (1979)*, vol. 371, no. 6524, 2021, doi: 10.1126/science.abb0738.
- [150] J. Kliukiene, T. Tynes, and A. Andersen, "Risk of breast cancer among Norwegian women with visual impairment," *British Journal of Cancer* 2001 84:3, vol. 84, no. 3, pp. 397–399, Jan. 2001, doi: 10.1054/bjoc.2000.1617.
- [151] L. Fu and N. M. Kettner, "The Circadian Clock in Cancer Development and Therapy," *Prog Mol Biol Transl Sci*, vol. 119, pp. 221–282, Jan. 2013, doi: 10.1016/B978-0-12-396971-2.00009-9.
- [152] C. Qi *et al.*, "A role for the clock gene Per1 in prostate cancer," *Cancer Res*, vol. 69, no. 19, pp. 7619–7625, Oct. 2009, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4199/654924/P/A-ROLE-FOR-THE-CLOCK-GENE-PER1-IN-PROSTATE-CANCER.
- [153] N. Mostafaie *et al.*, "Correlated downregulation of estrogen receptor beta and the circadian clock gene Per1 in human colorectal cancer," *Mol Carcinog*, vol. 48, no. 7, pp. 642–647, Jul. 2009, doi: 10.1002/MC.20510.
- [154] K. L. Pogue-Geile, J. Lyons-Weiler, and D. C. Whitcomb, "Molecular overlap of fly circadian rhythms and human pancreatic cancer," *Cancer Lett*, vol. 243, no. 1, pp. 55–57, Nov. 2006, doi: 10.1016/J.CANLET.2005.11.049.
- [155] H. Xiong, Y. Yang, K. Yang, D. Zhao, H. Tang, and X. Ran, "Loss of the clock gene PER2 is associated with cancer development and altered expression of important tumor-related genes in oral cancer," *Int J Oncol*, vol. 52, no. 1, pp. 279–287, Jan. 2018, doi: 10.3892/IJO.2017.4180.
- [156] M. Y. Yang *et al.*, "Altered expression of circadian clock genes in human chronic myeloid leukemia," *J Biol Rhythms*, vol. 26, no. 2, pp. 136–148, Apr. 2011, doi: 10.1177/0748730410395527.
- [157] G. Mazzocchi *et al.*, "Altered expression of the clock gene machinery in kidney cancer patients," *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 66, no. 3, pp. 175–179, Apr. 2012, doi: 10.1016/J.BIOPHA.2011.11.007.
- [158] J. Littlekalsoy, K. Rostad, K. H. Kalland, J. G. Hostmark, and O. D. Laerum, "Expression of circadian clock genes and proteins in urothelial cancer is related to cancer-associated genes," *BMC Cancer*, vol. 16, no. 1, pp. 1–17, Jul. 2016, doi: 10.1186/S12885-016-2580-Y/TABLES/9.
- [159] L. Fu, H. Pelicano, J. Liu, P. Huang, and C. C. Lee, "The circadian gene Period2 plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo," *Cell*, vol. 111, no. 1, 2002, doi: 10.1016/S0092-8674(02)00961-3.
- [160] Y. Ye *et al.*, "The Genomic Landscape and Pharmacogenomic Interactions of Clock Genes in Cancer Chronotherapy," *Cell Syst*, vol. 6, no. 3, pp. 314–328.e2, Mar. 2018, doi: 10.1016/j.cels.2018.01.013.
- [161] S. Gery *et al.*, "Epigenetic Silencing of the Candidate Tumor Suppressor Gene Per1 in Non-Small Cell Lung Cancer," *Clinical Cancer Research*, vol. 13, no. 5, pp. 1399–1404, Mar. 2007, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1730.
- [162] F. Hernández-Rosas, C. A. López-Rosas, and M. V. Saavedra-Vélez, "Disruption of the Molecular Circadian Clock and Cancer: An Epigenetic Link," *Biochem Genet*, vol. 58, no. 1, pp. 189–209, Feb. 2020, doi: 10.1007/S10528-019-09938-W/FIGURES/4.
- [163] C. M. Yeh *et al.*, "Epigenetic silencing of ARNTL, a circadian gene and potential tumor suppressor in ovarian cancer," *Int J Oncol*, vol. 45, no. 5, pp. 2101–2107, Nov. 2014, doi: 10.3892/IJO.2014.2627/HTML.
- [164] A. Chaix, A. Zarrinpar, and S. Panda, "The circadian coordination of cell biology," *J Cell Biol*, vol. 215, no. 1, 2016, doi: 10.1083/JCB.201603076.
- [165] C. H. Johnson, "Circadian clocks and cell division: what's the pacemaker?," *Cell Cycle*, vol. 9, no. 19, pp. 3864–3873, Oct. 2010, doi: 10.4161/CC.9.19.13205.
- [166] S. Sahar and P. Sassone-Corsi, "Metabolism and cancer: the circadian clock connection," *Nat Rev Cancer*, vol. 9, no. 12, pp. 886–896, Dec. 2009, doi: 10.1038/nrc2747.
- [167] D. Levens, "Disentangling the MYC web," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, no. 9, 2002, doi: 10.1073/pnas.102173199.
- [168] S. E. Mir *et al.*, "In Silico analysis of kinase expression identifies WEE1 as a gatekeeper against mitotic catastrophe in glioblastoma," *Cancer Cell*, vol. 18, no. 3, 2010, doi: 10.1016/j.ccr.2010.08.011.

- [169] A. Bhattacharya, U. Schmitz, O. Wolkenhauer, M. Schönherr, Y. Raatz, and M. Kunz, "Regulation of cell cycle checkpoint kinase WEE1 by miR-195 in malignant melanoma," *Oncogene*, vol. 32, no. 26, 2013, doi: 10.1038/ncr.2012.324.
- [170] Y. J. Choi *et al.*, "The Requirement for Cyclin D Function in Tumor Maintenance," *Cancer Cell*, vol. 22, no. 4, 2012, doi: 10.1016/j.ccr.2012.09.015.
- [171] T. Abbas and A. Dutta, "P21 in cancer: Intricate networks and multiple activities," *Nature Reviews Cancer*, vol. 9, no. 6, 2009. doi: 10.1038/nrc2657.
- [172] T. H. Kang and S. H. Leem, "Modulation of ATR-mediated DNA damage checkpoint response by cryptochrome 1," *Nucleic Acids Res*, vol. 42, no. 7, pp. 4427–4434, 2014, doi: 10.1093/NAR/GKU094.
- [173] R. v. Kondratov and M. P. Antoch, "Circadian proteins in the regulation of cell cycle and genotoxic stress responses," *Trends in Cell Biology*, vol. 17, no. 7, 2007. doi: 10.1016/j.tcb.2007.07.001.
- [174] N. M. Kettner, C. A. Katchy, and L. Fu, "Circadian gene variants in cancer," *Ann Med*, vol. 46, no. 4, 2014, doi: 10.3109/07853890.2014.914808.
- [175] J. Massagué, "G1 cell-cycle control and cancer," *Nature*, vol. 432, no. 7015, 2004. doi: 10.1038/nature03094.
- [176] T. Miki, T. Matsumoto, Z. Zhao, and C. C. Lee, "P53 regulates Period2 expression and the circadian clock," *Nat Commun*, vol. 4, 2013, doi: 10.1038/ncomms3444.
- [177] Y. A. Fouad and C. Aanei, "Revisiting the hallmarks of cancer," *American Journal of Cancer Research*, vol. 7, no. 5, 2017.
- [178] D. Hanahan, "Hallmarks of Cancer: New Dimensions," *Cancer Discov*, vol. 12, no. 1, pp. 31–46, Jan. 2022, doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.
- [179] A. Munshi and R. Ramesh, "Mitogen-Activated Protein Kinases and Their Role in Radiation Response," *Genes and Cancer*, vol. 4, no. 9–10, 2013. doi: 10.1177/1947601913485414.
- [180] M. Soták, A. Sumová, and J. Pácha, "Cross-talk between the circadian clock and the cell cycle in cancer," *Ann Med*, vol. 46, no. 4, 2014, doi: 10.3109/07853890.2014.892296.
- [181] A. E. Hoffman *et al.*, "Phenotypic effects of the circadian gene Cryptochrome 2 on cancer-related pathways," *BMC Cancer*, vol. 10, 2010, doi: 10.1186/1471-2407-10-110.
- [182] A. Sancar, N. Ozturk, J. H. Lee, and S. Gaddameedhi, "Loss of cryptochrome reduces cancer risk in p53 mutant mice," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 106, no. 8, 2009, doi: 10.1073/pnas.0813028106.
- [183] Y. Wu *et al.*, "BHLH transcription factor DEC2 regulates pro-apoptotic factor Bim in human oral cancer HSC-3 cells," *jstage.jst.go.jp*, vol. 33, no. 2, pp. 75–82, 2012, Accessed: Sep. 06, 2022. [Online]. Available: https://www.jstage.jst.go.jp/article/biomedres/33/2/33_2_75/_article/-char/ja/
- [184] Y. Liu *et al.*, "Anti-apoptotic effect of the basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor DEC2 in human breast cancer cells," *Wiley Online Library*, vol. 15, no. 4, pp. 315–325, Apr. 2010, doi: 10.1111/j.1365-2443.2010.01381.x.
- [185] M. B. Kastan and J. Bartek, "Cell-cycle checkpoints and cancer," *Nature*, vol. 432, no. 7015, 2004. doi: 10.1038/nature03097.
- [186] H. Wang *et al.*, "Time-Restricted Feeding Shifts the Skin Circadian Clock and Alters UVB-Induced DNA Damage," *Cell Rep*, vol. 20, no. 5, pp. 1061–1072, Aug. 2017, doi: 10.1016/j.celrep.2017.07.022.
- [187] T. H. Kang, J. T. Reardon, and A. Sancar, "Regulation of nucleotide excision repair activity by transcriptional and post-transcriptional control of the XPA protein," *Nucleic Acids Res*, vol. 39, no. 8, pp. 3176–3187, Apr. 2011, doi: 10.1093/NAR/GKQ1318.
- [188] X. Yang, X. He, Z. Yang, and E. Jabbari, "Mammalian PER2 regulates AKT activation and DNA damage response," *Biochemistry and Cell Biology*, vol. 90, no. 6, 2012, doi: 10.1139/o2012-025.
- [189] J. Mullenders, A. W. M. Fabius, M. Madiredjo, R. Bernards, and R. L. Beijersbergen, "A large scale shRNA barcode screen identifies the circadian clock component ARNTL as putative regulator of the p53 tumor suppressor pathway," *PLoS One*, vol. 4, no. 3, 2009, doi: 10.1371/journal.pone.0004798.
- [190] I. Robinson and A. B. Reddy, "Molecular mechanisms of the circadian clockwork in mammals," *FEBS Lett*, vol. 588, no. 15, pp. 2477–2483, 2014, doi: 10.1016/j.febslet.2014.06.005.
- [191] N. B. Milev and A. B. Reddy, "Circadian redox oscillations and metabolism," *Trends Endocrinol Metab*, vol. 26, no. 8, pp. 430–437, Aug. 2015, doi: 10.1016/J.TEM.2015.05.012.
- [192] D. E. Blask *et al.*, "Light Exposure at Night Disrupts Host/Cancer Circadian Regulatory Dynamics: Impact on the Warburg Effect, Lipid Signaling and Tumor Growth Prevention," *PLoS One*, vol. 9, no. 8, p. e102776, Aug. 2014, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0102776.
- [193] L. Mao *et al.*, "Melatonin suppression of aerobic glycolysis (Warburg effect), survival signalling and metastasis in human leiomyosarcoma," *J Pineal Res*, vol. 60, no. 2, pp. 167–177, Mar. 2016, doi: 10.1111/JPL.12298.
- [194] G. Rey *et al.*, "The Pentose Phosphate Pathway Regulates the Circadian Clock," *Cell Metab*, vol. 24, no. 3, 2016, doi: 10.1016/j.cmet.2016.07.024.

- [195] S. Masri *et al.*, "Partitioning circadian transcription by SIRT6 leads to segregated control of cellular metabolism," *Cell*, vol. 158, no. 3, pp. 659–672, Jul. 2014, doi: 10.1016/j.cell.2014.06.050.
- [196] Y. Nakahata *et al.*, "The NAD⁺-Dependent Deacetylase SIRT1 Modulates CLOCK-Mediated Chromatin Remodeling and Circadian Control," *Cell*, vol. 134, no. 2, pp. 329–340, Jul. 2008, doi: 10.1016/j.cell.2008.07.002.
- [197] S. Hui *et al.*, "Glucose feeds the TCA cycle via circulating lactate," *Nature* 2017 551:7678, vol. 551, no. 7678, pp. 115–118, Oct. 2017, doi: 10.1038/nature24057.
- [198] J. B. Spinelli, H. Yoon, A. E. Ringel, S. Jeanfavre, C. B. Clish, and M. C. Haigis, "Metabolic recycling of ammonia via glutamate dehydrogenase supports breast cancer biomass," *Science*, vol. 358, no. 6365, pp. 941–946, Nov. 2017, doi: 10.1126/SCIENCE.AAM9305.
- [199] G. Asher and P. Sassone-Corsi, "Time for food: The intimate interplay between nutrition, metabolism, and the circadian clock," *Cell*, vol. 161, no. 1, pp. 84–92, Mar. 2015, doi: 10.1016/J.CELL.2015.03.015.
- [200] J. Bass and J. S. Takahashi, "Circadian integration of metabolism and energetics," *Science* (1979), vol. 330, no. 6009, pp. 1349–1354, Dec. 2010, doi: 10.1126/SCIENCE.1195027.
- [201] S. Masri *et al.*, "Lung Adenocarcinoma Distally Rewires Hepatic Circadian Homeostasis," *Cell*, vol. 165, no. 4, pp. 896–909, May 2016, doi: 10.1016/J.CELL.2016.04.039.
- [202] H. Hojo *et al.*, "Remote reprogramming of hepatic circadian transcriptome by breast cancer," *Oncotarget*, vol. 8, no. 21, pp. 34128–34140, 2017, doi: 10.18632/ONCOTARGET.16699.
- [203] E. Batlle and H. Clevers, "Cancer stem cells revisited," *Nat Med*, vol. 23, no. 10, pp. 1124–1134, Oct. 2017, doi: 10.1038/NM.4409.
- [204] Z. Diamantopoulou *et al.*, "The metastatic spread of breast cancer accelerates during sleep," *Nature* 2022 607:7917, vol. 607, no. 7917, pp. 156–162, Jun. 2022, doi: 10.1038/s41586-022-04875-y.
- [205] W. J. M. Hrushesky, "Circadian timing of cancer chemotherapy," *Science* (1979), vol. 228, no. 4695, 1985, doi: 10.1126/science.3883493.
- [206] R. Dallmann, A. Okyar, and F. Lévi, "Dosing-Time Makes the Poison: Circadian Regulation and Pharmacotherapy," *Trends Mol Med*, vol. 22, no. 5, pp. 430–445, May 2016, doi: 10.1016/J.MOLMED.2016.03.004.
- [207] F. Lévi *et al.*, "Chronotherapy of colorectal cancer metastases," *Hepatogastroenterology*, vol. 48, no. 38, pp. 320–322, Mar. 2001, doi: 10.1007/978-1-4615-0547-1_21.
- [208] C. Danjoux *et al.*, "Effects of circadian rhythms and treatment times on the response of radiotherapy for painful bone metastases Related papers Effects of circadian rhythms and treatment times on the response of radiotherapy for painful bone metastases," *Ann Palliat Med*, vol. 6, no. 1, pp. 14–25, 2017, doi: 10.21037/apm.2016.09.07.
- [209] F. Lévi, "Circadian chronotherapy for human cancers," *Lancet Oncology*, vol. 2, no. 5, pp. 307–315, May 2001, doi: 10.1016/S1470-2045(00)00326-0.
- [210] S. Chan *et al.*, "Does the Time of Radiotherapy Affect Treatment Outcomes? A Review of the Literature," *Clin Oncol*, vol. 29, no. 4, pp. 231–238, Apr. 2017, doi: 10.1016/j.clon.2016.12.005.
- [211] R. U. Svensson *et al.*, "Inhibition of acetyl-CoA carboxylase suppresses fatty acid synthesis and tumor growth of non-small-cell lung cancer in preclinical models," *Nature Medicine* 2016 22:10, vol. 22, no. 10, pp. 1108–1119, Sep. 2016, doi: 10.1038/nm.4181.
- [212] G. Sulli *et al.*, "Pharmacological activation of REV-ERBs is lethal in cancer and oncogene-induced senescence," *Nature* 2018 553:7688, vol. 553, no. 7688, pp. 351–355, Jan. 2018, doi: 10.1038/nature25170.
- [213] R. S. Barberino *et al.*, "Melatonin protects against cisplatin-induced ovarian damage in mice via the MT1 receptor and antioxidant activity," *Biol Reprod*, vol. 96, no. 6, pp. 1244–1255, Jun. 2017, doi: 10.1093/BIOLRE/IOX053.
- [214] Y. Gao *et al.*, "Melatonin synergizes the chemotherapeutic effect of 5-fluorouracil in colon cancer by suppressing PI3K/AKT and NF-κB/iNOS signaling pathways," *J Pineal Res*, vol. 62, no. 2, Mar. 2017, doi: 10.1111/JPI.12380.
- [215] N. do Nascimento Gonçalves *et al.*, "Effect of Melatonin in Epithelial Mesenchymal Transition Markers and Invasive Properties of Breast Cancer Stem Cells of Canine and Human Cell Lines," *PLoS One*, vol. 11, no. 3, p. e0150407, Mar. 2016, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0150407.
- [216] L. Mao *et al.*, "Circadian Gating of Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Breast Cancer Cells Via Melatonin-Regulation of GSK3β," *Molecular Endocrinology*, vol. 26, no. 11, pp. 1808–1820, Nov. 2012, doi: 10.1210/ME.2012-1071.
- [217] P. Lissoni, M. Chieffo, S. Villa, L. Cerizza, and G. Tancini, "Five years survival in metastatic non-small cell lung cancer patients treated with chemotherapy alone or chemotherapy and melatonin: a randomized trial," *J Pineal Res*, vol. 35, no. 1, pp. 12–15, Aug. 2003, doi: 10.1034/J.1600-079X.2003.00032.X.
- [218] M. H. Vitaterna *et al.*, "Differential regulation of mammalian Period genes and circadian rhythmicity by cryptochromes 1 and 2," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 96, no. 21, p. 12114, Oct. 1999, doi: 10.1073/PNAS.96.21.12114.

- [219] V. Y. Gorbacheva *et al.*, "Circadian sensitivity to the chemotherapeutic agent cyclophosphamide depends on the functional status of the CLOCK/BMAL1 transactivation complex," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 102, no. 9, pp. 3407–3412, Mar. 2005, doi: 10.1073/PNAS.0409897102.
- [220] G. Sulli, E. N. C. Manoogian, P. R. Taub, and S. Panda, "Training the Circadian Clock, Clocking the Drugs, and Drugging the Clock to Prevent, Manage, and Treat Chronic Diseases," *Trends Pharmacol Sci*, vol. 39, no. 9, pp. 812–827, Sep. 2018, doi: 10.1016/J.TIPS.2018.07.003.
- [221] F. Lévi *et al.*, "Implications of circadian clocks for the rhythmic delivery of cancer therapeutics," *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 59, no. 9–10, pp. 1015–1035, Aug. 2007, doi: 10.1016/J.ADDR.2006.11.001.
- [222] J. R. Mayers *et al.*, "Elevation of circulating branched-chain amino acids is an early event in human pancreatic adenocarcinoma development," *Nat Med*, vol. 20, no. 10, pp. 1193–1198, Oct. 2014, doi: 10.1038/NM.3686.
- [223] S. Nishiumi *et al.*, "A novel serum metabolomics-based diagnostic approach for colorectal cancer," *PLoS One*, vol. 7, no. 7, Jul. 2012, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0040459.
- [224] S. Wei *et al.*, "Metabolomics approach for predicting response to neoadjuvant chemotherapy for breast cancer," *Mol Oncol*, vol. 7, no. 3, pp. 297–307, Jun. 2013, doi: 10.1016/J.MOLONC.2012.10.003.
- [225] T. Kobayashi *et al.*, "A novel serum metabolomics-based diagnostic approach to pancreatic cancer," *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, vol. 22, no. 4, pp. 571–579, Apr. 2013, doi: 10.1158/1055-9965.EPI-12-1033/71288/P/A-NOVEL-SERUM-METABOLOMICS-BASED-DIAGNOSTIC.
- [226] M. ; Mirian *et al.*, "Circadian and Immunity Cycle Talk in Cancer Destination: From Biological Aspects to In Silico Analysis," *Cancers 2022, Vol. 14, Page 1578*, vol. 14, no. 6, p. 1578, Mar. 2022, doi: 10.3390/CANCERS14061578.
- [227] Y. Wu, B. Tao, T. Zhang, Y. Fan, and R. Mao, "Pan-cancer analysis reveals disrupted circadian clock associates with t cell exhaustion," *Front Immunol*, vol. 10, no. OCT, p. 2451, 2019, doi: 10.3389/FIMMU.2019.02451/BIBTEX.
- [228] R. Qiu and Y. Wang, "Retinoic Acid Receptor-Related Orphan Receptor γ t (ROR γ t) Agonists as Potential Small Molecule Therapeutics for Cancer Immunotherapy," *J Med Chem*, vol. 61, no. 14, pp. 5794–5804, Jul. 2018, doi: 10.1021/ACS.JMEDCHEM.7B01314.
- [229] T. Bollinger *et al.*, "Circadian clocks in mouse and human CD4+ T cells," *PLoS One*, vol. 6, no. 12, Dec. 2011, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0029801.
- [230] G. Io Re *et al.*, "Interleukin-2 chronotherapy for metastatic renal cell carcinoma: Results of a phase I-II study," *Cytokine*, vol. 128, Apr. 2020, doi: 10.1016/J.CYTO.2019.154984.
- [231] A. Avgustinova and S. A. Benitah, "Epigenetic control of adult stem cell function," *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2016 17:10, vol. 17, no. 10, pp. 643–658, Jul. 2016, doi: 10.1038/nrm.2016.76.
- [232] P. Dierickx, L. W. van Laake, and N. Geijsen, "Circadian clocks: from stem cells to tissue homeostasis and regeneration," *EMBO Rep*, vol. 19, no. 1, pp. 18–28, Jan. 2018, doi: 10.15252/EMBR.201745130.
- [233] Y. Tsuchiya, Y. Umemura, and K. Yagita, "Circadian clock and cancer: From a viewpoint of cellular differentiation," *International Journal of Urology*, vol. 27, no. 6, pp. 518–524, Jun. 2020, doi: 10.1111/IJU.14231.
- [234] P. Dierickx *et al.*, "Circadian networks in human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes," *EMBO Rep*, vol. 18, no. 7, pp. 1199–1212, Jul. 2017, doi: 10.15252/EMBR.201743897.
- [235] Y. Umemura *et al.*, "Transcriptional program of Kpna2/Importin- α 2 regulates cellular differentiation-coupled circadian clock development in mammalian cells," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 111, no. 47, pp. E5039–E5048, Nov. 2014, doi: 10.1073/PNAS.1419272111.
- [236] M. Weger, N. Diotel, A. C. Dorsemans, T. Dickmeis, and B. D. Weger, "Stem cells and the circadian clock," *Dev Biol*, vol. 431, no. 2, pp. 111–123, Nov. 2017, doi: 10.1016/J.YDBIO.2017.09.012.
- [237] L. Ricci-Vitiani, E. Fabrizi, E. Palio, and R. de Maria, "Colon cancer stem cells.," *J Mol Med (Berl)*, vol. 87, no. 11, pp. 1097–1104, Nov. 2009, doi: 10.1007/s00109-009-0518-4.
- [238] R. C. van der Wath, B. S. Gardiner, A. W. Burgess, and D. W. Smith, "Cell Organisation in the Colonic Crypt: A Theoretical Comparison of the Pedigree and Niche Concepts," *PLoS One*, vol. 8, no. 9, Sep. 2013, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0073204.
- [239] A. Humphries and N. A. Wright, "Colonic crypt organization and tumorigenesis.," *Nat Rev Cancer*, vol. 8, no. 6, pp. 415–424, Jun. 2008, doi: 10.1038/nrc2392.
- [240] M. J. Munro, S. K. Wickremesekera, L. Peng, S. T. Tan, and T. Itinteang, "Cancer stem cells in colorectal cancer: a review," *J Clin Pathol*, vol. 71, no. 2, pp. 110–116, Feb. 2018, doi: 10.1136/JCLINPATH-2017-204739.
- [241] J. Beumer and H. Clevers, "Regulation and plasticity of intestinal stem cells during homeostasis and regeneration," *Development*, vol. 143, no. 20, pp. 3639–3649, Oct. 2016, doi: 10.1242/DEV.133132.
- [242] K. Stokes, A. Cooke, H. Chang, D. R. Weaver, D. T. Breault, and P. Karpowicz, "The Circadian Clock Gene BMAL1 Coordinates Intestinal Regeneration," *CMGH*, vol. 4, no. 1, pp. 95–114, Jul. 2017, doi: 10.1016/j.jcmgh.2017.03.011.

- [243] P. Karpowicz, Y. Zhang, J. B. Hogenesch, P. Emery, and N. Perrimon, "The Circadian Clock Gates the Intestinal Stem Cell Regenerative State," *Cell Rep*, vol. 3, no. 4, pp. 996–1004, Apr. 2013, doi: 10.1016/j.celrep.2013.03.016.
- [244] A. Kreso and J. E. Dick, "Evolution of the cancer stem cell model," *Cell Stem Cell*, vol. 14, no. 3, pp. 275–91, Mar. 2014, doi: 10.1016/j.stem.2014.02.006.
- [245] S. Zheng, L. Xin, A. Liang, and Y. Fu, "Cancer stem cell hypothesis: A brief summary and two proposals," *Cytotechnology*, vol. 65, no. 4, pp. 505–512, Aug. 2013, doi: 10.1007/S10616-012-9517-3.
- [246] M. Shimokawa, Y. Ohta, S. Nishikori, and et al., "Visualization and targeting of LGR5(+) human colon cancer stem cells," *Nature*, vol. 545, pp. 187–192, 2017.
- [247] C. Hadjimichael, K. Chanoumidou, N. Papadopoulou, P. Arampatzis, J. Papamatheakis, and A. Kretsovali, "Common stemness regulators of embryonic and cancer stem cells," *World J Stem Cells*, vol. 7, no. 9, pp. 1150–84, Oct. 2015, doi: 10.4252/WJSC.V7.I9.1150.
- [248] K. Takahashi and S. Yamanaka, "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors," *Cell*, vol. 126, no. 4, pp. 663–676, Aug. 2006, doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
- [249] S. Amini, F. Fathi, J. Mobalegi, H. Sofimajidpour, and T. Ghadimi, "The expressions of stem cell markers: Oct4, Nanog, Sox2, nucleostemin, Bmi, Zfx, Tcl1, Tbx3, Dppa4, and Esrrb in bladder, colon, and prostate cancer, and certain cancer cell lines," *Anat Cell Biol*, vol. 47, no. 1, pp. 1–11, 2014, doi: 10.5115/acb.2014.47.1.1.
- [250] J. W. Jang, Y. Song, S. H. Kim, J. Kim, and H. R. Seo, "Potential mechanisms of CD133 in cancer stem cells," *Life Sci*, vol. 184, pp. 25–29, Sep. 2017, doi: 10.1016/J.LFS.2017.07.008.
- [251] F. Ren, W. Q. Sheng, and X. Du, "CD133: a cancer stem cells marker, is used in colorectal cancers," *World J Gastroenterol*, vol. 19, no. 17, pp. 2603–2611, May 2013, doi: 10.3748/WJG.V19.I17.2603.
- [252] Z. Li, "CD133: A stem cell biomarker and beyond," *Exp Hematol Oncol*, vol. 2, no. 1, Jul. 2013, doi: 10.1186/2162-3619-2-17.
- [253] A. Vincent, A. Ouelkdite-Oumouchal, M. Souidi, J. Leclerc, B. Neve, and I. van Seuningen, "Colon cancer stemness as a reversible epigenetic state: Implications for anticancer therapies," *World J Stem Cells*, vol. 11, no. 11, p. 920, Nov. 2019, doi: 10.4252/WJSC.V11.I11.920.
- [254] Y. Wu and P. Y. Wu, "CD133 as a marker for cancer stem cells: progresses and concerns," *Stem Cells Dev*, vol. 18, no. 8, pp. 1127–1134, Oct. 2009, doi: 10.1089/scd.2008.0338.
- [255] X. Yu, Y. Lin, X. Yan, Q. Tian, L. Li, and E. H. Lin, "CD133, stem cells, and cancer stem cells: Myth or reality?," *Curr Colorectal Cancer Rep*, vol. 7, no. 4, pp. 253–259, Dec. 2011, doi: 10.1007/S11888-011-0106-1.
- [256] J. U. Schmohl and D. A. Vallera, "CD133, selectively targeting the root of cancer," *Toxins (Basel)*, vol. 8, no. 6, Jun. 2016, doi: 10.3390/TOXINS8060165.
- [257] L. Ricci-Vitiani et al., "Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells," *Nature*, vol. 445, no. 7123, pp. 111–115, Jan. 2007, doi: 10.1038/nature05384.
- [258] M. Todaro et al., "Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4," *Cell Stem Cell*, vol. 1, no. 4, pp. 389–402, Oct. 2007, doi: 10.1016/j.stem.2007.08.001.
- [259] Y. Yan, X. Zuo, and D. Wei, "Concise Review: Emerging Role of CD44 in Cancer Stem Cells: A Promising Biomarker and Therapeutic Target," *Stem Cells Transl Med*, vol. 4, no. 9, pp. 1033–1043, Sep. 2015, doi: 10.5966/sctm.2015-0048.
- [260] N. S. Basakran, "CD44 as a potential diagnostic tumor marker," *Saudi Med J*, vol. 36, no. 3, pp. 273–9, 2015, doi: 10.15537/smj.2015.3.9622.
- [261] V. J. M. Wielenga et al., "Expression of CD44 in Apc and Tcf Mutant Mice Implies Regulation by the WNT Pathway," *American Journal Of Pathology*, vol. 154, no. 2, pp. 515–523, 1999, doi: 10.1016/s0002-9440(10)65297-2.
- [262] P. Dalerba et al., "Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 104, no. 24, pp. 10158–10163, Jun. 2007, doi: 10.1073/pnas.0703478104.
- [263] C. Chen, S. Zhao, A. Karnad, and J. W. Freeman, "The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications," *J Hematol Oncol*, vol. 11, no. 1, May 2018, doi: 10.1186/S13045-018-0605-5.
- [264] P. Xia and X. Y. Xu, "Prognostic significance of CD44 in human colon cancer and gastric cancer: Evidence from bioinformatic analyses," *Oncotarget*, vol. 7, no. 29, p. 45538, Jul. 2016, doi: 10.18632/ONCOTARGET.9998.
- [265] I. Morath, T. N. Hartmann, and V. Orian-Rousseau, "CD44: More than a mere stem cell marker," *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, vol. 81, pp. 166–173, Dec. 2016, doi: 10.1016/J.BIOCEL.2016.09.009.
- [266] L. Du et al., "CD44 is of Functional Importance for Colorectal Cancer Stem Cells," *Clinical Cancer Research*, vol. 14, no. 21, pp. 6751–6760, Nov. 2008, doi: 10.1158/1078-0432.ccr-08-1034.
- [267] T. M. Yeung, S. C. Gandhi, J. L. Wilding, R. Muschel, and W. F. Bodmer, "Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 107, no. 8, pp. 3722–3727, Feb. 2010, doi: 10.1073/pnas.0915135107.

- [268] S. v. Shmelkov *et al.*, "CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors.," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 118, no. 6, pp. 2111–2120, Jun. 2008, doi: 10.1172/jci34401.
- [269] S. J. Dylla *et al.*, "Colorectal cancer stem cells are enriched in xenogeneic tumors following chemotherapy," *PLoS One*, vol. 3, no. 6, Jun. 2008, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0002428.
- [270] S. Ma *et al.*, "Aldehyde Dehydrogenase Discriminates the CD133 Liver Cancer Stem Cell Populations," *Molecular Cancer Research*, vol. 6, no. 7, pp. 1146–1153, Jul. 2008, doi: 10.1158/1541-7786.mcr-08-0035.
- [271] J. Lathia, H. Liu, and D. Matei, "The Clinical Impact of Cancer Stem Cells," *Oncologist*, vol. 25, no. 2, p. 123, Feb. 2020, doi: 10.1634/THEONCOLOGIST.2019-0517.
- [272] A. Malik, S. Nalluri, A. De, D. Beligala, and M. E. Geusz, "The Relevance of Circadian Clocks to Stem Cell Differentiation and Cancer Progression," *NeuroSci 2022, Vol. 3, Pages 146-165*, vol. 3, no. 2, pp. 146–165, Mar. 2022, doi: 10.3390/NEUROSCI3020012.
- [273] K. Yagita *et al.*, "Development of the circadian oscillator during differentiation of mouse embryonic stem cells in vitro," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 107, no. 8, pp. 3846–3851, Feb. 2010, doi: 10.1073/PNAS.0913256107/SUPPL_FILE/SM05.AVI.
- [274] E. Kowalska, E. Moriggi, C. Bauer, C. Dibner, and S. A. Brown, "The circadian clock starts ticking at a developmentally early stage," *J Biol Rhythms*, vol. 25, no. 6, pp. 442–449, Dec. 2010, doi: 10.1177/0748730410385281.
- [275] D. Morse, N. Cermakian, S. Brancorsini, M. Parvinen, and P. Sassone-Corsi, "No circadian rhythms in testis: Period1 expression is clock independent and developmentally regulated in the mouse," *Mol Endocrinol*, vol. 17, no. 1, pp. 141–151, Jan. 2003, doi: 10.1210/ME.2002-0184.
- [276] A. De, D. H. Beligala, V. P. Sharma, C. A. Burgos, A. M. Lee, and M. E. Geusz, "Cancer stem cell generation during epithelial-mesenchymal transition is temporally gated by intrinsic circadian clocks," *Clin Exp Metastasis*, vol. 37, no. 5, pp. 617–635, Oct. 2020, doi: 10.1007/S10585-020-10051-1.
- [277] V. P. Sharma, N. T. Anderson, and M. E. Geusz, "Circadian properties of cancer stem cells in glioma cell cultures and tumorspheres," *Cancer Lett*, vol. 345, no. 1, pp. 65–74, Apr. 2014, doi: 10.1016/J.CANLET.2013.11.009.
- [278] T. Noguchi, L. L. Wang, and D. K. Welsh, "Fibroblast PER2 circadian rhythmicity depends on cell density," *J Biol Rhythms*, vol. 28, no. 3, pp. 183–192, Jun. 2013, doi: 10.1177/0748730413487494.
- [279] R. Zhang, N. F. Lahens, H. I. Ballance, M. E. Hughes, and J. B. Hogenesch, "A circadian gene expression atlas in mammals: implications for biology and medicine," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 111, no. 45, pp. 16219–16224, Nov. 2014, doi: 10.1073/PNAS.1408886111.
- [280] D. Brena, M. B. Huang, and V. Bond, "Extracellular vesicle-mediated transport: Reprogramming a tumor microenvironment conducive with breast cancer progression and metastasis," *Transl Oncol*, vol. 15, no. 1, Jan. 2022, doi: 10.1016/J.TRANON.2021.101286.
- [281] S. C. Tao and S. C. Guo, "Extracellular vesicles: Potential participants in circadian rhythm synchronization," *Int J Biol Sci*, vol. 14, no. 12, pp. 1610–1620, Sep. 2018, doi: 10.7150/IJBS.26518.
- [282] R. v. Puram *et al.*, "Core Circadian Clock Genes Regulate Leukemia Stem Cells in AML," *Cell*, vol. 165, no. 2, pp. 303–316, Apr. 2016, doi: 10.1016/J.CELL.2016.03.015.
- [283] Z. Dong *et al.*, "Targeting Glioblastoma Stem Cells through Disruption of the Circadian Clock," *Cancer Discov*, vol. 9, no. 11, pp. 1556–1573, Nov. 2019, doi: 10.1158/2159-8290.CD-19-0215.
- [284] Q. Li *et al.*, "Circadian Rhythm Gene PER3 Negatively Regulates Stemness of Prostate Cancer Stem Cells via WNT/ β -Catenin Signaling in Tumor Microenvironment," *Front Cell Dev Biol*, vol. 9, p. 414, Mar. 2021, doi: 10.3389/FCCELL.2021.656981/BIBTEX.
- [285] F. Zhang, H. Sun, S. Zhang, X. Yang, G. Zhang, and T. Su, "Overexpression of PER3 Inhibits Self-Renewal Capability and Chemoresistance of Colorectal Cancer Stem-Like Cells via Inhibition of Notch and β -Catenin Signaling," *Oncol Res*, vol. 25, no. 5, pp. 709–719, 2017, doi: 10.3727/096504016X14772331883976.
- [286] L. A. Aaltonen, S. R. Hamilton, W. H. Organization., and I. A. for Research on Cancer., *Pathology and genetics of tumours of the digestive system*. IARC Press, 2000. [Online]. Available: <http://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Who-Iarc-Classification-Of-Tumours/Pathology-And-Genetics-Of-Tumours-Of-The-Digestive-System-2000>
- [287] D. Liska *et al.*, "Incidence, Patterns, and Predictors of Locoregional Recurrence in Colon Cancer," *Ann Surg Oncol*, vol. 24, no. 4, pp. 1093–1099, Apr. 2017, doi: 10.1245/S10434-016-5643-Z.
- [288] M. S. Lyall, S. R. Dundas, S. Curran, and G. I. Murray, "Profiling markers of prognosis in colorectal cancer," *Clin Cancer Res*, vol. 12, no. 4, pp. 1184–1191, Feb. 2006, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-1864.
- [289] P. L. Cheah, J. Li, L. M. Looi, K. H. Teoh, D. B. L. Ong, and M. J. Arends, "DNA mismatch repair and CD133-marked cancer stem cells in colorectal carcinoma," *PeerJ*, vol. 6, no. 9, 2018, doi: 10.7717/PEERJ.5530.

- [290] M. J. de Herdt *et al.*, "MET ectodomain shedding is associated with poor disease-free survival of patients diagnosed with oral squamous cell carcinoma," *Modern Pathology*, vol. 33, no. 6, pp. 1015–1032, Jun. 2020, doi: 10.1038/S41379-019-0426-2.
- [291] J. M. Satagopan, L. Ben-Porat, M. Berwick, M. Robson, D. Kutler, and A. D. Auerbach, "A note on competing risks in survival data analysis," *British Journal of Cancer* 2004 91:7, vol. 91, no. 7, pp. 1229–1235, Aug. 2004, doi: 10.1038/sj.bjc.6602102.
- [292] C. F. E. Platell and J. B. Semmens, "Review of survival curves for colorectal cancer," *Dis Colon Rectum*, vol. 47, no. 12, pp. 2070–2075, Dec. 2004, doi: 10.1007/S10350-004-0743-4.
- [293] L. M. McShane *et al.*, "Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies (REMARK)," *J Natl Cancer Inst*, vol. 97, no. 16, pp. 1180–1184, 2005, doi: 10.1093/JNCI/DJI237.
- [294] S. Wang *et al.*, "Prognostic and predictive role of JWA and XRCC1 expressions in gastric cancer," *Clinical Cancer Research*, vol. 18, no. 10, pp. 2987–2996, May 2012, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2863.
- [295] J. A. Hanley, "Receiver operating characteristic (ROC) methodology: the state of the art.," *Crit Rev Diagn Imaging*, vol. 29, no. 3, pp. 307–335, 1989, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2667567>
- [296] H. L. Weiss, S. Niwas, W. E. Grizzle, and C. Piyathilake, "Receiver operating characteristic (ROC) to determine cut-off points of biomarkers in lung cancer patients.," *Dis Markers*, vol. 19, no. 6, pp. 273–278, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15258328>
- [297] M. D. Ruopp, N. J. Perkins, B. W. Whitcomb, and E. F. Schisterman, "Youden Index and optimal cut-point estimated from observations affected by a lower limit of detection.," *Biom J*, vol. 50, no. 3, pp. 419–430, Dec. 2008, doi: 10.1002/bimj.200710415.
- [298] A. Stojadinovic *et al.*, "Clinical decision support and individualized prediction of survival in colon cancer: Bayesian belief network model," *Ann Surg Oncol*, vol. 20, no. 1, pp. 161–174, Jan. 2013, doi: 10.1245/s10434-012-2555-4.
- [299] H. Zhang, R. Shu, X. Liu, X. Zhang, and D. Sun, "Downregulation of REV-ERB α is associated with the progression of lung adenocarcinoma," *Ann Transl Med*, vol. 10, no. 2, pp. 56–56, Jan. 2022, doi: 10.21037/ATM-21-6405.
- [300] Y. Yuan Li *et al.*, "Downregulation of the circadian Period family genes is positively correlated with poor head and neck squamous cell carcinoma prognosis," *Chronobiol Int*, vol. 36, no. 12, pp. 1723–1732, Dec. 2019, doi: 10.1080/07420528.2019.1648486.
- [301] Y. Wang, L. Hua, C. Lu, and Z. Chen, "Expression of circadian clock gene human Period2 (hPer2) in human colorectal carcinoma," *World J Surg Oncol*, vol. 9, no. 1, pp. 1–8, Dec. 2011, doi: 10.1186/1477-7819-9-166/FIGURES/3.
- [302] X. Wang *et al.*, "Reduced expression of PER3 is associated with incidence and development of colon cancer," *Ann Surg Oncol*, vol. 19, no. 9, pp. 3081–3088, Sep. 2012, doi: 10.1245/S10434-012-2279-5.
- [303] Z. L. Zeng *et al.*, "Overexpression of the circadian clock gene bmal1 increases sensitivity to oxaliplatin in colorectal cancer," *Clinical Cancer Research*, vol. 20, no. 4, pp. 1042–1052, 2014, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0171.
- [304] I. Zlobec, R. Steele, L. Terracciano, J. R. Jass, and A. Lugli, "Selecting immunohistochemical cut-off scores for novel biomarkers of progression and survival in colorectal cancer," *J Clin Pathol*, vol. 60, no. 10, pp. 1112–1116, 2007, doi: 10.1136/jcp.2006.044537.
- [305] H. Yu *et al.*, "Cryptochrome 1 Overexpression Correlates with Tumor Progression and Poor Prognosis in Patients with Colorectal Cancer," *PLoS One*, vol. 8, no. 4, p. e61679, Apr. 2013, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0061679.
- [306] T. Karantanos *et al.*, "Expression of clock genes in patients with colorectal cancer," *International Journal of Biological Markers*, vol. 28, no. 3, pp. 280–285, Jul. 2013, doi: 10.5301/IBM.5000033/ASSET/IMAGES/LARGE/10.5301_IBM.5000033-FIG1.JPEG.
- [307] G. Mazzocchi *et al.*, "Deregulated expression of cryptochrome genes in human colorectal cancer," *Mol Cancer*, vol. 15, no. 1, Jan. 2016, doi: 10.1186/S12943-016-0492-8.
- [308] T. Karantanos, G. Theodoropoulos, D. Pektasides, and M. Gazouli, "Clock genes: Their role in colorectal cancer," *World J Gastroenterol*, vol. 20, no. 8, pp. 1986–1992, Feb. 2014, doi: 10.3748/wjg.v20.i8.1986.
- [309] A. He *et al.*, "Circadian Clock Genes Are Correlated with Prognosis and Immune Cell Infiltration in Colon Adenocarcinoma," *Comput Math Methods Med*, vol. 2022, 2022, doi: 10.1155/2022/1709918.
- [310] J. Zhang, H. Lv, M. Ji, Z. Wang, and W. Wu, "Low circadian clock genes expression in cancers: A meta-analysis of its association with clinicopathological features and prognosis," *PLoS One*, vol. 15, no. 5, May 2020, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0233508.
- [311] A. Lugli *et al.*, "Prognostic impact of the expression of putative cancer stem cell markers CD133, CD166, CD44s, EpCAM, and ALDH1 in colorectal cancer," *Br J Cancer*, vol. 103, no. 3, pp. 382–390, 2010, doi: 10.1038/sj.bjc.6605762.
- [312] C. Y. Yang *et al.*, "Genome-wide copy number changes and CD133 expression characterized distinct subset of colon polyps: differentiation between incidental polyps and cancer-associated polyps," *Int J Colorectal Dis*, vol. 30, no. 12, pp. 1617–1626, Dec. 2015, doi: 10.1007/S00384-015-2319-2.

- [313] K. Mia-Jan *et al.*, "CD133 expression is not an independent prognostic factor in stage II and III colorectal cancer but may predict the better outcome in patients with adjuvant therapy," *BMC Cancer*, vol. 13, Mar. 2013, doi: 10.1186/1471-2407-13-166.
- [314] F. Jing, H. J. Kim, C. H. Kim, Y. J. Kim, J. H. Lee, and H. R. Kim, "Colon cancer stem cell markers CD44 and CD133 in patients with colorectal cancer and synchronous hepatic metastases," *Int J Oncol*, vol. 46, no. 4, pp. 1582–1588, Apr. 2015, doi: 10.3892/ijo.2015.2844.
- [315] T. Oshima *et al.*, "Expression of circadian genes correlates with liver metastasis and outcomes in colorectal cancer," *Oncol Rep*, vol. 25, no. 5, pp. 1439–1446, May 2011, doi: 10.3892/OR.2011.1207/HTML.
- [316] C. Cadenas *et al.*, "Loss of circadian clock gene expression is associated with tumor progression in breast cancer," *Cell Cycle*, vol. 13, no. 20, pp. 3282–3291, Oct. 2014, doi: 10.4161/15384101.2014.954454/SUPPL_FILE/KCCY_A_954454_SM4872.ZIP.
- [317] K. Kume *et al.*, "mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop," *Cell*, vol. 98, no. 2, pp. 193–205, Jul. 1999, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81014-4.
- [318] K. Yagita *et al.*, "Dimerization and nuclear entry of mPER proteins in mammalian cells," *Genes Dev*, vol. 14, no. 11, p. 1353, Jun. 2000, doi: 10.1101/gad.14.11.1353.
- [319] L. Fu and C. C. Lee, "The circadian clock: pacemaker and tumour suppressor," *Nature Reviews Cancer* 2003 3:5, vol. 3, no. 5, pp. 350–361, May 2003, doi: 10.1038/nrc1072.
- [320] L. Borgs, P. Beukelaers, R. Vandenbosch, S. Belachew, L. Nguyen, and B. Malgrange, "Cell 'circadian' cycle: new role for mammalian core clock genes," *Cell Cycle*, vol. 8, no. 6, pp. 832–837, Mar. 2009, doi: 10.4161/CC.8.6.7869.
- [321] Z. Huang *et al.*, "The circadian clock is associated with prognosis and immune infiltration in stomach adenocarcinoma," *Aging*, vol. 13, no. 12, pp. 16637–16655, Jun. 2021, doi: 10.18632/AGING.203184.
- [322] F. Battaglin *et al.*, "Clocking cancer: the circadian clock as a target in cancer therapy," *Oncogene*, vol. 40, no. 18, pp. 3187–3200, May 2021, doi: 10.1038/S41388-021-01778-6.
- [323] Z. Zhang, P. Zeng, W. Gao, Q. Zhou, T. Feng, and X. Tian, "Circadian clock: a regulator of the immunity in cancer," *Cell Communication and Signaling*, vol. 19, no. 1, Dec. 2021, doi: 10.1186/S12964-021-00721-2.
- [324] S. Morales-Santana, S. Morell, J. Leon, A. Carazo-Gallego, J. C. Jimenez-Lopez, and M. Morell, "An overview of the polymorphisms of circadian genes associated with endocrine cancer," *Front Endocrinol (Lausanne)*, vol. 10, no. FEB, 2019, doi: 10.3389/FENDO.2019.00104.
- [325] F. Zhou *et al.*, "Functional polymorphisms of circadian positive feedback regulation genes and clinical outcome of Chinese patients with resected colorectal cancer," *Cancer*, vol. 118, no. 4, pp. 937–946, Feb. 2012, doi: 10.1002/CNCR.26348.
- [326] T. Karantanos *et al.*, "Association of the clock genes polymorphisms with colorectal cancer susceptibility," *J Surg Oncol*, vol. 108, no. 8, pp. 563–567, Dec. 2013, doi: 10.1002/JSO.23434.
- [327] C. Garufi *et al.*, "Gender effects of single nucleotide polymorphisms and miRNAs targeting clock-genes in metastatic colorectal cancer patients (mCRC)," *Sci Rep*, vol. 6, Sep. 2016, doi: 10.1038/SREP34006.
- [328] E. Limagne *et al.*, "Accumulation of MDSC and Th17 cells in patients with metastatic colorectal cancer predicts the efficacy of a FOLFOX-bevacizumab drug treatment regimen," *Cancer Res*, vol. 76, no. 18, pp. 5241–5252, Sep. 2016, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-3164.
- [329] L. Fuhr *et al.*, "The interplay between colon cancer cells and tumour-associated stromal cells impacts the biological clock and enhances malignant phenotypes," *Cancers (Basel)*, vol. 11, no. 7, Jul. 2019, doi: 10.3390/CANCERS11070988.
- [330] G. Mazzocchi *et al.*, "Clock gene expression in human and mouse hepatic models shows similar periodicity but different dynamics of variation," *Chronobiol Int*, vol. 33, no. 2, pp. 181–190, Feb. 2016, doi: 10.3109/07420528.2015.1132722.
- [331] W. Ruan, X. Yuan, and H. K. Eltzschig, "Circadian rhythm as a therapeutic target," *Nat Rev Drug Discov*, vol. 20, no. 4, pp. 287–307, Apr. 2021, doi: 10.1038/S41573-020-00109-W.
- [332] Z. Hong, Z. Feng, Z. Sai, and S. Tao, "PER3, a novel target of miR-103, plays a suppressive role in colorectal cancer in vitro," *BMB Rep*, vol. 47, no. 9, p. 500, 2014, doi: 10.5483/BMBREP.2014.47.9.212.
- [333] J. S. Im, B. H. Jung, S. E. Kim, K. H. Lee, and J. K. Lee, "Per3, a circadian gene, is required for Chk2 activation in human cells," *FEBS Lett*, vol. 584, no. 23, pp. 4731–4734, Dec. 2010, doi: 10.1016/J.FEBSLET.2010.11.003.
- [334] F. Sato *et al.*, "PERIOD1 (PER1) has anti-apoptotic effects, and PER3 has pro-apoptotic effects during cisplatin (CDDP) treatment in human gingival cancer CA9-22 cells," *Eur J Cancer*, vol. 47, no. 11, pp. 1747–1758, Jul. 2011, doi: 10.1016/J.EJCA.2011.02.025.
- [335] T. Momma *et al.*, "Expression of circadian clock genes in human colorectal adenoma and carcinoma," *Oncol Lett*, vol. 14, no. 5, p. 5319, Nov. 2017, doi: 10.3892/OL.2017.6876.

- [336] K. Hasakova, M. Vician, R. Reis, M. Zeman, and I. Herichova, "Sex-dependent correlation between survival and expression of genes related to the circadian oscillator in patients with colorectal cancer," *Chronobiol Int*, vol. 35, no. 10, pp. 1423–1434, Oct. 2018, doi: 10.1080/07420528.2018.1488722.
- [337] G. Mazzocchi *et al.*, "Clock Gene Expression Levels and Relationship With Clinical and Pathological Features in Colorectal Cancer Patients," <https://doi.org/10.3109/07420528.2011.615182>, vol. 28, no. 10, pp. 841–851, Dec. 2011, doi: 10.3109/07420528.2011.615182.
- [338] K. Davis, L. C. Roden, V. D. Leaner, and P. J. van der Watt, "The tumour suppressing role of the circadian clock," *IUBMB Life*, vol. 71, no. 7, pp. 771–780, Jul. 2019, doi: 10.1002/IUB.2005.
- [339] H. Hua *et al.*, "Circadian gene mPer2 overexpression induces cancer cell apoptosis," *Cancer Sci*, vol. 97, no. 7, pp. 589–596, Jul. 2006, doi: 10.1111/j.1349-7006.2006.00225.x.
- [340] T. Tomita, R. Kurita, and Y. Onishi, "Epigenetic regulation of the circadian clock: role of 5-aza-2'-deoxycytidine," *Biosci Rep*, vol. 37, no. 3, p. 20170053, Jun. 2017, doi: 10.1042/BSR20170053.
- [341] D. Z. Kochan and O. Kovalchuk, "Circadian disruption and breast cancer: An epigenetic link?," *Oncotarget*, vol. 6, no. 19, pp. 16866–16882, Dec. 2015. [Online]. Available: <http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path%5B%5D=4343&path%5B%5D=11513>
- [342] H. Taniguchi *et al.*, "Epigenetic inactivation of the circadian clock gene BMAL1 in hematologic malignancies," *Cancer Res*, vol. 69, no. 21, pp. 8447–8454, Nov. 2009, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0551/655122/P/EPIGENETIC-INACTIVATION-OF-THE-CIRCADIAN-CLOCK.
- [343] T. Gotoh, M. Vila-Caballer, C. S. Santos, J. Liu, J. Yang, and C. v Finkielstein, "The circadian factor Period 2 modulates p53 stability and transcriptional activity in unstressed cells," *Mol Biol Cell*, vol. 25, no. 19, pp. 3081–3093, Dec. 2014, doi: 10.1091/mbc.e14-05-0993.
- [344] T. Matsuo, S. Yamaguchi, S. Mitsui, A. Emi, F. Shimoda, and H. Okamura, "Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo," *Science (1979)*, vol. 302, no. 5643, 2003, doi: 10.1126/science.1086271.
- [345] A. Gréchez-Cassiau, B. Rayet, F. Guillaumond, M. Teboul, and F. Delaunay, "The circadian clock component BMAL1 is a critical regulator of p21WAF1/CIP1 expression and hepatocyte proliferation," *J Biol Chem*, vol. 283, no. 8, pp. 4535–4542, Feb. 2008, doi: 10.1074/JBC.M705576200.
- [346] D. M. Miller, S. D. Thomas, A. Islam, D. Muench, and K. Sedoris, "c-Myc and Cancer Metabolism," *Clin Cancer Res*, vol. 18, no. 20, p. 5546, Oct. 2012, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0977.
- [347] B. J. Altman *et al.*, "MYC Disrupts the Circadian Clock and Metabolism in Cancer Cells," *Cell Metab*, vol. 22, no. 6, pp. 1009–1019, 2015, doi: 10.1016/J.CMET.2015.09.003.
- [348] A. Katakaki, V. G. Giannakoulis, A. Derventzi, K. Papiris, E. Koniaris, and M. Konstadoulakis, "Membranous CD44v6 is upregulated as an early event in colorectal cancer: Downregulation is associated with circulating tumor cells and poor prognosis," *Oncol Lett*, vol. 22, no. 6, Dec. 2021, doi: 10.3892/OL.2021.13081.
- [349] D. Horst, L. Kriegel, J. Engel, T. Kirchner, and A. Jung, "Prognostic significance of the cancer stem cell markers CD133, CD44, and CD166 in colorectal cancer," *Cancer Invest*, vol. 27, no. 8, pp. 844–850, Oct. 2009, doi: 10.1080/07357900902744502.
- [350] A. Barrantes-Freer *et al.*, "CD133 Expression Is Not Synonymous to Immunoreactivity for AC133 and Fluctuates throughout the Cell Cycle in Glioma Stem-Like Cells," *PLoS One*, vol. 10, no. 6, p. e0130519, Jun. 2015, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0130519.
- [351] K. Kemper *et al.*, "The AC133 epitope, but not the CD133 protein, is lost upon cancer stem cell differentiation," *Cancer Res*, vol. 70, no. 2, pp. 719–729, Jan. 2010, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1820.
- [352] P. M. Glumac and A. M. LeBeau, "The role of CD133 in cancer: a concise review," *Clin Transl Med*, vol. 7, no. 1, p. 18, Dec. 2018, doi: 10.1186/S40169-018-0198-1.
- [353] Y. K. Mou *et al.*, "[Correlation analysis of clock genes and MEN2 medullary thyroid carcinoma]," *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*, vol. 57, no. 9, pp. 1079–1086, Sep. 2022, doi: 10.3760/CMA.J.CN115330-20211225-00822.
- [354] Y. Bu *et al.*, "A PERK-miR-211 axis suppresses circadian regulators and protein synthesis to promote cancer cell survival," *Nat Cell Biol*, vol. 20, no. 1, pp. 104–115, Jan. 2018, doi: 10.1038/S41556-017-0006-Y.
- [355] K. Stokes *et al.*, "The Circadian Clock Gene, Bmal1, Regulates Intestinal Stem Cell Signaling and Represses Tumor Initiation," *CMGH*, vol. 12, no. 5, pp. 1847–1872.e0, Jan. 2021, doi: 10.1016/J.CMGH.2021.08.001/ATTACHMENT/1A9A09FB-B71D-4402-91DB-06617971F926/MMC5.XLSX.
- [356] Z. L. Zeng *et al.*, "Effects of the biological clock gene Bmal1 on tumour growth and anti-cancer drug activity," *J Biochem*, vol. 148, no. 3, pp. 319–326, Sep. 2010, doi: 10.1093/JB/MVQ069.
- [357] C. H. Jung *et al.*, "Bmal1 suppresses cancer cell invasion by blocking the phosphoinositide 3-kinase-Akt-MMP-2 signaling pathway," *Oncol Rep*, vol. 29, no. 6, pp. 2109–2113, Jun. 2013, doi: 10.3892/OR.2013.2381.

- [358] J. O. Lipton *et al.*, "The Circadian Protein BMAL1 Regulates Translation in Response to S6K1-Mediated Phosphorylation," *Cell*, vol. 161, no. 5, pp. 1138–1151, May 2015, doi: 10.1016/J.CELL.2015.04.002.
- [359] J. Hesse, J. Martinelli, O. Aboumanify, A. Ballesta, and A. Relógio, "A mathematical model of the circadian clock and drug pharmacology to optimize irinotecan administration timing in colorectal cancer," *Comput Struct Biotechnol J*, vol. 19, p. 5170, Jan. 2021, doi: 10.1016/J.CSBJ.2021.08.051.
- [360] H. Lu *et al.*, "Circadian gene expression predicts patient response to neoadjuvant chemoradiation therapy for rectal cancer," *Int J Clin Exp Pathol*, vol. 8, no. 9, p. 10985, 2015, Accessed: Oct. 25, 2022. [Online]. Available: /pmc/articles/PMC4637631/
- [361] Z. Liu *et al.*, "Circadian regulation of c-MYC in mice," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 117, no. 35, pp. 21609–21617, Sep. 2020, doi: 10.1073/PNAS.2011225117.
- [362] O. J. Sansom *et al.*, "Myc deletion rescues Apc deficiency in the small intestine," *Nature*, vol. 446, no. 7136, pp. 676–679, Apr. 2007, doi: 10.1038/NATURE05674.
- [363] M. Jia *et al.*, "Circadian clock protein CRY1 prevents paclitaxel-induced senescence of bladder cancer cells by promoting p53 degradation," *Oncol Rep*, vol. 45, no. 3, pp. 1033–1043, Mar. 2021, doi: 10.3892/OR.2020.7914.
- [364] J. Casado *et al.*, "AA-NAT, MT1 and MT2 Correlates with Cancer Stem-Like Cell Markers in Colorectal Cancer: Study of the Influence of Stage and p53 Status of Tumors," *Int J Mol Sci*, vol. 18, no. 6, Jun. 2017, doi: 10.3390/IJMS18061251.
- [365] S. Godar *et al.*, "Growth-inhibitory and tumor-suppressive functions of p53 depend on its repression of CD44 expression," *Cell*, vol. 134, no. 1, pp. 62–73, Jul. 2008, doi: 10.1016/J.CELL.2008.06.006.
- [366] J. Li and B. P. Zhou, "Activation of β -catenin and Akt pathways by Twist are critical for the maintenance of EMT associated cancer stem cell-like characters," *BMC Cancer*, vol. 11, Feb. 2011, doi: 10.1186/1471-2407-11-49.
- [367] C. Liu *et al.*, "The microRNA miR-34a inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44," *Nat Med*, vol. 17, no. 2, pp. 211–216, Feb. 2011, doi: 10.1038/NM.2284.
- [368] Y. Gao *et al.*, "CD44 is a direct target of miR-199a-3p and contributes to aggressive progression in osteosarcoma," *Sci Rep*, vol. 5, Jun. 2015, doi: 10.1038/SREP11365.
- [369] G. H. Rauscher *et al.*, "Exploring DNA methylation changes in promoter, intragenic, and intergenic regions as early and late events in breast cancer formation," *BMC Cancer*, vol. 15, no. 1, Oct. 2015, doi: 10.1186/S12885-015-1777-9.
- [370] B. de Craene and G. Berx, "Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression," *Nat Rev Cancer*, vol. 13, no. 2, pp. 97–110, Feb. 2013, doi: 10.1038/NRC3447.
- [371] R. L. Brown *et al.*, "CD44 splice isoform switching in human and mouse epithelium is essential for epithelial-mesenchymal transition and breast cancer progression," *J Clin Invest*, vol. 121, no. 3, pp. 1064–1074, Mar. 2011, doi: 10.1172/JCI44540.
- [372] C. C. Warzecha, T. K. Sato, B. Nabet, J. B. Hogenesch, and R. P. Carstens, "ESRP1 and ESRP2 are epithelial cell-type-specific regulators of FGFR2 splicing," *Mol Cell*, vol. 33, no. 5, pp. 591–601, Mar. 2009, doi: 10.1016/J.MOLCEL.2009.01.025.
- [373] I. Shakhmantsir and A. Sehgal, "Splicing the Clock to Maintain and Entrain Circadian Rhythms," *J Biol Rhythms*, vol. 34, no. 6, pp. 584–595, Dec. 2019, doi: 10.1177/0748730419868136.
- [374] R. El-Athman, L. Fuhr, and A. Relógio, "A systems-level analysis reveals circadian regulation of splicing in colorectal cancer," *EBioMedicine*, vol. 33, pp. 68–81, Jul. 2018, doi: 10.1016/j.ebiom.2018.06.012.
- [375] R. El-Athman, D. Knezevic, L. Fuhr, and A. Relógio, "A computational analysis of alternative splicing across mammalian tissues reveals circadian and ultradian rhythms in splicing events," *Int J Mol Sci*, vol. 20, no. 16, Aug. 2019, doi: 10.3390/IJMS20163977.
- [376] D. Malhan, A. Basti, and A. Relógio, "Transcriptome analysis of clock disrupted cancer cells reveals differential alternative splicing of cancer hallmarks genes," *NPJ Syst Biol Appl*, vol. 8, no. 1, Dec. 2022, doi: 10.1038/S41540-022-00225-W.
- [377] Y. Kinugasa, T. Matsui, and N. Takakura, "CD44 expressed on cancer-associated fibroblasts is a functional molecule supporting the stemness and drug resistance of malignant cancer cells in the tumor microenvironment," *Stem Cells*, vol. 32, no. 1, pp. 145–156, Jan. 2014, doi: 10.1002/STEM.1556.
- [378] J. Manhas *et al.*, "Characterization of cancer stem cells from different grades of human colorectal cancer," *Tumor Biology*, vol. 37, no. 10, pp. 14069–14081, Oct. 2016, doi: 10.1007/S13277-016-5232-6/FIGURES/6.
- [379] S. H. Cho *et al.*, "CD44 enhances the epithelial-mesenchymal transition in association with colon cancer invasion," *Int J Oncol*, vol. 41, no. 1, pp. 211–218, Jul. 2012, doi: 10.3892/IJO.2012.1453.
- [380] M. Jeffery, B. E. Hickey, and P. N. Hider, "Follow-up strategies for patients treated for non-metastatic colorectal cancer," *Cochrane Database of Systematic Reviews*, vol. 2019, no. 9, Sep. 2019, doi: 10.1002/14651858.CD002200.PUB4.
- [381] C. de Mei *et al.*, "Dual inhibition of REV-ERB β and autophagy as a novel pharmacological approach to induce cytotoxicity in cancer cells," *Oncogene*, vol. 34, no. 20, pp. 2597–2608, May 2015, doi: 10.1038/ONC.2014.203.

- [382] M. Yu, W. Li, Q. Wang, Y. Wang, and F. Lu, "Circadian regulator NR1D2 regulates glioblastoma cell proliferation and motility," *Oncogene*, vol. 37, no. 35, pp. 4838–4853, Aug. 2018, doi: 10.1038/S41388-018-0319-8.
- [383] H. Tong *et al.*, "Nr1d2 accelerates hepatocellular carcinoma progression by driving the epithelial-to-mesenchymal transition," *Onco Targets Ther*, vol. 13, pp. 3931–3942, 2020, doi: 10.2147/OTT.S237804.
- [384] K. Shimozaaki, "Involvement of Nuclear Receptor REV-ERB β in Formation of Neurites and Proliferation of Cultured Adult Neural Stem Cells," *Cell Mol Neurobiol*, vol. 38, no. 5, pp. 1051–1065, Jul. 2018, doi: 10.1007/S10571-018-0576-7/FIGURES/5.
- [385] M. X. He *et al.*, "Transcriptional mediators of treatment resistance in lethal prostate cancer," *Nat Med*, vol. 27, no. 3, pp. 426–433, Mar. 2021, doi: 10.1038/S41591-021-01244-6.
- [386] R. Ikeda *et al.*, "REV-ERB α and REV-ERB β function as key factors regulating Mammalian Circadian Output," *Sci Rep*, vol. 9, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1038/S41598-019-46656-0.
- [387] P. Dalerba *et al.*, "Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 104, no. 24, pp. 10158–10163, 2007.
- [388] M. Ozawa *et al.*, "Prognostic significance of CD44 variant 2 upregulation in colorectal cancer," *Br J Cancer*, vol. 111, no. 2, pp. 365–374, Jul. 2014, doi: 10.1038/BJC.2014.253.
- [389] B. bin Wang, Z. J. Li, F. F. Zhang, H. T. Hou, J. K. Yu, and F. Li, "Clinical significance of stem cell marker CD133 expression in colorectal cancer," *Histol Histopathol*, vol. 31, no. 3, pp. 299–306, Mar. 2016, doi: 10.14670/HH-11-676.
- [390] S. Chen *et al.*, "CD133 expression and the prognosis of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis," *PLoS One*, vol. 8, no. 2, Feb. 2013, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0056380.
- [391] C. Fang *et al.*, "Prognostic value of CD133+ CD54+ CD44+ circulating tumor cells in colorectal cancer with liver metastasis," *Cancer Med*, vol. 6, no. 12, pp. 2850–2857, Dec. 2017, doi: 10.1002/CAM4.1241.
- [392] R. Huang, D. Mo, J. Wu, H. Ai, and Y. Lu, "CD133 expression correlates with clinicopathologic features and poor prognosis of colorectal cancer patients: An updated meta-analysis of 37 studies," *Medicine*, vol. 97, no. 23, Jun. 2018, doi: 10.1097/MD.00000000000010446.
- [393] Y. Y. Park, C. H. An, S. T. Oh, E. D. Chang, J. Lee, and V. C. Kok, "Expression of CD133 is associated with poor prognosis in stage II colorectal carcinoma," *Medicine*, vol. 98, no. 32, Aug. 2019, doi: 10.1097/MD.00000000000016709.
- [394] Y. Umemura *et al.*, "Involvement of posttranscriptional regulation of Clock in the emergence of circadian clock oscillation during mouse development," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 114, no. 36, pp. E7479–E7488, Sep. 2017, doi: 10.1073/PNAS.1703170114/SUPPL_FILE/PNAS.1703170114.SD04.XLSX.
- [395] I. al Mheid *et al.*, "Circadian variation in vascular function and regenerative capacity in healthy humans," *J Am Heart Assoc*, vol. 3, no. 3, 2014, doi: 10.1161/JAHA.114.000845.
- [396] P. Jiang *et al.*, "Epigallocatechin-3-gallate inhibits self-renewal ability of lung cancer stem-like cells through inhibition of CLOCK," *Int J Mol Med*, vol. 46, no. 6, pp. 2216–2224, Dec. 2020, doi: 10.3892/IJMM.2020.4758.