

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacología

Programa de Doctorado en Bioquímica y Biología Molecular



**Estudio del Papel de PARP-1 en el Desarrollo y
Progresión del Cáncer Colorrectal**

Tesis doctoral presentada para aspirar al grado de Doctor con
mención internacional presentada por

Jose David Puentes Pardo

Bajo la dirección de los doctores:

Julio Juan Gálvez Peralta

Josefa León López

Granada, 2025

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: José David Puentes Pardo
ISBN: 978-84-1195-763-2
URI: <https://hdl.handle.net/10481/103259>

El doctorando **Jose David Puentes Pardo** y los directores de la tesis **Julio Juan Gálvez Peralta** y **Josefa León López**

Garantizamos al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo recogida en esta memoria ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis, y hasta donde nuestro conocimiento alcanza se han respetado los derechos de otros autores al ser citados cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones

Directores de la tesis:

Doctorando:

Julio Juan Gálvez Peralta Josefa León López

Jose David Puentes Pardo

La realización de esta tesis doctoral ha sido posible gracias a la financiación proporcionada por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades a través del contrato predoctoral “Ayudas para la Formación del Profesorado Universitario FPU” con referencia FPU19/02269. Dicha ayuda se disfrutó encuadrada en los proyectos PI19/01058 y PI18/01947 financiados por el Instituto de Salud Carlos III. Además, se contó con una ayuda para la realización de una estancia breve de 3 meses, en el *Institut de Génomique Fonctionnelle* de Montpellier, financiada por *The Federation of European Biochemical Societies*.

ÍNDICE

Índice

<i>ABREVIATURAS</i>	1
<i>RESUMEN</i>	7
<i>ABSTRACT</i>	13
<i>INTRODUCCIÓN</i>	19
1. CÁNCER.....	21
2. CÁNCER COLORRECTAL.....	22
a. Perspectivas generales	22
b. Carcinogénesis.....	24
c. Prevención, diagnóstico y tratamiento	27
d. Recurrencia y metástasis.....	30
3. CÉLULAS MADRE CANCERÍGENAS.....	32
a. Epitelio colónico y células madre.....	34
b. Células madre cancerígenas y cáncer colorrectal	35
4. TP53.....	38
a. p53 y cáncer.....	39
b. p53 y células madre cancerígenas.....	41
c. p53 y cáncer colorrectal	42
5. RITMOS CIRCADIANOS	43
a. Ritmos circadianos y cáncer.....	46
b. Ritmos circadianos y p53	49
c. Ritmos circadianos y células madre cancerígenas	50
d. Ritmos circadianos y cáncer colorrectal.....	51
6. PARP-1.....	53
a. PARP-1 y ritmos circadianos	59
b. PARP-1 y cáncer	61
c. PARP-1 y p53	66

Índice

d. PARP-1 y células madre cancerígenas.....	67
e. PARP-1 y cáncer colorrectal.....	68
JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	71
1. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS	73
2. OBJETIVOS.....	76
MATERIALES Y MÉTODOS.....	77
1. ESTUDIO EN MUESTRAS DE COHORTE DE PACIENTES	79
2. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO.....	80
3. ANÁLISIS DEL ESTADO DE TP53	80
4. EXTRACCIÓN DE ARN	81
5. SINTESIS DE ADNc.....	81
6. Q-PCR EN TIEMPO REAL	81
7. LÍNEAS CELULARES Y CULTIVO.....	82
8. TRANSFECCIÓN	83
a. Transfección transitoria	83
b. Transfección estable.....	84
9. OBTENCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEINAS.....	84
10. Western Blot.....	85
11. CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE CANCERÍGENAS.....	86
a. Cuantificación de la población aldefluor deshidrogenasa-1 (ALDH1) positiva .	86
b. Caracterización fenotípica de los marcadores de superficie CD44, CD326 y CD133	87
c. Caracterización fenotípica de los marcadores internos NANOG, SOX2, OCT3/4, y superficie LGR5	87
d. Capacidad de formación de esferas.....	88
e. Caracterización fenotípica del marcador de superficie CD44v6.....	88
12. ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN	89
a. Ensayo con MTT	89

b. Ensayo de división con CFSE	89
13. MODELO <i>IN VIVO</i>	90
14. ANÁLISIS RITMO CIRCADIANO.....	90
a. Obtención de muestras de ARN para el estudio del ritmo circadiano	90
b. Análisis de la ritmicidad	90
15. ENSAYOS DE VIABILIDAD	91
a. Ensayo con MTT	91
b. Ensayo con SRB	92
c. Ensayo con Cell Titer-Glo.....	92
16. ANÁLISIS DE EFECTOS SINÉRGICOS.....	93
17. ENSAYO CLONOGÉNICOS	93
18. ENSAYO DE APOPTOSIS	94
19. CICLO CELULAR.....	94
20. ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> DEL PERFIL DE PARP-1 EN CTCs Y METÁSTASIS... 94	
21. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	95
RESULTADOS	97
CAPÍTULO 1: LA EXPRESIÓN DE PARP-1 INFLUYE EN EL FENOTIPO DE LAS CÉLULAS MADRE CANCERÍGENAS EN EL CÁNCER COLORRECTAL DEPENDIENDO DE P53	99
1. PARP-1 se encuentra sobreexpresado en el tejido tumoral.....	99
2. PARP-1 se asocia con el grado de diferenciación según el estado de p53.....	100
3. La expresión elevada de PARP-1 en tumores con p53 mutado es un factor pronóstico independiente de supervivencia	101
4. Los marcadores de CMCs se encuentran sobreexpresados en el tejido tumoral	103
5. La expresión de PARP-1 se correlaciona con la expresión de marcadores de CMCs según el estado de p53.....	104
6. PARP-1 se encuentra sobreexpresada en las CMCs de tumores con p53 salvaje	106

7. Desarrollo de un modelo <i>in vitro</i> para el estudio del efecto de PARP-1 sobre el fenotipo de las CMCs.....	107
8. La sobreexpresión de PARP-1 regula el fenotipo de las CMCs de forma diferencial según el estado de p53	107
CAPÍTULO 2: LA REGULACIÓN CIRCADIANA DIFERENCIAL DE PARP-1 SEGÚN P53 MODULA EL CARÁCTER DE LAS CÉLULAS MADRE CANCERÍGENAS EN EL CÁNCER COLORRECTAL	111
1. Los genes del reloj circadiano se encuentran infraexpresados en el tejido tumoral.....	111
2. La expresión de los genes del reloj circadiano se asocian con la expresión de marcadores de CMCs dependiendo del estado de p53.....	113
3. PARP-1 y los genes circadianos se correlacionan de manera diferencial según el nivel de expresión de los marcadores de CMCs y el estado de p53	115
4. Desarrollo de un modelo <i>in vitro</i> de sobreexpresión de PARP-1	116
5. La sobreexpresión de PARP-1 altera el crecimiento de manera diferencial según el estado de p53 <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	117
6. La sobreexpresión de PARP-1 incrementa las características de las CMCs en las células p53 salvaje, pero no en las p53 mutadas	119
7. La sobreexpresión de PARP-1 regula de forma diferencial el ritmo circadiano según el estado de p53.....	123
8. El olaparib disminuye la viabilidad celular independientemente del estado de p53 y la expresión de PARP-1.....	126
9. El tratamiento con olaparib induce acumulación en G2/M y aumento de la tasa de apoptosis	129
10. El olaparib afecta al fenotipo de CMCs según p53 y la sobreexpresión de PARP-1.....	131
11. El olaparib altera el ritmo circadiano de PER1 y REV-ERB β en las líneas estudiadas.....	133
CAPÍTULO 3: ANÁLISIS DEL PERFIL DE PARP-1 EN LÍNEAS CELULARES DERIVADAS DE PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL Y LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON OLAPARIB Y OXALIPLATINO	139
1. Evaluación del estado de TP53 en las líneas derivadas de pacientes	139
2. Análisis de la expresión de PARP-1 en las líneas derivadas de pacientes	139

3. Las CTCs presentan menores niveles de expresión de PARP-1	141
4. Selección de las líneas celulares para el estudio de respuesta al tratamiento con olaparib y oxaliplatino.....	143
5. El oxaliplatino y el olaparib inhiben el crecimiento de células metastásicas.	144
6. La combinación de olaparib y oxaliplatino ejerce un efecto sinérgico sobre la viabilidad en las células metastásicas.....	145
7. La combinación de olaparib y oxaliplatino ejerce un efecto sinérgico o antagónico sobre la población de CMCs en las células metastásicas según el estado de p53.....	147
8. El oxaliplatino y el olaparib reducen la viabilidad de las CTCs.....	149
9. La combinación de olaparib y oxaliplatino ejerce un efecto sinérgico sobre la viabilidad en las CTCs a dosis elevadas	151
10. El tratamiento con olaparib en CTCs aumenta el marcador de CMCs CD44v6 cuando p53 está mutado.....	153
DISCUSIÓN	155
CONCLUSIONES	193
CONCLUSIONS	197
BIBLIOGRAFÍA	201
ANEXOS	235
a. Materiales y Métodos.....	237
b. Resultados	241
c. Publicaciones.....	244
d. Estancias de investigación.....	245
d. Cursos y otros meritos.....	245

Índice

ABREVIATURAS

5-FU: 5-fluoracilo

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADP: adenosin difosfato

ADPr: adenosin difosfato ribosa

AJCC: comité conjunto americano del cáncer

ALDH1: aldehído deshidrogenasa 1

AMP: adenosin monofosfato

APC: *adenomatous polyposis coli*

AP-1: proteína activadora 1

ARN: ácido ribonucleico

ATM: ataxia telangiectasia mutado

ATP: adenosin trifosfato

BAAA: BODIPY-aminocetaldehído

BAX: proteína X asociada a Bcl-2

BCL-2: linfoma de células B2

BER: reparación por escisión de bases

BMAL1: *brain and muscle ARNT-like 1*

BMP: proteínas morfogénicas óseas

BRAF: proto oncogen B-RAF

BRCA1/2: gen cáncer de mama 1/2

CBC: células columnares de la base de la cripta

CCG: genes controlados por el reloj circadiano

CCR: cáncer colorectal

CFSE: éster de succinimidil-carboxifluoresceína

CHK2: *checkpoint kinase 2*

CIN: inestabilidad cromosómica

Abreviaturas

CK1 α : caseína quinasa 1 α

CLOCK: *circadian locomotor cycles kaput*

CMC: célula madre cancerígena

COX-2: ciclooxigenasa 2

CRL4B: complejo ligasa cullin4B-ring E3

CRM1: *chromosome region maintenance 1 homolog*

CRY: criptocromo

CTC: célula tumoral circulante

CTD: dominio carboxilo terminal

DBP: proteína de unión al promotor del sitio D de la albumina

DEAB: dietilaminobezaldehído

DSS: sulfato de dextrano sódico

EGF: factor de crecimiento epidérmico

FBS: suero fetal bovino

FDA: administración de alimentos y medicamentos

FOLFIRI: tratamiento con leuovorina + 5-fluoracilo + irinotecan

FOLFOX: tratamiento con leuovorina + 5-fluoracilo + oxaliplatino

FOLFOXIRI: tratamiento con leuovorina + 5-fluoracilo + oxaliplatino + irinotecan

FOXO3: forkhead box O3

GSK3: glucógeno sintasa quinasa 3

HIF1: factor 1 inducible por hipoxia

HLF: factor de leucemia hepática

HR: reparación por recombinación homóloga

HSA: modelo de sinergia por agente individual más alto

IARC: agencia internacional para la investigación sobre el cáncer

IC: intervalo de confianza

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible

iPARP-1: inhibidores de PARP-1

KIAA1199: proteína inductora de migración celular

KRAS: kirsten rat sarcoma virus

LGR5: receptor 5 acoplado a proteína G

LRP5/6: receptor de lipoproteínas de baja intensidad 5/6

LV: leuovorina

MDM2: mouse double minute 2 homolog

METTL3: subunidad N6-adenosina-metiltransferasa

MESOR: estimación estadística del valor medio del ritmo

MMR: reparación por apareamiento erróneo

MSI: inestabilidad de microsatélites

mtp53: p53 mutante

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5,-difetil tetrazolio

NAD: nicotinamida adenina dinucleótido

NADP: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NAMPT: nicotinamida fosforribosil transferasa

NER: reparación por escisión de nucleótido

NFAT: factor nuclear de las células T activadas

NF-kB: factor nuclear kappa B

NFIL3: factor nuclear regulado por la interleucina 3

NHEJ: reparación por unión de extremos no homólogos

NOTCH: proteína homóloga de la muesca del locus neurogénico

NRF2: factor nuclear 2 derivado de eritroide

NSQ: núcleo supraquiasmático

OCT3/4: factor de transcripción de unión al octamero 3/4

Abreviaturas

OMS: organización mundial de la salud

p53: proteína tumoral 53

PAR: cadenas de poli-ADP-ribosa

PARG: poli (ADP-ribosa) glicohidrolasa

PARP: poli (ADP-ribosa) polimerasa

PBS: tampón fosfato salino

PD-L1: ligando 1 de muerte programada

PER: homólogo de la proteína del periodo circadiano

PRMT6: arginina N-metiltransferasa 6

PTEN: fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa

PTDO: organoides derivados de pacientes

REV-ERB: receptor nuclear de la subfamilia 1 grupo D

ROR: receptor nuclear de la subfamilia 1 grupo F

SDS: sodio dodecil sulfato

SIRT-1: sirtuina 1

SRB: sulforodamina B

SSBR: reparación de roturas de cadenas simple

TBP: proteína de unión a TATA

TEF: factor embrionario tirotrofo

TNM: clasificación tumor/metástasis/nódulo

TP53BP1: proteína de unión al supresor tumoral p53

UBC: ubiquitina C

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

WNT: wingless-related integration site

wtp53: p53 salvaje

RESUMEN

El cáncer colorrectal (CCR) es el tercer tipo de cáncer con mayor incidencia, y el segundo con mayor tasa de mortalidad a nivel mundial. A pesar de que en las últimas décadas se han producido grandes avances en cuanto a la prevención, diagnóstico y mejoras de los tratamientos, éstos no han resultado en mejoras clínicas sustanciales. Esto revela la necesidad de la búsqueda de nuevos biomarcadores con los que mejorar la detección y pronóstico del CCR, así como la potencial respuesta a los tratamientos disponibles o nuevas dianas de tratamiento con el objetivo de desarrollar una medicina personalizada con mayor probabilidad de éxito para el paciente.

La poli-(ADP-ribosa) polimerasa 1 (PARP-1) es una enzima que se caracteriza por la síntesis y transferencia de cadenas ADP-ribosa a distintos sustratos. En un principio PARP-1 se relacionó con la reparación del ADN debido a su función en el reclutamiento y activación de las proteínas involucradas en éste. Sin embargo, en los últimos años se ha observado que PARP-1 también está involucrada en la regulación de diferentes procesos biológicos estrechamente relacionados con el cáncer. Además, el hecho de que PARP-1 esté sobreexpresada en distintos tipos tumorales, sugiere un potencial papel en el desarrollo y progresión tumoral. En este sentido se están utilizando inhibidores de PARP-1 (iPARP-1) como tratamiento del cáncer de ovario y mama con deficiencias en los sistemas de reparación del ADN. Sin embargo, algunos de estos pacientes, o en otros tipos tumorales como el CCR no se obtienen los resultados esperados, sugiriendo que la función de PARP-1, y por tanto la respuesta a los iPARP-1 podría depender de otros contextos.

El objetivo principal de este trabajo ha sido describir el potencial papel de PARP-1 en el desarrollo y progresión del CCR a través de la regulación de las células madre cancerígenas (CMC), consideradas por muchos autores como las responsables del proceso de tumorigénesis, en el contexto del estado del supresor tumoral p53, así como su posible mecanismo. Además, se ha determinado si el uso de iPARP-1 es positivo según el contexto de p53 en el CCR.

Para ello hemos analizado el nivel de expresión de *PARP-1* en una cohorte de pacientes con CCR, en la que previamente se había evaluado el estado de p53, salvaje (wtp53) o mutante (mtp53). Según nuestros resultados, *PARP-1* se encontró sobreexpresada en el tejido tumoral de los pacientes con CCR independientemente del estado de p53.

A nivel de la supervivencia, se observó una mayor supervivencia global y libre de la enfermedad en aquellos tumores mtp53 con una expresión alta de *PARP-1*, frente a la expresión baja. Además, en mtp53, la expresión elevada de *PARP-1* era un factor pronóstico independiente para una mayor tasa supervivencia. La expresión de *PARP-1* se relacionó con tumores pobre y moderadamente diferenciados al analizarla en toda la cohorte, o en aquellos tumores con wtp53. Dado que dicho grado de diferenciación se asocia con la presencia de CMCs, se analizó la expresión de los marcadores de CMCs *CD44* y *CD133*, encontrándose éstos sobreexpresados. Aunque la expresión de *PARP-1* se correlacionó positivamente con la expresión de *CD44* y *CD133*, independientemente de p53, al agrupar la expresión de los dos marcadores y estratificar a los pacientes en *CD44CD133* alto y bajo, se observó que la expresión alta de *PARP-1* se correlacionaba con la expresión de *CD44CD133*_{ALTO} al considerar todos los casos o aquellos con wtp53. Además, los niveles de *PARP-1* son mayores en el grupo *CD44CD133*_{ALTO} al tener en cuenta todos los tumores o aquellos wtp53. Esto sugiere una posible regulación diferencial de *PARP-1* sobre las CMCs según el estado de p53.

Para corroborar estos resultados, se realizaron estudios *in vitro* utilizando dos líneas celulares isogénicas de CCR, con diferente estado de p53, HCT-116 (wtp53) y HCT-116 p53^{-/-} sobreexpresando *PARP-1* de forma transitoria. El análisis fenotípico de los marcadores *ALDH1* y *CD44CD326CD133*, y funcional, mediante el ensayo de formación de esferas, de las CMCs mostró diferencias según p53 tras la sobreexpresión de *PARP-1*. Mientras que en la línea con p53 funcional la sobreexpresión produjo un enriquecimiento en los marcadores de CMCs y una mayor capacidad de formación de esferas, en la línea p53^{-/-} disminuyeron las propiedades de las CMCs tras la sobreexpresión de *PARP-1*. De esta forma se confirmaron los resultados obtenidos en la cohorte de estudio.

Teniendo en cuenta que *PARP-1* regula los ritmos circadianos en condiciones fisiológicas, y la relación entre los ritmos circadianos – p53 – CMCs, nuestra hipótesis era que *PARP-1* ejerce su regulación diferencial sobre las CMCs a través de una regulación diferencial de los ritmos circadianos según p53. En la cohorte de estudio se observó una menor expresión de los genes del reloj *BMAL1*, *PER1-3* y *REV-ERBβ*, independiente del estado de p53, a excepción de *REV-ERBβ* en mtp53. En aquellos pacientes con wtp53, una alta expresión de *PER1* se correlacionó con una baja expresión de *CD44CD133*, mientras que una baja expresión de *PER3* se correlacionaba con una elevada expresión de *CD44CD133*,

y la baja expresión de *CLOCK* y *REV-ERB β* lo hacía con una baja expresión de *CD44CD133*. Al observar la relación de *PARP-1* con los genes del reloj y los marcadores de CMCs, observamos la relación positiva con *CLOCK* en los tumores mtp53 con baja expresión de marcadores de CMCs. Sin embargo, en los tumores wtp53, *PARP-1* se correlacionaba positivamente con *REV-ERB β* , y negativamente con *PER1-2* en tumores con elevada expresión de *CD44CD33*. Estos resultados sugerían una relación diferencial de *PARP-1* con los genes del reloj y los marcadores de CMCs según p53, que podría explicar el efecto observado sobre las CMCs.

Para evaluarlo, se realizó un nuevo modelo *in vitro* utilizando la línea HCT-116 (wtp53) y HT-29 (mtp53) sobreexpresando *PARP-1* de manera estable, y sincronizando los ritmos circadianos antes de cada experimento. Las células wtp53 con sobreexpresión de *PARP-1* presentaban una mayor tasa de proliferación, observándose el efecto contrario en la línea mtp53. Estos resultados a nivel de crecimiento tumoral se corroboraron en un modelo murino *in vivo* de tumores subcutáneos de CCR derivados de las distintas líneas celulares. El análisis del fenotipo de CMCs en el contexto de la sincronización circadiana volvió a mostrar que en la línea wtp53, la sobreexpresión de *PARP-1* producía un aumento de los marcadores estudiados anteriormente, de los marcadores *LGR5*, *SOX2*, *NANOG* y *OCT3/4*, y de la capacidad de formación de esferas; propiedades que se vieron reducidas o no modificadas tras la sobreexpresión en la línea mtp53, confirmando nuevamente los resultados anteriores. La sobreexpresión de *PARP-1* en la línea wtp53 provocó una potenciación general del ritmo circadiano de *PER1* y *REV-ERB β* , mientras que lo debilitó en *PER1-3* y *REV-ERB β* en la línea mtp53, lo que explicaría el efecto observado sobre las CMCs, al depender éstas de un ritmo circadiano robusto.

El tratamiento con olaparib, un i*PARP-1*, disminuyó la viabilidad celular a través del aumento de la apoptosis y la parada en la fase G2/M del ciclo celular. Al analizar su efecto sobre los marcadores de CMCs, se observó una reversión del efecto observado tras la sobreexpresión de *PARP-1* en la línea wtp53. Sin embargo, al analizarlo a nivel funcional se observó una disminución general de la capacidad de formación de esferas, más marcada en las líneas wtp53, pero que en las líneas mtp53 venía acompañado de un cambio fenotípico a uno más agresivo. El olaparib también revirtió la potenciación del ritmo observada tras la sobreexpresión de *PARP-1* en la línea wtp53, mientras que en las líneas mtp53 los altera de forma distinta según la expresión de *PARP-1*.

Finalmente se analizó la expresión de PARP-1 en líneas celulares derivadas de paciente con distinto origen: primario, metástasis y células tumorales circulantes (CTCs). La expresión de PARP-1 fue menor en las CTCs analizadas, lo que concuerda con datos de expresión de otras cohortes de CCR, sugiriendo que esta disminución podría ser uno de los mecanismos para su supervivencia en el torrente sanguíneo.

El tratamiento de líneas metastásicas y CTCs con olaparib u oxaliplatino tuvo un efecto citotóxico dosis-dependiente, presentando las CTCs una mayor resistencia al tratamiento. Además, la combinación de ambos fármacos presentó un efecto sinérgico, observándose a dosis bajas en las líneas metastásicas, mientras que en las CTCs lo hacía a las dosis más altas. Al analizar el efecto sobre la población de CMCs se observó que el tratamiento en líneas con wtp53 redujo esta población, sin embargo, en el contexto de mtp53 generó un enriquecimiento de dicha población.

En base a todos estos resultados, podemos concluir que esta tesis doctoral avanza en el estudio del papel de PARP-1 en el desarrollo y progresión del CCR. *PARP-1* se encuentra sobreexpresado en los tumores de CCR, con un efecto distinto según el contexto de p53. Mientras que en los tumores con p53 funcional, PARP-1 favorece el fenotipo de CMCs mediante la potenciación de los ritmos circadianos; en los tumores con p53 mutado, la expresión elevada de *PARP-1* es un factor pronóstico independiente para la supervivencia, deteriorando el fenotipo de las CMCs mediante una debilitación de los ritmos circadianos. El tratamiento con olaparib revierte y disminuye a nivel funcional las propiedades de las CMCs en células wtp53, y, aunque en las mtp53 tiene un efecto similar a nivel funcional, se promueve un fenotipo más agresivo, perjudicial para el paciente a pesar de su efecto antitumoral en términos de viabilidad. La expresión de *PARP-1* varía según el origen de la célula tumoral, siendo menor en las CTCs, lo que podría ser uno de los mecanismos que presentan para sobrevivir en el torrente sanguíneo. Además, el tratamiento con olaparib o combinado con oxaliplatino de las células metastásicas y CTCs, a pesar de su efecto citotóxico, reduce la población de CMCs en el contexto de wtp53, pero lo favorece en el de mtp53.

Esto explicaría la falta de resultados positivos en los tratamientos con iPARP-1 en CCR, al no tenerse normalmente p53 en consideración, y abriría la puerta a estrategias terapéuticas con éste tipo de fármacos teniendo en cuenta el contexto de p53.

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is the third most common type of cancer and the second one with the highest mortality rate worldwide. Despite great advances done in terms of prevention, diagnosis and treatment improvements in recent decades, these have not resulted in substantial clinical improvements. This reveals the need to the search for new biomarkers to improve the detection and prognosis of CRC, as well as the potential response to available treatments or new treatment targets in order to develop personalized medicine with a greater probability of success for patients.

Poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) is an enzyme characterized by the synthesis and transfer of ADP-ribose chains to several substrates. Initially PARP-1 was associated with DNA repair due to its role in the recruitment and activation of proteins involved in this process. However, in the recent years it has been described that PARP-1 is also involved in the regulation of different biological processes closely related to cancer. Moreover, the fact that PARP-1 is overexpressed in a number of tumour types suggests a potential role in tumour development and progression. In this regard, PARP-1 inhibitors (iPARP-1) are being used as treatment for ovarian and breast cancer with deficient DNA repair systems. However, some of these patients, or in other tumour types such as CRC, iPARP-1 do not obtain the expected results, suggesting that PARP-1 function, and therefore, the response to iPARP-1 may depend on other contexts.

The main objective of this thesis work was to describe the potential role of PARP-1 in the development and progression of CRC by regulating cancer stem cells (CSCs), considered by many authors to be responsible for the process of tumourigenesis, taking into account the status of the tumour suppressor p53, as well as its possible mechanism. In addition, it was intended to determine whether the use of iPARP-1 was positive in the context of p53 in CRC.

To this end, *PARP-1* expression was analysed from a cohort of CRC patients, in which p53 status, wild-type (wtp53) or mutant (mtp53), was assessed. *PARP-1* was found to be overexpressed in the tumour tissue of CRC patients regardless of p53 status.

In terms of survival, higher overall and disease-free survival was observed in mtp53 tumours with high *PARP-1* expression, compared to low expression. In addition, in mtp53, high *PARP-1* expression was an independent prognostic factor for survival. *PARP-1* expression was associated with poorly and moderately differentiated tumours when analysed in the entire cohort, or in

Abstract

those tumours with wtp53. Since this degree of differentiation is associated with the presence of CSCs, the expression of the CMC markers *CD44* and *CD133* was analysed and found to be overexpressed. Although PARP-1 expression correlated positively with *CD44* and *CD133* expression, independently of p53, when pooling the expression of the two markers together, and stratifying patients into *CD44CD133* high and low, it was observed that high PARP-1 expression correlated with *CD44CD133*_{HIGH} when considering all cases or those with wtp53. Furthermore, *PARP-1* levels are higher in the *CD44CD133*_{HIGH} group when all, or wtp53 tumours are taken into account. This suggests a possible differential regulation of PARP-1 on CSCs, according to p53 status.

To corroborate these results, *in vitro* studies were performed using two isogenic CRC cell lines with different p53 status, HCT-116 (wtp53) and HCT-116 p53^{-/-} overexpressing PARP-1 transiently. Phenotypic analysis of ALDH1 and *CD44CD326CD133* markers, and functional analysis, through the sphere formation assay, of the CSCs showed differences depending on p53 after PARP-1 overexpression. While in the functional p53 cell line, overexpression resulted in an enrichment of CSCs markers and an increased sphere-forming capacity, in the p53^{-/-} cell line the properties of CSCs were decreased after PARP-1 overexpression. This confirmed the results obtained in the study cohort.

Because PARP-1 regulated circadian rhythm under physiological conditions, and the relationship between circadian rhythms – p53 – CSCs, we hypothesised that PARP-1 exerts its differential regulation on CSCs through differential regulation of circadian rhythms depending on p53. In the study cohort, we observed lower expression of the clock genes *BMAL1*, *PER1-3* and *REV-ERB β* , independent of p53 status, except for *REV-ERB β* on mtp53. In those patients with wtp53, high *PER1* expression correlated with low *CD44CD133* expression, while low *PER3* expression correlated with high *CD44CD133* expression, and low *CLOCK* and *REV-ERB β* expression correlated with low *CD44CD133* expression. Looking at the relationship of *PARP-1* with clock genes and CSCs markers, we observed a positive relationship with *CLOCK* in mtp53 tumours with low expression of CSCs markers. However, in wtp53 tumours, PARP-1 correlated positively with *REV-ERB β* , and negatively with *PER1-2* in tumours with high *CD44CD133* expression. These results suggested a differential relationship of PARP-1 with clock genes and CSCs markers depending on p53, which could explain the observed effect on CMCs.

To evaluate this, a new *in vitro* model was performed using the HCT-116 (wtp53) and HT-29 (mtp53) cell lines overexpressing PARP-1 stably, and synchronising circadian rhythms before each experiment. PARP-1 overexpressing wtp53 cell lines showed a higher proliferation rate, with the opposite effect observed in the mtp53 cell line. These tumour growth results were corroborated in an *in vivo* murine model of subcutaneous CRC tumours derived from the different cell lines. Analysis of the phenotype of CSCs in the context of circadian synchronisation showed again that in the wtp53 cell line, PARP-1 overexpression led to an increase in the previously studied markers, in LGR5, SOX2, NANOG and OCT3/4 markers, and in sphere-forming capacity; properties that were reduced or unchanged after PARP-1 overexpression in the mtp53 cell line. This confirmed again, the previous results. PARP-1 overexpression in the wtp53 cell line led to an overall enhancement of the circadian rhythm of PER1 and REV-ERB β , whereas it weakened it in PER1-3 and REV-ERB β , in the mtp53 cell line, which would explain the observed effect on CMC, as they depend on a robust circadian rhythm.

Treatment with olaparib, an iPARP-1, decreased cell viability through increased apoptosis and arrest in the G2/M phase of the cell cycle. When analysing its effect on CSCs markers, the effect observed after PARP-1 overexpression in the wtp53 cell line was reversed. However, when analysed at the functional level, an overall decrease in sphere-forming capacity was observed, most marked in wtp53 cell lines, but accompanied by a phenotypic shift to a more aggressive one in mtp53 cells. Olaparib also reversed the enhancement of the rhythm observed following PARP-1 overexpression in wtp53 cells, whereas in the mtp53 it alters them differently depending on PARP-1 expression.

Finally, PARP-1 expression was analysed in cell lines derived from patients with different origins, primary, metastatic and circulating tumour cells (CTCs). PARP-1 expression was lower in CTCs analysed, which is consistent with expression data from other CRC cohorts, suggesting that this may be one of the mechanisms for its survival in the bloodstream.

Treatment of metastatic cell lines and CTCs with olaparib or oxaliplatin had a dose-dependent cytotoxic effect, with CTCs showing increased resistance to treatment. In addition, the combination of both drugs has a synergistic effect, observed at low doses in metastatic cell lines, while in CTCs it is observed at higher doses. When analysing the effect on the CSCs population, it is observed

Abstract

that the treatment in the cell lines with wtp53 reduces this population, while treatment in the context of mtp53 generates an enrichment of this population.

Based on all these results, we can conclude that this doctoral thesis advances the study of the role of PARP-1 in the development and progression of CRC. *PARP-1* is overexpressed in CRC tumours with different effect depending on p53 context. While in tumours with functional p53, PARP-1 favours the phenotype of CSCs by enhancing circadian rhythms; in tumours with mutated p53, elevated *PARP-1* expression is an independent prognostic factor for survival, impairing the phenotype of CSCs by weakening circadian rhythms. Olaparib treatment reverses and functionally diminishes the CSCs properties of wtp53 cells, and, although it has a similar effect on mtp53 cells at functional level, it promotes a more aggressive phenotype, detrimental to the patient despite its antitumoural effect in terms of viability. *PARP-1* expression varies according to the origin of the tumour cell, being lower in CTCs, which could be one of the mechanisms they present to survive in the bloodstream. Moreover, despite their cytotoxic effect, the treatment of metastatic cells and CTCs with olaparib, alone or in combination with oxaliplatin, reduces the population of CSCs in the context of wtp53, but favours it in the context of mtp53.

This would explain the lack of positive results with iPARP-1 treatments in CRC, as p53 is not normally taken into consideration, and would open the door to therapeutic strategies with this type of drug taking into account the p53 context.

INTRODUCCIÓN

1. CÁNCER

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es un término genérico utilizado para describir a un grupo heterogéneo y amplio de enfermedades, que pueden afectar a cualquier tejido u órgano del organismo, caracterizadas por un proceso de crecimiento descontrolado de células anormales, y que, además, tienen la capacidad de diseminarse e invadir otras partes del cuerpo.

Aunque en los últimos años se han conseguido grandes avances en el diagnóstico y manejo del cáncer, este sigue siendo una de las grandes causas de morbi-mortalidad a nivel mundial. En 2022, el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC) estimó 20 millones de casos nuevos de cáncer y 9.7 millones de muertes en todo el mundo, y que para 2050 éstos aumentarán hasta 35 y 16.1 millones, respectivamente (Bray et al. 2024).

Actualmente está aceptado que el cáncer surge de la transformación de células sanas en malignas como consecuencia de la acumulación progresiva y secuencial de mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores. Estas alteraciones provocan que células normales presenten una mayor capacidad de proliferación, evasión de señales de muerte celular, de crecimiento celular, inmunoevasión, inestabilidad genómica, reprogramación metabólica, inducción de angiogénesis y finalmente, la activación de la capacidad invasiva y desarrollo de metástasis (Hanahan 2022). Tras la transformación maligna, el cáncer no permanece estático, sino que éste es dinámico y continúa evolucionando a medida que la enfermedad progresa, contribuyendo así a la formación de un tumor heterogéneo compuesto por distintos subtipos de células tumorales con diferentes características moleculares. Esta heterogeneidad tumoral surge como consecuencia de cambios a nivel genético, transcriptómico, epigenético y fenotípico, y de la compleja relación de las células tumorales con el también dinámico microambiente tumoral. La heterogeneidad tumoral tiene una importante implicación a nivel clínico ya que influye tanto en la respuesta al posible tratamiento como en el avance y pronóstico de la enfermedad (Burrell et al. 2013).

En líneas generales, la heterogeneidad tumoral puede clasificarse en heterogeneidad intertumoral e intratumoral. La heterogeneidad intertumoral hace referencia a las diferencias observadas entre pacientes con tumores del mismo tipo histológico; mientras que la heterogeneidad intratumoral hace

referencia a la heterogeneidad observada en las células tumorales que constituyen el cáncer de un mismo paciente. De igual modo, la heterogeneidad intratumoral puede dividirse en heterogeneidad espacial y temporal. La heterogeneidad espacial alude a las diferencias existentes entre el tumor primario y las posibles metástasis; pero también hace mención a la distribución desigual de las distintas subpoblaciones tumorales dentro del tumor. Por otro lado, la heterogeneidad temporal es el resultado de la evolución de las células tumorales debido a los cambios dinámicos que ocurren a nivel molecular durante el transcurso de la enfermedad en respuesta a las presiones selectivas a que se ven sometidas (Figura 1) (Dagogo-Jack & Shaw 2017).

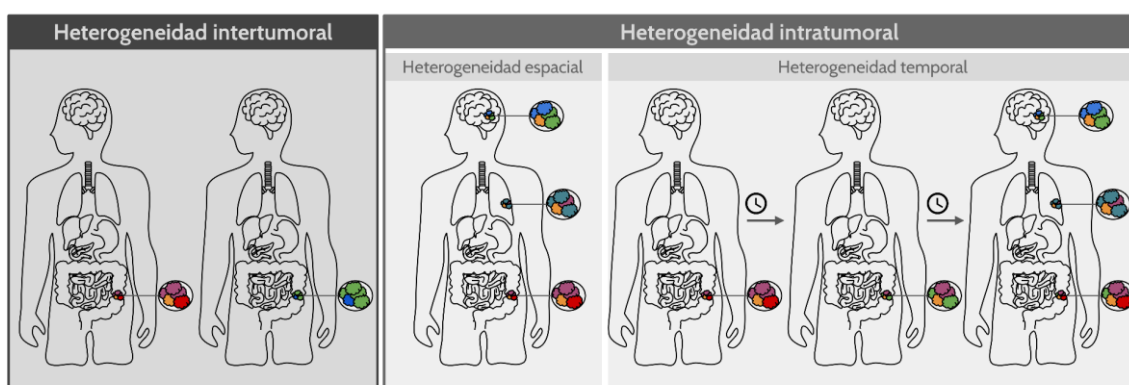


Figura 1. Esquema de los distintos tipos de heterogeneidad tumoral. La heterogeneidad intertumoral describe las diferencias en las características del tumor de individuos con tumores del mismo tipo histológico. La heterogeneidad intratumoral se divide en heterogeneidad espacial y temporal. La heterogeneidad espacial describe las diferencias en las características de las distintas células que componen el tumor, o entre el tumor primario y las metástasis. La heterogeneidad temporal describe la variación en las subpoblaciones que componen el tumor durante el transcurso de la enfermedad. Los distintos colores hacen referencia a subpoblaciones tumorales con distintas características moleculares.

La heterogeneidad intra- e intertumoral son importantes, ya que pueden ser utilizadas para la búsqueda de biomarcadores que puedan ser empleados para la toma de decisiones clínicas, siendo especialmente interesante la heterogeneidad temporal en el contexto de las recaídas tumorales o aparición de metástasis tras el tratamiento del tumor primario (Bedard et al. 2013).

2. CÁNCER COLORRECTAL

a. Perspectivas generales

El cáncer colorrectal (CCR), también denominado adenocarcinoma colorrectal, engloba a un conjunto heterogéneo de enfermedades caracterizadas

por la aparición de un tumor maligno en el intestino grueso, bien en el colon o bien en el recto. Realmente, el CCR engloba a dos tipos de cáncer: cáncer de colon y cáncer de recto. Según la IARC, en 2022, el cáncer de colon y de recto fueron el quinto y noveno tipo de cáncer más diagnosticados, respectivamente, a nivel mundial, siendo la suma de ambos, el CCR, el tercero en términos de incidencia tan solo por detrás del cáncer de mama y de pulmón. Sin embargo, en términos de mortalidad, el CCR ocupa el segundo puesto tan solo por detrás del cáncer de pulmón (Bray et al. 2024). En España, tan sólo en el año 2022 se diagnosticaron más de 41.646 nuevos casos, siendo el tipo de tumor más diagnosticado (López Salas et al. 2023). Esta cifra se ha incrementado un 22% en los últimos 10 años y se estima que para 2040 la incidencia seguirá incrementándose un 27% adicional con respecto a la actual (Portero de la Cruz & Cebrino 2023).

En los últimos años, aunque la tasa de supervivencia a 5 años ha aumentado como consecuencia de las mejoras en los tratamientos y de los programas de detección precoces, situándose en torno al 65%, siguen existiendo grandes diferencias dependiendo del estadio en el que se detecte la enfermedad, variando entre el 91% en estadios localizados y el 13% en estadios avanzados de la misma (Rawla, Sunkara, & Barsouk 2019). A esta falta de respuesta en las fases más avanzadas, cuando es más probable que se detecte la enfermedad, se le suma la creciente preocupación debido al aumento de incidencia en población joven menor de 50 años (Loomans-Kropp & Umar 2019).

La causa de este cambio en términos de incidencia sigue siendo desconocida, pero parecen estar relacionados con cambios en la dieta, la vida sedentaria y el envejecimiento de la población que contribuyen como factores de riesgo para el desarrollo de CCR. Entre los factores de riesgo se encuentran: la edad, siendo más frecuente a partir de los 50 años; la etnia, aunque este factor podría estar influido por diferencias socioeconómicas; sexo, siendo más común en hombres; antecedentes familiares; estilo de vida sedentario; otras enfermedades, tales como diabetes o enfermedades inflamatorias intestinales; y la dieta, puesto que un alto consumo de carnes rojas y procesados, y un bajo consumo de calcio, vitamina D y fibra se asocia con un mayor riesgo de CCR (Bray et al. 2024)(Rawla et al. 2019). Sin embargo, es importante destacar que, aunque estos factores aumentan el riesgo de sufrir CCR, sigue sin estar completamente claro cómo contribuyen cada uno de ellos a su desarrollo (Keum & Giovannucci 2019).

b. Carcinogénesis

El proceso de desarrollo del CCR puede dividirse en cuatro etapas bien diferenciadas: iniciación, desarrollo, progresión y metástasis. La iniciación comprende la alteración genética que predispone a las células epiteliales del colon a la transformación neoplásica. Durante la etapa de desarrollo dichas células comienzan a crecer de manera anormal dando lugar a la formación de un tumor o adenoma, que posteriormente como consecuencia de nuevas alteraciones genéticas y epigénéticas adquieren características agresivas dando lugar al adenocarcinoma, constituyendo la etapa de progresión, y, por último, se desarrolla la capacidad para invadir otros tejidos en la etapa de metástasis (Kuipers et al. 2015). La duración de cada etapa es variada, pero se estima que se necesitan al menos 10 años para que un adenoma se convierta en un adenocarcinoma (Brenner et al. 2013). Sin embargo, esta estimación puede variar según el origen de la mutación, pudiéndose encontrar 3 tipos de CCR:

- ❖ Hereditarios: Están asociados con síndromes hereditarios conocidos, como el Síndrome de Lynch o la Poliposis Adenomatosa Coli, producidos por la presencia de mutaciones germinales en genes de reparación al ADN o en el gen *APC*, respectivamente, lo cual facilita la aparición de lesiones en forma de pólipos. Representan el 5% de los casos de CCR (Stoffel & Kastrinos 2014).
- ❖ Familiares: Están relacionados con casos en los que existe un historial familiar con CCR, sin embargo, no poseen mutaciones germinales en los genes asociados con el desarrollo del cáncer. Representan aproximadamente un 25% de los casos de CCR (Stoffel & Kastrinos 2014)(Keum & Giovannucci 2019).
- ❖ Esporádicos: Este tipo de cáncer surge por mutaciones puntuales que pueden ocurrir en cualquier momento de la vida. Este tipo de CCR es el más común, siendo el responsable de aproximadamente el 70% de los casos. Engloba a un conjunto muy heterogéneo de CCR cuya progresión está estrechamente relacionada con el contexto genómico y las alteraciones que presenten (Keum & Giovannucci 2019).

La mayoría de los CCR esporádicos comienzan como una lesión precancerosa benigna denominada pólipo adenomatoso. Estos pólipos son muy heterogéneos, y se estima que tan solo un 10% de ellos progresa a CCR (Keum & Giovannucci 2019). Esta progresión puede darse a través de dos modelos (Figura 2):

- ❖ **Secuencia Adenoma-Carcinoma:** Este modelo explica la mayoría de los casos esporádicos de CCR. Según este modelo, como consecuencia de mutaciones espontáneas en el gen *APC* se produce una sobreactivación de la ruta Wnt/ β -Catenina dando lugar a una proliferación desregulada de las células epiteliales, lo que resulta en la formación del adenoma. Como consecuencia de aberraciones genéticas y epigénéticas posteriores se produce la alteración de genes, como *KRAS*, *TP53*, *SMAD4* o *PTEN*, que contribuyen al desarrollo y la progresión del cáncer (Keum & Giovannucci 2019). Sin embargo, la alteración de estos genes resulta en el desarrollo del tumor solamente en el contexto de la inactivación de *APC*, lo que sugiere que la pérdida de *APC* es el primer evento que ocurre en el proceso de carcinogénesis (Onuma et al. 2013).
- ❖ **Vía Serrada:** Los pólipos serrados engloban a un grupo heterogéneo de pólipos precancerosos caracterizados por su aspecto en forma de sierra al ser observados en el microscopio. Al igual que en el modelo adenoma-carcinoma, la vía Wnt/ β -Catenina también está sobreactivada, pero en este caso no ocurre por la inactivación de *APC*, sino por mecanismos alternativos variados. En este modelo las mutaciones en *BRAF*, son las mutaciones iniciales más frecuentes que conducen al desarrollo del cáncer, aunque el mecanismo a través del cual se acaba desarrollando el tumor es diverso según la lesión precancerosa (De Palma et al. 2019). Tan solo un 10% de los CCR esporádicos siguen este modelo (Keum & Giovannucci 2019).

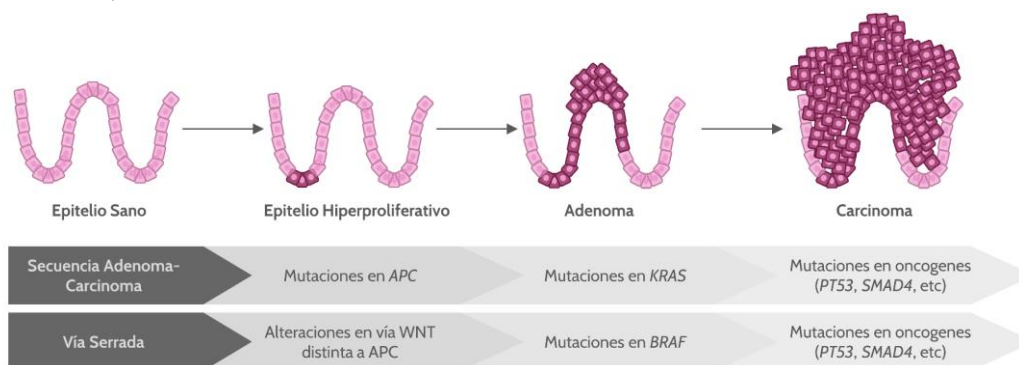


Figura 2. Secuencia de desarrollo del carcinoma colorrectal. En la secuencia adenoma-carcinoma, el epitelio sano sufre la alteración del gen *APC* afectando a la vía Wnt dando lugar a un epitelio hiperproliferativo, resultando en la formación de adenomas que con el tiempo acumulan mutaciones en *KRAS*, y otros oncogenes y genes supresores de tumores. La vía serrada presenta las mismas etapas, sin embargo, la alteración de la vía Wnt ocurre a través de mecanismos distintos a *APC*, y las mutaciones ocurren fundamentalmente en *BRAF* en lugar de *KRAS*. Además, en esta última vía se desarrollan pólipos con características morfológicas distintas a los de la secuencia adenoma-carcinoma.

La inestabilidad genómica se observa en todos los casos de CCR y es en parte la responsable de la heterogeneidad de la enfermedad. Los mecanismos a través de los cuales surge la inestabilidad genómica son variados, pudiendo distinguirse tres diferentes:

- ❖ Inestabilidad cromosómica (CIN): producida por la pérdida o ganancia de parte o la totalidad de cromosomas. Es la más común, observándose en aproximadamente el 80% de los CCR. Los tumores con CIN presentan acumulación de mutaciones en oncogenes concretos como *KRAS*, *APC*, *BRAF* y *TP53* (Sawicki et al. 2021).
- ❖ Inestabilidad de microsatélites (MSI): caracterizada por la inserción/delección de nucleótidos en microsatélites. Está asociada con defectos en los sistemas de reparación por apareamiento erróneo (MMR). Se observa en 10-15% de los casos de CCR (Sawicki et al. 2021)(Kuipers et al. 2015).
- ❖ Metilación de islas CpG: Las islas CpG son regiones ricas en citosinas y guaninas que se encuentran en los promotores de gran cantidad de genes. La hipermetilación de dichas zonas resulta en el silenciamiento de la expresión génica, de forma que puede afectar a genes supresores de tumores. Por el contrario, la hipometilación puede dar lugar a inestabilidad genómica a través de la activación de oncogenes que favorecen el desarrollo tumoral. Se observa en un 20% de los casos de CCR (Keum & Giovannucci 2019)(Kuipers et al. 2015).

Aunque estos mecanismos moleculares de inestabilidad genómica están asociados con diferentes características, éstas no son exclusivas, y en un mismo tumor pueden ocurrir varias al mismo tiempo, lo que revela la complejidad de estratificar al CCR en subtipos (Keum & Giovannucci 2019). En este sentido, en 2015, un consorcio internacional intentó establecer un sistema de estratificación basado en perfiles de expresión y características moleculares del CCR describiendo cuatro posibles subtipos consensuados: inmunológico (CMS1), canónico (CMS2), metabólico (CMS3) y mesenquimal (CMS4) (Guinney et al. 2015). Sin embargo, entre los distintos subtipos había características compartidas, un alto porcentaje de casos no podían incluirse en ningún subtipo y según una reciente revisión sistemática, la clasificación propuesta no es óptima para ser utilizada en la práctica clínica (Alwers et al. 2019).

c. Prevención, diagnóstico y tratamiento

El diagnóstico de CCR puede resultar de la evaluación de personas que presenten o no síntomas. Los principales síntomas asociados con el CCR son dolor abdominal, presencia de sangre en heces, cambios en los hábitos intestinales, fatiga, pérdida de peso y anemia. No obstante, el desarrollo lento de este tipo de tumor hace que, en muchos casos, especialmente en los estadios iniciales, sea asintomático hasta las etapas más avanzadas. De hecho, se estima que un cuarto de los casos diagnosticados ocurre en el estadio más avanzado de la enfermedad, y de los restantes se estima que al menos un 20% de ellos desarrollarán metástasis metacrónica, lo que disminuye drásticamente la supervivencia (Hossain et al. 2022).

El desarrollo lento del CCR abre una ventana de oportunidades para la prevención o, al menos, el diagnóstico temprano de la enfermedad a través de un sistema de cribado. Los métodos de cribado más comunes son los test de sangre oculta en heces y colonoscopias, siendo esta última utilizada también para el diagnóstico de personas con síntomas. El objetivo de ambas es detectar la presencia de pólipos para que puedan ser eliminados antes de que se desarrolle el adenocarcinoma, o bien, detectar la enfermedad, preferentemente en sus estadios iniciales (Tárraga López, Solera Albero, & Rodríguez-Montes 2014) (Brenner & Chen 2018). En caso de que se detecte un adenocarcinoma durante la exploración, mediante el análisis de biopsias y de estudios de imágenes se hace una primera clasificación clínica basada en características del tumor primario, nódulos y metástasis (TNM), así como una posterior clasificación quirúrgica del CCR basada en cuatro estadios, combinándose normalmente ambas para establecer un sistema de estadificación más completo, con el fin de determinar las opciones de tratamiento más adecuadas para cada caso, la posible progresión de la enfermedad, así como su pronóstico (Tabla 1).

Esta primera etapa clínica es importante para decidir la mejor opción de tratamiento inicial. El tratamiento ideal para el CCR es lograr la eliminación completa del tumor y de las posibles metástasis, lo que implica, normalmente, la intervención quirúrgica para su extirpación (Kuipers et al. 2015).

Tabla 1. Sistema de estadificación del AJCC Y TNM.

Estadio	TNM	Descripción etapa
0	Tis N0 M0	Etapa más temprana. Carcinoma intramucoso (Tis) que no ha crecido más allá de la mucosa.
I	T1 o T2 N0 M0	El cáncer ha crecido hasta la capa submucosa (T1) o hasta la muscular propia (T2). No se ha propagado ni a ganglios (N0) ni a sitios distantes (M0).
IIA	T3 N0 M0	El cáncer ha crecido hasta las capas más externas del colon o recto, pero no las ha atravesado (T3). No se ha propagado ni a ganglios (N0) ni sitios distantes (M0).
IIB	T4a N0 M0	El cáncer ha crecido a través de la pared del colon o del recto, pero no ha crecido a otros tejidos adyacentes (T4a). No se ha propagado ni a ganglios (N0) ni a sitios distantes (M0).
IIC	T4b N0 M0	El cáncer ha crecido a través de la pared del colon o del recto y crece hacia otros tejidos adyacentes (T4b). No se ha propagado ni a ganglios (N0) ni a sitios distantes (M0).
IIIA	T1 o T2 N1/N1c M0	El cáncer ha crecido hasta la submucosa (T1) o hasta la muscular propia (T2). Se propagó a 1-3 ganglios adyacentes (N1), o a grasa cercana a los ganglios (N1c), pero no a sitios distantes (M0)
	T1 N2a M0	El cáncer ha crecido hasta la submucosa (T1). Se ha extendido a 4-6 ganglios cercanos (N2a), pero no a sitios distantes (M0)
IIIB	T3 o T4a N1/N1c M0	El cáncer ha crecido a las capas más externas (T3) o a través de ellas sin afectar a órganos adyacentes (T4). Se ha propagado a 1-3 ganglios adyacentes (N1) o grasa cercana a ellos (N1c), pero no a sitios distantes (M0)
	T2 o T3 N2a M0	El cáncer ha crecido hasta la muscular propia (T2) o a las capas más externas (T3). Hay de 4-6 ganglios afectados (N2a), pero no se ha propagado a sitios distantes (M0)
	T1 o T2 N2B M0	El cáncer ha crecido hasta la submucosa (T1) o hasta la muscular propia (T2). Hay más de 7 ganglios afectados (N2b), pero no se ha propagado a sitios distantes (M0)
IIIC	T4a N2a M0	El cáncer ha crecido a través de la pared del colon o recto (T4a) sin afectar a órganos adyacentes. Se ha propagado a 4-6 ganglios adyacentes (N2a) pero no a sitios distantes (M0)
	T3 o T4a N2b M0	El cáncer ha crecido a la capa más externa (T3) o a través del perineo (T4a) sin afectar a órganos adyacentes. Se ha propagado a más de 7 ganglios adyacentes (N2b) pero no a sitios distantes (M0)
	T4b N1 o N2 M0	El cáncer ha crecido a través de la pared del colon o recto y lo hace hasta los tejidos adyacentes (T4b). Se ha propagado a más de un ganglio (N1 o N2) pero no a sitios distantes (M0)
IVB	Cualquier T/N M1a	El cáncer se ha extendido a un órgano distante o a un grupo de ganglios distantes pero no a partes distantes del peritoneo (M1a)
IVB	Cualquier T/N M1b	El cáncer se ha extendido a más de un órgano distante o a un grupo de ganglios distantes pero no a partes distantes del peritoneo (M1b)
IVC	Cualquier T/N M1c	El cáncer se ha propagado a partes distantes del peritoneo y puede o no extenderse a órganos y ganglios distantes (M1c)

En aquellos pacientes con tumores no metastásicos, la cirugía es el principal tratamiento curativo, sola, en estadios 0 y I, junto a un tratamiento adyuvante posterior, en estadio II, o tras un tratamiento neoadyuvante previo seguido de un tratamiento adyuvante tras la operación, en estadio III (Matsuda et al. 2018). En el caso de que se hayan desarrollado metástasis, si las metástasis son operables junto con el tumor primario se realiza la cirugía seguida de tratamiento adyuvante, sin embargo, si no son operables, la quimioterapia/radioterapia es el tratamiento primario, y la cirugía sería una opción en caso de que el tumor se reduzca (Kumar et al. 2023). Tras la cirugía, los tejidos extraídos pueden ser analizados para determinar la etapa patológica del cáncer, hacer una clasificación más precisa, análisis genéticos o una valoración del grado de diferenciación de las células que conforman el tumor, que pueden usarse como biomarcadores o herramientas de pronóstico, supervivencia o elección del tratamiento adyuvante (Derwinger et al. 2010)(Aroca-Siendones et al. 2021).

El tratamiento neoadyuvante para el CCR varía ligeramente según si es de colon o de recto. El cáncer de recto, a diferencia del de colon, suele ser tratado con radioterapia en combinación o no con quimioterapia. Sin embargo, aunque la radioterapia es la mejor opción para el tratamiento de cáncer de recto en estadio II y III, esta terapia tiene efectos secundarios a largo plazo en órganos vitales (Roeder et al. 2020). Para el cáncer de colon, se utiliza fundamentalmente quimioterapia como agente neoadyuvante (Zheng & Tao 2020).

El tratamiento adyuvante estándar para pacientes con CCR consiste en la administración de quimioterapia tras la cirugía. La terapia elegida dependerá de las características de cada tumor. El agente quimioterapéutico más utilizado es el 5-Fluorouracilo (5-FU) en combinación con leucovorina (LV) (Kumar et al. 2023).

El 5-FU es un antimetabolito del grupo de las fluoropirimidinas, que actúa a través de la inhibición de la enzima timidilato sintasa responsable de la síntesis de timidilato que es el precursor de la timina, afectando así a la replicación del ADN. Además, el 5-FU podría incorporarse al ADN y al ARN afectando a la función de los ácidos nucleicos. Por tanto, la administración de 5-FU acaba provocando la inhibición de la división y del crecimiento tumoral, y la inducción de la apoptosis (Vodenkova et al. 2020). Por su parte, la LV se utiliza en combinación con 5-FU ya que potencia su efecto y reduce sus efectos secundarios. Pese a ser uno de los agentes quimioterápicos más usados y más seguros, presenta efectos secundarios importantes, y gran parte de los pacientes acaban

desarrollando resistencias al tratamiento (Vodenkova et al. 2020)(Latchman, Guastella, & Tofthagen 2014).

Otra opción de tratamiento es el uso de capecitabina, un profármaco de 5-FU, como monoterapia de CCR metastásico (Kumar et al. 2023).

Debido al desarrollo de resistencias y a los efectos secundarios, el 5-FU se utiliza en combinación de otros agentes como el irinotecan, (FOLFIRI), oxaliplatino (FOLFOX) o con ambos (FOLFOXIRI), especialmente en los estadios más avanzados y metastásicos. La combinación de estos fármacos tiene un efecto sinérgico, debido al bloqueo de la topoisomerasa I que impide la división celular, en el caso del irinotecan, y el daño al ADN en forma de aductos en el caso del oxaliplatino. Aunque la combinación de estos fármacos ha aumentado la supervivencia de los pacientes de CCR, también lo hacen los efectos secundarios lo que limita su uso y provoca que en ciertos casos se usen como monoterapia (Gustavsson et al. 2015). En los últimos años, se han desarrollado terapias personalizadas basadas en inmunoterapia, que se usan en combinación con la quimioterapia o en casos de CCR metastásico que no responden a ella (Kumar et al. 2023).

Como resultado de estas limitaciones, se está invirtiendo una gran cantidad de dinero en el desarrollo de estrategias con las que perfeccionar o incluso reemplazar la quimioterapia.

d. Recurrencia y metástasis

Alrededor de un 40% de los pacientes que han sido sometidos a cirugía resectiva acaban desarrollando recaídas del CCR durante los siguientes años, ocurriendo la mayoría durante los 2-3 años posteriores al tratamiento inicial. La recaída de la enfermedad puede darse a varios niveles: local, cuando ocurre en el mismo lugar que el cáncer original; regional, si ocurre en nódulos linfáticos o tejidos cercanos al tumor original; y metastásico cuando ocurre en un órgano diferente (Purandare et al. 2010). El tratamiento seguido para la nueva terapia es similar a la original, siendo la cirugía el tratamiento ideal, acompañado de quimioterapia y/o radioterapia. Sin embargo, la posible respuesta al tratamiento y la prognosis va a depender del tipo de recidiva, siendo la metastásica la que peor pronóstico tiene, además de ser la más común (Pu et al. 2023).

La metástasis es la principal causa de muerte en pacientes con CCR. Alrededor de un 25% de los casos ya presentan metástasis en el momento del

diagnóstico, y un 25% de los casos localizados acaba desarrollándola durante el transcurso de la enfermedad (Biller & Schrag 2021). A nivel anatómico, el sitio más común de metástasis es el hígado, seguido de pulmón, y menos frecuente a nivel óseo y del sistema nervioso. Gracias a los avances en el estudio de las vías moleculares y celulares involucradas en el proceso metastásico se han desarrollado nuevos fármacos antitumorales como anticuerpos frente a factores de crecimiento como el VEGF o la inmunoterapia, que se utilizan en combinación con la quimioterapia frente a la cual suelen ser más resistentes, con los que se ha mejorado la supervivencia unos meses (Ohishi et al. 2023)(Fares et al. 2020).

Para que ocurra el proceso de metástasis es necesario que se produzcan una serie de cascadas de reacciones que van a provocar cambios fenotípicos en las células cancerosas, pero también en el microambiente tumoral. Dichos cambios incluyen la separación de células tumorales de la masa tumoral, su extravasación a vasos sanguíneos y/o linfáticos, su supervivencia en el torrente sanguíneo, la extravasación a otros tejidos, la capacidad de entrar en estado de latencia, y la colonización de los nuevos tejidos para formar nuevas masas tumorales en sitios distantes (Shin, Giacotti, & Rustgi 2023). Cuando las células tumorales circulan por el torrente sanguíneo se les denomina células tumorales circulantes (CTCs).

El análisis de las CTCs en sangre puede usarse como biomarcador de pronóstico, riesgo de recaída y desarrollo de metástasis, valor predictivo de respuesta a tratamientos y caracterización molecular, genotípica y fenotípica del tumor (Petrik et al. 2022). Sin embargo, el uso de las CTCs presenta dos obstáculos fundamentales: su bajo número en sangre y su heterogeneidad.

En cuanto al número de CTCs en sangre se estima que hay entre 1-10 células entre millones de células hematopoyéticas por cada 10 ml de sangre, y que su vida media es de 1 a 2.4 horas en circulación, lo que dificulta tanto su detección como su aislamiento para sus estudios posteriores (Yadav, Kumar, & Siddiqui 2021). Concretamente en el CCR su número parece ser menor que en otros tumores sólidos, especialmente en estadios tempranos (Bidard et al. 2012).

La heterogeneidad de las CTCs se ha observado a través de análisis de célula única, secuenciación de ARN y de ADN. En este sentido, este tipo de estudios han identificado distintas subpoblaciones de CTCs incluso en una misma muestra de sangre de un paciente (Powell et al. 2012). Esta heterogeneidad fenotípica representa un problema también a la hora de aislar este tipo de células, ya que pueden no aislarse todas las subpoblaciones clínicamente relevantes. A pesar de que los estudios de secuenciación masiva han ayudado a caracterizar

estas CTCs, éstos abordan sólo los aspectos funcionales de la biología de las CTCs. Para solventar esto, varios grupos han intentado generar líneas de CTCs derivadas de pacientes, aunque solo unos pocos grupos lo han conseguido (Grillet et al. 2017). A través de estudios funcionales en estos modelos *in vitro* se ha demostrado que las CTCs son heterogéneas a nivel genotípico y fenotípico, expresan niveles altos de genes de metabolismo de fármacos, muestran elevada resistencia a terapias convencionales, son capaces de generar metástasis *in vivo*, y contienen características de células madre cancerígenas funcionales (Grillet et al. 2017).

3. CÉLULAS MADRE CANCERÍGENAS

Las células madre son un tipo de células que se caracterizan por su capacidad de autorrenovación y por su pluripotencia celular, es decir, su capacidad de diferenciarse en distintos tipos celulares en respuesta a determinadas condiciones ambientales (Zeki, Graham, & Wright 2011). La mayoría de tejidos adultos humanos tienen una población de células madre adultas que son capaces de dar lugar a distintos subtipos celulares diferenciados del tejido en el que residen con el objetivo de mantener la homeostasis, el crecimiento y la regeneración tisular. Tradicionalmente se ha postulado que estas células tienden a permanecer quiescentes, sin embargo, existen tejidos, como el intestino o la médula ósea, en los que las células madre adultas presentan una alta tasa de proliferación (de Morree & Rando 2023).

Debido a la existencia de estas células madre adultas, diferentes autores han sugerido que podrían estar, en cierta medida, implicadas en el cáncer. Esto se debe a que estas células, por sus características, serían capaces de acumular mutaciones y propagarlas a su progenie, lo que las convierte en uno de los posibles responsables del inicio del proceso tumoral. De esta manera surge la teoría de las células madre cancerígenas (CMCs).

Las CMCs son una subpoblación de células dentro del tumor que se caracterizan por su capacidad de iniciar el proceso tumoral, sostener el crecimiento tumoral, la resistencia al tratamiento, inducir la metástasis tumoral y del proceso de recaída post-tratamiento (Batlle & Clevers 2017). La existencia de CMCs se ha descrito en varios tumores sólidos incluyendo mama, ovario, sistema nervioso, colorectal o páncreas entre otros (Hermann et al. 2010). Además, la presencia de las CMCs está asociada con un peor pronóstico y supervivencia (Lathia, Liu, & Matei 2020).

El origen de este tipo de células sigue cuestionado. Por un lado, las CMCs podrían surgir a partir de células madre adultas sanas que a través de la adquisición secuencial de ciertas mutaciones obtienen capacidades tumorigénicas. Esta teoría se ve apoyada por el hecho de que las CMCs presentan características en común con las células madre adultas (Munro et al. 2018). Por otro lado, las células somáticas diferenciadas podrían sufrir un proceso de desdiferenciación a través de mutaciones o cambios epigénéticos que les proporcionarían características similares a las células madre, además de un comportamiento maligno. Ambas teorías son igualmente plausibles e incluso podrían ocurrir simultáneamente (Munro et al. 2018) (Batlle & Clevers 2017). Además, el concepto de CMCs ha evolucionado a lo largo del tiempo, de manera que ahora no es tan rígido. Esto es debido a que tanto las CMCs como las células tumorales diferenciadas son altamente plásticas y pueden sufrir, bajo las señales adecuadas, transiciones entre un estado y el otro (Batlle & Clevers 2017).

Al igual que las células madre, estas células se dividen asimétricamente dando lugar a células tumorales diferenciadas, que además presentan la capacidad de dividirse simétricamente, y a células hijas idénticas, pero a diferencia de las células madre, las CMCs han perdido el control del proceso de replicación y de diferenciación lo cual resulta en el desarrollo tumoral (Munro et al. 2018).

Las CMCs también podrían estar implicadas en el proceso de metástasis a distintos niveles. Por un lado, estas células van a secretar factores angiogénicos y linfagiogénicos, que van a facilitar que se inicie el proceso de metástasis, además de otros factores que son cruciales para la formación de un nicho pre-metastásico (Liao et al. 2014). Por otro lado, las células que sufren la transición epitelio-mesénquima, necesario para que se produzca el proceso de invasión, presentan características de CMCs, al igual que las CTCs (Liao et al. 2014)(Grillet et al. 2017).

Su relación con la resistencia a los tratamientos y el proceso de recaída viene dada debido a que las CMCs presentan elevados niveles de transportadores ABC, relacionados con la expulsión de sustancias xenobióticas fuera de la célula, proteínas antiapoptóticas y enzimas detoxificadoras, así como de sistemas de reparación del ADN altamente funcionales y la capacidad de entrar en quiescencia (Gaggianesi et al. 2021). Esto hace que las terapias actuales no actúen o tengan un efecto menor sobre ellas, de hecho, los tumores residuales tras el tratamiento, normalmente, están enriquecidos en CMCs, de manera que junto al

resto de sus características hacen que sean las responsables de la recaída posterior al tratamiento (Najafi, Farhood, & Mortezaee 2019)(Gaggianesi et al. 2021).

Debido a todas estas características y la implicación de las CMCs en procesos claves del desarrollo tumoral se están desarrollando nuevas terapias o estrategias, utilizando los fármacos actuales, que sean capaces de acabar con este tipo celular (Najafi et al. 2019). Sin embargo, la instauración de estas terapias es complicada debido a la heterogeneidad y la plasticidad de las CMCs (Batlle & Clevers 2017). Dentro de un mismo tumor se han encontrado diferentes subtipos de CMCs que presentan diferentes características funcionales y fenotípicas, lo que dificulta tanto su identificación como su eliminación selectiva (Batlle and Clevers 2017)(Liao et al. 2014). Además, a esto se le suma la gran plasticidad de las CMCs y la posibilidad de procesos de desdiferenciación de células tumorales diferenciadas hacia estados similares de los de las CMCs como respuesta adaptativa ante ciertos estímulos del microambiente dificultando aún más el éxito de las terapias anti-CMCs (Batlle & Clevers 2017).

a. Epitelio colónico y células madre

La superficie luminal del colon está formada por una única capa de células epiteliales columnares que sufren invaginaciones dando lugar a las criptas intestinales de Lieberkühn, que son las unidades funcionales del intestino. El epitelio intestinal está compuesto por varios tipos de células epiteliales entre las que se encuentran enterocitos, células de Tuft, células caliciformes, células enteroendocrinas y células de Paneth (Munro et al. 2018).

Todas estas células diferenciadas tienen una vida media corta por lo que tienen que ser constantemente renovadas. La regeneración de estas células depende de una pequeña población de células llamadas células columnares de la base de la cripta (CBC) (Gehart & Clevers 2018). Este grupo de células son consideradas las células madre intestinales debido a que son capaces de dividirse asimétricamente dando lugar a células hijas exactamente iguales y en células amplificadoras en tránsito, o células progenitoras, que continuarán proliferando y diferenciándose en las distintas células epiteliales a medida que ascienden en la cripta hacia el lumen (Munro et al. 2018)(Gehart & Clevers 2018). Tradicionalmente se ha postulado que las CBCs permanecen quiescentes y que se dividen lentamente, sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que presentan tasas de división rápidas (Zeki et al. 2011). Además de las CBCs, algunos autores han descrito la existencia de otra posible población de células

madre intestinales caracterizadas por ser quiescentes y capaces de reponer a las CBCs (Beumer & Clevers 2016)(Gehart & Clevers 2018). Sin embargo, las CBCs también podrían ser repuestas a través de un proceso de desdiferenciación de las células epiteliales diferenciadas, revelando una alta plasticidad celular (Yan et al. 2017). Para mantener la homeostasis intestinal es necesario, por tanto, la existencia de un correcto microambiente o nicho, en el cual se asegure el mantenimiento de estas células madre, su proliferación y los procesos de migración y diferenciación a lo largo de las criptas.

El nicho de las células madre intestinales se encuentra en el fondo de las criptas de Lieberkühn, donde residen las CBCs. A nivel celular está compuesto por las células que componen las criptas y por las células mesenquimales adyacentes. Todas estas células no solo proporcionan soporte, sino que también influyen en los procesos de autorrenovación y diferenciación a través de distintas vías de señalización como Notch, BMPs, EGF y Wnt, siendo esta última la más importante (Gehart & Clevers 2018).

La vía Wnt- β -Catenina es una vía de señalización muy conservada en el desarrollo de los órganos, que juega un papel clave para el mantenimiento, proliferación y diferenciación de las células madre, y cuya desregulación se ha relacionado con el desarrollo de distintos tipos de cáncer (Gehart & Clevers 2018). Las proteínas Wnt son liberadas por las células epiteliales y mesenquimales capaces de actuar de manera autocrina y paracrina. Esas proteínas se unen a los receptores de membrana Frizzled y LRP5/6, lo cual provoca el reclutamiento y activación de la proteína Dishevelled que va a inhibir la actividad de un complejo proteico formado por Axina, GSK3, CK1 α y APC. En condiciones normales, este complejo se une a β -Catenina e inicia una cascada de reacciones que va a provocar su degradación. Por este motivo, la activación de Wnt resulta en la inhibición del complejo degradador, y por tanto en la acumulación de β -Catenina, que es translocada al núcleo donde facilita la expresión de genes relacionados con la proliferación, supervivencia, migración y diferenciación (J. Liu et al. 2022).

b. Células madre cancerígenas y cáncer colorrectal

Al igual que en otros tumores sólidos se han identificado CMCs en el CCR, jugando un papel clave en los procesos de iniciación, invasión y progresión, así como en la resistencia al tratamiento y la recaída tumoral (Hermann et al. 2010). El origen de las CMCs en CCR puede ser diverso, ya que pueden surgir a partir

de la adquisición de cambios celulares y moleculares en las células madre colónicas, o bien a partir de la dediferenciación de células diferenciadas debido a cambios genéticos o del microambiente (Hervieu et al. 2021). En ambos casos, una sobreactivación de la vía Wnt parece ser el regulador principal para que ocurra el proceso de tumorigénesis debido a su papel en el control del carácter “stem” y la proliferación en las criptas (Ebrahimi et al. 2023). Esto se ve apoyado por el hecho de que alteraciones en el gen *APC*, que afecta al complejo degradador de la β -Catenina y que conducen, por tanto, a una sobreactividad de ésta y de sus genes diana, son necesarias para que se inicie el proceso tumoral (Onuma et al. 2013).

A nivel práctico, la identificación de las CMCs es compleja debido a que se definen por su capacidad de tumorigénesis, y de regenerar y propagar el tumor. Sin embargo, en los últimos años se han desarrollado diferentes aproximaciones para identificarlas a través de ensayos *in vitro* o la identificación de ciertos marcadores celulares (Najafi et al. 2019). En relación con esto último se han identificado varios marcadores de las CMCs en el CCR entre los que destacan:

- ❖ Aldehído Deshidrogenasa 1 (ALDH1): la ALDH1 es una enzima dependiente de NAD(P) responsable de la oxidación de los aldehídos intracelulares en ácidos carboxílicos protegiendo así a la célula del daño oxidativo (Najafi et al. 2019). Aunque se considera un marcador tanto de células madre como de CMCs, en el caso del colon, ésta se expresa relativamente poco en células sanas en comparación con células tumorales. Se ha correlacionado con peor pronóstico y un mayor riesgo de metástasis y quimioresistencia (Najafi et al. 2019)(Munro et al. 2018).
- ❖ LGR5: es un receptor acoplado a proteína G que se encuentra estrechamente relacionado con la vía de señalización Wnt. Se encuentra expresado en las CBCs en el fondo de las criptas intestinales. Esta proteína se encuentra sobreexpresada en las células tumorales. Aunque existen conclusiones dispares en cuanto al rol de LGR5, probablemente porque esté influido por el contexto tumoral, está generalmente aceptado su rol en la progresión tumoral y el desarrollo de metástasis (Najafi et al. 2019)(Munro et al. 2018)(Morgan, Mortensson, & Williams 2018).
- ❖ SOX2: es un factor de transcripción relacionado con la regulación de la pluripotencia. Se encuentra expresado tanto en células madre como en CMCs. En relación con las CMCs se ha demostrado que SOX2 favorece el

proceso de metástasis, quimioresistencia y el estado de las CMCs (Zhu et al. 2021).

- ❖ OCT3/4: se trata de otro factor de transcripción relacionado con la regulación de las células madre. En CRC se ha relacionado con el crecimiento tumoral, la metástasis y el mantenimiento de las propiedades de las CMCs (Munro et al. 2018).
- ❖ NANOG: es un factor de transcripción necesario para inducir pluripotencia y comportamiento de célula madre junto con OCT3/4 y SOX2. Su expresión se relaciona con un peor pronóstico y se ha vinculado con el proceso de tumorigénesis y metástasis (Vasefifar et al. 2022) (Munro et al. 2018).
- ❖ CD133: se trata de una glicoproteína transmembrana y es uno de los marcadores de CMCs más extendidos. La mayoría de las células son CD133⁻ sin embargo, aquellas CD133⁺ son capaces de iniciar el proceso tumoral, manteniéndose indiferenciadas y siendo cada vez más agresivas. Además, su expresión se asocia con recurrencia, metástasis, y resistencia al tratamiento (Munro et al. 2018)(Ren, Sheng, & Du 2013).
- ❖ CD326: También conocida como EpCAM, se trata de una glicoproteína que se encuentra sobreexpresada en células tumorales. Su expresión se correlaciona con menores tasas de supervivencia, estadios avanzados de la enfermedad, metástasis y características de CMCs (Munro et al. 2018).
- ❖ CD44: Es considerado como uno de los marcadores de CMCs más importantes en el CCR. Esta glicoproteína participa en los procesos de interacción célula-célula, adhesión y migración. Su transcripción está en parte controlada por la señalización Wnt, por lo que se ha hipotetizado que su sobreexpresión podría ser una de las primeras etapas del proceso de tumorigénesis en el CCR (Munro et al. 2018). Esta proteína presenta diferentes variantes de *splicing*, siendo una de las más relevantes CD44v6. CD44v6, en lugar de CD44 total, parece ser la responsable del proceso de migración y metástasis (Munro et al. 2018)(Grillet et al. 2017)(Hervieu et al. 2021).

Pese a la existencia de diferentes marcadores para la identificación de las CMCs, ésta sigue siendo difícil debido a la plasticidad que presentan estas células y sobre todo a su heterogeneidad. Dentro de un mismo tumor pueden existir diferentes poblaciones de CMCs con distinto grado de expresión de estos

marcadores, presentando diferentes características moleculares y fenotípicas (Munro et al. 2018) (Hervieu et al. 2021) (Najafi et al. 2019). Por este motivo la combinación de distintos marcadores es una de las aproximaciones utilizadas para el estudio de este tipo celular.

4. TP53

El gen *TP53* es uno de los principales genes supresores de tumores en los seres humanos. Se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13.1), y consiste en 11 exones y 10 intrones que codifican para una proteína, p53, de 393 aminoácidos. Esta proteína está dividida en tres dominios funcionales: un dominio de transactivación, un dominio de unión al ADN y un dominio de tetramerización, desde el extremo amino terminal al carboxilo terminal (Chen et al. 2022).

La proteína p53 actúa fundamentalmente como factor de transcripción controlando la expresión de distintos genes, regulando así procesos biológicos como la reparación del ADN, apoptosis, senescencia celular, metabolismo, reprogramación de células madre, autofagia o el ciclo celular entre otros (Liebl & Hofmann 2021). Debido a la importancia de dichos procesos en el mantenimiento de la homeostasis y la integridad celular, la actividad de p53 está fuertemente regulada para evitar el desarrollo de situaciones patológicas.

En condiciones fisiológicas normales, los niveles de p53 se mantienen bajos debido a su degradación por parte del proteosoma. Para ello, la proteína MDM2, una ubiquitina ligasa E3 cuya expresión está controlada por p53, poliubiquitina a p53 para que sea reconocida por el proteosoma para su degradación, controlando así su expresión a través de un bucle de retroalimentación negativa (Ozaki & Nakagawara 2011). Sin embargo, cuando se producen condiciones de estrés celular, genotóxico o no genotóxico, como señales de crecimiento celular aberrantes o daño en el ADN, p53 es modificado postraduccionalmente a través de reacciones de fosforilaciones o acetilación entre otras, que impiden su interacción con MDM2. Como resultado se produce la estabilización, acumulación, tetramerización y activación de p53 que va a activar o reprimir la expresión de genes relacionados con la inducción de la apoptosis, de arresto del ciclo celular, senescencia, reparación del ADN, diferenciación o la inhibición de invasión, metástasis, reprogramación metabólica y de pluripotencia (Liebl & Hofmann 2021)(Ozaki & Nakagawara 2011). Además de su principal papel como factor de transcripción, p53 es capaz de interactuar con otras proteínas y ejercer

otras funciones no-transcripcionales para mantener la integridad celular. p53 es capaz de interactuar, reclutar y formar complejos con proteínas involucradas en los procesos de replicación y reparación del ADN regulando así su función; promover el proceso de apoptosis a través de la interacción con las proteínas BCL-2 y BAX en la mitocondria; e incluso reducir las señales de crecimiento celular a través de promover la internalización y degradación de los receptores de factor de crecimiento epidérmico (Ho, Tan, & Lane 2020) (Figura 3).

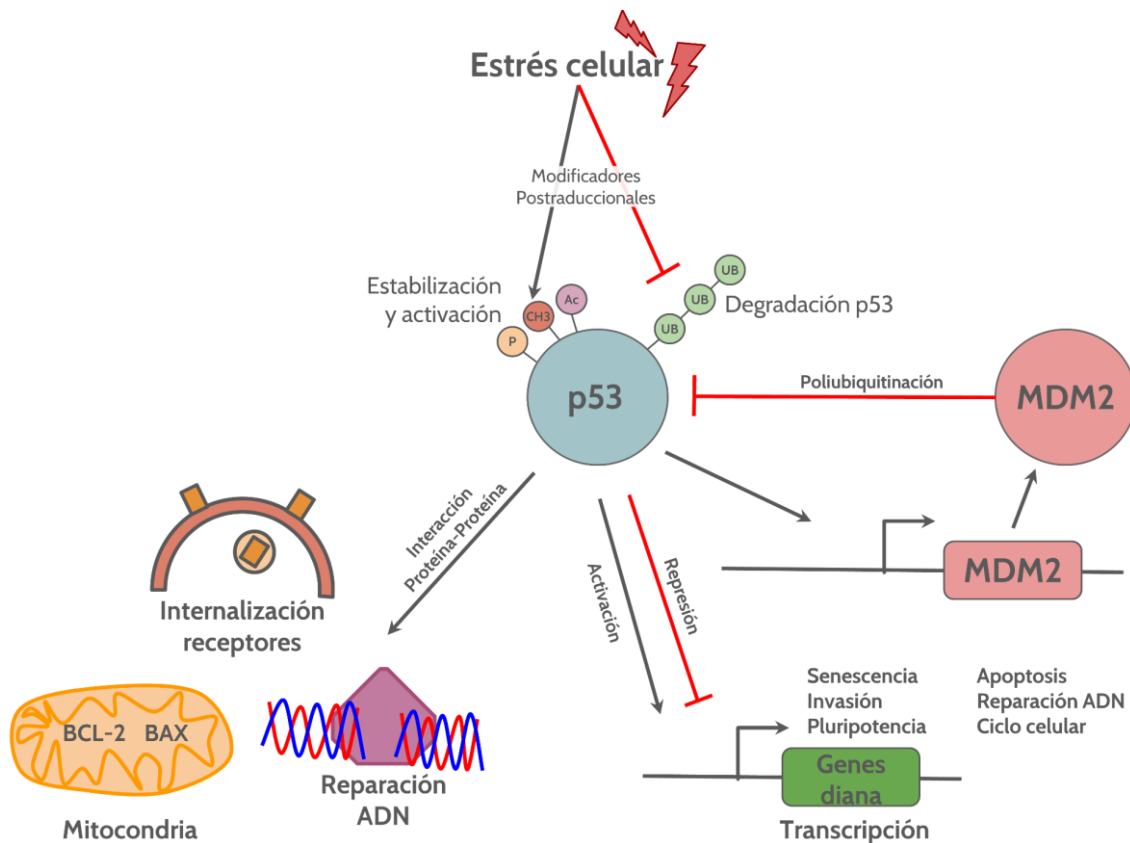


Figura 3. Esquema de los mecanismos de acción de la vía p53. En condiciones fisiológicas normales, los niveles de p53 están controlados por la acción de MDM2, que lo poliubiquitina y marca para su degradación. En respuesta al estrés celular distintos modificadores postraduccionales estabilizan y activan a p53. Entre los mecanismos que desencadena p53 se encuentran la activación y/o represión de genes involucrados en procesos de senescencia, invasión, pluripotencia, apoptosis, reparación del ADN y ciclo celular; así como la interacción con complejos proteicos involucrados en apoptosis a nivel mitocondrial, en la reparación del ADN o la internalización de receptores involucrados en la regulación de señales de crecimiento. UB: ubiquitinación. Ac: acetilación CH3: metilación P: fosforilación

a. p53 y cáncer

La principal función de p53 es actuar como un supresor tumoral regulando distintos procesos a través de los cuales asegura la integridad celular. Si dichos procesos se ven alterados o no funcionan correctamente puede desencadenarse

un proceso de tumorigénesis. De hecho, la inactivación del gen *TP53* es un evento común durante el cáncer, encontrándose mutado en aproximadamente el 50% de los cánceres humanos (Chen et al. 2022).

Aunque las mutaciones en *TP53* pueden ocurrir en cualquier nucleótido de la secuencia de ADN, éstas son más comunes en el dominio de unión al ADN, concretamente entre los exones 5 y 8. Aproximadamente un 10% de las mutaciones son mutaciones sin sentido que van a dar lugar a proteínas truncadas, mientras que un 80% son mutaciones de pérdida de sentido, ocurriendo alrededor de la mitad de ellas en las posiciones R175, G245, R248, R249, R273 y R282 (Marei et al. 2021)(Hassin & Oren 2022). En cualquier caso, las mutaciones van a afectar al plegamiento y estructura de la proteína y/o a la actividad de p53.

Dado que p53 ejerce funciones protectoras, el principal efecto que tienen las mutaciones de este gen es una pérdida de dichas funciones facilitando el inicio y desarrollo tumoral. Esta pérdida de función puede estar producida por varios motivos. La forma mutada de p53 (mtp53) frecuentemente presenta un efecto dominante negativo sobre la forma salvaje (wtp53), de forma que es posible que se formen tetrámeros de ambas formas que son incapaces de iniciar la respuesta normal de p53 (Liebl & Hofmann 2021). Sin embargo, lo más común es que tras la mutación puntual en un alelo de *TP53* se produzca la pérdida del alelo salvaje, perdiendo así la heterocigosidad (Ghaleb, Padellan, & Marchenko 2020). La pérdida de función de mtp53 es producida también por la incapacidad de reconocer los elementos de respuesta a p53 en los genes controlados por esta proteína en respuesta a estrés celular, y por la pérdida de la interacción proteína-proteína que desencadenaba la respuesta no transcripcional de p53 (Mantovani, Collavin, & Del Sal 2018).

Además de la pérdida de función de mtp53, algunas mutaciones pueden provocar un fenotipo de ganancia de función desencadenando respuestas oncogénicas diferentes que favorecen al tumor (Kasthuber & Lowe 2017). Los mecanismos a través de los cuales se produce esta ganancia de función son variados. Es posible que ésta surja como consecuencia de la unión a nuevos sitios de respuesta que desembocan en la regulación de la transcripción de genes no canónicos de p53, de la interacción de mtp53 con nuevas proteínas alterando su función o a través de la interacción con diferentes factores de transcripción inhibiendo o activando la expresión de distintos genes (Marei et al. 2021)(Chen et al. 2022) (Figura 4).

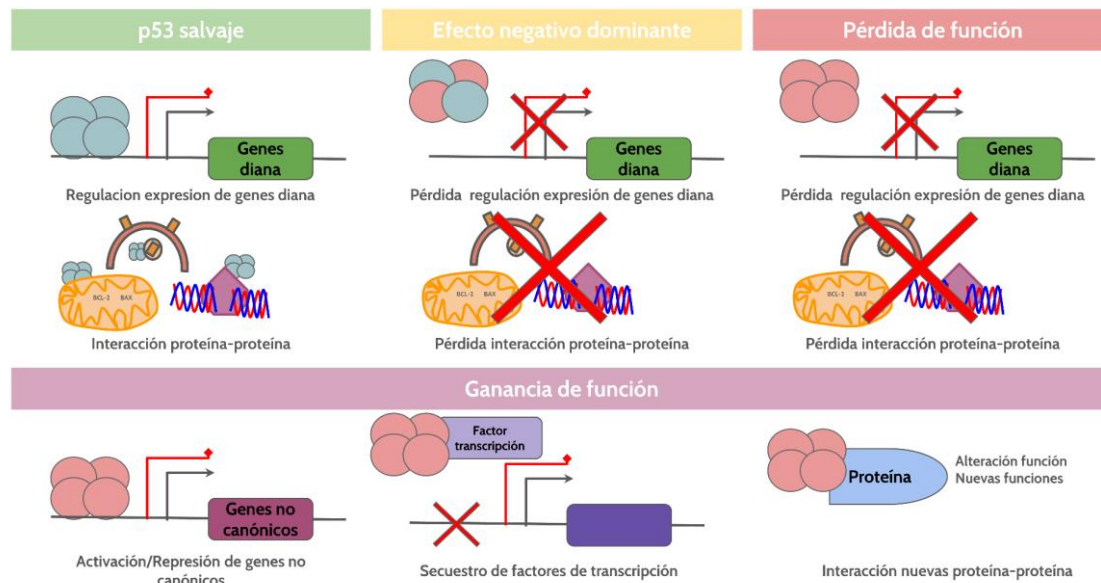


Figura 4. Efecto de las mutaciones en TP53 sobre los mecanismos de acción. Las formas mutantes de p53 generan un efecto dominante negativo sobre la forma salvaje de modo que la coexistencia de ambas formas genera heterodímeros que son incapaces de interactuar con las proteínas diana o de regular la expresión de sus genes diana. Igualmente, las mutaciones en p53 conducen a la pérdida de la actividad normal de p53. Algunas mutaciones en p53 conducen a la ganancia de nuevas funciones entre las que destacan la activación/represión directa de genes no canónicos, el secuestro de factores de transcripción que impiden la correcta expresión de los genes controlados por éstos o la interacción con nuevos complejos proteicos alterando su correcta función o proporcionándole nuevas funciones. En azul, monómeros de p53 salvajes, y en rojo, monómeros de p53 mutantes.

La presencia de mutaciones en *TP53* se ha asociado con un peor pronóstico y mayor riesgo de desarrollar metástasis y tumores más agresivos (Chen et al. 2022). Sin embargo, es importante señalar que no todas las mutaciones son equivalentes. De hecho, las distintas mutaciones están asociadas con distintos fenotipos, en términos de progresión, pronóstico, y de las características del tumor como su respuesta al tratamiento o su capacidad de metastatizar, debido a los diferentes mecanismos de pérdida y/o ganancia de función que pueden presentar (Kennedy & Lowe 2022). En este sentido los mecanismos exactos a través los cuales las distintas mutaciones contribuyen a los distintos fenotipos tumorales siguen sin ser completamente conocidos, lo cual limita su uso como herramienta terapéutica, pronóstica o de estratificación de los pacientes.

b. p53 y células madre cancerígenas

Las propiedades de las CMCs se encuentran reguladas negativamente directa o indirectamente por p53. La expresión de marcadores de CMCs como *CD133* o

CD44 es inhibida por la unión directa de p53 a sus promotores (Ghatak, Das Ghosh, & Roychoudhury 2021). También existe una regulación indirecta de la expresión de *CD44* mediada por p53 a través de la regulación de ciertos micro-ARNs como el miR-34a (Liu et al. 2011). Cuando p53 muta no solo se produce un aumento de los marcadores de CMCs, sino que también se ve favorecida la proliferación de este tipo de células (Chen et al. 2022).

El correcto funcionamiento de la proteína también es necesario para evitar la transformación de células madre sanas y células diferenciadas en CMCs. La pérdida de la actividad de p53 resulta en un aumento de las divisiones simétricas de las células madre y de su capacidad de auto-renovación facilitando el proceso de tumorigénesis, al igual que facilita que se produzcan fenómenos de dediferenciación de células diferenciadas (Chen et al. 2022).

c. p53 y cáncer colorrectal

El gen *TP53* se encuentra mutado aproximadamente en el 43% de los tumores de CCR, siendo más común en los tumores colorrectales distales frente a los tumores proximales de colon (45% vs. 34%, respectivamente) (Liebl & Hofmann 2021). Hasta un 90% de las mutaciones son de pérdida de sentido, y aunque se han descrito mutaciones hasta en 257 de los codones del *TP53*, la mitad de ellos ocurren en los puntos calientes R175, G245, R248, R273 y R282 (Liebl & Hofmann 2021).

Al igual que en otros tipos de tumores, el principal efecto de las mutaciones en *TP53* en el CCR es la pérdida de función. Además de esta pérdida de función se puede producir ganancia de función. Entre los mecanismos de ganancia de función descritos en el CCR se encuentra un aumento de la proliferación vía STAT3 y la interacción con enzimas modificadores de la cromatina, aumento de la capacidad de invasión vía microARN, promoción de un microambiente protumoral a través de la secreción de exosomas o un aumento de los marcadores de CMCs *CD44*, *LGR5* y *ALDH1* directa o indirectamente a través de ARN no codificantes de cadena larga (Chen et al. 2022) (Marei et al. 2021)(Cooks et al. 2018). Además de estos posibles mecanismos adicionales, las mutaciones en p53 están asociadas con una peor respuesta a los agentes quimioterapéuticos más comunes para el tratamiento del CCR como son el 5-FU, el oxaliplatino o el irinotecan (Michel et al. 2021).

Sin embargo, no todas las mutaciones de *TP53* en el CCR son equivalentes, y dan lugar a distintos fenotipos con distinto pronóstico y características

moleculares tanto a nivel del tumor primario como a nivel de las metástasis (Hassin et al. 2022)(Pan et al. 2022).

5. RITMOS CIRCADIANOS

La rotación de la Tierra sobre su propio eje cada 24 horas genera ciclos constantes de luz/oscuridad que van a condicionar el comportamiento, funcionamiento y actividad de los seres vivos. Para poder coordinarse y así responder a las señales ambientales de dichas oscilaciones rítmicas de 24 horas, a lo largo del proceso evolutivo, los organismos han desarrollado un sistema de cronometraje interno conocido como reloj circadiano. Este reloj circadiano va a ser responsable de la regulación de una amplia variedad de procesos biológicos que van más allá de la regulación del sueño/vigilia, tales como la secreción hormonal, temperatura corporal, función cardiovascular, metabolismo, procesos digestivos o la regeneración tisular entre otros procesos cuya actividad fluctúa a lo largo de un periodo aproximado de 24 horas (Ayyar & Sukumaran 2021). Estas oscilaciones rítmicas son conocidas como ritmos circadianos, por su duración aproximada de 24 horas, y se caracterizan por (1) ser endógenos y persistir en condiciones constantes, incluso en ausencia de señales externas; y (2) estar sincronizadas con el entorno ambiental, de forma que pueden reajustarse cuando las señales ambientales cambian (García-Costela et al. 2020).

En mamíferos, el reloj circadiano se encuentra organizado de manera jerárquica compuesto por múltiples osciladores. El reloj u oscilador central se encuentra localizado en el núcleo supraquiasmático (NSQ) en el hipotálamo. La luz es recibida por la retina que transmite la información al NSQ, que a través de vías nerviosas y factores endocrinos como glucocorticoides y, fundamentalmente, melatonina, va a sincronizar a los relojes periféricos (Ruan, Yuan, & Eltzschig 2021). Estos relojes periféricos se han descrito en prácticamente todos los órganos y células del organismo. Aunque los relojes periféricos son sincronizados por el NSQ, éstos son capaces de oscilar de manera independiente a él con el fin de asegurar los requerimientos específicos de cada órgano concreto (Patke, Young, & Axelrod 2019). Aunque la luz es el principal *zeitgeber* o sincronizador, los ritmos circadianos pueden ser modulados por otros factores como la temperatura, fármacos o la ingesta de alimentos, siendo especialmente relevantes en los relojes periféricos (Ruan et al. 2021).

A nivel molecular, los ritmos circadianos están controlados por bucles de retroalimentación que se autorregulan de forma autónoma en cada célula

mediante la transcripción/traducción de los llamados genes del reloj circadiano. El bucle principal está regulado por la expresión y acumulación de las proteínas BMAL1 (*Brain and muscle Arnt-like protein*) y CLOCK (*Circadian locomotor output cycles kaput*) durante la fase luminosa. Estas dos proteínas van a formar un heterómero BMAL1:CLOCK que es translocado al núcleo donde actúan como factores de transcripción de aquellos genes que contienen secuencias de elementos *E-box* en sus promotores, activando su transcripción. Entre dichos genes se encuentran los genes *PER1-3* (*Period 1-3*) y *CRY1/2* (*Cryptochrome 1-2*). Estas proteínas constituyen la parte negativa del bucle y se van acumulando a lo largo del día. En el citoplasma se van a formar complejos PER:CRY que serán translocados al núcleo donde van a inhibir la actividad de BMAL1:CLOCK, inhibiendo su propia transcripción. De esta forma durante la fase oscura, como consecuencia de la inhibición de la actividad de BMAL1:CLOCK, los niveles del PER y CRY disminuyen hasta llegar al punto que se libera la inhibición sobre BMAL1:CLOCK, pudiendo comenzar un nuevo ciclo de transcripción. El heterodímero BMAL1:CLOCK también regula la expresión de los genes *REV-ERBa/β* y *RORα/β/γ* lo cual constituye un segundo bucle de retroalimentación en la regulación molecular del ritmo circadiano. Las proteínas REV-ERB y ROR van a competir entre ellas por la unión a los elementos RRE que se encuentran en el promotor de *BMAL1*, inhibiendo la transcripción de *REV-ERB*, o activando la de *ROR* (Patke et al. 2019) (Figura 5).

Estos bucles de retroalimentación no solo van a regular el ritmo circadiano a nivel molecular, sino que van a controlar la expresión de manera circadiana de una gran cantidad de genes a través de la unión a elementos RRE o E-box, o incluso a través de la interacción con otras proteínas. Estos genes son llamados genes controlados por el reloj (CCG), son específicos de cada tejido, y en última instancia, responsables de los requisitos y características fisiológicas de cada órgano. Se estima que aproximadamente el 50% de las proteínas se expresan de manera circadiana (Ayyar & Sukumaran 2021).

Existe un tercer bucle o sub-bucle, controlado por BMAL1:CLOCK y REV-ERB y ROR que regula la expresión de los factores de transcripción DBP, TEF y HLF, los cuales compiten con NFIL3, para activar o reprimir la expresión de genes que contengan elementos D-box entre los que se encuentran ROR. Este último bucle no es relevante para el control del ritmo circadiano a nivel molecular *per se* (Patke et al. 2019) (Ruan et al. 2021).

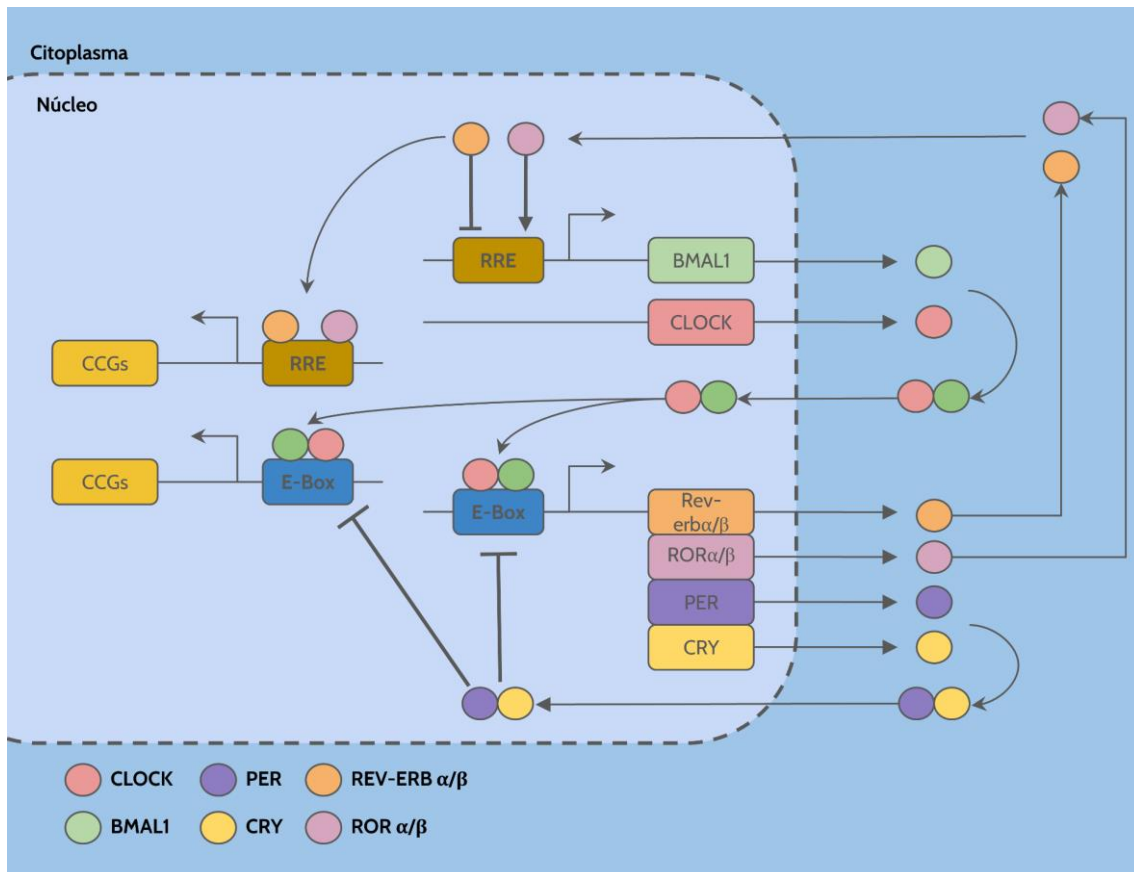


Figura 5. Regulación molecular del ritmo circadiano. El reloj circadiano está regulado a nivel molecular por bucles de retroalimentación basados en la transcripción/traducción de los genes del reloj. BMAL1 y CLOCK forman un heterodímero que es translocado al núcleo regulando la expresión de aquellos genes que contienen elementos E-Box. Entre ellos se encuentran *PER* y *CRY*, cuyas proteínas van a formar un heterodímero en el citoplasma que posteriormente es translocado al núcleo donde van a reprimir la actividad de BMAL1:CLOCK, incluido su propia expresión. BMAL1:CLOCK también controla la expresión de *RORα/β* y *REV-ERBα/β* que van a activar o reprimir la expresión de *BMAL1*. Asimismo, estas proteínas controlan la expresión de los llamados genes controlados por el reloj, responsables de las características de cada órgano.

La regulación molecular del ritmo circadiano es compleja ya que no solo depende de los bucles de transcripción/traducción descritos previamente, sino que existen numerosas modificaciones postraduccionales que ayudan a regular la duración y el funcionamiento del ritmo. Estas modificaciones postraduccionales son variadas y aunque la más relevante son la fosforilación y ubiquitinación, también destacan la SUMOilación, acetilación, glicosilación y ADP-ribosilación. Estas modificaciones van a regular la actividad transcripcional, la interacción con otras proteínas, la estabilidad y la localización de las proteínas del reloj circadiano, y por tanto, el ritmo circadiano y los procesos regulados por éste (Okamoto-Uchida et al. 2019).

La regulación circadiana podría ser incluso más compleja, ya que además de los bucles de transcripción/traducción y las modificaciones postraduccionales de los componentes del reloj, el estado redox influye en la transcripción y actividad del reloj circadiano, aunque sigue sin estar claro si sirve como un marcador del tiempo celular o se trata de un componente más en la regulación molecular del reloj (Robinson & Reddy 2014).

Debido a la gran cantidad de procesos biológicos controlados por los ritmos circadianos, la alteración y/o ausencia de un ritmo circadiano funcional está asociada con el desarrollo de diferentes trastornos fisiológicos que acaban derivando en distintas enfermedades, entre las que destaca el cáncer (García-Costela et al. 2020).

a. Ritmos circadianos y cáncer

La relación entre los ritmos circadianos y el desarrollo del cáncer se puso de manifiesto por primera vez a través de distintos estudios epidemiológicos, en los cuales se asocia la desregulación de los ritmos circadianos debido a trabajos de turnos rotatorios con un mayor riesgo de desarrollar distintos tipos de cáncer (Qu 2023). Otros estudios epidemiológicos señalan también que aparte de los cambios continuos en los patrones de vida, hechos como cenar después de las 22:00 *p.m.* o acostarse después de cenar aumenta el riesgo de algunos tipos de cáncer como el de mama o próstata (Kogevinas et al. 2018). Tanta es su relevancia, que la OMS ha concluido que la alteración circadiana se trata de un probable carcinógeno. Este tipo de estudios epidemiológicos se han corroborado a través de estudios en modelos animales mediante procedimientos no genéticos de interrupción del ritmo circadiano, y mediante la alteración o eliminación genética de los distintos genes del reloj, observándose un incremento en la formación y crecimiento de distintos tipos de tumores (Sulli, Lam, & Panda 2019).

En humanos, la pérdida de la homeostasis circadiana, tanto a nivel del propio ritmo como cambios en la expresión de los genes circadianos, no solo se han asociado con el proceso de iniciación y progresión tumoral, sino que también lo hace con una peor respuesta al tratamiento y tasas más altas de mortalidad (García-Costela et al. 2020).

Según análisis de conjuntos de datos de expresión genética recogidos en *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) y *Gene Expression Omnibus* (GEO) los genes del reloj circadiano se encuentran diferencialmente expresados en gran multitud de tumores, a pesar de que la tasa de mutaciones de estos genes es relativamente

baja (Ye et al. 2018). Concretamente, en el estudio realizado por Ye y colaboradores, se ha observado que el 90.2% de los genes relacionados con el reloj circadiano se encuentran diferencialmente expresados, con respecto al tejido no tumoral, en al menos uno de los catorce tipos de cánceres estudiados. En líneas generales se observa una disminución de la expresión de los genes del reloj, destacando el caso de *PER1-3* y *CRY1-2*, sugiriendo que el reloj circadiano presenta un potencial papel como supresor tumoral. Sin embargo, algunos de los genes que se encuentran principalmente infraexpresados, como *PER2*, se encuentran expresados al alza en alguno de los tipos de cánceres estudiados, u otros como *BMAL1* que se encuentra sobreexpresado e infraexpresado indistintamente en varios tipos de tumores (Ye et al. 2018). De manera más concreta, una baja expresión de *BMAL1* se asocia con peor pronóstico en tumores de mama o páncreas, sin embargo, su expresión es esencial para el mantenimiento de la leucemia aguda mieloide o glioblastoma. Otro ejemplo de diferencias entre tejidos lo representa *REV-ERB β* , que en tumores hepáticos una elevada expresión de esta proteína se asocia con una peor supervivencia, mientras que su activación farmacológica en cáncer de mama, leucemia, melanoma y CCR provoca una regresión tumoral (Battaglin et al. 2021). Todo esto sugiere que las proteínas del reloj circadiano podrían desempeñar distinto papel en diferentes tejidos y/o ambientes tumorales, lo que demuestra la necesidad de su estudio de manera concreta en los distintos tipos, e incluso subtipos, de cánceres para poder comprender su papel exacto en el proceso de tumorigénesis (Ye et al. 2018).

Se ha propuesto que los componentes del reloj circadiano podrían estar involucrados en el inicio o progresión del cáncer a través de cuatro mecanismos: (I) Los componentes del reloj regulan directa o indirectamente la expresión rítmica de genes involucrados en procesos clave para la homeostasis como son la reparación del daño en el ADN, regulación redox o ciclo celular, de forma que su alteración proporcionaría un ambiente propicio para el proceso de tumorigénesis. (II) Las proteínas del reloj interactúan físicamente con proteínas de ruta relevantes para el proceso tumoral, de manera que pueden proteger contra el cáncer o promoverlo. (III) El estado redox de la célula puede afectar a la interacción de las proteínas del reloj entre sí, por ejemplo, al heterodímero *CLOCK:BMAL1*, o a la actividad de los modificadores postraduccionales del reloj; de manera que los cambios en el estado redox como consecuencia de procesos oncogénicos pueden afectar a la estabilidad, localización y función de las proteínas del reloj. (IV) El reloj circadiano regula la

expresión de citoquinas, hormonas y neurotransmisores que actúan a nivel paracrino o endocrino que pueden afectar a la propia función del reloj o afectar a la sincronización de los relojes periféricos en otros tejidos. Algunos tumores pueden producir cantidades anómalas de estos factores afectando por tanto al ritmo en el propio tejido o en órganos distantes (Sulli et al. 2019).

A pesar de la gran cantidad de evidencias que vinculan la pérdida del correcto funcionamiento del reloj circadiano con el proceso tumoral, a nivel molecular esta relación sigue sin estar completamente descrita y entendida. Por un lado, existen pruebas de que el reloj circadiano se encuentra alterado en las células tumorales, sin embargo, sigue sin saberse si esto es causa o efecto del proceso tumoral; pero por otro lado también existen algunos tipos de tumores, como el glioblastoma, en los que el reloj no solo es funcional si no que es necesario para la progresión tumoral. Por otra parte, las funciones biológicas que desencadenan los distintos componentes del reloj, incluso las distintas isoformas, dependen en gran medida del tejido estudiado, lo que explicaría sus papeles como supresores tumorales o como oncogenes en distintos tumores. Además, relacionado con esto último, está el hecho de que los genes del reloj influyen en una gran cantidad de procesos fisiológicos que forman parte de complejas redes de regulación lo que hace difícil, especialmente en un contexto tumoral donde se ven alteradas, establecer relaciones bien definidas y que puedan ser utilizadas (Battaglin et al. 2021).

A nivel molecular, los genes del reloj se relacionan con algunas de las *hallmarks* o características distintivas del cáncer. El control del ciclo celular está en parte controlado por la acción del reloj. PER1 causa arresto del ciclo a través de la interacción con las proteínas CHK2 o ATM, mientras que CRY1 facilita la progresión hacia la fase M a través de la inhibición de WEE1, que también es regulado positivamente por CLOCK:BMAL1. Además, otros oncogenes como β -Catenina, relacionada con el proceso de proliferación y diferenciación, y otros reguladores del ciclo celular presentan una expresión circadiana (Shafi & Knudsen 2019). Estrechamente relacionado con el ciclo celular se encuentran los sistemas de respuesta al daño del ADN. Éstos presentan comportamiento circadiano también, tanto en términos de expresión génica, como de acumulación y actividad de sus proteínas. Además, los componentes del reloj interactúan directamente con los componentes del sistema de respuesta al daño del ADN. Por ejemplo, PER1 interactúa con ATM y CHK2 modulando la actividad de ATM o CRY interactúa con ATR modulando mecanismos de reparación del ADN, apoptosis en respuesta al daño y ciclo celular (Sulli et al. 2019)(Qu 2023).

El desarrollo vascular también está modulado por el reloj circadiano a través de la regulación de los niveles de VEGF por parte de BMAL1 y PER2. Cuando se produce una alteración del ritmo se produce una situación de angiogénesis patológica. En un contexto de hipoxia, especialmente característico del ambiente tumoral, HIF1 es capaz de regular la expresión de *BMAL1* y de genes que contengan elementos E-box, o de interaccionar con los componentes del reloj provocando la sobreexpresión de VEGF facilitando la metástasis tumoral (Qu 2023)(Fagiani et al. 2022). A nivel metabólico, las células cancerígenas presentan una reprogramación metabólica favoreciendo el proceso de glicolisis. Muchos genes metabólicos están controlados de manera circadiana destacando transportadores y enzimas del metabolismo glicolítico y la fosforilación oxidativa. Como consecuencia de esta reprogramación metabólica y de la acción de HIF1, que favorece el proceso de glucólisis, se produce una acidificación celular que provoca una disminución de los niveles de expresión de los genes del reloj y alteración del ritmo (Sulli et al. 2019). El estado redox parece ser el vínculo entre el metabolismo y ritmos circadianos, especialmente a través de los niveles de NAD(H) y NADP(H) que regulan la capacidad de unión al ADN de BMAL1 y CLOCK. A su vez, la producción de NAD está controlada de manera rítmica por parte de BMAL1:CLOCK, ya que la expresión de NAMPT, la enzima limitante en la producción de NAD⁺ está bajo su control. Los niveles cíclicos de NAD(H) van a repercutir en la actividad de distintas enzimas entre las que destaca SIRT1, cuya expresión está controlada por BMAL1:CLOCK (Shafi & Knudsen 2019). SIRT1 es un deacetilasa dependiente de NAD⁺, involucrada en múltiples procesos celulares y que se considera tanto un oncogén como un gen supresor de tumor según el contexto, capaz de controlar el ritmo circadiano a través de la modificación de PER2 y BMAL1 (Shafi & Knudsen 2019)(Kumar & Takahashi 2010). Estrechamente relacionada con SIRT1 se encuentra PARP-1. PARP-1 compite con SIRT1 por el uso del NAD. La principal función de PARP-1 es iniciar la reparación del ADN consumiendo NAD, pudiendo afectar a la función del reloj circadiano de esta forma. Sin embargo, PARP-1 es capaz por sí mismo de interaccionar con CLOCK modificando el ritmo (Kumar & Takahashi 2010).

b. Ritmos circadianos y p53

Existe una interacción entre el reloj circadiano y la actividad del gen supresor de tumores p53. Esta interacción da lugar a oscilaciones circadianas en la expresión, estabilidad y actividad de p53. BMAL1 se une al promotor de p53

estimulando su expresión y su fosforilación con la consiguiente activación de los mecanismos supresores de tumores mediados por p53 (Jiang et al. 2016) (Zhao et al. 2022). Otra interacción entre p53 y los componentes del reloj circadiano ocurre a través de PER2. Cuando se encuentra en un estado salvaje, p53 regula negativamente la expresión de PER a través de la competencia con BMAL1:CLOCK por unirse a su receptor. De hecho, en condiciones fisiológicas normales, los niveles oscilantes de p53 están inversamente correlacionados con los niveles de PER2. Sin embargo, la acumulación de p53 en respuesta a estrés genotóxico resulta en el bloqueo de la transcripción de PER2. PER2 por su parte interacciona con p53, estabilizándolo e impidiendo su ubiquitinización por MDM2, lo que provoca la activación de los mecanismos dependientes de p53 (Gotoh et al. 2015).

c. Ritmos circadianos y células madre cancerígenas

El papel y/o la existencia de un ritmo circadiano funcional en las CMCs sigue siendo un tema controvertido.

En condiciones fisiológicas normales se ha descrito que las células madre embrionarias carecen de un reloj circadiano funcional pese a que la mayoría de los componentes moleculares del reloj se expresan, lo que sugiere un papel diferente en este tipo de células. Sin embargo, tras el proceso de diferenciación el reloj se vuelve funcional (Dierickx, Van Laake, & Geijsen 2018). Por el contrario, las células madre adultas presentan un reloj circadiano funcional, que sería importante para mantener las propiedades de estas células y para el control de los procesos de regeneración celular, diferenciación y respuestas a estrés en las células madre del intestino, piel, folículos pilosos, sistema hematopoyético y, músculo esquelético (Dierickx et al. 2018)(Benitah & Welz 2020).

Los tumores están compuestos por un grupo heterogéneo de células tumorales con diferentes características moleculares y fenotípicas. En líneas generales se ha descrito que los ritmos circadianos en tumores son débiles o incluso se encuentran ausentes contribuyendo al proceso tumoral, sin embargo, es posible que existan subpoblaciones tumorales con ritmos funcionales y persistentes que no sean detectados. En ese sentido, a través de distintas técnicas, principalmente PCR y ensayos de genes reporteros con luciferasa se ha descrito que distintas líneas celulares de cáncer de pulmón, colon, glioblastoma, osteosarcoma y melanoma presentan ritmos funcionales (Malik et al. 2022).

En el contexto de las CMCs, estudios utilizando líneas celulares como MCF-7 consideradas arrítmicas cuando crecen en monocapa en condiciones estándar de cultivo, presentan ritmos robustos cuando se utilizan modelos en 3D o mamografías en medio de cultivo que favorece a las CMCs, sugiriendo que esta subpoblación celular presenta un reloj circadiano funcional (De et al. 2020). La existencia de un ritmo circadiano robusto en CMCs se ha descrito en otros tumores como glioblastoma o leucemia, en los cuales no solo hay un ritmo circadiano funcional, sino que también es necesario para el mantenimiento de las CMCs ya que el silenciamiento o disrupción de BMAL1 y/o CLOCK resulta en la depleción de estas células a través de procesos de diferenciación, disminución de la tasa de proliferación y apoptosis (Puram et al. 2016)(Dong et al. 2019). Por el contrario, en el cáncer de mama, las células ALDH⁺, relacionadas con las propiedades de CMCs, presentan menores niveles de expresión de CLOCK, y su sobreexpresión suprime las características del fenotipo de las CMCs y el crecimiento tumoral (Ogino et al. 2021). Estos datos sugieren distinto efecto de CLOCK/BMAL1, y posiblemente de los ritmos en cuanto a la regulación de las CMCs según el tipo de tumor y el contexto celular.

Otras proteínas del reloj circadiano, concretamente PER2 y PER3, parecen mostrar menos variabilidad en cuanto a su papel en relación con las CMCs. En estudios de glioblastoma y de cáncer de páncreas estas proteínas se encuentran reguladas a la baja en CMCs, y su sobreexpresión reduce las características de las CMCs induciendo un fenotipo menos agresivo (Lee & Tanggono 2022).

d. Ritmos circadianos y cáncer colorrectal

La alteración del ritmo circadiano se ha asociado con el desarrollo del CCR. En modelos animales se ha demostrado que, en el contexto de mutaciones en APC, la pérdida genética o ambiental del ritmo de BMAL1 acelera la progresión del CCR (Chun et al. 2022). Otro estudio con otro modelo murino mutante de APC señala que la pérdida de BMAL1 resulta en un aumento del proceso de tumorigénesis a través de la desregulación de las células madre intestinales (Stokes et al. 2021). Ambos estudios señalan que los tumores carecen o presentan ritmos circadianos muy débiles o alterados en comparación con el tejido sano adyacente (Chun et al. 2022)(Stokes et al. 2021). La presencia o ausencia de ritmos circadianos funcionales en CCR parece ser bastante heterogénea encontrándose líneas celulares que presentan oscilaciones circadianas robustas (HCT-116), moderadas (SW480) y débiles (SW680). En el caso de las metástasis, las

oscilaciones de los genes del reloj están ausentes, y éstas parecen modificar el ritmo de los órganos que colonizan y los de alrededor (Huisman et al. 2015).

Diferentes estudios señalan que en líneas generales se produce una disminución de la expresión de los genes reloj en el CCR en relación con la mucosa sana. Los genes *PER1-3* se encuentran infraexpresados en la mayoría de trabajos, aunque en algunos de ellos no se observan diferencias entre tumor y mucosa sana. Una baja expresión de *PER1* y *PER3* se asocia en múltiples estudios con peor pronóstico y con el desarrollo de metástasis (Rao & Lin 2022). En líneas celulares de CCR, la sobreexpresión de *PER3* resulta en una disminución de las características de CMCs y una mayor sensibilidad al 5-FU (Zhang et al. 2017). En cuanto a *PER2* existe cierta controversia, encontrándose estudios que asocian una alta expresión con una peor prognosis y otros con un mejor pronóstico (Rao & Lin 2022). En relación con *PER2* se ha visto que el aumento de los niveles de β -Catenina como consecuencia de la inactivación de APC puede provocar la desestabilización de *PER2* afectando al ritmo circadiano (Yang et al. 2009).

Por su parte, *CRY1* se encuentra sobreexpresado en el tejido tumoral mientras que *CRY2* se encuentra infraexpresado. Curiosamente, aunque *CRY2* se ha relacionado con la inhibición del crecimiento tumoral, existen estudios en los que se ha asociado una alta expresión con un peor pronóstico, sin embargo, otros estudios señalan la asociación de una alta expresión con un mejor pronóstico o con una mayor probabilidad de remisión tras el tratamiento neoadyuvante en cáncer rectal (Rao & Lin 2022). Una mayor expresión de *CRY1* se asocia con una peor tasa de supervivencia, mayor riesgo de metástasis y peor respuesta al tratamiento en varios estudios (Rao & Lin 2022)(Aroca-Siendones et al. 2021).

La expresión de *BMAL1* se ha encontrado tanto aumentada como disminuida en el tejido tumoral con respecto al tejido sano en distintos estudios clínicos (Rao & Lin 2022). En cuanto a su asociación con las características clinicopatológicas de la enfermedad también existe cierta discrepancia, encontrándose estudios en los cuales su expresión no se correlaciona con ninguna característica, otros que describen que una baja expresión se asocia con peor pronóstico y mayor riesgo de metástasis, y otros estudios relacionan la baja expresión con una menor quimiorresistencia y capacidad de desarrollar metástasis (Aroca-Siendones et al. 2021)(Zhang et al. 2021). La discrepancia entre estudios puede deberse a la cantidad de individuos con mutaciones en p53 en la cohorte, ya que, aunque la disminución de su expresión activa las mismas rutas moleculares el destino celular es distinto según el estado de p53 (Zhang et al. 2020).

CLOCK se encuentra fundamentalmente expresada al alza en diversos estudios, y una elevada expresión de esta proteína se relaciona con tumores en estadios más avanzados, y con una mayor probabilidad de remisión completa tras el tratamiento con terapia neoadyuvante en el cáncer rectal (Zhang et al. 2020).

En cuanto a los elementos responsables del bucle secundario del ritmo circadiano apenas hay estudios de expresión en CCR, y los pocos que hay señalan una disminución de los niveles de ROR α y de REV-ERB β en el tejido (Rao & Lin 2022)(Aroca-Siendones et al. 2021). Además, este último se ha asociado con un mayor riesgo de recidiva local (Aroca-Siendones et al. 2021).

6. PARP-1

Las poli-(ADP-Ribosa) polimerasas (PARPs) son una familia de 17 enzimas que se caracterizan por la presencia de una secuencia de 50 aminoácidos conocida como “dominio PARP”. Este motivo proteico permite a estas proteínas la síntesis y transferencia de cadenas de ADP-Ribosa a una gran cantidad de sustratos a través de un proceso denominado poli(ADP-ribosil)ación o PARilación (Rodríguez et al. 2015). Las PARPs se subdividen en cuatro grupos basados en sus funciones principales y su estructura: (I) PARPs dependientes de ADN que se activan en respuesta al daño en el ADN; (II) Tankirasas que contienen repeticiones de anquirina y dominios SAM que les permiten interactuar con ciertas proteínas; (III) PARP CCCH que contienen dominios CX₇₋₁₁CX₃₋₉CX₃H para la unión al ARN; y (IV) macro-PARPS que presentan dominios macro con los que interactúan con residuos de poli(ADP-ribosa) en sustratos modificados. Existen algunas PARPs que no pueden incluirse en ninguna de esas categorías (Martí et al. 2020).

PARP-1 es el principal miembro de la familia de PARPs. Se trata de una PARP dependiente de ADN, que se encuentra principalmente en el núcleo y es responsable del 80-90% del proceso de PARilación dentro de la célula. Además, se encuentra expresada en todos los tejidos, aunque a distintos niveles (Jubin et al. 2016).

A nivel estructural, PARP-1 se divide principalmente en 3 regiones funcionales: (I) un dominio de unión al ADN en el extremo N-terminal, que le permite la interacción con el ADN, así como con algunas proteínas, (II) un dominio de automodificación, que sirve de esqueleto para el proceso de autoPARilación y que está involucrado en la interacción proteína:proteína, y (III)

un dominio catalítico, dominio PARP, que se encuentra en el extremo C-terminal responsable de la síntesis de las cadenas de poli-ADP-ribosa (PAR) (Jubin et al. 2016).

Para poder llevar a cabo el proceso de PARilación, PARP-1 presenta actividad poli(ADP-ribosil) sintetasa y transferasa. Durante el proceso de PARilación, la primera etapa consiste en la formación de ADP ribosa a partir de la ruptura del enlace glicosídico entre la nicotinamida y la ribosa de la molécula de NAD⁺. Esa ADP ribosa es posteriormente unida de manera covalente a diferentes proteínas aceptoras, incluidas la propia PARP-1, a través de enlaces éster entre la ADP ribosa y aminoácidos de la proteína. Como consecuencia de su actividad transferasa, PARP-1 también va a catalizar las reacciones de elongación y ramificación a partir de la síntesis de nuevas moléculas de ADP-ribosa a partir de NAD⁺. Finalmente, las cadenas de PAR son eliminadas a través de la acción de la poli (ADP-ribosa) glicohidrolasa (PARG) y de la ADP-ribosil protein liasa. Los productos finales de la eliminación de las cadenas de PAR son monómeros y polímeros de ADP-ribosa libres que son muy reactivos pudiendo causar daño a través de reacciones de glicosilación, por lo que son convertidos por la ADP-ribosa pirofosfatasa a AMP y ribosa 5-fosfato, menos reactivos y que pueden ser usados para el reciclaje de nuevas moléculas de NAD⁺ (Alemasova & Lavrik 2019).

Como consecuencia de la activación de PARP-1 el efecto principal es el proceso de PARilación y la consecuente modificación covalente de proteínas a través de cadenas de PAR que van a regular o alterar su función. Sin embargo, existen otros procesos subyacentes derivados del proceso de PARilación como son la modificación no covalente de proteínas que interaccionan con cadenas libres de PAR afectando así también a su función, la depleción o reducción de los niveles de NAD⁺ o la generación de una ratio AMP/ATP alta que puede causar muerte celular por apoptosis y necrosis. Además, los polímeros libres de PAR, aparte de ser tóxicos por su reactividad, tienen la capacidad de actuar como una molécula señalizadora capaz de inducir un subtipo de muerte celular conocida como *parthanatos* (Martí et al. 2020).

A pesar de que PARP-1 se identificó por primera vez en 1963, a día de hoy siguen existiendo una gran cantidad de incógnitas en cuanto a su mecanismo exacto, qué efectos biológicos desencadena y cómo están regulados, cómo reconoce a sus proteínas diana y sus sitios específicos de PARilación, y, sobre todo, cuales son las dianas de PARP-1 (Alemasova & Lavrik 2019). Con respecto

a esto último, aunque se han hecho varios intentos para descifrar el ADP-ribosiloma, destacando los análisis llevados a cabo mediante espectrometría de masas los resultados varían considerablemente entre estudios, dificultando su identificación (Singh et al. 2022). Estas diferencias pueden ser el resultado del uso de distintos procedimientos experimentales con distintos grados de sensibilidad y/o como consecuencia del propio proceso de PARilación. El proceso de PARilación es un proceso dinámico, el tamaño de las cadenas de PAR es variable al igual que el de sus ramificaciones y las cadenas de PAR libres son capaces de interactuar con otros sustratos de forma no covalente alterando los resultados. Además, las técnicas actuales causan estrés celular lo que puede afectar a los resultados (Lehner et al. 2022). Pese a ello se han conseguido identificar y validar gran cantidad de proteínas (Singh et al. 2022)(Lehner et al. 2022).

Originalmente PARP-1 se vinculó con los procesos de reparación del ADN. De hecho, la actividad de PARP-1 se ve incrementada como consecuencia de la aparición de rupturas en las cadenas de ADN (Martí et al. 2020). Con respecto al proceso de reparación del ADN es importante destacar que PARP-1 no está directamente relacionado con éste, sino que inicia y modula varios de los mecanismos de reparación, siendo importante en el mantenimiento de la integridad genómica. Este hecho se ve apoyado por experimentos en modelos animales en los que se someten a ratones a dietas para privar al hígado de NAD⁺, o *knock-out* de PARP-1, aumentando la incidencia de distintos tumores. Además, el *knock-out* de PARP-1 en combinación con la deficiencia de otras proteínas de reparación del ADN resultan en letalidad embrionaria (Ko & Ren 2012). Concretamente, PARP-1 está relacionado con la reparación por escisión de base (BER), reparación por escisión de nucleótido (NER), reparación por malapareamiento (MMR), reparación de roturas de cadenas simple (SSBR), reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ) y reparación por recombinación homóloga (HR) (Demény & Virág 2021). A pesar de que se tratan de mecanismos distintos y sus lesiones están producidas por diferentes agentes, PARP-1 funciona de manera similar en todos ellos. PARP-1 reconoce la lesión en el ADN, se une a ésta, se activa y comienza el proceso de PARilación sobre sí misma primero, y posteriormente sobre otras proteínas, actuando como andamio para el reclutamiento y formación de complejos con las distintas proteínas responsables en última instancia de llevar a cabo la reparación del ADN (Ko & Ren 2012).

En estos últimos años se ha asociado con diferentes funciones que van más allá de la reparación del ADN como son la regulación de la transcripción, metabolismo, ciclo celular o inmunidad entre otras (Figura 6).

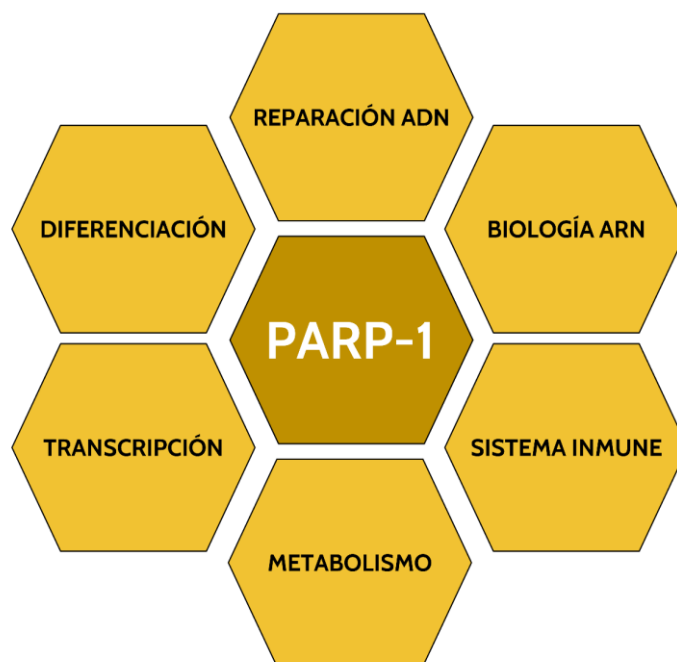


Figura 6. Funciones celulares reguladas por PARP-1. PARP-1 desempeña un papel importante en la regulación de diversas funciones celulares como la reparación del ADN, la biología del ARN, sistema inmune, metabolismo, transcripción y diferenciación.

A nivel transcripcional PARP-1 regula la expresión de genes a través de tres mecanismos principalmente. Por un lado, PARP-1 es capaz de regular la estructura de la cromatina a través de alteración del nucleosoma, bien uniéndose directamente o a través de la PARilación directa de histonas, de las proteínas no histonas asociadas a la cromatina o de las proteínas remodeladoras de la cromatina, lo que permite el acceso o bloqueo de factores de transcripción y la actividad de la ARN polimerasa II (Gupte, Liu, & Kraus 2017). Por otro lado, PARP-1 cuando es acetilada es capaz de regular a factores de transcripción como NF- κ B de forma independiente a su actividad enzimática. También es capaz de interactuar con factores de transcripción como OCT-1 o PPAR γ , y PARilarlos, modificando la expresión de los genes controlados por éstos (Ko & Ren 2012). Por último PARP-1 es capaz de regular la expresión de varios genes uniéndose directamente a regiones dentro del promotor que contienen motivos de unión a PARP-1, destacando especialmente genes involucrados en la reparación del ADN (Ko & Ren 2012).

PARP-1 es capaz de regular también el metabolismo celular, aunque su papel es complejo. A nivel del metabolismo de los carbohidratos PARP-1 dificulta el flujo glucolítico por un lado reduciendo la actividad de la hexoquinasa y la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (Szántó & Bai 2020). Este mecanismo podría tratarse de un mecanismo protector para evitar un exceso de producción de superóxido en condiciones de exceso de glucosa, y para derivarla a la ruta de las hexosaminas (Hopp, Grüter, & Hottiger 2019). Por otro lado, PARP-1 favorece la estabilización de HIF, lo que favorece la entrada de glucosa y el proceso de glucólisis, así como la inducción de la expresión de C-MYC y E2F, y la coactivación de NRF2 lo que deriva intermediarios del proceso de glucólisis hacia las rutas de las pentosas fosfato, serina/glicina, y C-1 para la síntesis de nucleótidos, ácidos nucleicos y NADPH (Demény & Virág 2021). En cuanto al metabolismo de los lípidos, PARP-1 es activado en respuesta a dietas ricas en grasas o por aumento de la biosíntesis lipídica, y dicha activación está relacionada con una reducción de los mecanismos de oxidación lipídica y de captación de ácidos grasos, sin embargo, existen contradicciones en cuanto a su función (Szántó et al. 2021). Algunos de los efectos que se observan a nivel metabólico no son necesariamente el resultado directo de la actividad de PARP-1, sino una consecuencia del consumo de NAD⁺ que afecta a la función de otras enzimas dependientes de NAD⁺ como SIRT-1 (Hopp et al. 2019).

PARP-1 parece desempeñar un papel importante en el mantenimiento de las características de las células madre y el proceso de diferenciación. Sin embargo, al igual que en otros procesos en los que PARP-1 está involucrado, existen datos controvertidos en cuanto a su papel. PARP-1 se encuentra más expresado en células embrionarias con respecto a células más diferenciadas, y la pérdida de su expresión se asocia con el proceso de diferenciación (Roper et al. 2014). Sin embargo, existen trabajos que señalan que la expresión de PARP-1 es necesaria para que se produzca el proceso de diferenciación al antagonizar el efecto del factor de pluripotencia SOX2 mediante su PARilación (Dadheech et al. 2022). Esta controversia se ha observado en otros estudios en los que la actividad de PARP-1 parece ser necesaria para la diferenciación de los adipocitos (Erener et al. 2012), mientras que otros estudios señalan que es la inhibición de la actividad de PARP-1 la que promueve el proceso de adipogénesis (Luo et al. 2017). En el caso de las fibras musculares, PARP-1 impide el proceso de diferenciación, sin embargo, su expresión es necesaria para la diferenciación de los oligodendrocitos mostrando de nuevo diferentes roles en el proceso de diferenciación (Wang et al. 2021)(Matteini et al. 2020). Esta controversia sugiere un papel complejo de PARP-

1 en el proceso de diferenciación que se evidencia aún más en el caso de los islotes pancreáticos. En las células progenitoras pancreáticas la depleción de PARP-1 impide la diferenciación en islotes pancreáticos, sin embargo, el uso de inhibidores de PARP-1 acelera el proceso de diferenciación, lo que sugiere que PARP-1 es necesario para el proceso de diferenciación, pero es independiente de su actividad enzimática (Dadheech et al. 2022).

Más claro está el papel del PARP-1 en la regulación de la respuesta inmunitaria. PARP-1 es necesario para la maduración de linfocitos T y linfocitos B, así como para la diferenciación de monocitos, células dendríticas y *natural killers* (NK) (Bai 2015). Además, PARP-1 ejerce un papel pro-inflamatorio. En respuesta a citoquinas, radicales libres, quimiocinas y patrones moleculares asociados a patógenos, PARP-1 actúa como cofactor de factores de transcripción pro-inflamatorios como NF- κ B, NFAT, AP-1 o YY1 lo cual permite la expresión de citoquinas y quimiocinas inflamatorias, moléculas de adhesión y otros factores inflamatorios como la iNOS o la COX2 (Bai 2015). Su función pro-inflamatoria se ve apoyada en el hecho de que la ausencia de PARP-1 conduce a la inhibición de la activación de linfocitos, un aumento de la cantidad de linfocitos inmunosupresores Treg o una mayor tendencia al desarrollo de macrófagos inmunosupresores M2 (Yélamos et al. 2020)(Sobczak, Zyma, & Robaszkiewicz 2020). Sin embargo, existen discrepancias entre estudios en cuanto al efecto de la inhibición de PARP-1, encontrándose estudios que señalan que la inhibición de PARP-1 puede aumentar la capacidad de células NK para reconocer células tumorales, producir un aumento de macrófagos pro-inflamatorios en el sitio patológico o de linfocitos T citotóxicos (Sobczak et al. 2020)(Yélamos et al. 2020). Estas diferencias pueden deberse al modelo usado, al tipo de inhibición utilizada, génica o farmacológica, del microambiente celular y/o del efecto concreto sobre el tipo celular estudiado y la regulación que ejerce éste sobre otras células inmunitarias.

Recientemente se ha asociado la actividad de PARP-1 y el proceso de PARilación con la regulación de la biología del RNA a distintos niveles. PARP-1 puede regular el proceso del *splicing* alternativo afectando a la elongación de la ARN polimerasa y mediante la PARilación de factores de *splicing* que regula, o bien la actividad del spliceosoma, o bien la expresión de sus componentes regulando así su función (Guo, Fan, & Li 2023). La relevancia de PARP-1 en la regulación del ARN también se ha observado en estudios nucleolares. PARP-1 es fundamental para el mantenimiento y funcionamiento del nucléolo,

especialmente para la biosíntesis de ribosomas. Asimismo, en condiciones de estrés, PARP-1 es capaz de PARilar a la poli(A) polimerasa, inhibiéndola y, por tanto, afectando a la maduración del ARNm (Manco et al. 2022).

PARP-1 participa en una diversa cantidad de procesos biológicos destinados a mantener la homeostasis celular y tisular, especialmente en condiciones de estrés. Esto hace que, en cierta medida, PARP-1 actúe a modo de sensor de estrés, de forma que a medida que la fuerza del estímulo estresante aumenta, también lo hace el aumento de su actividad. Esto puede desencadenar distintas respuestas celulares a nivel de reparación del ADN, respuesta inflamatoria, metabolismo, diferenciación, etc., aunque también puede desembocar en una respuesta exacerbada que derive en la muerte celular o pérdida de la homeostasis celular como consecuencia de la hiperactivación de ciertas rutas biológicas (Gupte et al. 2017). Esto es especialmente relevante en contextos fisiopatológicos, ya que PARP-1 podría acabar agravando la sintomatología o progresión de una enfermedad en esos casos.

a. PARP-1 y ritmos circadianos

El funcionamiento y regulación del ritmo circadiano a nivel molecular está controlado por complejos bucles de transcripción/traducción de las proteínas del reloj circadiano, así como de la modificación postraduccional de éstas (Okamoto-Uchida et al. 2019). Aunque entre esas modificaciones destacan acetilaciones, metilaciones y fosforilaciones también es posible encontrar la PARilación (Asher et al. 2010).

PARP-1 parece mostrar un comportamiento circadiano al menos en cuanto a su actividad enzimática (Asher et al. 2010). Sin embargo, en términos de expresión está más discutido. En experimentos hechos en pez cebra se ha observado que el ARNm de *PARP-1* parece ser rítmico presentándose el mayor pico durante el día mientras que la proteína lo hace durante la noche, aunque es importante señalar que no hacen un estudio de ritmicidad (Zada et al. 2021). En otro estudio en humanos en el que se analizó el efecto del trabajo por turnos, se observó que la expresión del ARNm de *PARP-1* en sangre mostraba ritmicidad (Koritala et al. 2021). Por el contrario, en hígados de ratón los niveles de proteína de PARP-1 se mantienen de manera constante (Asher et al. 2010). Las diferencias pueden ser debido al tipo celular estudiado, a diferencias entre especies o al análisis realizado sobre proteínas o ARNm.

La actividad rítmica de PARP-1 persiste en ausencia de un reloj circadiano funcional, probablemente como consecuencia de los niveles cíclicos de NAD⁺ y de los ritmos redox que parecen ser independientes de los ritmos circadianos, y regulada principalmente por la alimentación, al menos en el hígado (Asher et al. 2010). Sin embargo, un exceso de NAD⁺ no altera la actividad oscilatoria de PARP-1, por lo que podría estar controlado también por otros procesos. Además, la actividad rítmica de PARP-1 depende de su propia actividad y es independiente de la acción de PARG, o de su modificación por procesos de fosforilación o acetilación que afectan a la activación de PARP-1 (Asher et al. 2010).

Esta actividad rítmica tiene un impacto directo sobre la regulación de los ritmos circadianos. Al inicio de la fase luminosa, PARP-1 interacciona con BMAL1:CLOCK, PARilando a CLOCK lo cual reduce su capacidad de unión al ADN alterando la expresión de las proteínas represoras del bucle que controla el reloj molecular, como son PER y CRY, y probablemente de genes controlados por el reloj (Asher et al. 2010) (Figura 7).

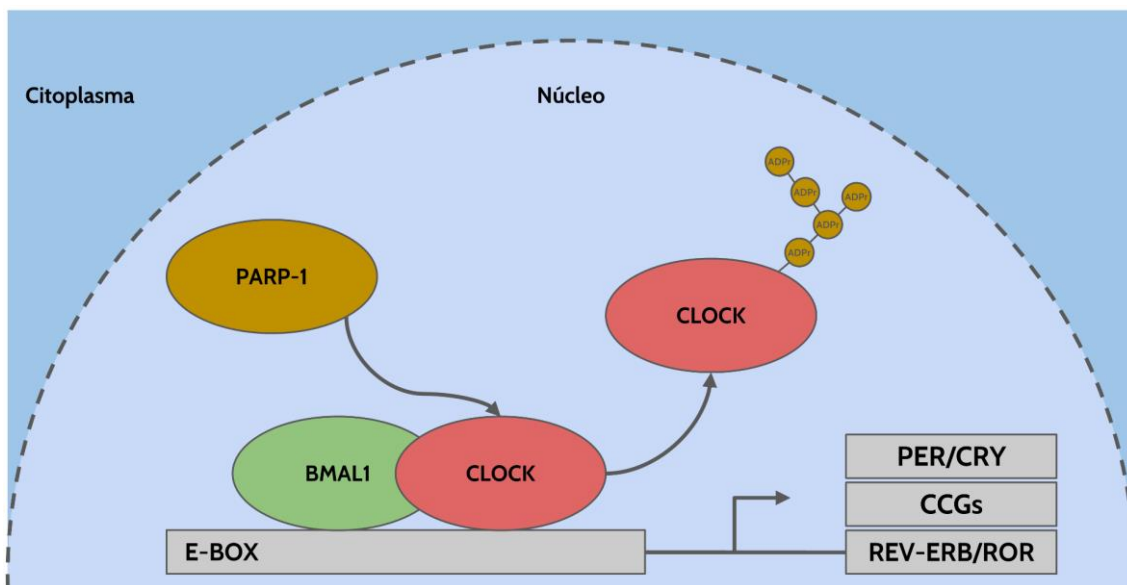


Figura 7. Relación de PARP-1 con los ritmos circadianos. PARP-1 en el núcleo interacciona con el heterodímero BMAL1:CLOCK, PARilando a CLOCK lo que reduce su afinidad por el ADN afectando a la expresión de PER/CRY, y posiblemente a REV-ERB/ROR y otros genes controlados por el reloj que contenga elementos E-box en sus promotores. Adaptada de (Kumar & Takahashi 2010). ADPr: ADP-ribosa. CCG: genes controlados por el reloj.

Por tanto, PARP-1 en hígado parece regular los ritmos circadianos y participar en el acoplamiento entre los ritmos metabólicos y el ritmo circadiano en los tejidos periféricos (Kumar & Takahashi 2010). Por otra parte, en neuronas, el pico

de expresión de PARP-1 durante la noche está relacionado con la inducción del sueño y la reparación del daño en el ADN (Zada et al. 2021).

b. PARP-1 y cáncer

PARP-1 presenta un papel multifacético y complejo a la hora de mantener la homeostasis celular, regulando procesos biológicos estrechamente relacionados con las características distintivas del cáncer, por lo que su estudio es relevante para comprender el proceso de carcinogénesis. De hecho, PARP-1 podría ser tanto protectora, al mantener la integridad genómica, como impulsora, al ser pro-inflamatoria, del proceso de carcinogénesis (Hanahan 2022).

Numerosos grupos han desarrollado modelos murinos en los que genéticamente se ha eliminado PARP-1 para ver la función de ésta en diferentes órganos. Estos modelos muestran que los animales *PARP-1^{-/-}* presentan mayor inestabilidad genómica, pero no predisposición temprana para el desarrollo de tumores. Sin embargo, la exposición a agentes genotóxicos resulta en un mayor desarrollo de tumores en distintas localizaciones (Pazzaglia & Pioli 2019). Este efecto se ve potenciado en modelos *PARP-1^{-/-}* combinados con deficiencias en p53 o en proteínas relacionadas con la reparación del ADN, resultando en una mayor tasa de aparición espontánea de tumores malignos de mama, colon, hígado, próstata, útero, nerviosos y sanguíneos (Pazzaglia & Pioli 2019) (Masutani et al. 2006). Asimismo, existen modelos murinos en los que se inhibe PARP-1 de manera farmacológica, observándose en líneas generales un aumento de la tumorigénesis, aunque el efecto contrario también ha sido descrito en algunos casos (Masutani et al. 2006). Estos modelos sugieren que PARP-1 tiene un carácter protector frente al proceso de carcinogénesis, desempeñando un posible papel similar al de un supresor tumoral.

En humanos, la función protectora de PARP-1 frente al desarrollo del cáncer sigue sin estar del todo clara. No obstante, a través de estudios de polimorfismos de *PARP-1* se ha observado que el polimorfismo Val762Ala (rs1136410 T>C) da lugar a una reducción de un 30-40% de la actividad de la proteína, y se ha asociado con un mayor riesgo de cáncer gástrico, tiroides y útero, por lo que PARP-1 sería protectora frente al proceso de carcinogénesis (Li et al. 2020).

Curiosamente, a pesar del papel protector que sugieren los estudios en animales y polimorfismos en humanos, las mutaciones en *PARP-1* o la pérdida de heterocigosidad raramente son descritas para este gen (Nosho et al. 2006). Por el contrario, amplificaciones del brazo 1q donde se localiza *PARP-1* son

frecuentemente observadas en varios tipos de cáncer humanos (Jacobs & Norton 2021)(Barwick et al. 2019)(Gonçalves et al. 2011).

Asimismo, contrariamente a su posible papel protector, *PARP-1* se encuentra sobreexpresado en numerosos tipos de cáncer humanos, en comparación con el tejido sano adyacente (Ossovskaya et al. 2010). Las mayores diferencias se han descrito en cáncer de mama, ovario, linfomas y pulmón, sin embargo, su sobreexpresión también se observa en cáncer de colon, próstata o gástrico (Ossovskaya et al. 2010)(Pazzaglia & Pioli 2019). A nivel de proteína, existen menos estudios en los que se haya estudiado la expresión de *PARP-1*, pero al igual que con el ARNm, los niveles de proteína de *PARP-1* son mayores en el tumor comparados con el tejido sano adyacente (Ossovskaya et al. 2010)(Bi, Li, & Yang 2013). Además, en el caso concreto del cáncer, *PARP-1* también se ha observado en el citoplasma (Zhai et al. 2015). Aparte del aumento del nivel de expresión de *PARP-1*, en el tejido tumoral se observa igualmente un aumento de su actividad en éste comparado con el tejido sano (Zaremba et al. 2009). La correlación entre la actividad de *PARP-1* y su expresión, no está clara, encontrándose un estudio con paneles de células de distintos tumores que no encuentran asociación entre ambas, y otro con varias células de CCR en el que la actividad y la expresión de *PARP-1* están correlacionadas (Zaremba et al. 2009)(Tentori et al. 2006).

Las asociaciones de *PARP-1* con distintas características clinicopatológicas no son consistentes y varían según el estudio, incluso entre aquellos del mismo tipo tumoral. Sin embargo, en términos de supervivencia, una elevada expresión de *PARP-1* se asocia generalmente con peores tasas de supervivencia según un meta análisis en varios tumores sólidos. No obstante, algunos estudios incluidos señalan que una elevada expresión de *PARP-1* se asocia con una mayor supervivencia (Thakur et al. 2021). Además, es importante señalar que los estudios incluidos utilizan distintos valores para realizar el *cut-off*, usan distintos periodos de seguimiento, cohortes de estudio concretas, y no hacen referencia a estudios que no encuentran asociación alguna con la supervivencia (Chang et al. 2010)(Thakur et al. 2021).

En un contexto tumoral, sigue sin conocerse si la sobreexpresión de *PARP-1* es una causa o una consecuencia del proceso tumoral. Del mismo modo, aunque parece que *PARP-1* puede facilitar el proceso tumoral, debido a su papel en la regulación de procesos biológicos estrechamente relacionados con las

características del cáncer, PARP-1 puede actuar como anti-tumoral en ciertos contextos (Weaver & Yang 2013).

El hecho de que *PARP-1* se encuentre sobreexpresada en el tejido tumoral, y especialmente por su papel en la reparación del ADN, ha impulsado el desarrollo de inhibidores de PARP-1 (iPARP-1) con fines antitumorales. Los iPARP-1 son moléculas pequeñas, análogas del NAD⁺ que compiten con éste por la unión al sitio catalítico de PARP-1. Debido a que el sitio de unión al NAD⁺ está conservado en la familia de las PARPs, estos iPARP-1 pueden también afectar a la actividad de otras PARPs (Rose et al. 2020).

El efecto antitumoral ejercido por los iPARP-1 se debe fundamentalmente a dos mecanismos. Los iPARP-1 inhibirían el proceso de PARilación de PARP-1 lo cual incrementaría la cantidad de daño en el ADN causando inestabilidad genética, y eventualmente muerte celular. Sin embargo, este mecanismo no parece ser el principal (Rose et al. 2020). El mecanismo principal sería a través del atrapamiento de PARP-1 en los sitios donde se ha producido el daño en el ADN. En presencia de un iPARP-1, PARP-1 es capaz de unirse al sitio donde se ha producido el daño en el ADN, pero no va a ser capaz de autoPARilarse, de manera que no puede activarse, ni tampoco disociarse del ADN, favoreciendo que se produzca el colapso de la horquilla de replicación y se favorezca la aparición de doble rotura del ADN. En el contexto de deficiencias del sistema de reparación homóloga, especialmente en mutaciones en BRCA, esto conduce a la muerte celular, conocida como letalidad sintética (Rose et al. 2020) (Bastos, Rebelo, & Silva 2024) (Figura 8).

La importancia del atrapamiento de PARP-1 para llevar a cabo los efectos citotóxicos se ve apoyada por el hecho de que los distintos iPARP-1 son más potentes cuanto mayor capacidad de atrapamiento tienen, aunque esto también afecta a sus efectos secundarios (Dias et al. 2021).

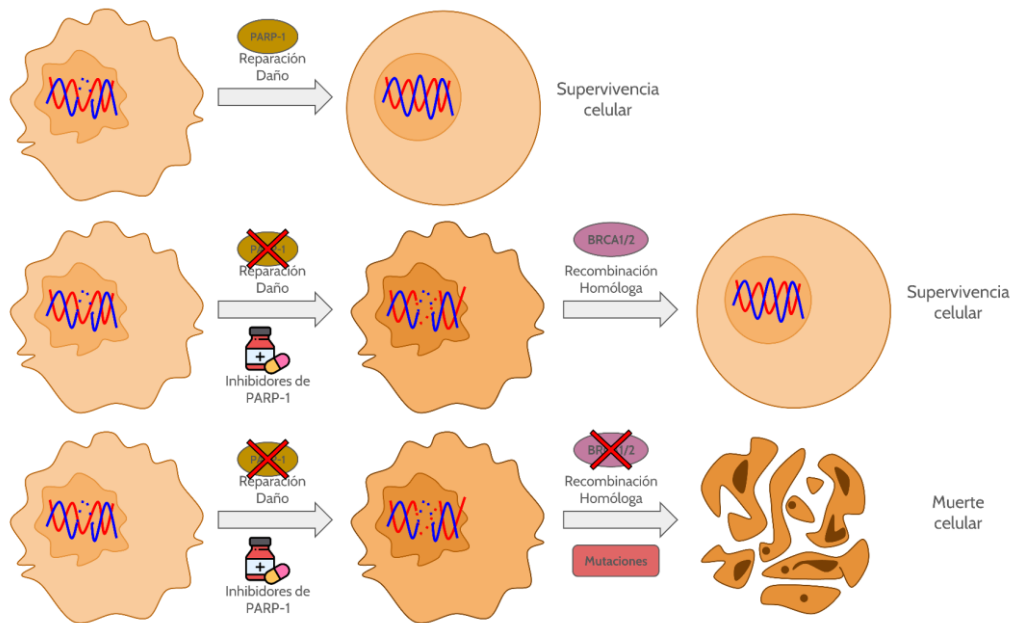


Figura 8. Muerte por letalidad sintética producida por el uso de iPARP-1. Cuando se produce daño en el ADN, PARP-1 se une al sitio donde se ha producido, se activa y se modifica así misma para reclutar la maquinaria de reparación al ADN. Cuando se usan iPARP-1, PARP-1 es capaz de unirse al sitio donde se ha producido la lesión, pero no es capaz ni de modificarse ni de reclutar la maquinaria de reparación al ADN lo que acaba provocando la doble rotura del ADN, que es reparada por el sistema de recombinación homóloga mediada por BRCA1/2. Cuando se usan iPARP-1 en el contexto de deficiencias en BRCA1/2 o del sistema de recombinación homóloga, el daño no se puede reparar y resulta en la muerte celular. Adaptada de (Bastos et al. 2024).

El olaparib fue el primer iPARP-1 aprobado por la FDA, en 2014, para el tratamiento de cáncer de ovario avanzado con deficiencias en BRCA. Actualmente está aprobado el uso de otros tres iPARP-1, rucaparib, niraparib y talazorib, para el tratamiento del cáncer de mama, ovario, próstata y páncreas con mutaciones en *BRCA* o deficiencias en el mecanismo de recombinación homóloga (Bastos et al. 2024). A pesar de la eficacia de los iPARP-1 en esos tumores, a largo plazo ésta es limitada como consecuencia de la aparición de resistencias al tratamiento. Se estima que entre un 40-70% de los pacientes sometidos a estos tratamientos acaban desarrollando resistencias (Cheasley et al. 2022). Los mecanismos más comunes a través de los cuales surge la resistencia al tratamiento son la reversión de mutaciones en *BRCA* o la restauración total o parcial de la reparación homóloga del ADN, una disminución de la expresión de PARP-1 lo cual reduce su atrapamiento, el refuerzo de la estabilidad de la horquilla de replicación, y por un aumento de la expresión de transportadores de sustancias genotóxicas como la Glucoproteína-P (Bhamidipati et al. 2023). A la aparición de resistencias al tratamiento hay que añadirle la aparición de efectos secundarios derivados de su consumo tales como vómitos, náuseas, diarrea,

fatiga, anemia, neutropenia, leucopenia, y, aunque más raros, un mayor riesgo de infecciones, de enfermedad pulmonar intersticial y leucemias (Daly et al. 2024). Éstos provocan la disminución de la dosis de tratamiento e incluso su cese, y contribuyen junto con la aparición de resistencias al fracaso de los tratamientos con iPARP-1.

A pesar de que el uso de iPARP-1 está aprobado y tiene buenos resultados a nivel clínico en pacientes de cáncer de mama, ovario, próstata y páncreas con mutaciones en *BRCA* o deficiencias en la recombinación homóloga; cuando se ha intentado extender su uso a otros tumores sólidos, como el CCR, los ensayos clínicos han fracasado, incluso en tumores con deficiencias en sistemas de reparación del ADN (Leichman et al. 2016). El porqué de la falta de respuesta en otros tumores sólidos sigue sin estar claro, aunque existen estudios en CCR o de cáncer de útero que señalan que la eficacia de los iPARP-1 depende del estado de p53, o del nivel de expresión y actividad de PARP-1 (Bianchi et al. 2019)(Smeby et al. 2020).

Aunque el uso de iPARP-1 produzca un efecto beneficioso a corto plazo produciendo la regresión tumoral, en un estudio de cáncer de ovario se ha demostrado que a largo plazo se produce un enriquecimiento de la población de CMCs independientemente del estado de *BRCA* (Bellio et al. 2019). Por otra parte, el uso de los iPARP-1 también produce un aumento de la expresión de PD-L1 lo cual favorecería la inmunosupresión tumoral (Jiao et al. 2017).

A día de hoy existen más de 500 ensayos clínicos en los que se intenta extender el uso de iPARP-1 a distintos tipos de tumores con distintas características a través de su combinación con radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia o terapias dirigidas, al igual que con nuevos iPARP-1 para solventar las limitaciones actuales de este tratamiento (Bhamidipati et al. 2023).

En condiciones fisiopatológicas como el cáncer, PARP-1 parece también ser importante para el control de los ritmos circadianos. En cáncer de mama se ha descrito que PARP-1 forma complejos con las proteínas PRMT6 y CRL4B, que afectan al ritmo circadiano a través de la represión de *PER3* al bloquear su promotor (Yang et al. 2023). En cáncer de mama se ha descrito también que PARP-1 es capaz de PARilar a otras proteínas del reloj circadiano, concretamente a *REV-ERB α* , reclutándolo a los sitios donde se ha producido daño en el ADN, donde actúa bloqueando la formación de complejos necesarios para que se produzca la reparación del ADN (Ka et al. 2017). Otra proteína del reloj con la que interacciona PARP-1 es *TIMELESS*, que, aunque en otras especies es

importante para el mantenimiento de los ritmos circadianos, en humanos su papel circadiano está más discutido. En distintas líneas celulares de cáncer, PARP-1 interacciona con TIMELESS independientemente de su actividad enzimática y la recluta a los sitios donde se ha producido daño para iniciar la reparación por recombinación homóloga (Xie et al. 2015).

c. PARP-1 y p53

La función de PARP-1 en un contexto tumoral es compleja y dinámica debido a que existe una continua interacción entre ésta y el microambiente tumoral. En este sentido una de las proteínas con las que PARP-1 interacciona es p53, estando la función de ambas proteínas relacionadas a distintos niveles.

Las cadenas de PAR interaccionan de manera no covalente con el extremo carboxilo terminal de p53 lo cual media su interacción con PARP-1 auto-PARilada, lo que permite la posterior PARilación de p53 (Figura 8). La PARilación de p53 es importante en la regulación de su actividad transcripcional, su localización o la interacción con otras proteínas (Fischbach et al. 2018).

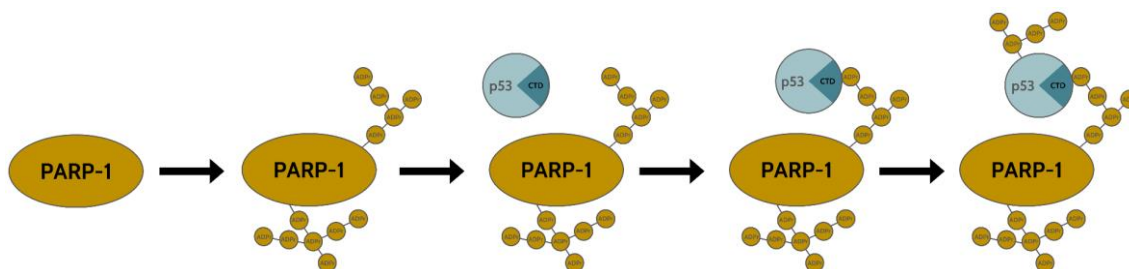


Figura 9. Mecanismo por el cual PARP-1 modifica a p53. Cuando PARP-1 se activa, ésta se modifica a si misma PARilandose. A través del dominio carboxilo terminal (CTD), p53 se une de forma no covalente a las cadenas de PAR, de forma que queda próxima al centro catalítico de PARP-1. PARP-1 PARila a p53 modificando sus funciones celulares. Adaptada de (Fischbach et al. 2018). ADPr: ADP ribosa.

Como consecuencia de la PARilación de p53 se promueve su localización nuclear al impedir interacción con la exportina Crm1 (Kanai et al. 2007). Además de su efecto sobre la compartimentación de p53, PARP-1 también parece ser necesario para su estabilización y su acumulación en respuesta a estrés, al proteger las cadenas de PAR los sitios proteolíticos de p53 (Won et al. 2006).

Aunque existen trabajos que señalan que la PARilación de p53 reduce su capacidad de unión al ADN (Krüger et al. 2019), pudiendo llegar a afectar a la transcripción de genes diana relacionados con apoptosis (Simbulan-Rosenthal et al. 2001), otros señalan que es necesaria para la transactivación de los genes dependientes de p53 (Wieler et al. 2003)(Fischbach et al. 2018), o incluso que no

afecta a su actividad (Kanai et al. 2007). Estas inconsistencias pueden deberse a diferencias celulares o del tipo de estrés inducido para su estudio. Sin embargo, estos tres hechos podrían ocurrir de manera concomitante, ya que la PARilación de p53 provoca una disminución de la unión no específica de p53 al ADN, favoreciendo su unión a aquellas zonas que contienen motivos consenso de p53. Además, para poder llevar a cabo la transcripción de sus genes diana, p53 tiene que disociarse finalmente del ADN para comenzar la transcripción, y este proceso podría estar mediado por la repulsión de cargas negativas aportadas por las cadenas de PAR, regulando de forma dinámica la unión al ADN y transcripción de genes diana de manera espacio-temporal (Fischbach et al. 2018).

PARP-1 también es capaz de interactuar con p53 cuando éste está mutado, siempre que la mutación no afecte a la región carboxilo terminal (Węsierska-Gądek & Schmid 2001)(Fischbach et al. 2018). Cuando los niveles de mtp53 son elevados, éste secuestra a PARP-1 promoviendo su localización citoplasmática, mientras que cuando está en su forma salvaje promueve la localización nuclear (Węsierska-Gądek & Schmid 2001). Sin embargo, esto contrasta con otro estudio que señala que la depleción de mtp53 provoca la localización citoplasmática de PARP-1, mientras que una elevada expresión de mtp53 se asocia con un mayor nivel de proteínas PARiladas en el núcleo además de la localización nuclear de PARP-1. No obstante, estos resultados se observan con la mutación R273H, y cuando se intentan extender a otras mutaciones no se observan los mismos resultados en la regulación citoplasmática de PARP-1, sugiriendo que diferentes mutaciones pueden desembocar en distintos efectos (Polotskaia et al. 2015).

La interacción entre PARP-1 y p53 es bidireccional. PARP-1 regula la actividad de p53 como se ha descrito anteriormente, pero p53 también modula positivamente la actividad de PARP-1. El mecanismo de esta regulación sigue sin ser del todo conocido, pero podría estar mediado por SIRT-1. Cuando p53 está ausente, los niveles de SIRT-1 aumentan, y éste regula negativamente a PARP-1 acetilándolo (Montero et al. 2013).

d. PARP-1 y células madre cancerígenas

La expresión de PARP-1 no es homogénea en las células que componen el tumor, si no que ésta parece ser mayor en células con características de CMCs, en varios tumores humanos incluyendo colon (Jarrar et al. 2019), mama (Gilbert et al. 2014), o glioblastoma (Venere et al. 2013). Esta mayor expresión de PARP-1 en las CMCs podría estar relacionada con una posible función relacionada con el

mantenimiento de las CMCs o como consecuencia de la mayor capacidad de respuesta en el ADN que presentan estas células (Rizvi, Merlin, & Shah 2021).

La sobreexpresión de PARP-1 en el tejido tumoral con respecto al tejido sano impulsó el desarrollo de los iPARP-1 para el tratamiento del cáncer. El hecho de que la expresión de PARP-1 sea mayor en las CMCs, sugiere que estas células pueden tener una mayor dependencia de la actividad de PARP-1, y por tanto ser más sensibles al tratamiento con iPARP-1. En glioblastoma, las CMCs son más sensibles que las no-CMCs al tratamiento con iPARP-1 (Venere et al. 2013), pero en el caso de cáncer de mama éstas son resistentes al tratamiento con olaparib (Gilabert et al. 2014). Además el tratamiento con olaparib sensibiliza a las CMCs de CCR al tratamiento con 5-FU (Jarrar et al. 2019), o a las de glioblastoma a la radioterapia (Jarrar et al. 2019)(Rizvi et al. 2021). Sin embargo, en el caso de CMCs hepáticas, el tratamiento con iPARP-1 aumenta la sensibilidad al tratamiento con irinotecan pero aumenta la resistencia a los tratamientos con cisplatino y doxorubicina (Jarrar et al. 2019).

El uso de iPARP-1 también tendría un efecto directo sobre el fenotipo de las CMCs. En estudios de CMCs de glioblastoma derivadas de paciente, el uso de iPARP-1 reduce su capacidad de formación de esferas, su auto-renovación y su expansión *in vivo*. Resultados similares en glioblastoma se han obtenido al inhibir PARP-1 de forma genética, observándose una reducción en la capacidad de formación de esferas (Long et al. 2018). La inhibición de PARP-1 también compromete las características de células madre en células sanas progenitoras neuronales (Okuda et al. 2017).

A pesar de los resultados positivos de los iPARP-1 en la regulación del fenotipo de CMCs hacia otros menos agresivos en glioblastoma, en ovario, el uso de iPARP-1 aunque reduce el crecimiento tumoral, hace que las células restantes se encuentren enriquecidas en características de CMCs (Bellio et al. 2019).

Estos resultados muestran un efecto de los iPARP-1 dependiente del tipo celular, o que el efecto de PARP-1, y de los iPARP-1, sobre las CMCs es mucho más complejo, y que se requieren estudios adicionales para poder aplicarlo a nivel clínico.

e. PARP-1 y cáncer colorrectal

A diferencia de otros tumores sólidos, el papel de PARP-1 en el CCR apenas se ha estudiado. Modelos murinos PARP-1 $-/-$ sometidos a azoximetano, un

agente inductor del carcinoma de colon, mostraron un mayor número de tumores, además de mayor tamaño, en comparación con los ratones PARP-1^{+/+}. En ambos casos, el proceso de tumorigénesis está mediado por la acumulación de β -Catenina, sugiriendo que PARP-1 no afecta al mecanismo de carcinogénesis, pero protege frente al desarrollo del CCR (Nozaki et al. 2003).

Pese al posible papel protector, en humanos PARP-1 se encuentra sobreexpresada en el tejido tumoral con respecto al tejido sano adyacente (Nosho et al. 2006). En CCR, PARP-1 parece estar correlacionado con la expresión de β -Catenina, a la cual regula a través de la interacción con TCF-4 que facilita su expresión (Nosho et al. 2006)(Idogawa et al. 2005). De hecho, en el estudio llevado a cabo por Idogawa y col. se comprobó que la expresión de PARP-1 se asocia con niveles elevados de β -Catenina y células intestinales indiferenciadas, y su silenciamiento reduce la proliferación en líneas celulares de CCR (Idogawa et al. 2005). Otro estudio en humanos señala que los niveles de ARNm de *PARP-1* en tumores son más elevados que en el tejido sano, y en éstos últimos mayores que en adenomas. Sin embargo, a nivel proteico, los niveles de PARP-1 siguen siendo mayores en los tumores, pero en el caso de adenomas son mayores que en el tejido sano y similares al de los tumores (Dziaman et al. 2014). Estos resultados son similares a los obtenidos por Dörsam y col., en los que se observa que los niveles de PARP-1 son mayores en carcinomas seguidos por adenomas y tejido sano, siendo los niveles más altos encontrados en tumores moderadamente diferenciados. Los niveles de PAR también son mayores en carcinomas y adenomas, pero estos tienden a reducirse en tumores más indiferenciados (Dörsam et al. 2018). Estos mismos autores a través de un modelo murino tratado con azoximetano/DSS observaron que los animales PARP-1 ^{-/-} desarrollaban menos tumores que los PARP-1^{+/+}, y, además, éstos eran de mayor tamaño (Dörsam et al. 2018). Esos resultados contrastan con los obtenidos por Nozaki y col. previamente (Nozaki et al. 2003). En el trabajo de Dörsam y col. además observan que la falta de PARP-1 atenúa la respuesta inflamatoria resultando en un menor número de células inmunitarias. Cuando se repite en el contexto de deficiencias a la hora de reparar los daños producidos por el azoximetano observaron que realmente PARP-1 protege frente al proceso de tumorigénesis, sin embargo, una vez iniciado facilita la progresión a través de la promoción de la respuesta inflamatoria y la estimulación del eje IL-6-STAT3-ciclina D1 (Dörsam et al. 2018).

Introducción

Al igual que en otros tumores sólidos, el hecho de que PARP-1 esté sobreexpresado en el tejido tumoral y su posible vinculación con la progresión del CCR ha provocado que se intenten usar iPARP-1 para su tratamiento. A pesar de los resultados positivos obtenidos *in vitro*, especialmente en líneas tumorales con inestabilidad de microsatélites, los ensayos clínicos en fase II no han dado resultados positivos para su uso en CCR (Vilar et al. 2011)(Leichman et al. 2016). Actualmente el mayor interés de los iPARP-1 en el CCR se centra en su uso combinado con radioterapia o con agentes quimioterapéuticos, y por su posible papel a la hora de sensibilizar a las CMCs a los diferentes tratamientos (Qin et al. 2022)(Jarrar et al. 2019)(Augustine et al. 2019).

*JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y
OBJETIVOS*

1. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

El CCR es el tercer tipo de cáncer en número de casos y el segundo en términos de mortalidad a nivel mundial (Bray et al. 2024). Aunque en los últimos años se han producido avances en materia de diagnóstico y tratamientos, éstos realmente no se han traducido en mejoras clínicas sustanciales, especialmente en estadios avanzados cuando es más común que se detecte este cáncer (Rawla et al. 2019). A esto hay que sumarle el hecho de que se estima que en los próximos 25 años la incidencia y mortalidad del CCR seguirá aumentando, especialmente en la población joven menor de 50 años en la que este tipo de cáncer era poco frecuente, suponiendo un problema sanitario, social y económico importante (Loomans-Kropp & Umar 2019).

Esto muestra la necesidad de la búsqueda de marcadores biológicos con los que mejorar la detección y pronóstico del cáncer, así como la predicción de la posible respuesta a tratamientos disponibles en el mercado o fármacos en ensayos clínicos con el fin de desarrollar una medicina personalizada con mayor probabilidad de éxito para el paciente.

PARP-1 es una poli-(ADP-Ribosa) polimerasa dependiente de NAD, que cataliza la síntesis y transferencia de cadenas de ADP-ribosa a diferentes sustratos a través de un proceso denominado poli(ADP-ribosil)ación o PARilación (Rodríguez et al. 2015). Originalmente, PARP-1 se ha asociado a los procesos de reparación del ADN, ya que, en respuesta a la ruptura de ADN, la actividad de PARP-1 se ve incrementada, iniciando y facilitando los distintos procesos de reparación de éste mediante la modificación y reclutamiento de distintos complejos proteicos, que en última instancia son los responsables de reparar el ADN (Martí et al. 2020)(Demény & Virág 2021). En los últimos años, además del papel en la reparación del ADN, PARP-1 se ha asociado con distintos procesos biológicos tales como la regulación del metabolismo, transcripción, inmunidad o diferenciación celular entre muchos otros, aunque su implicación exacta en ellos sin ser completamente entendida (Demény & Virág 2021). Esto refleja que PARP-1 está involucrado en numerosos procesos celulares destinados a mantener la homeostasis celular y tisular, especialmente en condiciones de estrés, aumentado su actividad bajo dichas condiciones, pudiendo llegar a producir incluso una respuesta exacerbada que contribuya a la pérdida de la homeostasis como consecuencia de la sobreactivación de ciertas rutas biológicas (Gupte et al. 2017). Esto podría ser particularmente importante en situaciones

fisiopatológicas en las cuales, PARP-1 podría agravar la sintomatología o progresión de la enfermedad.

El papel multifacético de PARP-1 a la hora de mantener la homeostasis celular, regulando procesos que se encuentran alterados en el cáncer hace que su estudio sea relevante para entender el proceso de carcinogénesis. Distintos modelos murinos revelan que la ausencia de PARP-1 predispone a una mayor inestabilidad genómica y una mayor aparición espontánea de tumores, especialmente cuando hay exposición a agentes genotóxicos u otras alteraciones relacionadas con la reparación del ADN, sugiriendo un papel como posible supresor tumoral (Pazzaglia & Pioli 2019)(Masutani et al. 2006). Estudios de polimorfismos en humanos muestran que aquellas variaciones que reducen la actividad de la proteína se asocia con un mayor riesgo de desarrollar cáncer, lo que apoyaría su papel protector frente al proceso de carcinogénesis (Li et al. 2020). Sin embargo, el estudio de la expresión de PARP-1 en distintos tumores revela que ésta se encuentra sobreexpresada frente al tejido sano, sugiriendo un papel como protooncogen (Ossovskaya et al. 2010). Por otra parte, la asociación de PARP-1 con distintas características clínico-patológicas no son consistentes y varía entre los distintos estudios, incluso entre aquellos del mismo tipo tumoral, (Thakur et al. 2021). PARP-1 podría tener un papel dual, facilitando el proceso tumoral o actuando como anti-tumoral según el contexto celular (Weaver & Yang 2013). De hecho, PARP-1 interacciona con distintas proteínas importantes en el ambiente tumoral, como p53, que regulan mutuamente su actividad, y, por tanto, a sus funciones (Fischbach et al. 2018)(Krüger et al. 2019)(Montero et al. 2013).

Los ritmos circadianos son procesos biológicos con una duración aproximada de 24 horas que regulan diferentes procesos fisiológicos como la división celular, ciclos sueño-vigilia, la respuesta inmune o el metabolismo, entre otros (Ayyar & Sukumaran 2021). Estas oscilaciones rítmicas, dependen a nivel molecular de ciclos de retroalimentación de transcripción-traducción de los llamados genes del reloj circadiano, *BMAL1*, *CLOCK*, *PER1-3*, *CRY1-2*, *REV-ERB α - β* y *ROR α* , que regulan su propia expresión y la de los llamados genes controlados por el reloj, que en última instancia son los responsables de las características fisiológicas de cada tejido (Patke et al. 2019). Además de los bucles de retroalimentación de transcripción-traducción, los ritmos circadianos se encuentran regulados a través de la modificación postranscripcional de los distintos componentes del reloj (Okamoto-Uchida et al. 2019).

La alteración del ritmo circadiano se ha relacionado con el inicio y la progresión tumoral (Ye et al. 2018). Sin embargo, la pérdida del correcto funcionamiento del reloj circadiano en el proceso tumoral sigue sin ser comprendida, ya que, aunque los genes del reloj circadiano se relacionan con algunas de las características distintivas del cáncer, éstos forman parte de redes complejas de mecanismos de regulación que dificultan su estudio en un contexto tumoral donde ya de por sí se encuentran alteradas (Battaglin et al. 2021). Además, la pérdida del reloj funcional podría no ser homogéneo siquiera en toda la masa tumoral, que a su vez es heterogénea, describiéndose en algunos tipos de tumores que en las CMCs existen ritmos circadianos robustos, siendo incluso necesarios para el mantenimiento de este subtipo celular (De et al. 2020)(Puram et al. 2016)(Dong et al. 2019).

La actividad de PARP-1 presenta un comportamiento circadiano en condiciones fisiológicas normales, y ésta tiene un impacto directo sobre la regulación del ritmo mediante la fosforilación de CLOCK, afectando a su capacidad de unión al ADN, y a la posterior expresión de PER y CRY, y probablemente a la de otros genes controlados por el reloj (Asher et al. 2010). Sin embargo, este fenómeno apenas se ha estudiado en condiciones fisiopatológicas.

El papel de PARP-1 en el CCR ha sido escasamente estudiado, encontrando solamente unos pocos estudios sobre éste (Nozaki et al. 2003)(Nosho et al. 2006)(Dziaman et al. 2014)(Dörsam et al. 2018). Al igual que en otros tumores, en el CCR, la expresión de PARP-1 se encuentra elevada frente al tejido sano adyacente, y aunque parece que la expresión de PARP-1 protege frente a las primeras etapas del proceso de carcinogénesis, su expresión favorecería la progresión tumoral una vez iniciada (Dörsam et al. 2018). Sin embargo, entre estudios se encuentran resultados discordantes en cuanto al papel de PARP-1 en el CCR (Dörsam et al. 2018)(Nosho et al. 2006).

El hecho de que *PARP-1* se encuentre sobreexpresado en el tejido tumoral ha provocado el desarrollo de iPARP-1 para el tratamiento del cáncer, y aunque éstos han tenido resultados positivos en cáncer de mama y ovario con mutaciones en BRCA1/2, cuando se ha intentado extender su uso al CCR, no se han obtenido resultados positivos en ensayos clínicos de fase II, independientemente del estado de los sistemas de reparación del ADN (Leichman et al. 2016). Esto revela que el papel de PARP-1 continúa sin estar claramente definido en el CCR, así como los mecanismos a través de los cuales puede actuar o los motivos por los cuales los iPARP-1 parecen no funcionar en el CCR.

De acuerdo con todo lo anterior, nuestro trabajo parte de la premisa que PARP-1 ejercería un efecto dual en el desarrollo y progresión del CCR según el contexto tumoral, concretamente, según el estado de p53 a través de la regulación diferencial de las CMCs. Además, dicha regulación sería producida por una modulación distinta de los ritmos circadianos según p53. Este efecto dual explicaría la controversia en cuanto al papel de PARP-1 encontrada entre estudios, y la falta de respuesta a iPARP-1 en ensayos clínicos al no tenerse en cuenta el estado de p53.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal planteado para este trabajo es describir el posible papel de PARP-1 en el desarrollo y progresión del CCR, así como determinar el mecanismo a través del cual actuaría, y los potenciales factores que expliquen la controversia entre estudios y la falta de respuesta a los iPARP-1.

Los objetivos específicos planteados para el desarrollo del objetivo general son:

1. Evaluar la expresión de PARP-1 en biopsias de pacientes con CCR, y su correlación con las características clínico-patológicas (estadio, grado de diferenciación, estado de p53, marcadores de CMCs o supervivencia).
2. Determinar mediante la sobreexpresión de PARP-1 el efecto de ésta sobre la población de CMCs.
3. Estudiar la relación de PARP-1 con los genes del reloj circadiano y marcadores de CMCs en biopsias de pacientes con CCR.
4. Determinar si la sobreexpresión de PARP-1 afecta a los procesos de crecimiento tumoral, la población de CMCs o la capacidad invasiva a través de la regulación circadiana, así como el efecto del olaparib sobre éstos.
5. Analizar el perfil de PARP-1 en líneas celulares derivadas de pacientes con CCR (tumor primario, metástasis y CTCs).
6. Evaluar el efecto *in vitro* del tratamiento simple y combinado de oxaliplatino y olaparib en líneas metastásicas y CTCs derivadas de pacientes.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. ESTUDIO EN MUESTRAS DE COHORTE DE PACIENTES

La cohorte de pacientes utilizada en este estudio forma parte de un estudio prospectivo mayor cuyo objetivo es el estudio de las vías que regulan la biología de las células madre cancerígenas en el cáncer colorrectal (PI-067-2013: Regulación circadiana de los marcadores de células madre cancerosas en el cáncer colorrectal).

El dictamen favorable para el desarrollo del estudio en pacientes fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Clínico Universitario San Cecilio de Granada. Las muestras fueron proporcionadas por la Red de Bancos de Tumores de Andalucía de pacientes de Granada, Cádiz y Almería. Las muestras utilizadas en el estudio provenían de pacientes con tumor esporádico de CCR que habían sido sometidos a cirugía para su extracción.

Los pacientes incluidos en el estudio debían ser personas mayores de 18 años, sin antecedentes de cáncer, y que no hubiesen sido tratados previamente con terapia neoadyuvante. Se excluyeron del estudio a pacientes mayores de 85 años y aquellos con sospecha de cáncer hereditario. Todos los pacientes incluidos firmaron un consentimiento informado para el uso y almacenamiento de muestras post-cirugía, y su posterior uso en investigación biomédica (Anexo 1).

Teniendo en cuenta estos criterios, en el estudio se incluyeron a 201 pacientes con una edad media de 71 ± 12 años, cuyas características clínico-patológicas fueron proporcionadas por la Red de Biobancos de Andalucía. Éstas incluyen edad, sexo, sitio del tumor, diferenciación celular, estadio clínico TNM y metástasis en nódulos linfáticos, y se incluyen en la tabla 2. Se hizo un seguimiento de la cohorte de estudio de 120 meses.

De cada paciente se obtuvieron muestras del tejido tumoral y del tejido no tumoral adyacente. Las muestras una vez extraídas se congelaron inmediatamente en *Tissue-Tek O.C.T* (Sakura Finetek Europe B.V, Zoeterwoude, Países Bajos).

Tabla 2. Características de los pacientes de la cohorte de estudio.

Características		Número (%)
Edad	< 72	99 (49.3)
	≥ 72	102 (50.7)
Genero	Masculino	125 (62.2)
	Femenino	76 (37.8)
Localización	Colon	189 (94.0)
	Recto	12 (6.0)
Grado de diferenciación	Bien	42 (20.9)
	Moderado	136 (67.7)
	Pobre	23 (11.4)
Estadio TNM	Estadio I	22 (10.9)
	Estadio II	77 (38.3)
	Estadio III	83 (41.3)
	Estadio IV	19 (9.5)
Nº Nódulos linfáticos extraídos	< 12	71 (35.3)
	≥ 12	130 (64.7)
Metástasis en nódulos linfáticos	Ausente	107 (53.2)
	Presente	94 (46.8)

2. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

El ADN genómico de las distintas muestras se obtuvo utilizando el kit comercial *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. La cantidad de ADN genómico se cuantificó utilizando un *NanoDrop ND-1000* (Implen GmbH, Múnich, Alemania), y su integridad fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa.

3. ANÁLISIS DEL ESTADO DE TP53

El estado de *TP53* se analizó mediante secuenciación del tipo *Sanger*. Para ello se realizó una PCR con el kit *GoTaq DNA Polymerase* (Promega, Madison, EE. UU) y cebadores específicos para los exones del 2 al 10 (Tabla 3). Las condiciones de PCR fueron 45 ciclos con el siguiente programa: 95°C durante 30 segundos, 64°C durante 30 segundos y 30 segundos a 72°C. Posteriormente, parte del producto de PCR se corrió en un gel de agarosa para comprobar su correcta amplificación

y pureza. El resto del producto de PCR fue purificado utilizando el kit comercial *Wizard SV gel and PCR clean-up system* (Promega, Madison, EE. UU). Tras esto se realizó la secuenciación mediante el procedimiento de secuenciación cíclica con *BigDye Terminator V3.1* (Thermo Fisher, Waltham, EEUU) y electroforesis multicapilar automática *3130XL GeneticAnalyzer* (Applied Biosystems, Foster City, EE. UU). Los datos se analizaron mediante el programa *Geneious Prime* (Dotmatrix, Boston, EE.UU) y la herramienta online *GLASS* (<https://station3.arrest.tools/glass/>).

Tabla 3. Cebadores usados para el análisis del estado de TP53.

Exones	Sentido	Antisentido
2-4	agctgtctcagacactggcatggtgttgg	cactgacaggaagccaaagggtgaagagg
5-6	gttgctttatctgttcacttgtgcctgac	tagggagggtcaatatagcagcaggagaaag
7-9	cagcctgggacagagcgagattccatc	aaccaggagccattgtctttgagcatcac
10	tacttgaagtgcagtttactaaatgcat	aggaagactaaaaaatgtctgtgcagggc

4. EXTRACCIÓN DE ARN

El ARN total de las distintas muestras se extrajo utilizando el kit comercial *Qiagen RNeasy Protect Mini* (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones proporcionadas por la casa comercial. La cantidad de ARN total se cuantificó utilizando un *NanoDrop ND-1000* (Implen GmbH, Múnich, Alemania), y su integridad fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa.

5. SINTESIS DE ADNc

Una vez cuantificado el ARN extraído, 500 ng se utilizaron para la síntesis de ADNc. Para ello se utilizó el kit comercial *qScript cDNA Synthesis* (Quanta, Houston, EE. UU) siguiendo el protocolo proporcionado por la casa comercial.

6. Q-PCR EN TIEMPO REAL

El análisis cuantitativo de la expresión de ARNm se realizó utilizando el kit comercial *SSO Advanced Universal Syber Green SuperMix* (BioRad, Hercules, EE. UU) en un lector *Quant Studi 7 Flex* (Thermo Fisher, Waltham, EE. UU) y los cebadores correspondientes para cada uno de los genes de interés (Tabla 4). Para cada gen se elaboró una curva estándar representado los valores de C_T frente al logaritmo de la dilución de ADNc. También se comprobó que no hubiese productos inespecíficos o dímeros de cebadores en los productos de la PCR

mediante el análisis del perfil de temperatura de disociación y electroforesis en gel de agarosa. Los niveles de expresión de ARNm se normalizaron utilizando los genes *UBC* o *TBP*.

Tabla 4. Cebadores usados para el análisis de expresión de distintos genes.

Gen	Sentido	Antisentido
<i>PARP-1</i>	agggcaagcacagtgtcaaa	tacccatcagcaacttagcg
<i>CD44</i>	gcttcaatagcaccttgcccacaatgg	aaagaggctctgtctgtccaaatcttc
<i>CD133</i>	tccacagaaattacactacattgg	cagcagagagcagatgacca
<i>PER1</i>	ttgatgtgatggcctgtgtggactgtggg	gtgcagtttctgtctgtaggaaggctgg
<i>PER2</i>	ttcttcggtggaaccaccagacatctgc	ccctggtcctttaagcctcatagtcttgg
<i>PER3</i>	ggggactgcaaaagagaaaacgtccaggcg	aaaaggtcgattttcctaatacattacaggacgc
<i>CRY1</i>	gtgcgtaatccaaattggtattgtagc	acatgatactccacaagttgggctc
<i>CLOCK</i>	ctatgaggtatgatgtgctgctgggaatgg	aaaatcaaggcactatggggtttttccctcg
<i>BMAL1</i>	gcaaatggtcatttcagatgtatgg	ggattcttacaaggaagaataaacgg
<i>REV-ERBβ</i>	acttgaagctattctggaactaacat	catgtcctcatcaattacagttttag
<i>TBP</i>	ttgtccttttgccatttctgtgggctctc	gtcatcagtgagacggtttccatttaacc
<i>UBC</i>	tgggatgcaaatctctgtgaagaccctgac	accaagtcagagtgactcttctggatg

7. LÍNEAS CELULARES Y CULTIVO

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral se han utilizado tres líneas celulares estables comerciales de carcinoma colorrectal humano con diferente estado del gen p53: HCT-116 (p53 salvaje), HCT-116 p53^{-/-} (p53 *knock-out*), y HT-29 (p53 mutado R273H) procedentes del repositorio de *Horizon Discovery* (Cambridge, Reino Unido). También se utilizaron líneas celulares de tumor primario, metástasis y CTCs derivadas de pacientes con CCR procedentes del *CHU-Carêmeau* de Nîmes (Francia, ClinicalTrial.gov Identifier#NCT01577511) (Tabla 5), cuyas características clínico-patológicas se encuentran recogidas en el Anexo 2. Todas las células se cultivaron en condiciones estándar de temperatura (37°C) y CO₂ (5%) en una atmósfera relativa de humedad. Para las líneas comerciales de carcinoma colorrectal humano se utilizó medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco, Carsbad, EE. UU) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 1% de penicilina-estreptomicina-anfotericina B y 2 mM de L-glutamina (Gibco, Carsbad, EE. UU). Las líneas de tumor primario y metastásicas derivadas de paciente se cultivaron en 3D en medio DMEM (Gibco, Carsbad, EE. UU)

suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 1% de penicilina-estreptomina y 2 mM de L-glutamina (Gibco, Carsbad, EE. UU). Las líneas de CTCs derivadas de paciente se cultivaron en medio Advanced DMEM F12 (1-1) (Gibco, Carsbad, EE. UU) suplementado con EGF (20 ng/ml), FGF (10 ng/ml), N2, 1% penicilina-dihidroestreptomina y 2 mM de L-glutamina (Gibco, Carsbad, EE. UU), en 3D.

Tabla 5. Líneas celulares derivadas de pacientes usadas y el tumor de origen. CTC: célula tumoral circulante.

Origen	Líneas celulares
Primario	CRC1, CPP6, CPP14, CPP24, CPP25, CPP35, CPP42, CPP43, CPP44
Metastásico	CPP19, CPP30, CPP36, CPP45
CTC	CTC31, CTC41, CTC44, CTC45

Los cultivos en 3D se realizaron en placas o flask pretratados con *polyHeme* (Sigma Aldrich Co, Burlington, EE. UU) durante la noche a 50-60°C.

La sincronización de los cultivos en aquellos ensayos que involucraron ritmo circadiano se realizó añadiendo al medio forskolina (Sigma Aldrich Co, Burlington, EE. UU) 10 μ M durante una hora, tras lo cual el medio fue cambiado por medio fresco, antes de comenzar el experimento.

Los tratamientos con olaparib se llevaron a cabo utilizando fármacos obtenidos de Selleckchem (Houston, EE. UU), mientras que oxaliplatino se obtuvo de Sigma Aldrich Co (Burlington, EE. UU).

Las células se contaron de manera manual en cámara de *Neubauer* utilizando una tinción con azul tripán para discriminar las células no viables (Sigma Aldrich Co, Burlington, EE. UU).

8. TRANSFECCIÓN

Se realizaron dos tipos de protocolos de transfección dependiendo si ésta era transitoria o estable.

a. Transfección transitoria

Las líneas HCT-116 y HCT-116 p53^{-/-} se transfectaron con el plásmido de sobreexpresión de PARP-1 (NM_001618) y su respectivo vector vacío (Origene Technologies, Rockville, EE. UU).

Para ello se sembraron 50.000 células/pocillo en placas de 6 pocillos y se incubaron durante 24 horas para permitir su adhesión. Al día siguiente se realizó la transfección. Para ello, se preparó una mezcla de lipofectamina 3000 (Thermo Fisher, Waltham, EEUU) y del plásmido correspondiente en una relación lipofectamina/plásmido de 2.5 en medio Opti-MEM I (1X) + GlutaMAX-I (Gibco, Carlsbad, EE. UU) sin suero ni antibióticos. Esta mezcla se añadió a los pocillos con células a los que previamente se les había eliminado el medio de cultivo y lavado con Opti-MEM I (1X) + GlutaMAX-I. A las 6 horas se añadió medio fresco RPMI 1640 y se mantuvo hasta el día siguiente. El día siguiente se sustituyó el medio con la mezcla de transfección por medio fresco y se dejó las células crecer durante 72 o 96 horas adicionales antes de realizar los distintos experimentos.

b. Transfección estable

La transfección estable con el plásmido de sobreexpresión de PARP-1 se realizó con las líneas HCT-116 y HT-29.

El protocolo utilizado es el mismo que para la transfección transitoria con unas pequeñas modificaciones. En este caso se sembraron 150.000 células/pocillo en placas de 6 pocillos, y a las 24 horas post-transfección se eliminó el medio con la mezcla de transfección y se sustituyó por medio fresco RPMI 1640 con una concentración elevada de G418, un análogo de la neomicina. El plásmido de sobreexpresión de PARP-1 contiene además resistencia a la neomicina, de forma que solo aquellas células que lo integren son capaces de crecer en medio con presencia de este antibiótico. Cada 48 horas se cambió el medio por medio fresco con G418 hasta que la selección se completó, quedando solo aquellas que habían incorporado el plásmido de sobreexpresión. En dicho momento se empezó a disminuir progresivamente la concentración de antibiótico hasta llegar a la concentración de mantenimiento de 0.4 mg/mL, y se seleccionaron aquellas células que habían crecido formando colonias individuales con el fin de obtener clones monoclonales. La sobreexpresión de PARP-1 se determinó por *Western Blot* para comprobar si los clones sobreexpresaban la proteína de interés.

9. OBTENCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEINAS

Con el fin de extraer las proteínas, se tripsinizaron las células y se centrifugaron a 400 rcf durante 10 minutos, tras los cuales se eliminó el sobrenadante y se congeló el pellet de células al menos 1 hora a -20°C. Tras esto, el pellet de células se incubó durante 30 minutos sobre hielo en tampón de lisis

RIPA suplementado con inhibidores de proteasas e inhibidores de fosfatasa (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EE. UU). Posteriormente se centrifugó a máxima velocidad durante 10 minutos a 4°C, y se recogió el sobrenadante en el que se encontraban disueltas las proteínas.

Con el objetivo de utilizar la misma cantidad de proteína posteriormente en el *Western Blot*, se llevó a cabo la cuantificación de la concentración de proteína a través del método de Bradford. Para ello se hicieron diluciones de la proteína y se les añadió *Bradford* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EE. UU) diluido 1/5, y tras una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz se midió su absorbancia a 595 nm en un lector *Triad Multimode* (Dynex Technologies, Chantilly, EE. UU). Previamente se hizo una curva patrón a partir de cantidades conocidas de BSA, lo cual permitió determinar la cantidad de proteína a partir de la ecuación de la recta de la curva patrón de BSA.

10. Western Blot

Una vez aislada y cuantificada la concentración de proteína se utilizaron 35 µg de proteína de cada muestra para cargar un gel de electroforesis *SDS-PAGE* de diferente porcentaje (entre 7.5-15%) según el tamaño de la proteína de interés. Las proteínas se corrieron en los geles aplicando una corriente eléctrica inicial de 90V, y posteriormente al alcanzar la parte reveladora del gel a 120V. Como marcador de peso molecular se utilizaron 3 µL de *Precision Plus Protein Dual Color Standards* (BioRad, Hercules, EE. UU).

Una vez separadas las proteínas en función de su peso molecular se realizó una transferencia se transfirió a una membrana de PVDF (Cytiva, Amersham, Reino Unido) a 250 mAh durante 4 horas en una celda *Mini Trans-Blot* (BioRad, Hercules, EE. UU). Una vez transferida, la membrana se incubó con el anticuerpo primario correspondiente durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, tras varios lavados con el tampón de lavado TBS-T, se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente durante 1 hora a temperatura ambiente. Las proteínas se detectaron sobre la membrana utilizando el revelador *ECL Select Western Blotting Detection Reagent* (Cytiva, Amersham, Reino Unido), y el equipo *ChemiDoc MP imaging System Blot* (BioRad, Hercules, EE. UU). Los anticuerpos utilizados se encuentran recogidos en la tabla 6.

Tabla 6. Anticuerpos empleados para Western Blot.

Proteína	Isotipo	Especie	Dilución	Referencia
PARP-1	IgG	Conejo	1:5000	ab32071
β -ACTINA	IgG1 κ	Ratón	1:1000	sc-58673
Anti-Rabbit	IgG-HRP	Ratón	1:100.000	sc-2357
Anti-Mouse	m-IgG κ BP-HRP	Ratón	1:100.000	sc-516102

Las imágenes obtenidas se analizaron utilizando el programa *Quantity One Analytical Software*, y la cantidad de proteína se normalizó utilizando la expresión de β -actina.

11. CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE CANCERÍGENAS

Las CMCs se caracterizaron fenotípicamente a través de diferentes experimentos:

a. Cuantificación de la población aldehído deshidrogenasa-1 (ALDH1) positiva

La población ALDH1⁺ se determinó detectando la actividad de la enzima ALDH1 mediante el kit *ALDEFLUOR* (Stem cell Technologies, Vancouver, Canadá). Para ello se siguió el protocolo propuesto por el fabricante.

Se sembraron las células en placas de 6 pocillos y se incubaron durante 24 horas para permitir su adhesión. Tras esto, las células se trataron según el tipo de experimento durante 72 horas, tras las cuales se les retiró el medio, se lavaron con PBS y se tripsinizaron. Las células se centrifugaron a 400 rcf durante 5 minutos y posteriormente resuspendidas en 1 ml del tampón proporcionado en el kit a una concentración de 1.000.000 células/ml. En ese momento se preparó un tubo control negativo, que contenía 5 μ L del inhibidor específico de la ALDH1, DEAB (Dietilaminobezaldehído). Al ml con las células se le añadió 5 μ L del reactivo BAAA (BODIPY-aminocetaldehído), se resuspendieron las células y se transfirieron 500 μ L al tubo control negativo con DEAB y los 500 μ L a un tubo denominado test, que se incubaron durante 40 minutos a temperatura ambiente y oscuridad. Tras la incubación ambos tubos con células se centrifugaron a 400 rcf durante 5 minutos, y el pellet de células se resuspendió en el tampón proporcionado en el kit, y se mantuvo a 4°C hasta su análisis.

El porcentaje de células ALDH1⁺ se determinó cuantificando la señal en FITC en el Citómetro de flujo BD *FACSAria IIIu* (Becton Dickinson, BD Biosciences, San José, EE. UU), utilizando como blanco las células tratadas con el DEAB.

b. Caracterización fenotípica de los marcadores de superficie CD44, CD326 y CD133

Para caracterizar el fenotipo de las CMCs se analizaron los marcadores de superficie relacionados con CMCs CD44, CD326 y CD133. Para ello, se sembraron células en placas de 6 pocillos y se incubaron durante 24 horas para permitir su adhesión. Tras esto las células se trataron según el tipo de experimento durante 72 horas, tras las cuales se les retiró el medio, se lavaron con PBS y se tripsinizaron. Posteriormente las células se centrifugaron a 400 rcf durante 5 minutos y posteriormente se resuspendieron 100.000 células en 100 µL de PBS, a las que se le añadió 1 µL de los siguientes marcadores de membrana: anti-CD44-PE, anti-CD133-APC, y anti-CD326-FITC (Biolegend, San Diego, EE. UU). Éstos se incubaron durante 30 minutos a 4°C y en oscuridad. Tras la incubación, las células se centrifugaron a 400 rcf durante 5 minutos, y el pellet se resuspendió en PBS. El análisis se llevó a cabo utilizando el Citómetro de flujo BD *FACSAria IIIu* (Becton Dickinson, BD Biosciences, San José, EE. UU).

c. Caracterización fenotípica de los marcadores internos NANOG, SOX2, OCT3/4, y superficie LGR5

Para caracterizar el fenotipo de las CMCs se analizaron los marcadores de CMCs internos de NANOG, SOX2, OCT3/4, y el marcador de superficie LGR5. Para ello, se sembraron células en placas de 6 pocillos y se incubaron durante 24 horas para permitir su adhesión. Tras esto las células se trataron según el tipo de experimento durante 72 horas, tras las cuales se les retiró el medio, se lavaron con PBS y se tripsinizaron. Posteriormente las células se centrifugaron a 400 rcf durante 5 minutos y posteriormente se resuspendieron 100.000 células en 100 µL de PBS, a las que se le añadió 5 µL de anti-LGR5-PE-VIO770 (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Alemania) durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Tras la incubación, se centrifugaron las células a 400 rcf durante 5 minutos y el pellet se resuspendió en tampón de fijación *IC eBioscience™* (Thermo Fisher, Waltham, EEUU) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se volvió a centrifugar a 400 rcf durante 5 minutos y el pellet se resuspendió en 100 µL de tampón de permeabilización *eBioscience™* (Thermo Fisher, Waltham, EEUU), y se añadieron 1 µL de los siguientes marcadores: anti-NANOG-AF647, anti-SOX2-AF488, y

anti-OCT3/4-BV421 (Biolegend, San Diego, EE. UU). Éstos se incubaron durante 30 minutos a 4°C y en oscuridad. Tras la incubación, las células se centrifugaron a 400 rcf durante 5 minutos, y el pellet se resuspendió en PBS. El análisis se llevó a cabo utilizando el Citómetro de flujo *BD FACSAria IIIu* (Becton Dickinson, BD Biosciences, San José, EE. UU).

d. Capacidad de formación de esferas

Este experimento se realizó de dos formas distintas según si las células habían sido transfectadas de forma transitoria o de forma estable.

Para los experimentos con células transfectadas transitoriamente, se sembraron 3.000 células/pocillo en placas de 24 pocillos de ultra baja adherencia (Corning, Nueva York, EE. UU) en medio de esferas (DMEM/F12, 1% penicilina/estreptomicina, B27, insulina (10 µg/mL), hidrocortisona (1 µg/mL) heparina (4 ng/mL) EGF (10 ng/mL), y FGF (20 ng/mL) (Gibco, Carsbad, EE. UU). A los 4 días post-siembra se llevó a cabo el recuento de esferas formadas con un tamaño superior a 25 µm, utilizando el microscopio *LEICA DM IRB* (Leica, Wetzlar, Alemania).

Para los experimentos con células que sobreexpresaban PARP-1 de forma estable, se sembraron 1.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos pretratadas con *polyHeme* en medio de esferas. A los 7 días se evaluó la formación de esferas utilizando el microscopio *LEICA DM IRB*. Se contabilizaron aquellas esferas con tamaño superior a 25 µm.

e. Caracterización fenotípica del marcador de superficie CD44v6

Para caracterizar el fenotipo de las CMCs de las células derivadas de pacientes con CCR se analizó el marcador de superficie CD44v6. Para ello, se sembraron células en placas de 6 pocillos y se incubaron durante 24 horas para permitir su adhesión o la formación de esferas en el caso de las CTCs. Tras esto las células se trataron según el tipo de experimento durante 72 horas, tras las cuales se les retiró el medio, se lavaron con PBS y se tripsinizaron/disociaron. Posteriormente las células se centrifugaron a 400 rcf durante 5 minutos y posteriormente se resuspendieron 100.000 células en 100 µL de PBS, a las que se le añadió 1 µL del siguiente marcador de membrana: anti-CD44v6-APC (Biolegend, San Diego, EE. UU). Tras una incubación de 30 minutos a 4°C y en oscuridad, las células se centrifugaron a 400 rcf durante 5 minutos, y el pellet se resuspendió en PBS. El

análisis se llevó a cabo utilizando el Citómetro de flujo Miltenyi MACS quant (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Alemania).

12. ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN

Para analizar la proliferación celular se utilizaron distintas técnicas complementarias:

a. Ensayo con MTT

La proliferación se analizó utilizando el ensayo con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT). Se sembraron 250 células en placas de 48 pocillos de fondo plano en un volumen total de 200 μ L y se incubaron durante 24 horas para permitir su adhesión. Tras esto, se sincronizaron constituyendo el tiempo 0 días, y se incubaron a lo largo de 6 días.

Al día 2, 4 y 6 se detuvo el experimento añadiendo 20 μ L de MTT a 5 mg/ml a cada pocillo y se incubaron durante 4 horas a 37°C y 5% de CO₂ protegido de la luz. Posteriormente se añadieron 200 μ L de tampón de lisis (20% SDS en 50% formamida, pH 4.7). A continuación, se utilizó un lector *Triad Multimode* (Dyner Technologies, Chantilly, EE. UU) para medir la absorbancia a 570 nm. La tasa de proliferación se calculó dividiendo la absorbancia de cada día entre la absorbancia del día 2.

b. Ensayo de división con CFSE

Las células fueron tripsinizadas y teñidas con 1 μ M éster de succinimidil-carboxifluoresceína (Thermo Fisher, Waltham, EEUU) durante 20 minutos a temperatura ambiente, oscuridad y agitación suave. Posteriormente las células teñidas se sembraron en una placa de 6 pocillos a una densidad de 50.000 células/pocillo y se incubaron 24 horas para permitir su adhesión. Tras la sincronización, dicho tiempo se consideró como tiempo 0 horas y se incubaron hasta un total de 72 horas. Las células se recogieron a las 0, 24, 48 y 72 horas, y se fijaron con 4% Paraformaldehído en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras esto, las células se resuspendieron en PBS y se mantuvieron a 4º hasta su análisis utilizando el Citómetro de flujo *BD FACSAria IIIu* (Becton Dickinson, BD Biosciences, San José, EE. UU). La tasa de división se calculó dividiendo la mediana de intensidad de fluorescencia de cada tiempo entre la del tiempo 0 horas.

13. MODELO *IN VIVO*

Se realizaron dos tipos de ensayos *in vivo* con las células que sobreexpresaban PARP-1 de forma estable. Para ambos experimentos se utilizaron ratones hembra NSG (Charles River Laboratories) con edad entre 6-8 semanas. Todos los ratones se mantuvieron en cajas con libre acceso a comida y bebida, con las siguientes condiciones ambientales: 20-24°C, humedad relativa del 50%, condiciones libres de patógenos, y ciclos luz-oscuridad de 12 horas. Los estudios contaban con la aprobación previa del comité ético de experimentación animal de la Universidad de Granada (código de referencia 12/07/2019/127).

Con el fin de comprobar el efecto de la sobreexpresión de PARP-1 sobre el crecimiento tumoral, se inyectaron 2.500.000 células que sobreexpresaban PARP-1 o de sus vectores vacíos, de las líneas HCT-116 y HT-29, en el flanco derecho e izquierdo de cada ratón (n=5). A partir de que los tumores fueran palpables se fue controlando cada 2 días el volumen tumoral mediante un calibre manual. Para calcular el volumen tumoral se usó la siguiente fórmula: $V = (4\pi/3) \times (\text{ancho}/2)^2 \times (\text{largo}/2)$.

14. ANÁLISIS RITMO CIRCADIANO

El experimento de análisis del ritmo circadiano consta de dos partes:

a. Obtención de muestras de ARN para el estudio del ritmo circadiano

Se sembraron células en placas de 6 pocillos y se dejaron incubar durante 24 horas para permitir su adhesión. Al día siguiente se sincronizaron las células añadiendo forskolina 10 μM durante 1 hora a 37°C. Posteriormente se retiró el medio y se sustituyó por medio fresco solo o con olaparib. Dicho momento se consideró el tiempo 0 horas, a partir del cual se recogieron las muestras cada 3 horas utilizando el tampón RLT del kit de extracción de ARN (Qiagen, Hilden, Alemania).

Las muestras recogidas se mantuvieron a -20°C hasta el momento de su extracción del ARN, su posterior retrotranscripción a ADNc, y Q-PCR de los genes *REV-ERB- β* , *PER1*, *PER2*, *PER3* y *UBC*, del mismo modo descrito en apartados anteriores.

b. Análisis de la ritmicidad

Con el fin de obtener los parámetros circadianos, primero se determinó la distribución, distribución normal e interdependencia de los datos, para los datos

de cada serie de tiempo a analizar mediante *lag plots*/Q-test y los gráficos de probabilidad normal/K-S test.

Para poder analizar la ritmicidad de los datos, así como los diferentes parámetros que componen el ritmo circadiano, se realizó un análisis Cosinor utilizando el programa TSA (*Time Series Analysis – Cosinor 8.0 Lab View January 2020 software*) (<http://www.euroestech.com/>). Este método consisten en ajustar los puntos experimentales a una función sinoidal (coseno), cuya función es: $y = M + A \cos(\omega t - \varphi)$, donde:

- ❖ M es el MESOR (*Mean estimated over rhtym*): Valor medio de un ritmo ajustado a la función sinusoidal.
- ❖ A es la amplitud: Valor obtenido de la diferencia entre el valor máximo y el valor mínimo de un ritmo.
- ❖ φ es la acrofase: Valor de la localización temporal del máximo valor de la función sinusoidal ajustada a los datos de una determinada variable biológica.
- ❖ ω es la frecuencia en radianes.
- ❖ t es el tiempo.

A partir de estos datos se determinaron también los siguientes parámetros circadianos:

- ❖ Periodo: Duración de un ciclo completo de una determinada variable rítmica.
- ❖ Frecuencia: Número de veces que se repite un determinado fenómeno en una unidad de tiempo. Es la inversa del periodo.

15. ENSAYOS DE VIABILIDAD

Para analizar la viabilidad de las células tras los distintos tratamientos se utilizaron distintas técnicas.

a. Ensayo con MTT

Los ensayos de viabilidad en las líneas comerciales de CCR se realizaron mediante el ensayo con MTT. Para ello se sembraron 2.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos de fondo plano en un volumen total de 100 μL y se

incubaron durante 24 horas antes del tratamiento. Tras esto, las células se trataron con distintas dosis de olaparib durante 72 horas.

Al final del periodo de tratamiento se añadieron 10 μ L de MTT a 5 mg/ml a cada pocillo y se incubaron durante 4 horas a 37°C y 5% de CO₂ protegido de la luz. Posteriormente se añadieron 100 μ L de tampón de lisis (20% SDS en 50% formamida, pH 4.7). A continuación, se utilizó un lector *Triad Multimode* (Dynex Technologies, Chantilly, EE. UU) para medir la absorbancia a 570 nm. El porcentaje de células viables se determinó dividiendo la absorbancia de las células tratadas entre la absorbancia de las células control tratadas con DMSO.

b. Ensayo con SRB

Los ensayos de viabilidad en las líneas CPP19 y CPP45 se realizaron mediante el ensayo con sulforodamina B (SRB). Para ello se sembraron 4.000 células en placas de 96 pocillos de fondo plano en un volumen total de 100 μ L y se incubaron durante 24 horas antes del tratamiento. Tras esto, las células se trataron con distintas dosis de olaparib y oxaliplatino, solas o en combinación durante 72 horas.

Al final del periodo de tratamiento se retiró el sobrenadante, y se fijaron las células añadiendo 100 μ L de ácido tricloroacético al 10% durante 1 hora a 4°C. Tras esto se eliminó el sobrenadante y se lavaron las células 3 veces con agua destilada que finalmente fue descartada. Una vez secos los pocillos, se añadieron 50 μ L de SRB al 0.4% a cada pocillo y se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 30 minutos protegidos de la luz. Posteriormente, se lavaron los pocillos 3 veces con ácido acético 1%, eliminando finalmente el sobrenadante. Finalmente, y una vez secos los pocillos, se añadieron 100 μ L de Tris-Base 10 mM a cada pocillo y se mantuvieron en agitación durante 30 min hasta que la solución estuvo homogenizada, tras lo cual se midió la absorbancia a 560 nm utilizando un lector de placas *Tecan Spark* (Tecan life sciences, Zúrich, Suiza). El porcentaje de células viables se determinó dividiendo la absorbancia de las células tratadas entre la absorbancia de las células control tratadas con DMSO.

c. Ensayo con Cell Titer-Glo

Los ensayos de viabilidad en las líneas CTC31 y CTC45 se realizaron mediante el ensayo con *CellTiter-Glo Luminescent Viability Assay* (Promega, Madison, EE. UU). Para ello se sembraron 2.000 células en placas de 96 pocillos de fondo plano pretratadas con *PolyHeme* en un volumen total de 100 μ L y se incubaron durante

24 horas antes del tratamiento. Tras esto, las células se trataron con distintas dosis de olaparib y oxaliplatino, solas o en combinación durante 72 horas.

Al final del periodo de tratamiento se sacaron las placas del incubador y se dejaron a temperatura ambiente 20 minutos. Tras esto se añadieron 100 μ L de *CellTiterGlo* y se resuspendió el contenido del pocillo para facilitar la lisis celular. Posteriormente se incubó en oscuridad durante 10 minutos, y finalmente, se transfirieron 100 μ L a una placa de 96 pocillos compatible con luminiscencia. La luminiscencia se leyó en un lector de placas *Tecan Spark* (Tecan life sciences, Zúrich, Suiza). El porcentaje de células viables se determinó dividiendo la luminiscencia de las células tratadas entre la luminiscencia de las células control tratadas con DMSO.

16. ANÁLISIS DE EFECTOS SINÉRGICOS

Las respuestas esperadas a la combinación de fármacos (olaparib y oxaliplatino) se calcularon en función de los modelos de referencia HSA (agente único más alto), Loewe (aditividad de Loewe), y Bliss (independencia de Bliss) utilizando el software *Combenefit* (Di Veroli et al. 2016). Las puntuaciones de sinergia se calcularon como las desviaciones entre las respuesta observadas y esperadas y se representaron en un mapa de calor que definen la sinergia (>0), y antagonismo (<0) de los medicamentos utilizados.

17. ENSAYO CLONOGÉNICOS

Para evaluar la capacidad de las células de formar colonias *in vitro* se utilizó el ensayo clonogénico. Para ello se sembraron 1.000 células/pocillo pretatadas con DMSO u olaparib 10 μ M durante 72 horas en placas de 6 pocillos, y se dejaron crecer durante 7 días.

Para detener el experimento se retiró el medio, se lavaron las células con PBS frío, y posteriormente se añadió una mezcla de cristal violeta y metanol 20% durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras esto se lavó el pocillo con agua milliQ fría y se dejó secar la placa hasta el día siguiente. La cuantificación del número de colonias se realizó utilizando el software de análisis de imagen *ImageJ*.

Se realizó un análisis fenotípico de las colonias formadas categorizándolas en holoclon, meroclon y paraclon tal y como describen Lucena-Cacace y col. (Lucena-Cacace et al. 2018) (Anexo 3).

18. ENSAYO DE APOPTOSIS

Para analizar la apoptosis celular se utilizó el kit *IP-Anexina-V-FITC* (Becton Dickinson, BD Biosciences, San José, EE. UU).

Para ello se sembraron 30.000 células/pocillo en placas de 6 pocillos y se incubaron durante 24 horas para permitir su adhesión. Posteriormente se trataron según las condiciones de estudio correspondientes durante 72 horas. Tras este tiempo, las células se lavaron con PBS, se tripsinizaron y se centrifugaron a 400 rcf durante 5 minutos. Tras esto se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en el *Binding Buffer* suministrado en el propio kit, y se incubaron las células durante 15 minutos en oscuridad y temperatura ambiente en presencia de 2.5 µL de Anexina-V-FITC y 2.5 µL de IP. Finalmente se analizó utilizando un Citómetro de flujo *BD FACSAria IIIu* (Becton Dickinson, BD Biosciences, San José, EE. UU).

19. CICLO CELULAR

Para analizar el ciclo celular se utilizó el kit *PI/RNASE* solution (ImmunoStep, Salamanca, España), basado en cuantificar el contenido de ADN en las células, lo que permite determinar el porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo celular (G0/G1, S o G2/M).

Para ello se sembraron 30.000 células/pocillo en placas de 6 pocillos y se incubaron durante 24 horas para permitir su adhesión. Posteriormente se trataron según las condiciones de estudio correspondientes durante 72 horas. Tras este tiempo, las células se lavaron con PBS, se tripsinizaron y se centrifugaron a 400 rcf durante 5 minutos. Tras esto se eliminó el sobrenadante y se fijaron las células en etanol frío 70%, se lavaron con PBS-BSA 2% y se volvieron a centrifugar 5 minutos a 400 rcf. El pellet se resuspendió en IP (20 µM)/RNasa (50 µM) y se incubó a 4°C durante 15 minutos. Posteriormente se analizó el porcentaje de células en cada fase utilizando un Citómetro de flujo *BD FACSAria IIIu* (Becton Dickinson, BD Biosciences, San José, EE. UU) a partir de la intensidad de señal de IP.

20. ANÁLISIS *IN SILICO* DEL PERFIL DE PARP-1 EN CTCs Y METÁSTASIS

Para el estudio del perfil de PARP-1 en tumores primarios, metastásicos y CTCs en cohortes de estudio de distintos tipos de tumores se utilizaron datos

obtenidos de la base de datos *Gene Expression Omnibus*. Se utilizaron los datos GSE74369. Los análisis de *heatmap* se realizaron con el paquete *ComplexHeatmap* utilizando el *software R*.

21. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El tipo de análisis estadístico desarrollado dependió del tipo de dato, muestra y comparación realizada.

En el estudio de las muestras de pacientes los análisis estadísticos se realizaron utilizando el *software SPSS* versión 15.0 para *Windows* (IBM, Chicago, EE. UU). En la estadística descriptiva, las variables continuas se expresaron mediante la mediana y el rango intercuartílico, mientras que las variables categóricas lo hicieron como números y porcentajes. Los niveles de ARNm en las muestras de mucosa sana adyacente y de tejido normal se compararon mediante la prueba T de Wilcoxon para muestras pareadas. La asociación de la expresión de genes y las características clinicopatológicas se llevaron a cabo mediante los test no paramétricos de Kruskal-Wallis y la U de Mann-Whitney. El test de Spearman se utilizó para los análisis de correlaciones tras transformar las variables aplicando logaritmos naturales. Las comparaciones entre los niveles de PARP-1 y los marcadores de CMCs se hicieron con el test exacto de Fisher. El método de Kaplan-Meier se utilizó para determinar la probabilidad acumulada de supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad, y las diferencias se analizaron usando test log-rank. El modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox, univariado y multivariado, se utilizó como test de factores pronóstico. La expresión alta o baja del ARNm de cada gen se determinó en base a la mediana de nuestra población de estudio. Los valores de p inferiores a 0.05 se consideraron significativos y los niveles de confianza se establecieron al 95%.

En los estudios con modelos *in vitro* e *in vivo*, los análisis estadísticos se realizaron utilizando el *software Graphpad Prism 7.0* (GraphPad, La Jolla, EE. UU). En primer lugar, se realizaron pruebas de normalidad de los datos, seguido del posterior análisis con test paramétricos o no paramétricos en base a la normalidad de los datos que se quisiesen comparar, con las correspondientes correcciones en caso de ser necesarias. De forma específica en el caso del análisis del ritmo circadiano, la ritmicidad se analizó mediante el rechazo de la hipótesis de amplitud cero con un 95% de certeza. Los datos de las curvas ajustadas se transfirieron y analizaron en *Graphpad Prism 7.0* (GraphPad, La Jolla, EE. UU), y

Materiales y Métodos

las características de las variables del ritmo se compararon mediante una prueba no paramétrica.

Las diferencias estadísticas entre las muestras se consideraron significativas cuando el p-valor fue $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), o $p < 0.001$ (***)).

RESULTADOS

CAPÍTULO 1: LA EXPRESIÓN DE PARP-1 INFLUYE EN EL FENOTIPO DE LAS CÉLULAS MADRE CANCERÍGENAS EN EL CÁNCER COLORRECTAL DEPENDIENDO DE P53

1. PARP-1 se encuentra sobreexpresado en el tejido tumoral

Con el objetivo de determinar los niveles de expresión de *PARP-1* en muestras de pacientes con CCR, se analizó mediante RT-Q-PCR su expresión en el tejido tumoral y en el tejido no tumoral adyacente.

En la cohorte de estudio, la expresión de *PARP-1* es significativamente mayor en el tejido tumoral en comparación con su propio tejido no tumoral adyacente ($p < 0.0001$), lo que indica que *PARP-1* se encuentra sobreexpresado en el tumor (Figura 10A).

A los pacientes de la cohorte de estudio se le evaluó el estado del gen *TP53* (Anexo 4), lo cual nos permitió estratificarlos en p53 salvaje (wtp53) (59.1%) y p53 mutado (mtp53) (40.9%). Al agrupar a los individuos según el estado de *TP53* se observa que la expresión de *PARP-1* sigue siendo mayor en el tejido tumoral con respecto a su tejido no tumoral adyacente, tanto en aquellos pacientes con wtp53 como en aquellos con mtp53 ($p < 0.001$) (Figura 10B). Estos datos muestran que la sobreexpresión de *PARP-1* en el tumor es independiente del estado de p53.

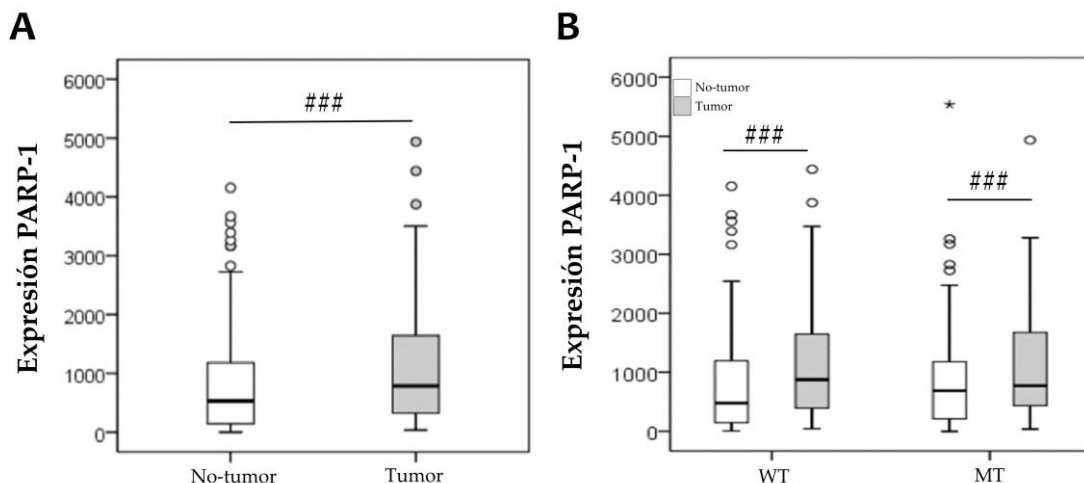


Figura 10. Diagramas de caja mostrando la expresión de *PARP-1* en las muestras de tejido tumoral y tejido no tumoral adyacente de (A) todos los pacientes de la cohorte, y (B) los pacientes estratificados según el estado de *TP53* en p53 salvaje (WT) y mutado (MT). ° representa valores atípicos 1.5 veces mayores que el rango intercuartílico; * representa los valores atípicos 3 veces mayores que el rango intercuartílico, ### $p < 0.001$.

No se observan diferencias significativas en la expresión de PARP-1 entre tumores wtp53 y tumores mtp53 ($p=0.774$). La estadística descriptiva de la expresión de PARP-1 en la cohorte de estudio se encuentra recogida en el Anexo 5.

2. PARP-1 se asocia con el grado de diferenciación según el estado de p53

Tras observar que la expresión de PARP-1 es mayor en el tejido tumoral con respecto al tejido no tumoral adyacente, a continuación, con el objetivo de analizar el posible papel de PARP-1 en la progresión del CCR, se estudió la posible asociación de su expresión con diferentes características clínico-patológicas de los pacientes (Tabla 7).

Tabla 7. Relación entre la expresión de PARP-1 y las características clínico-patológicas de los pacientes según el estado de p53.

Características		Todos los casos		Casos wtp53		Casos mtp53	
		Mediana \pm IC	p	Mediana \pm IC	p	Mediana \pm IC	p
Edad (y) ^{*,†}	<72	1.63 (0.94-2.73)	0.654	1.81 (1.10-3.03)	0.157	1.46 (0.84-2.46)	0.489
	\geq 72	1.52 (1.00-2.52)		1.44 (1.01-2.21)		1.60 (0.96-2.93)	
Sexo*	Masculino	1.60 (0.98-2.89)	0.323	1.71 (1.09-2.93)	0.184	1.50 (0.88-3.20)	0.403
	Femenino	1.54 (0.96-2.37)		1.53 (0.97-1.96)		1.47 (0.92-2.50)	
Localización*	Colon	1.62 (0.98-2.57)	0.430	1.71 (1.05-2.44)	0.325	1.51 (0.91-2.81)	0.540
	Recto	1.24 (0.86-3.09)		1.62 (0.86-3.59)		1.62 (0.98-26.25)	
Grado de diferenciación [†]	Bien	1.16 (0.58-2.50)	0.042	1.10 (0.56-1.43)	0.002	1.23 (0.57-4.97)	0.980
	Moderado	1.77 (1.11-2.57)		1.78 (1.19-2.63)		1.65 (0.99-2.52)	
	Pobre	1.54 (0.92-3.28)		2.32 (0.91-4.55)		1.27 (0.92-4.80)	
Estadio pTNM*	I+II	1.69 (1.07-2.66)	0.501	1.69 (1.10-2.65)	0.785	1.70 (0.92-2.74)	0.445
	III + IV	1.58 (0.96-2.69)		1.57 (0.92-2.29)		1.54 (0.88-2.69)	
Estadio tumoral*	T1+T2	1.78 (1.07-3.25)	0.505	1.61 (1.17-2.40)	0.732	2.01 (0.57-4.08)	0.942
	T3+T4	1.57 (0.95-2.52)		1.56 (0.96-2.73)		1.50 (0.92-2.76)	
Metástasis en Ganglios linfáticos*	Ausente	1.42 (0.78-2.48)	0.503	1.58 (0.97-2.52)	0.850	1.46 (0.53-3.33)	0.383
	Presente	1.50 (0.92-2.10)		1.58 (0.90-2.03)		1.27 (0.90-2.54)	

*El análisis se realizó utilizando la prueba U de Mann-Whitney no paramétrica para muestras independientes o † mediante la prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes; † dicotomizado por la mediana. IC: Intervalo de confianza.

Teniendo en cuenta todos los pacientes de la cohorte de CCR, los resultados muestran que un aumento de la expresión de PARP-1 se asocia significativamente con tumores moderado y pobremente diferenciados ($p=0.042$).

Sin embargo, no se encuentran asociaciones significativas con otras características clínico-patológicas como la edad, sexo, localización, estadio TNM, estadio tumoral o la presencia de metástasis.

Tras estratificar a los pacientes según el estado de p53, la asociación significativa de PARP-1 con tumores moderado y pobremente diferenciados solamente se mantiene en aquellos pacientes que presentan un p53 salvaje ($p=0.002$). Tampoco se encontraron asociaciones con el resto de características clínico-patológicas estudiadas, independientemente del estado de p53.

3. La expresión elevada de PARP-1 en tumores con p53 mutado es un factor pronóstico independiente de supervivencia

Con el objeto de evaluar a fondo la posible relación de PARP-1 con la prognosis de los pacientes, se generaron curvas de supervivencia de Kaplan-Meier. Para ello se estratificó a la cohorte de estudio según el estado de p53, salvaje y mutado, y según la expresión de *PARP-1*, alta y baja, utilizando como *cutt-off* el valor de la mediana.

Una expresión alta de *PARP-1* en aquellos pacientes con mtp53 se asocia con una supervivencia global significativamente más alta ($p=0.031$), así como con una mayor supervivencia libre de enfermedad ($p=0.040$) a los 120 meses tras el diagnóstico de la enfermedad (Figura 11A y 11B). Sin embargo, en el caso de los pacientes con wtp53, no se encontró una relación significativa entre PARP-1 y la supervivencia global o la supervivencia libre de enfermedad a los 120 meses ($p=0.972$ y $p=0.998$, respectivamente) (Figura 11C y 11D). En ningún caso se encontraron asociaciones significativas entre la expresión de *PARP-1* y la supervivencia ni a los 30 ni a los 60 meses de seguimiento, aunque es llamativo el cambio de la tendencia que se produce en los pacientes wtp53.

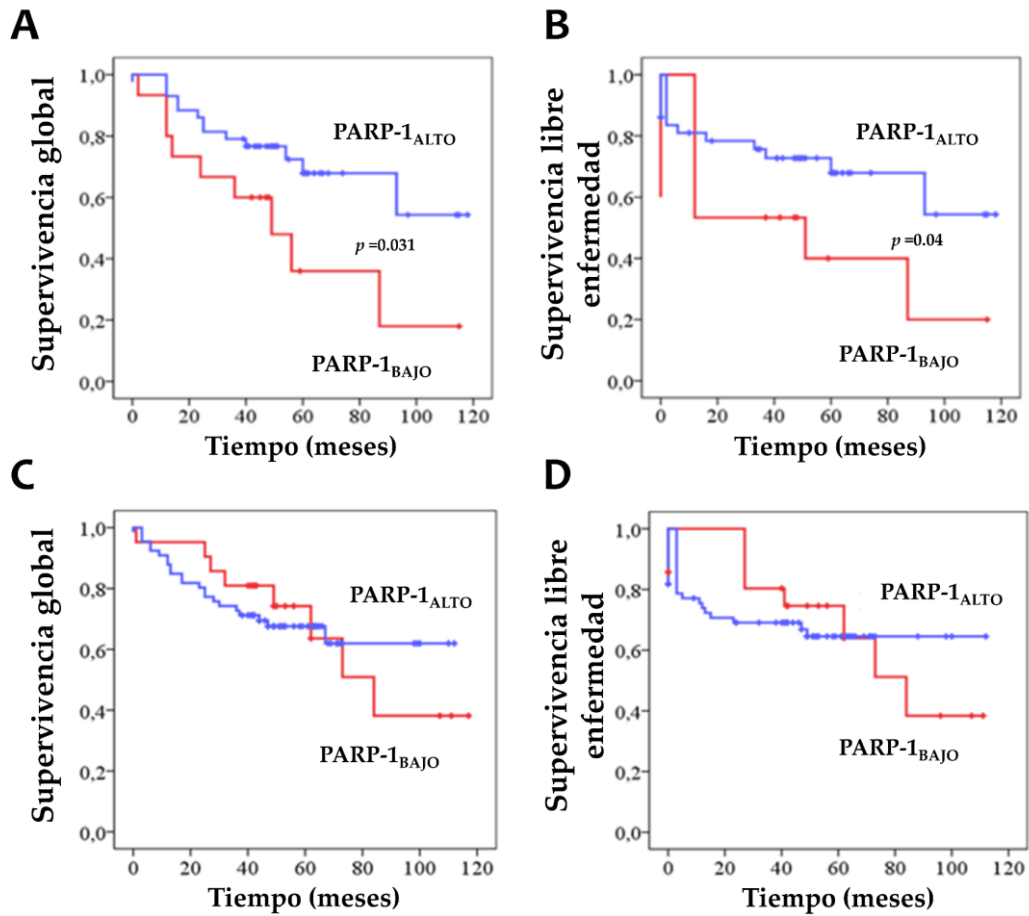


Figura 11. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier representando la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad en pacientes con tumores con p53 mutado (A, B) y en pacientes con p53 salvaje (C y D).

Además, se realizó un análisis de regresión multivariado de Cox para la supervivencia observada (Tabla 8). Este análisis muestra que la expresión alta de *PARP-1* es un factor de pronóstico independiente para la supervivencia en los pacientes de CCR de la cohorte que presentan mutaciones en p53 ($p=0.025$). No se encontraron resultados significativos en el resto de factores estudiados, edad, sexo, estadio tumoral y tratamiento recibido, independientemente del estado de p53.

Tabla 8. Regresión multivariada de Cox de factores pronóstico de supervivencia en la cohorte de CCR.

Variables		Casos wtp53		Casos mtp53	
		HR [95 % IC]	<i>p</i>	HR [95 % IC]	<i>p</i>
PARP-1*	Baja	1	0.532	1	0.025
	Alta	1.30 [0.57, 3.00]		0.36 [0.15, 0.88]	
Edad	≤72	1	0.078	1	0.072
	>72	2.27 [0.91, 5.64]		2.32 [0.93, 5.79]	
Sexo	Femenino	1	0.286	1	0.709
	Masculino	1.54 [0.70, 3.38]		1.21 [0.45, 3.26]	
TNM	Estadio I+II	1	0.130	1	0.322
	Estadio III+IV	1.86 [0.83, 4.16]		1.72 [0.59, 5.04]	
Q ¹ y/o R ²	No	1	0.341	1	0.602
	Sí	0.66 [0.28, 1.56]		0.74 [0.25, 2.62]	

*Categorizado por la mediana; ¹quimioterapia; ²radioterapia. HR: Hazard Ratio; IC: Intervalo de confianza

4. Los marcadores de CMCs se encuentran sobreexpresados en el tejido tumoral

A continuación, se analizó la expresión por RT-Q-PCR de dos de los marcadores de CMCs descritos en CCR, *CD44* y *CD133*, en las muestras de tejido tumoral y tejido no tumoral adyacente de la cohorte de estudio.

En los pacientes de la cohorte de estudio, la expresión de *CD44* y de *CD133* es significativamente mayor en el tejido tumoral en comparación con su propio tejido no tumoral adyacente ($p < 0.001$), lo que indica que tanto *CD44* como *CD133* se encuentran sobreexpresados en el tumor (Figura 12A y 12C). La estadística descriptiva de la expresión de *CD44* y *CD133* en la cohorte de estudio se encuentra recogida en el Anexo 6.

Al estratificar a los pacientes según el estado de p53, la expresión de *CD44* y *CD133* sigue siendo significativamente mayor en el tejido tumoral con respecto al tejido no tumoral adyacente, independientemente del estado de p53 ($p < 0.001$) (Figura 12B y 12D).

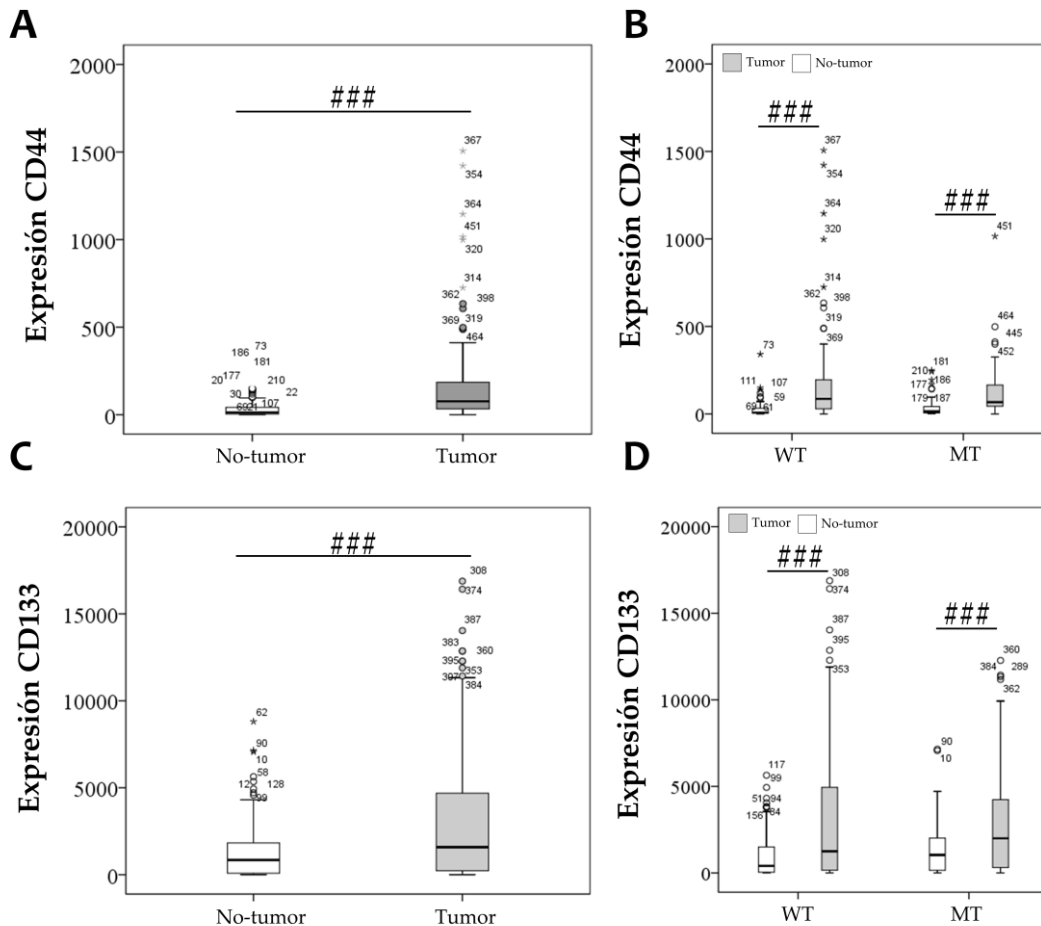


Figura 12. Diagramas de caja mostrando la expresión de (A) *CD44* y (C) *CD133* en las muestras de tejido tumoral y tejido no tumoral adyacente todos los pacientes de la cohorte, y la expresión de (B) *CD44* y (D) *CD133* en los pacientes estratificados según el estado de p53 en p53 salvaje (WT) y mutado (MT). ° representa valores atípicos 1.5 veces mayores que el rango intercuartílico; * representa los valores atípicos 3 veces mayores que el rango intercuartílico, ### $p < 0.001$.

5. La expresión de PARP-1 se correlaciona con la expresión de marcadores de CMCs según el estado de p53

Debido a la asociación descrita entre PARP-1 y el grado de diferenciación en todos los tumores y en aquellos con wtp53; y la relación descrita en la bibliografía entre tumores pobre y moderadamente diferenciados con el enriquecimiento de la población de CMCs en el tumor y peor prognosis (Zhao et al. 2016)(Ben-Porath et al. 2008)(Mohanta et al. 2017), a continuación se estudió la correlación entre la expresión de PARP-1 y los marcadores de CMCs.

En la cohorte de pacientes de CCR, la expresión de *PARP-1* y *CD44* se correlaciona de forma positiva en todos los casos ($R_s=0.498$ y $p < 0.0001$) (Figura 13A). Del mismo modo, la expresión de *PARP-1* y *CD133* también se correlaciona de forma positiva cuando se tienen en cuenta todos los casos ($R_s=0.329$ y $p < 0.0001$)

(Figura 13D). Al estratificar a los pacientes según el estado de p53, *PARP-1* sigue correlacionándose positivamente con *CD44* en aquellos tumores wtp53 ($R_s=0.543$ y $p<0.0001$), y mtp53 ($R_s=0.467$ y $p<0.0001$) (Figura 13B y 13C). La relación entre la expresión de *PARP-1* y *CD133* también es positiva en aquellos pacientes con wtp53 ($R_s=0.335$ y $p=0.002$), y mtp53 ($R_s=0.378$ y $p=0.003$) (Figura 13D y 13F).

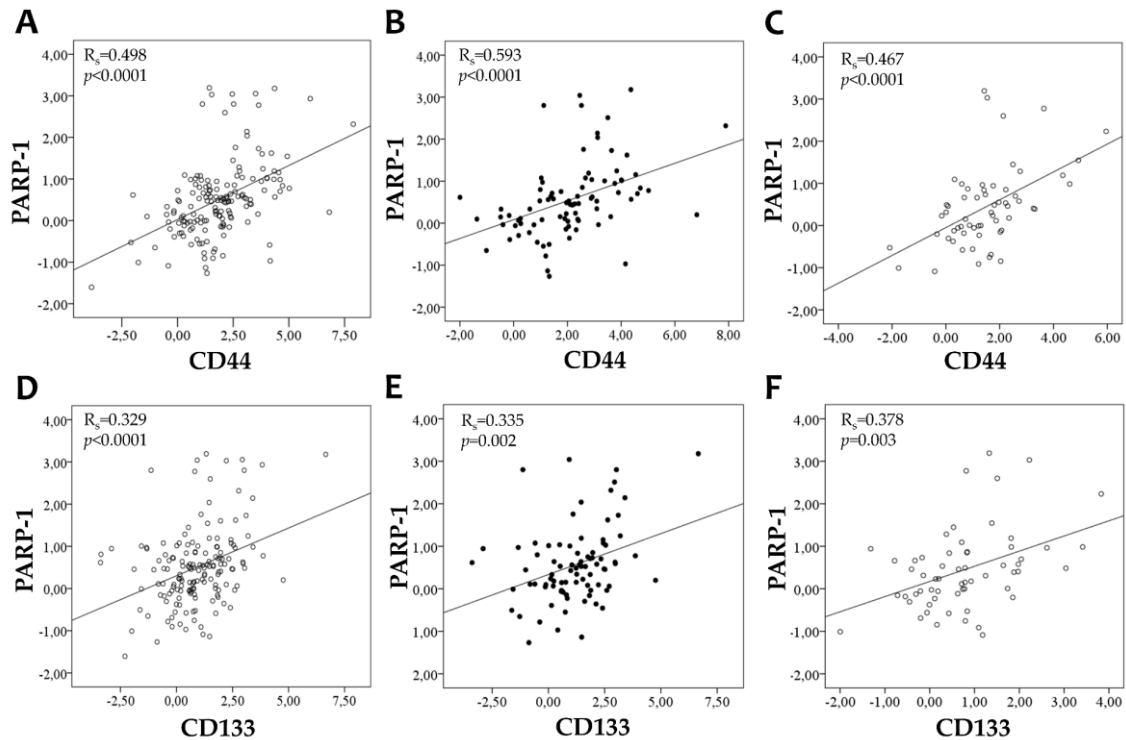


Figura 13. Correlación entre la expresión de *PARP-1* y *CD44* en (A) todos los casos, (B) wtp53, y (C) mtp53; y entre la expresión de *PARP-1* y *CD133* en (D) todos los casos, (E) wtp53, y (F) mtp53.

Dado que a nivel práctico la identificación de CMCs es compleja ya que se definen por su capacidad de tumorigénesis, y de regenerar y propagar el tumor; la aproximación más óptima es a través de la combinación de diferentes características de éstas. Para ello, y para estudiar de manera más exacta la relación de *PARP-1* con las CMCs en el tumor, se hizo una estratificación adicional de los pacientes en $CD44_{ALTO}CD133_{ALTO}$ y $CD44_{BAJO}CD133_{BAJO}$, según sus valores de la mediana.

Cuando se tienen en cuenta todos los casos, una elevada expresión de *PARP-1* se asocia con una elevada expresión de marcadores de CMCs ($p<0.0001$). Sin embargo, al separar a los pacientes de la cohorte según el estado de p53, solamente en aquellos con wtp53 presentaron una asociación significativa entre una elevada expresión de *PARP-1* y la expresión alta de marcadores de CMCs ($p<0.0001$) (Tabla 9).

Tabla 9. Tabla de contingencia de la relación entre PARP-1 con los marcadores de CMCs en la cohorte de CCR.

	Todos los casos			Casos wtp53			Casos mtp53		
	PARP-1		<i>p</i>	PARP-1		<i>p</i>	PARP-1		<i>p</i>
	Bajo	Alto		Bajo	Alto		Bajo	Alto	
CD44_{BAJO}CD133_{BAJO}	30 (61.2)	19 (38.8)	<0.001	17 (53.1)	15 (46.9)	<0.001	13 (76.5)	4 (23.5)	0.144
CD44_{ALTO}CD133_{ALTO}	13 (22.4)	45 (77.6)		6 (14.0)	37 (86.0)		7 (46.7)	8 (53.3)	

6. PARP-1 se encuentra sobreexpresada en las CMCs de tumores con p53 salvaje

Posteriormente, se comparó la expresión de *PARP-1* entre aquellos tumores con una elevada expresión de los marcadores *CD44* y *CD133*, y aquellos con una baja expresión de los marcadores de CMCs.

Al tener en cuenta todos los tumores sin estratificar según p53, la expresión de *PARP-1* en los tumores *CD44_{ALTO}CD133_{ALTO}* es significativamente mayor que en los tumores *CD44_{BAJO}CD133_{BAJO}* ($p < 0.001$) (Figura 14A). Estas diferencias se mantienen en aquellos tumores wtp53, observándose una expresión significativamente mayor de *PARP-1* en los tumores con elevada expresión de marcadores en comparación con los que presentan una baja expresión de éstos ($p < 0.0001$) (Figura 14B). Sin embargo, en el caso de los tumores mtp53, aunque se observa una mayor expresión de *PARP-1* en los tumores con elevada expresión de *CD44* y *CD133*, ésta no es significativa ($p = 0.183$) (Figura 14C).

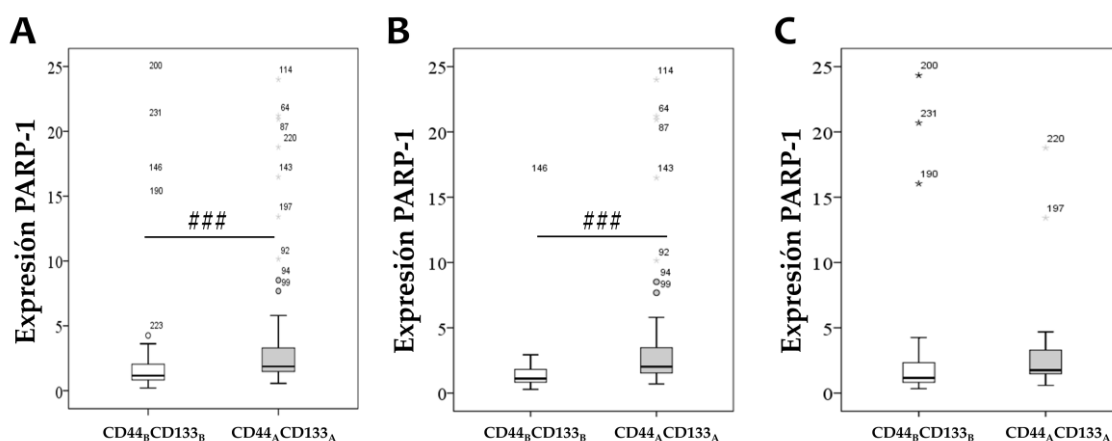


Figura 14. Diagramas de caja mostrando la expresión de *PARP-1* en los tumores *CD44_{BAJO}CD133_{BAJO}* y *CD44_{ALTO}CD133_{ALTO}* en (A) todos los casos, (B) wtp53, y (C) mtp53. ° representa valores atípicos 1.5 veces mayores que el rango intercuartílico; * representa los valores atípicos 3 veces mayores que el rango intercuartílico. B: bajo, A: alto, ### $p < 0.001$

7. Desarrollo de un modelo *in vitro* para el estudio del efecto de PARP-1 sobre el fenotipo de las CMCs

Para poder indagar aún más en el papel de PARP-1 en la regulación del fenotipo de las CMCs en el CCR, y validar los resultados observados en pacientes, desarrollamos un modelo *in vitro* sobreexpresando PARP-1 de forma transitoria en dos líneas comerciales de CCR con distinto estado de p53.

Se utilizaron las líneas isogénicas HCT-116 y HCT-116 p53^{-/-}, que presentan las mismas características genéticas a excepción del estado de *TP53*, presentando la primera un p53 salvaje, y la segunda un codón de parada temprano para p53, provocando la ausencia de la proteína.

Las células se transfectaron con el plásmido de sobreexpresión de PARP-1 (pCMV6-PARP1) o con su respectivo vector vacío como control (vector). A las 48 horas post-transfección, ya se observa sobreexpresión de PARP-1 (Anexo 7), y ésta se mantiene a las 72 y 96 horas post-transfección, tiempos en los que se evaluó el efecto sobre las CMCs (Figura 15).

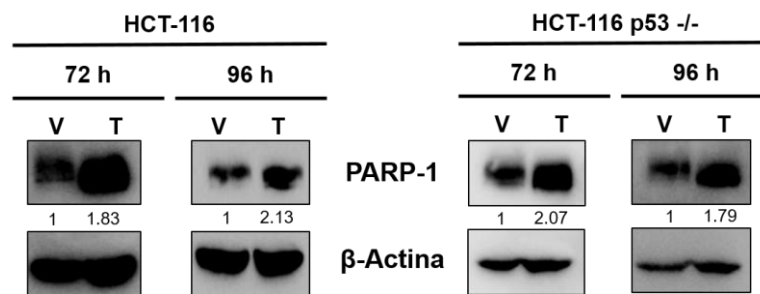


Figura 15. Expresión de PARP-1 y β -actina a las 72 y 96 horas post-transfección con el plásmido de vector vacío (V) y sobreexpresión de PARP-1 (T), para cada una de las líneas celulares.

8. La sobreexpresión de PARP-1 regula el fenotipo de las CMCs de forma diferencial según el estado de p53

La caracterización del fenotipo de las CMCs tras la sobreexpresión transitoria de PARP-1 se realizó a través del análisis de distintos marcadores y ensayos funcionales de CMCs con el fin de hacer una aproximación lo más exacta posible.

En primer lugar, se evaluó el efecto sobre la población ALDH1⁺, considerado un marcador de CMCs en CCR. En el caso de la línea HCT-116, la sobreexpresión de PARP-1 aumenta significativamente el porcentaje de las células ALDH1⁺ a las 96 horas post-transfección ($p < 0.001$) (Figura 16A). Por el contrario, en la línea HCT-116 p53^{-/-}, la sobreexpresión de PARP-1 reduce significativamente el

porcentaje de células ALDH1⁺ a las 72 y 96 horas post-transfección ($p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente) (Figura 16B).

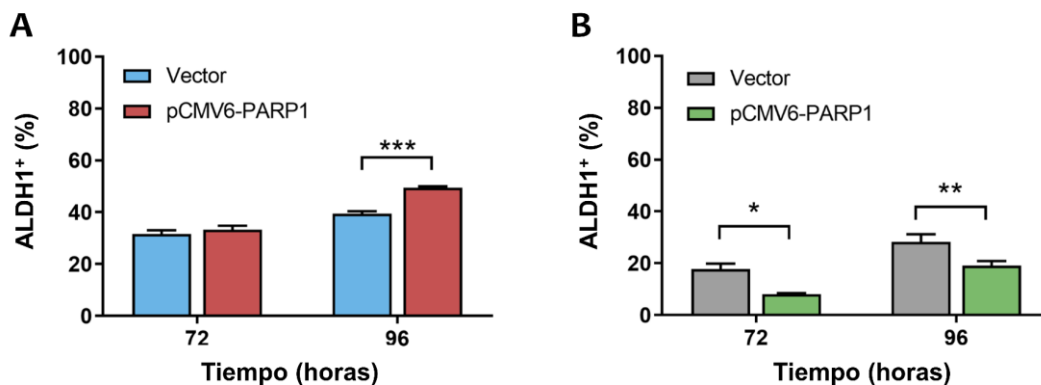


Figura 16. Porcentaje de células ALDH1⁺ en las células transfectadas con el plásmido vector vacío (vector) y plásmido de sobreexpresión de PARP-1 (pCMV6-PARP1) a las 72 y 96 horas post-transfección en las líneas celulares (A) HCT-116 y (B) HCT-116 p53^{-/-}. Los datos representan la media \pm SD de dos experimentos independientes realizados por duplicado * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, frente al vector.

A continuación, se realizó un análisis de los marcadores de membrana relacionados con CMCs, CD44, CD326 y CD133. En el caso de la línea HCT-116, la sobreexpresión de PARP-1 induce un aumento significativo en el porcentaje de células CD44CD326^{ALTO} a las 72 horas post-transfección ($p < 0.01$), aunque ésta no es significativa a las 96 horas (Figura 17A). En el caso de las células CD44CD326CD133^{ALTO}, no se observan cambios significativos a las 72 horas, pero si un aumento significativo al sobreexpresar PARP-1, a las 96 horas tras la transfección ($p < 0.05$) (Figura 17B). El efecto contrario se aprecia en la línea HCT-116 p53^{-/-}, observándose una disminución significativa de la población CD44CD326^{ALTO} a las 96 horas post-transfección, cuando se sobreexpresa PARP-1 ($p < 0.01$); aunque no se encontraron diferencias significativas a las 72 horas (Figura 17C). No se encontraron células con triple marcaje en el caso de la línea HCT-116 p53^{-/-}, al no detectarse señal en CD133 como se ha descrito en otros trabajos (Chen et al. 2018).

En conjunto, estos resultados indican un cambio fenotípico opuesto en las líneas HCT-116 y HCT-116 p53^{-/-} debido a la sobreexpresión de PARP-1 y la presencia/ausencia de p53.

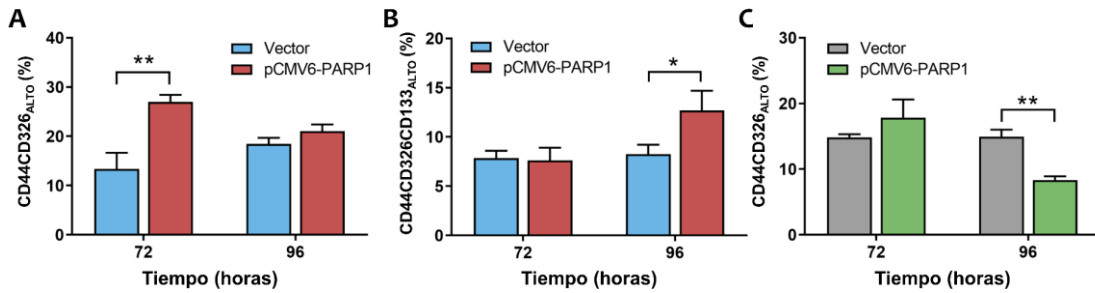


Figura 17. Porcentaje de células transfectadas con el plásmido vector vacío (vector) y plásmido de sobreexpresión de PARP-1 (pCMV6-PARP1) a las 72 y 96 horas post-transfección (A) CD44CD326^{ALTO}, y (B) CD44_sCD326CD133^{ALTO} en la línea HCT-116, y (C) CD44CD326^{ALTO} en la línea HCT-116 p53^{-/-}. Los datos representan la media ± SD de dos experimentos independientes realizados por duplicado * p < 0.05; ** p < 0.01, frente al vector.

Finalmente, para estudiar si estos cambios fenotípicos afectaban a la funcionalidad de las CMCs, se analizó la capacidad de formación de esferas de en ambas líneas celulares. La sobreexpresión de PARP-1 en la línea HCT-116 resulta en un aumento significativo de la capacidad de formación de esferas ($p < 0.01$) (Figura 18A y 18B). Sin embargo, la sobreexpresión de PARP-1 produce una disminución significativa de la capacidad de formación de esferas en la línea HCT-116 p53^{-/-} (Figura 18C y 18D).

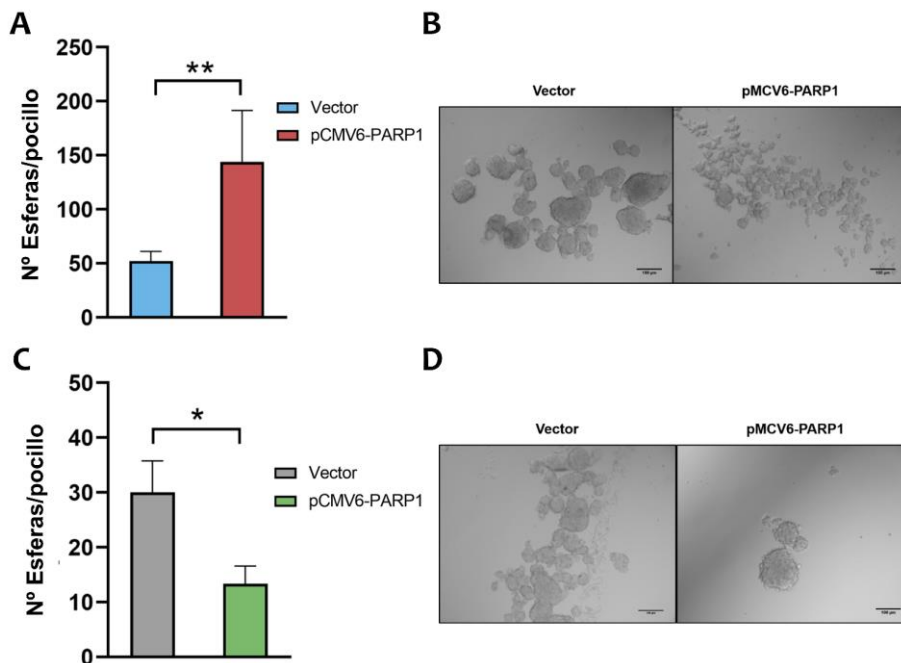


Figura 18. Número de esferas formadas en (A) HCT-116 y (C) HCT-116 p53^{-/-} al transfectar con el plásmido vacío (vector) y con el plásmido de sobreexpresión de PARP-1 (pCMV6-PARP1). Imágenes representativas de las esferas formadas en (B) HCT-116 y (D) HCT-116 p53^{-/-}. Los datos representan la media ± SD de dos experimentos independientes realizados por cuadruplicado * p < 0.05; ** p < 0.01, frente al vector.

CAPÍTULO 2: LA REGULACIÓN CIRCADIANA DIFERENCIAL DE PARP-1 SEGÚN P53 MODULA EL CARÁCTER DE LAS CÉLULAS MADRE CANCERÍGENAS EN EL CÁNCER COLORRECTAL

Debido a la regulación diferencial de PARP-1 del fenotipo de las CMCs según el estado de p53 observada previamente, el siguiente paso fue intentar descifrar a través de qué mecanismo PARP-1 podría ejercer dicho efecto.

1. Los genes del reloj circadiano se encuentran infraexpresados en el tejido tumoral

Puesto que se ha descrito la implicación de PARP-1 en la regulación del reloj circadiano en condiciones fisiológicas normales (Asher et al. 2010), aunque no en condiciones fisiopatológicas, y la importancia de la existencia de un reloj circadiano funcional para el mantenimiento de las CMCs (Puram et al. 2016)(Dong et al. 2019); se analizó la expresión de los genes del reloj circadiano bajo la hipótesis de que el efecto de PARP-1 sobre las CMCs podría estar mediado a través de la regulación de los ritmos circadianos.

En la cohorte de estudio, se analizó la expresión mediante RT-Q-PCR de los genes *BMAL1*, *CLOCK*, *PER1*, *PER2*, *PER3*, *CRY1*, y *REV-ERB β* .

Aunque la expresión de *CLOCK* disminuye en el tejido tumoral frente al tejido no tumoral adyacente, ésta no es significativa ($p=0.291$). Del mismo modo, a pesar de que la expresión de *CRY1* aumenta en el tejido tumoral, está tampoco es significativa ($p=0.931$). En el caso del resto de los genes circadianos estudiados, *BMAL1*, *PER1*, *PER2*, *PER3* y *REV-ERB β* , éstos se encuentran infraexpresados de manera significativa en el tejido tumoral frente a la mucosa no tumoral adyacente asociada ($p<0.0001$) (Tabla 10).

Tabla 10. Expresión de los genes del reloj estudiados en las muestras de tejido no tumoral y tumoral de los distintos pacientes.

Gen	Tejido no tumoral adyacente ^a	Tejido tumoral ^a	<i>p</i>
<i>BMAL1</i>	66.2 (42.0 – 124.4)	47.8 (33.2 – 107.2)	<0.0001
<i>CLOCK</i>	4.1 (2.9 – 9.9)	3.9 (2.4 – 7.3)	0.291
<i>PER1</i>	59.1 (24,4 – 158.2)	23,9 (10.7 – 52.4)	<0.0001
<i>PER2</i>	18.134 (5.1 – 60.7)	10.0 (2.3 – 20.9)	<0.0001
<i>PER3</i>	56.5 (35.1 – 86.0)	19.0 (11.4 – 33.8)	<0.0001
<i>CRY1</i>	578.8 (320.9 – 1130.6)	618.7 (370.2 – 1143.5)	0.931
<i>REV-ERBβ</i>	105.6 (47.0 – 225.7)	95.6 (42.2 – 192.4)	<0.0001

^a Los datos representan la mediana (percentiles 25 y 75). Las comparaciones se realizaron usando un test no paramétrico de dos muestras pareadas.

Puesto que se había analizado el estado de *TP53* a los pacientes de la cohorte de estudio, se estratificó a los pacientes en wtp53 y mtp53 para analizar el posible efecto de p53 en la expresión de los componentes del reloj. Tras la estratificación no se observan cambios en la tendencia de la expresión de los distintos genes estudiados entre el tejido tumoral y el no tumoral adyacente. Sin embargo, cabe destacar que en los tumores con p53 mutado, la disminución de *REV-ERBβ* no es significativa ($p=0.104$), mientras que en los tumores con p53 salvaje lo seguía siendo ($p<0.0001$). Además, en general se observa que la expresión de los distintos genes del reloj es mayor cuando p53 está salvaje, a excepción de *REV-ERBβ* y *CRY1*, aunque solo es significativo en el caso de *PER1* ($p<0.01$) (Tabla 11).

Tabla 11. Expresión de los genes del reloj estudiados en las muestras de tejido no tumoral y tumoral de los distintos pacientes estratificados según p53.

Gen	Casos wtp53			Casos mtp53		
	Tejido no tumoral adyacente ^a	Tejido Tumoral ^a	<i>p</i>	Tejido no tumoral adyacente ^a	Tejido Tumoral ^a	<i>p</i>
BMAL1	67.9 (44.8 – 158.4)	52.2 (36.5 – 110.7)	<0.0001	59.9 (39.1 – 112.2)	41.8 (27.5 – 89.6)	<0.0001
CLOCK	4.1 (3.1 – 9.6)	4.2 (3.0 – 6.0)	0.295	3.7 (2.4 – 9.1)	3.4 (2.2 – 6.1)	0.234
PER1	54.7 (26.3 – 124.3)	30.4 (15.26 – 53.9) ^b	<0.0001	56.6 (22.1 – 171.2)	17.9 (7.6 – 34.2)	<0.0001
PER2	15.8 (5.3 – 45.8)	10.7 (3.35 – 20.9)	<0.0001	17.7 (4.0 – 70.6)	7.0 (1.9 – 15.0)	<0.0001
PER3	59.4 (41.1 – 88.8)	20.7 (11.8 – 37.1)	<0.0001	51.5 (27.5 – 83.6)	17.3 (10.7 – 28.8)	<0.0001
CRY1	490.0 (321.8 – 1318.8)	603.9 (376.9 – 1308.7)	0.640	692.1 (335.0 – 1066.5)	634.8 (362.1 – 1010.8)	0.304
REV-ERB β	100.2 (47.0 – 271.5)	84.3 (40.2 – 184.4)	<0.0001	121.9 (53.8 – 220.3)	101.8 (46.6 – 189.5)	0.104

^a Los datos representan la mediana (percentiles 25 y 75). ^b $p < 0.01$ vs. p53 mut. Las comparaciones se realizaron usando un test no paramétrico de dos muestras pareadas

2. La expresión de los genes del reloj circadiano se asocian con la expresión de marcadores de CMCs dependiendo del estado de p53

Dado que los genes del reloj circadiano parecen tener un impacto en las características o funciones de las CMCs en algunos tipos de cáncer, lo siguiente fue analizar la relación de los genes del reloj circadiano con los marcadores *CD44* y *CD133* según el estado de p53 en nuestra cohorte de estudio. Para ello se estratificaron a los pacientes en *CD44*_{ALTO}*CD133*_{ALTO} y *CD44*_{BAJO}*CD133*_{BAJO}, y en expresión alta o baja de cada uno de los genes circadianos en base a los valores de su mediana, además del estado de p53.

El análisis de la expresión circadiana muestra un comportamiento diferente según el gen estudiado.

Independientemente del estado de p53, no se encuentran asociaciones significativas para *BMAL1*, *PER2* y *CRY1* en los tumores con baja o alta expresión de los marcadores *CD44* y *CD133*.

En aquellos tumores wtp53, un aumento en los niveles de expresión de *PER1* se correlaciona con una menor expresión de los marcadores de CMCs ($p=0.05$). Asimismo, una menor expresión *PER3* se asocia con un aumento en la expresión

de los marcadores *CD44CD133* en el grupo de tumores wtp53 ($p=0.014$). Estas asociaciones no se encontraron en los tumores mtp53. Por lo tanto, los genes de la familia *PER*, a excepción de *PER2*, están inversamente correlacionados con los marcadores *CD44CD133* en el grupo wtp53.

En los tumores wtp53, una menor expresión del gen *CLOCK* se asocia significativamente con una menor expresión de los marcadores de CMCs ($p=0.011$), sin embargo, esta relación no se observa en los tumores con mutaciones en p53.

Una menor expresión de *REV-ERB β* se relaciona con una disminución significativa de la combinación de marcadores de CMCs estudiados, sin embargo, nuevamente, esta asociación solo se observa en los tumores con wtp53 ($p=0.038$) (Tabla 12).

Tabla 12. Tabla de contingencia de la relación entre los genes del reloj circadiano y los marcadores de CMCs en la cohorte de CCR.

Gen	Casos wtp53			Casos mtp53		
	CD44CD133		<i>p</i>	CD44CD133		<i>p</i>
	Bajo N (%)	Alto N (%)		Bajo N (%)	Alto N (%)	
PER1						
Bajo	6 (28.6)	25(54.3)	0.05	15 (62.5)	15 (62.5)	1
Alto	15 (71.4)	21 (45.7)		9 (37.5)	9 (37.5)	
PER2						
Bajo	11 (52.4)	29 (63.0)	0.409	11 (45.8)	14 (58.3)	0.386
Alto	10 (47,6)	17 (37.0)		13 (54.2)	10 (41.7)	
PER3						
Bajo	9 (42.9)	34 (73.9)	0.014	14 (58.3)	17 (70.8)	0.365
Alto	12 (57.1)	12 (26.1)		10 (41,7)	7 (29.2)	
CRY1						
Bajo	11 (57.9)	19 (42.2)	0.251	16 (66.7)	9 (42.9)	0.109
Alto	8 (42.1)	26 (57.8)		8 (33.3)	12 (57.1)	
CLOCK						
Bajo	12 (85.7)	15 (45.5)	0.011	9 (47.4)	8 (44.4)	0.858
Alto	2 (14.3)	18 (54.5)		10 (52.6)	10 (55.6)	
BMAL1						
Bajo	10 (52.6)	23 (51.1)	0.911	11 (45.8)	12 (57.1)	0.449
Alto	9 (47.4)	22 (48.9)		13 (54.2)	9 (42.9)	
REV-ERBβ						
Bajo	15 (78,9)	23(51.1)	0.038	9 (37.5)	9 (42.9)	0.714
Alto	4 (21.1)	22 (48.9)		15 (62.5)	12 (57.1)	

3. PARP-1 y los genes circadianos se correlacionan de manera diferencial según el nivel de expresión de los marcadores de CMCs y el estado de p53

A continuación, evaluamos si la expresión de *PARP-1* y los genes del reloj circadiano están correlacionadas diferencialmente en el contexto del estado de p53 y una expresión baja o alta de *CD44* y *CD133*, con el objetivo de comprobar si el efecto observado previamente de PARP-1 sobre el fenotipo de las CMCs podría estar mediado a través de la regulación circadiana (Tabla 13).

Al estratificar según el estado de p53, se observa que en los tumores wtp53, la expresión de *PARP-1* se correlaciona significativamente de manera negativa con la expresión de *PER1* y *PER2* cuando la expresión de *CD44CD133* es alta ($p=0.020$ y 0.001 , respectivamente). En los tumores del grupo mtp53 no se observan correlaciones significativas entre PARP-1 y estos genes.

La expresión de *PARP-1* y *CRY1* se correlaciona de manera positiva en tumores mtp53 y una baja expresión de *CD44CD133* ($p=0.012$), pero no en aquellos con alta expresión de los marcadores de CMCs, ni en los tumores wtp53, independientemente de la expresión alta o baja de los marcadores de CMCs.

En el caso de *REV-ERB β* , *PARP-1* se asocia significativamente y de manera positiva con ésta en tumores con elevada expresión de *CD44CD133* y wtp53 ($p=0.005$ wtp53), pero no en los tumores con baja expresión de marcadores de CMCs. En tumores wtp53, no se encuentran diferencias significativas, independientemente de los marcadores de CMCs.

Para el resto de genes, *BMAL1*, *CLOCK* y *PER3*, no se encontraron correlaciones significativas en ninguno de los casos estudiados.

Tabla 13. Tabla de correlación entre PARP-1 y los genes del reloj circadiano estratificados según el estado de p53 y la expresión alta o baja de los marcadores de CMCs CD44CD133.

Gen	Casos wtp53		Casos mtp53	
	CD44CD133		CD44CD133	
	Bajo	Alto	Bajo	Alto
PER1				
R_s	-0.046	-0.353	-0.345	0.239
p	0.855	0.020	0.116	0.325
PER2				
R_s	0.032	-0.479	-0.144	0.239
p	0.900	0.001	0.523	0.325
PER3				
R_s	0.230	0.037	-0.027	0.414
p	0.358	0.815	0.907	0.078
CRY1				
R_s	0.175	0.213	0.514	0.037
p	0.473	0.169	0.012	0.881
CLOCK				
R_s	0.264	-0.119	0.404	0.401
p	0.433	0.522	0.107	0.700
BMAL1				
R_s	-0.014	-0.100	0.238	0.160
p	0.955	0.525	0.274	0.514
REV-ERBβ				
R_s	0.063	0.418	0.254	0.200
p	0.797	0.005	0.242	0.412

Rs: Coeficiente de correlación de Spearman.

Los resultados en la cohorte de estudio sugieren una relación entre PARP-1 y los distintos genes del reloj que puede influir en los niveles de marcadores de CMCs según el estado de p53. Sin embargo, solo con los datos de tejido no es posible determinar la dirección de esta relación o su causalidad, por lo que posteriormente desarrollamos un modelo *in vitro* con el que validar y extender los resultados de la cohorte de pacientes, y del capítulo anterior, en el contexto de los ritmos circadianos, sincronizando las células antes de los experimentos.

4. Desarrollo de un modelo *in vitro* de sobreexpresión de PARP-1

Para poder estudiar la relación de PARP-1—ritmos circadianos—CMCs según el contexto de p53, desarrollamos un modelo *in vitro* sobreexpresando

PARP-1 de forma estable en dos líneas comerciales de CCR con distinto estado de p53.

Se utilizaron las líneas HCT-116, empleada previamente para ver el efecto de la sobreexpresión transitoria de PARP-1 sobre la población de CMCs, que presenta un p53 salvaje, y la línea HT-29, que presenta la mutación R273H en p53, con el objeto de extender también los resultados obtenidos previamente en el contexto de la ausencia de p53 a otras mutaciones.

Las líneas celulares se transfectaron con el plásmido de sobreexpresión de PARP-1 (pCMV6-PARP1) o con su respectivo vector vacío como control (vector), generando las líneas HCT116-vector, HCT116-PARP1, HT29-vector y HT29-PARP1.

A través de *Western Blot*, se cuantificó la expresión de PARP-1 tras la selección con neomicina post-transfección, seleccionando aquellos clones que tuvieron aproximadamente el doble de expresión de PARP-1 que el vector (Figura 19).

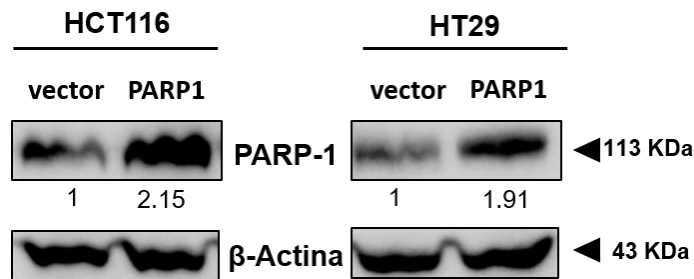


Figura 19. Expresión de PARP-1 y β -actina en las líneas seleccionadas tras la sobreexpresión estable de PARP-1 en las líneas HCT116-vector, HCT116-PARP1, HT29-vector y HT29-PARP.

5. La sobreexpresión de PARP-1 altera el crecimiento de manera diferencial según el estado de p53 *in vitro* e *in vivo*

En primer lugar, caracterizamos el efecto de la sobreexpresión sobre el crecimiento tumoral en nuestro modelo *in vitro*. Mediante ensayos de MTT se siguió el crecimiento celular durante 6 días.

En la línea HCT116, la sobreexpresión de PARP-1 da lugar a una tasa significativamente mayor de crecimiento a los 4 y 6 días con respecto a HCT116-vector ($p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente) (Figura 20A). En la línea HT-29 el efecto observado fue el opuesto, ya que, aunque a los 4 días se observa una mayor tasa de proliferación al sobreexpresar PARP-1 ($p < 0.05$), a los 6 días se observa una potente disminución de la viabilidad ($p < 0.001$) (Figura 20B).

La tasa de proliferación está influida por diversos factores, entre ellos propiedades físicas como el contacto célula con célula. Dado que la proliferación a través de MTT requiere de un número de partida de células bajo para evitar alcanzar una confluencia que inhiba el crecimiento, y una baja densidad también puede afectar al crecimiento, los resultados se confirmaron mediante un ensayo del CFSE. El CFSE es un colorante fluorescente verde permeable a las células, cuya intensidad disminuye a la mitad en cada división celular, permitiendo analizar así la proliferación celular (Figura 20C).

La línea HCT116-PARP1 presenta una mayor disminución de la intensidad de CSFE a las 72 horas del inicio del experimento con respecto a la línea HCT116-vector ($p < 0.001$), lo que indica una mayor tasa de división celular tras la sobreexpresión de PARP-1 en la línea con p53 salvaje (Figura 20D). Por el contrario, en la línea HT-29, la sobreexpresión de PARP-1 resulta en una menor disminución de la intensidad de CSFE a las 72 horas con respecto a la disminución de la señal observada en HT29-vector ($p < 0.05$), señalando una menor tasa de proliferación (Figura 20E).

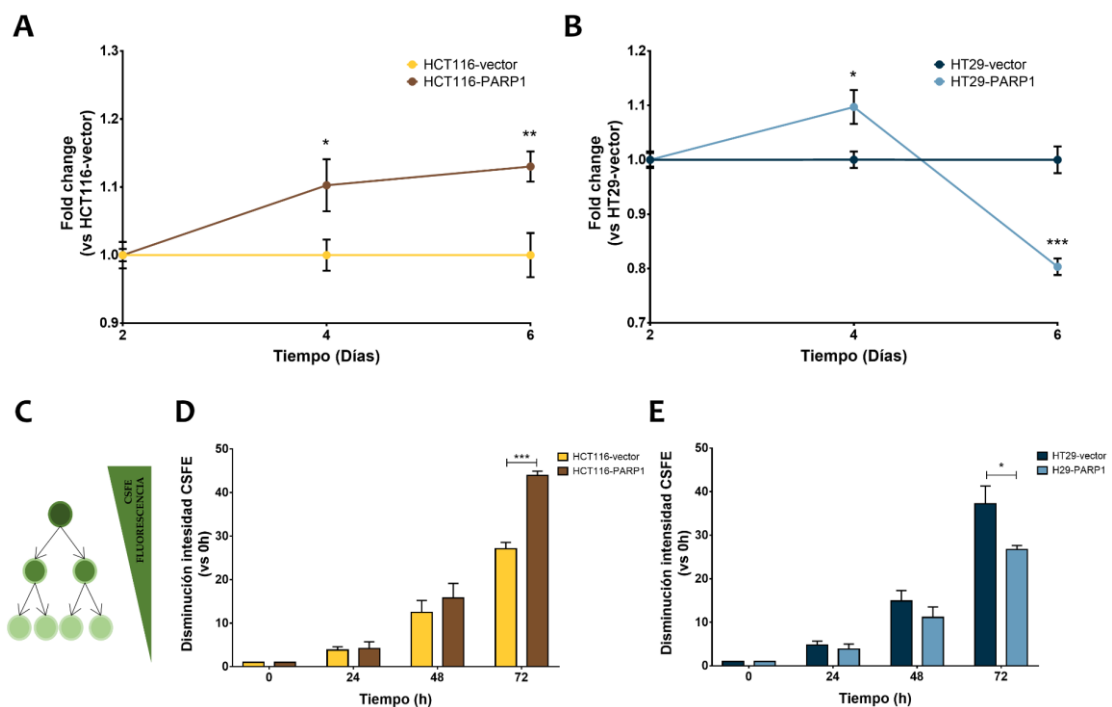


Figura 20. Análisis de la proliferación celular por medio del ensayo MTT en (A) las líneas HCT116-vector y HCT116-PARP1 y (B) las líneas HT29-vector y HT29-PARP1. Los datos representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes por cuadruplicado. Y el análisis de la proliferación celular por medio del ensayo CSFE (C) cuya intensidad disminuye al 50% en cada división, en (D) las líneas HCT116-vector y HCT116-PARP1 y (E) las líneas HT29-vector y HT29-PARP1. Los datos representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes por duplicado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ frente a su respectivo vector.

Para complementar la caracterización de la sobreexpresión de PARP-1 sobre la proliferación y su posible influencia en el crecimiento tumoral *in vivo*, se indujo la formación de tumores inyectando las células control, vectores, y las células con sobreexpresión de PARP-1 en los flancos de ratones hembras tipo NGS.

En la línea HCT-116 la sobreexpresión de PARP-1 produce un aumento de un 25% del tamaño tumoral con respecto al vector ($p < 0.05$). Por otra parte, la sobreexpresión de PARP-1 en la línea HT-29 induce un 53% de menor crecimiento *in vivo* frente a la línea HT29-vector ($p < 0.001$) (Figura 21). Estos resultados muestran un comportamiento similar al obtenido en los cultivos *in vitro*.

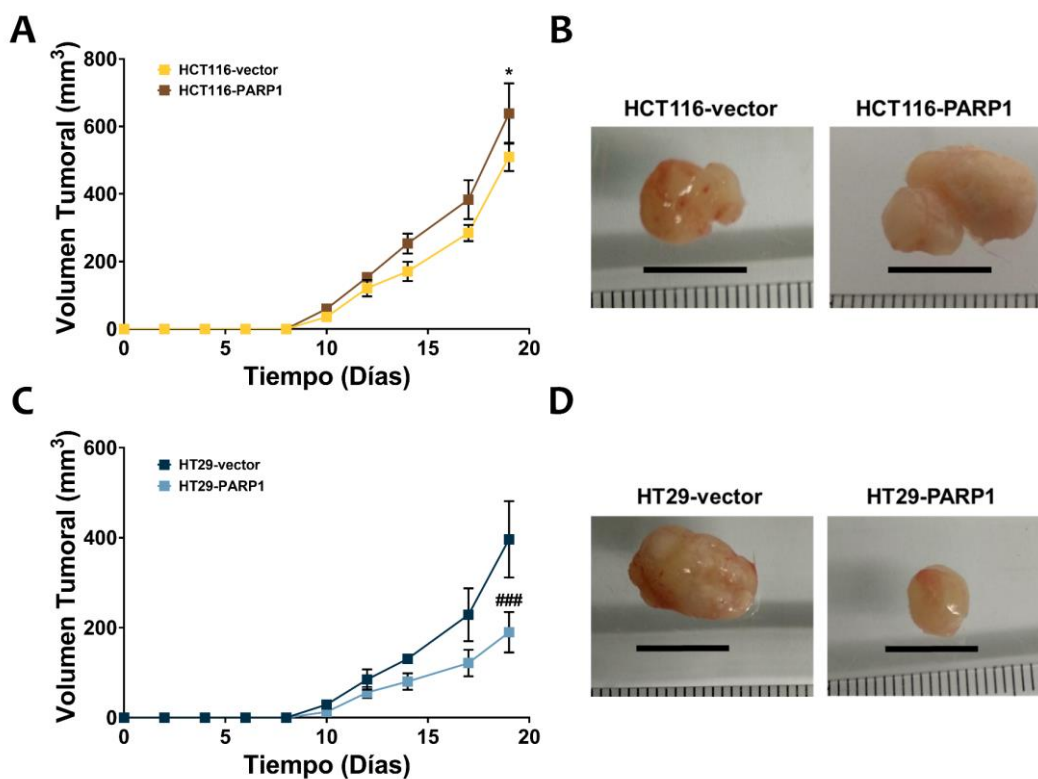


Figura 21. Modelo *in vivo* para el análisis del efecto de PARP-1 sobre la proliferación celular. (A) Representación gráfica del crecimiento del volumen tumoral en las líneas (A) HCT116-vector y HCT116-PARP1, y (B) sus imágenes representativas; y el volumen tumoral en las líneas (C) HT29-vector y HT29-PARP1, y (D) sus imágenes representativas. Los datos muestran la media \pm SEM de cinco ratones en cada grupo. * $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ frente a su respectivo vector.

6. La sobreexpresión de PARP-1 incrementa las características de las CMCs en las células p53 salvaje, pero no en las p53 mutadas

En el capítulo anterior observamos que la sobreexpresión transitoria de PARP-1 provoca un aumento de las características de las CMCs tanto en pacientes como en el modelo *in vitro* con las células con p53 salvaje, por lo que

repetimos los experimentos en el contexto de los ritmos circadianos sincronizando las células al inicio del experimento. Además, usamos la línea HT-29 para verificar si el efecto observado previamente en la línea p53 *knock-out* se extiende también a otras mutaciones de p53.

En la línea HCT-116, la sobreexpresión estable de PARP-1 aumenta de forma significativa el porcentaje de población ALDH1⁺ en la línea HCT116-PARP1 frente a HCT116-vector ($p < 0.05$) (Figura 22A). El análisis de los marcadores de CMCs CD44, CD326 y CD133 muestra resultados similares. La línea con sobreexpresión de PARP-1, HCT116-PARP1, presenta un mayor porcentaje de células CD44CD326^{ALTO} con respecto a HCT116-vector ($p < 0.05$) (Figura 22B). Al analizar el porcentaje de células de CD44CD326CD133^{ALTO}, la sobreexpresión de PARP-1 en la línea HCT-116 aumenta también el porcentaje de esta población de células frente a HCT116-vector ($p < 0.05$) (Figura 22C).

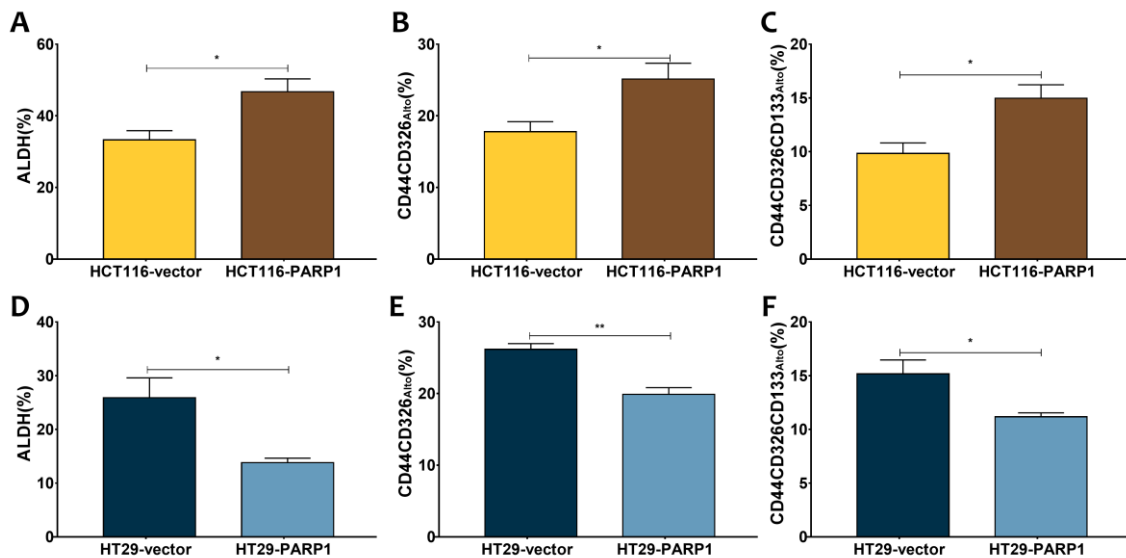


Figura 22. Análisis de los marcadores de CMCs ALDH1, CD44, CD133 y CD326. (A) Porcentaje de la población de células ALDH1⁺ en las líneas HCT116-vector y HCT116-PARP1. Los datos representan la media \pm SEM de cuatro experimentos independientes realizados por duplicado. (B) Porcentaje de células CD44CD326^{ALTO} y (C) CD44CD326CD133^{ALTO} en las líneas HCT116-vector y HCT116-PARP1. Los datos representan la media \pm SEM de seis experimentos independientes realizados por duplicado. (D) Porcentaje de la población de células ALDH1⁺ en las líneas HT29-vector y HT29-PARP1. Los datos representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes realizados por duplicado. (E) Porcentaje de células CD44CD326^{ALTO} y (F) CD44CD326CD133^{ALTO} en las líneas HT29-vector y HT29-PARP1. Los datos representan la media \pm SEM de cuatro experimentos independientes realizados por duplicado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ frente a su respectivo vector.

En la línea p53 mutada, HT-29, la sobreexpresión de PARP-1 provoca un efecto distinto al observado en la línea HCT-116. En relación con la población

ALDH1⁺, se produce una disminución significativa de ésta en la línea HT29-PARP1 con respecto al porcentaje en HT29-vector ($p < 0.05$) (Figura 22D). El análisis de los marcadores CD44 y CD326 muestra una disminución de la proporción de células CD44CD326^{ALTO} en la línea HT29-PARP1 con respecto a la línea HT29-vector ($p < 0.01$), indicando que la sobreexpresión de PARP-1 induce una disminución de esta población (Figura 22E). Este mismo efecto se aprecia al analizar la población CD44CD326CD133^{ALTO}, observándose una disminución del porcentaje de estas células en la línea HT29-PARP1 en comparación con HT29-vector ($p < 0.05$) (Figura 22F).

Estos resultados son similares a los obtenidos previamente con las líneas HCT-116 y HCT-116 p53 ^{-/-} sobreexpresando PARP-1 de manera transitoria, confirmando así los resultados y extendiéndolos a otras mutaciones de p53.

Posteriormente se analizaron por citometría de flujo otros marcadores relacionados con las células madre intestinales y CMCs como NANOG, SOX2, OCT3/4 y LGR5.

Al sobreexpresar PARP-1 en la línea HCT-116, se produce un aumento de la mediana de intensidad de los marcadores SOX2, NANOG, OCT3/4 ($p < 0.01$), y LGR5 ($p < 0.05$) con respecto a la intensidad de dichos marcadores en la línea HCT116-vector (Figura 23A-D). En la línea HT29-PARP1, la sobreexpresión de PARP-1 no tiene ningún efecto sobre la intensidad de estos marcadores (Figura 23E-H).

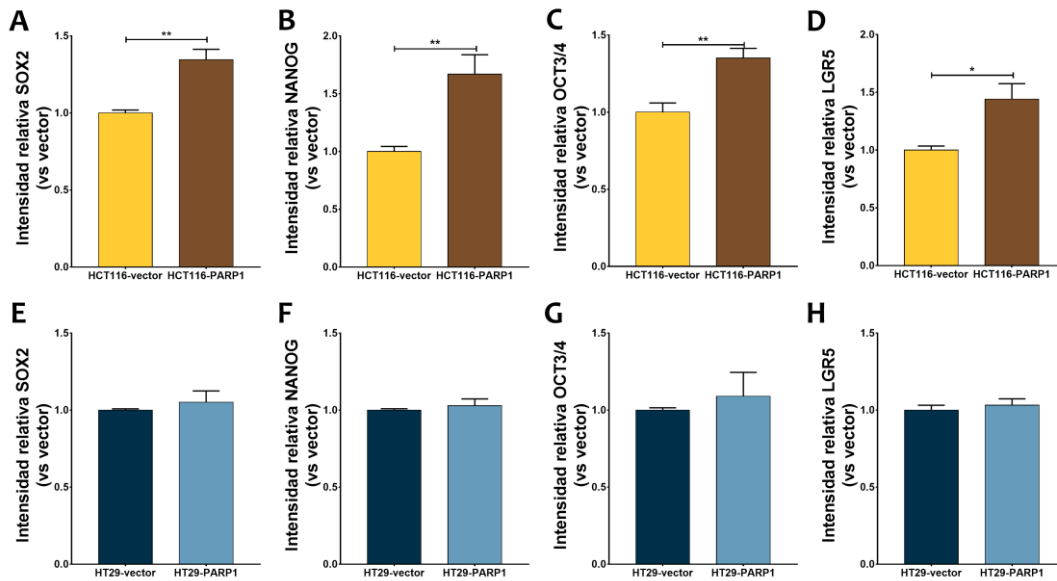


Figura 23. Análisis de los marcadores SOX2, NANOG, OCT3/4 Y LGR5. Intensidad relativa de (A) SOX2, (B) NANOG, (C) OCT3/4, y (D) LGR5 en las líneas HCT116-vector y HCT116-PARP1. Porcentaje de la población de células ALDH1⁺ en las líneas HCT116-vector y HCT116-PARP1. Intensidad relativa de (E) SOX2, (F) NANOG, (G) OCT3/4, y (H) LGR5 en las líneas HT29-vector y HT29-PARP1. Los datos representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes realizados por duplicado). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ frente a su respectivo vector.

Posterior a la caracterización fenotípica del efecto de PARP-1 en relación con marcadores de CMCs, se realizó un análisis funcional a través del ensayo de formación de esferas.

La sobreexpresión de PARP-1 en la línea con wtp53, HTC116-PARP1, aumenta la capacidad de formación de esferas, llegando a formarse un número significativamente mayor de esferas que en la línea HCT116-vector ($p < 0.05$). (Figura 24A y 24B).

Por el contrario, en la línea HT-29, la sobreexpresión de PARP-1 induce una disminución de la capacidad de formación de esferas en la línea HT29-PARP1 frente a la línea HT29-vector con expresión basal de PARP-1 (Figura 24C y 24D).

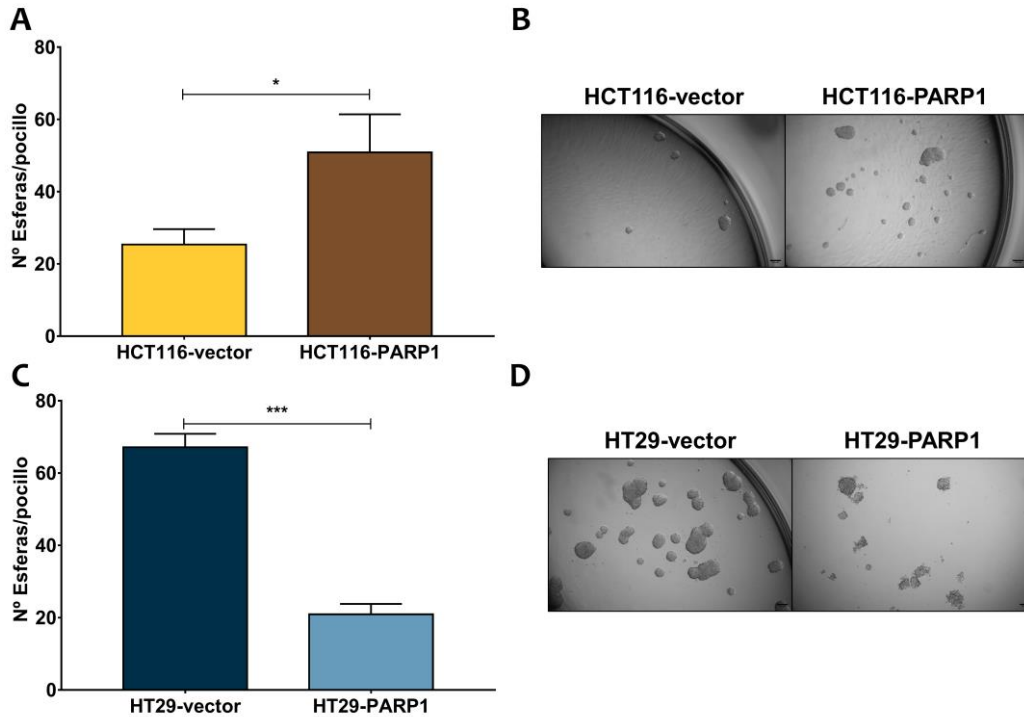


Figura 24. Análisis de la capacidad de formación de esferas. Número de esferas formadas en (A) HCT116-vector y HCT116-PARP1 y (B) su imagen representativa; y en (C) HT29-vector y HT29-PARP1 y (D) su imagen representativa. Los datos representan la media \pm SEM de seis experimentos independientes realizados por quintuplicado. * $p < 0.05$; frente al vector, *** $p < 0.001$; frente al vector.

7. La sobreexpresión de PARP-1 regula de forma diferencial el ritmo circadiano según el estado de p53

Dada la implicación PARP-1 en la regulación de los ritmos circadiano en condiciones fisiológicas, y los resultados en la cohorte de estudio que sugieren una regulación diferencial según el estado de p53 y su impacto sobre las CMCs, se comprobó si la sobreexpresión de PARP-1 regula los ritmos circadianos de forma diferencial. El ritmo circadiano se evaluó a través de cambios en la amplitud, acrofase y MESOR en los genes *PER1*, *PER2*, *PER3* y *REV-ERB β* , previa sincronización del cultivo celular con forskolina.

En la línea HCT-116, la sobreexpresión de PARP-1 provoca un aumento significativo de la amplitud de *PER1* con respecto a HCT116-vector ($p < 0.05$). Además, se produce un retraso de la acrofase, cercano a la significancia, en HCT116-PARP1 ($p = 0.08$) (Figura 25A) (Tabla 14). En cuanto a la ritmicidad de *PER2*, la línea HCT116-PARP1 presenta un adelanto significativo de la acrofase ($p < 0.01$) (Figura 25B) (Tabla 14).

Tabla 14. Análisis de Cosinor de la expresión de los genes *PER1*, *PER2*, *PER3* y *REV-ERBβ* en las líneas HCT116-vector y HCT116-PARP1.

Gen	Condición	PR ¹	p-valor ²	Amplitud (U.A) ³	Acrofase (h) ⁴	MESOR (U.A) ³
PER1	HCT116-vector	56.53	0.0002	0.46 ± 0.09	0.99 ± 0.72	1.02 ± 0.06
	HCT116-PARP1	92.41	<0.0001	0.93 ± 0.04*	23.22 ± 0.22	1.16 ± 0.04
PER2	HCT116-vector	86.16	<0.0001	0.62 ± 0.05	5.46 ± 0.29	1.02 ± 0.04
	HCT116-PARP1	87.67	<0.0001	0.49 ± 0.04	3.46 ± 0.25**	0.98 ± 0.03
PER3	HCT116-vector	62.58	<0.0001	0.57 ± 0.09	5.95 ± 0.49	1.02 ± 0.04
	HCT116-PARP1	70.50	<0.0001	0.40 ± 0.07	21.77 ± 0.49***	1.06 ± 0.05
REV-ERBβ	HCT116-vector	71.25	<0.0001	0.48 ± 0.07	1.33 ± 0.53	1.06 ± 0.05
	HCT116-PARP1	43.24	0.0026	0.82 ± 0.20	21.77 ± 0.95***	1.39 ± 0.14

¹PR: porcentaje de ritmo, ²P-valor: amplitud test cero, ³U.A: unidad, ⁴h: horas. Comparación de los parámetros de ritmicidad en distintas condiciones llevada a cabo a partir de un estudio con un periodo de 24 horas. **p<0.01 vs HCT116-vector, *** p<0.001 vs HCT116-vector.

Por otro lado, la sobreexpresión de PARP-1 produce un retraso significativo de la acrofase de *PER3* con respecto a HCT116-vector ($p<0.001$) (Figura 25C) (Tabla 14). En el caso de *REV-ERBβ*, la línea HCT116-PARP-1 presenta un retraso significativo de su acrofase ($p<0.001$). Aunque se observa un aumento de la amplitud tras la sobreexpresión de PARP-1 ésta no es significativa, sucediendo lo mismo con el aumento del MESOR (Figura 25D) (Tabla 14).

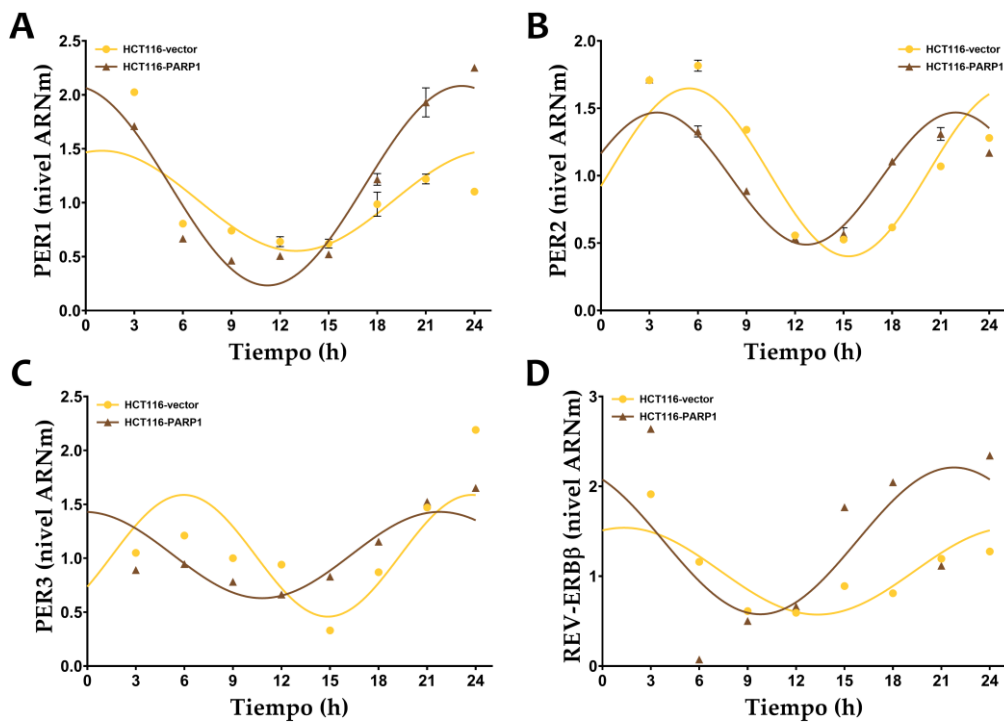


Figura 25. Ritmos circadianos de la expresión de los genes (A) *PER1*, (B) *PER2*, (C) *PER3* y (D) *REV-ERBβ* en las líneas HCT116-vector y HCT116-PARP1.

En la línea HT-29, la sobreexpresión de PARP-1 provoca una disminución significativa de la amplitud de *PER1* con respecto a HT29-vector ($p < 0.01$), así como un adelanto de la acrofase ($p < 0.05$) (Figura 26A) (Tabla 6).

Tabla 15. Análisis de Cosinor de la expresión de los genes *PER1*, *PER2*, *PER3* y *REV-ERB β* en las líneas HT29-vector y HT29-PARP1.

Gen	Condición	PR ¹	p-valor ²	Amplitud (U.A) ³	Acrofase (h) ⁴	MESOR (U.A) ³
PER1	HT29-vector	71.43	<0.0001	0.63 ± 0.09	22.80 ± 0.52	1.06 ± 0.06
	HT29-PARP1	79.96	<0.0001	0.16 ± 0.02**	20.29 ± 0.37*	0.98 ± 0.01
PER2	HT29-vector	70.20	<0.0001	0.53 ± 0.06	3.73 ± 0.35	0.98 ± 0.05
	HT29-PARP1	62.58	<0.0001	0.31 ± 0.04*	1.87 ± 0.40*	0.93 ± 0.03
PER3	HT29-vector	61.44	<0.0001	0.37 ± 0.06	23.68 ± 0.66	1.05 ± 0.04
	HT29-PARP1	20.28	0.0926	0.10 ± 0.04*	16.84 ± 1.64*	0.89 ± 0.03*
REV-ERBβ	HT29-vector	73.54	<0.0001	0.71 ± 0.09	23.15 ± 0.50	1.13 ± 0.07
	HT29-PARP1	58.12	<0.0001	0.23 ± 0.04**	0.23 ± 0.48	1.05 ± 0.03

¹PR: porcentaje de ritmo, ²P-valor: amplitud test cero, ³U.A: unidad, ⁴h: horas. Comparación de los parámetros de ritmicidad en distintas condiciones llevada a cabo a partir de un estudio con un periodo de 24 horas. * $p < 0.05$ vs HT29-vector, ** $p < 0.01$ vs HT29-vector *** $p < 0.001$ vs HT29-vector.

Con respecto a *PER2*, HT29-PARP1 presenta una disminución significativa de la amplitud ($p < 0.05$), así como un adelanto de la acrofase ($p < 0.05$), con respecto a HT29-vector (Figura 26B) (Tabla 15). Nuevamente, la sobreexpresión de PARP-1 en la línea HT-29 provoca una disminución significativa de la amplitud de *PER3* con respecto a HT29-vector ($p < 0.05$), así como un adelanto de la acrofase ($p < 0.05$) y una disminución significativa del MESOR ($p = 0.047$) en la línea HT29-PARP1 (Figura 26C) (Tabla 15). El ritmo circadiano de *REV-ERB β* también se ve afectado, observándose una disminución de la amplitud tras la sobreexpresión de PARP-1 ($p < 0.01$) (Figura 26D) (Tabla 15).

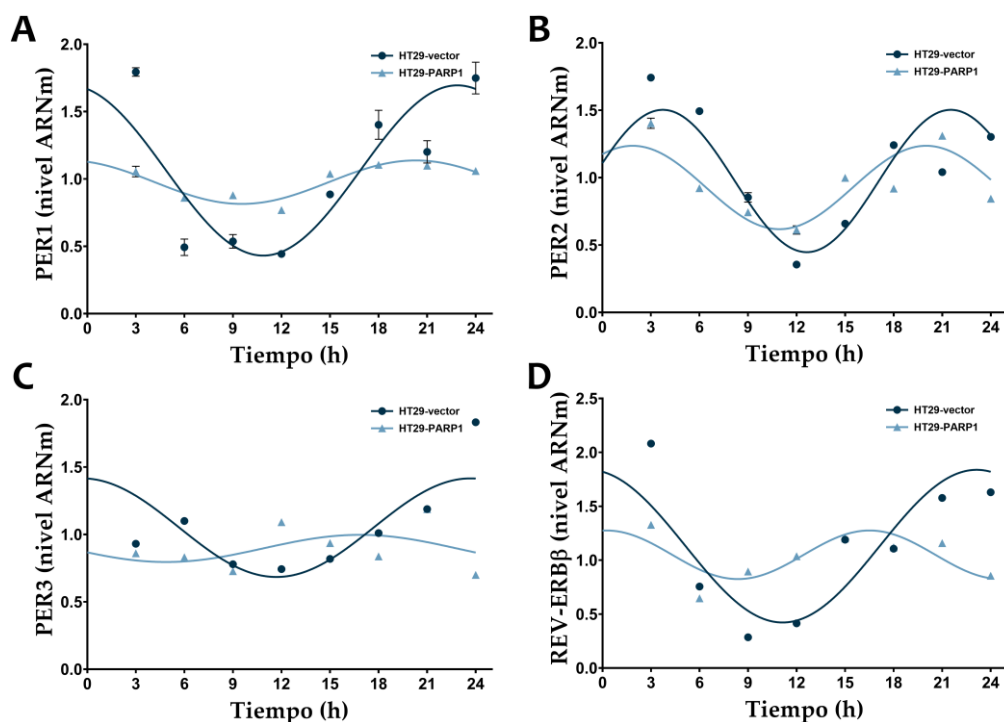


Figura 26. Ritmos circadianos de la expresión de los genes (A) *PER1*, (B) *PER2*, (C) *PER3* y (D) *REV-ERBβ* en las líneas HT29-vector y HT29-PARP1.

8. El olaparib disminuye la viabilidad celular independientemente del estado de p53 y la expresión de PARP-1

Visto el efecto de la sobreexpresión de PARP-1 sobre distintas características y aspectos tumorales, el siguiente paso fue analizar el efecto del tratamiento con olaparib, uno de los inhibidores de PARP-1 aprobados por la FDA para su uso en cáncer de ovario y de mama.

El tratamiento con olaparib disminuyó el crecimiento en todas las líneas de manera dosis-dependiente, desde la dosis más baja utilizada (1 μ M) a las 72 horas post-tratamiento (Figura 27A y 27B). Además, no se observaron diferencias en cuanto a la citotoxicidad del olaparib entre HCT116-vector y HCT116-PARP1, ni entre HT29-vector y HT29-PARP1, sugiriendo que la sobreexpresión de PARP-1 no influye en el efecto citotóxico del olaparib. Se obtuvieron unos valores de IC50 de 14.91 ± 1.51 y 14.42 ± 1.82 para las líneas HCT116-vector y HCT116-PARP1, respectivamente; y de 12.84 ± 2.54 y 12.79 ± 1.21 para las líneas HT29-vector y HT29-PARP1.

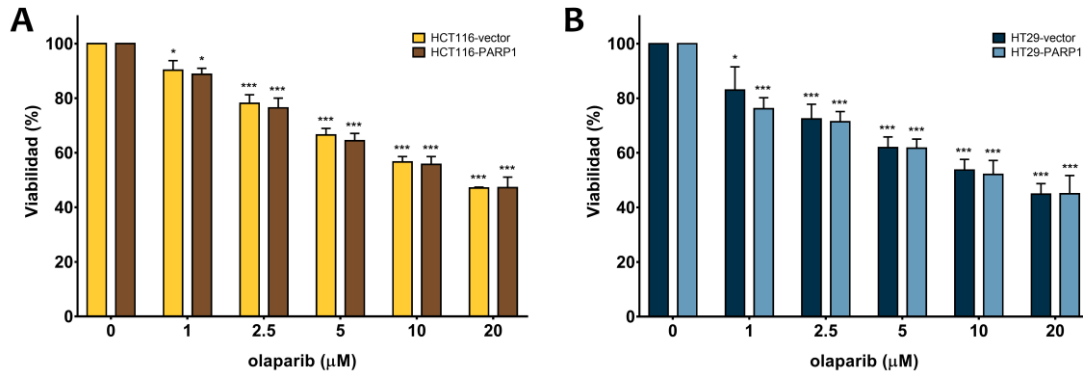


Figura 27. Viabilidad tras 72 horas con el tratamiento con olaparib en (A) las líneas HCT116-vector y HCT116-PARP1, y (B) las líneas HT29-vector y HT29-PARP1. Los resultados representan la media \pm SEM de 6 experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs control tratado con DMSO.

Dado que algunos fármacos provocan un efecto citotóxico que no se manifiesta hasta varias generaciones después cuando el efecto se vuelve letal, se determinó el efecto del olaparib sobre la supervivencia celular a largo plazo se mediante un ensayo de formación de colonias durante 7 días con un pre-tratamiento previo de 72 horas con olaparib 10 μ M.

El tratamiento con olaparib durante 72 horas provoca una disminución en el número de colonias tanto en la línea HCT116-vector como en la línea HCT116-PARP1, reduciéndose un 92.4 y un 95.5% respectivamente ($p < 0.001$). No se observan diferencias en el número de colonias formadas entre HCT116-vector y HCT116-PARP1. A diferencia de lo observado en el ensayo de viabilidad de MTT, las células con sobreexpresión de PARP-1 se ven más afectadas por el olaparib a largo plazo, presentando un número significativamente menor de colonias ($p < 0.01$) (Figura 28A). Este mismo resultado se obtiene en la línea HT29-vector y HT29-PARP-1, observándose un menor número de colonias, reduciéndose en 71.9 y 87.82% ($p < 0.001$). En las líneas con mtp53 se observa el mismo efecto descrito anteriormente en la línea wtp53, de forma que la línea con PARP-1 sobreexpresado se ve más afectada por el tratamiento con olaparib ($p < 0.001$) (Figura 28B).

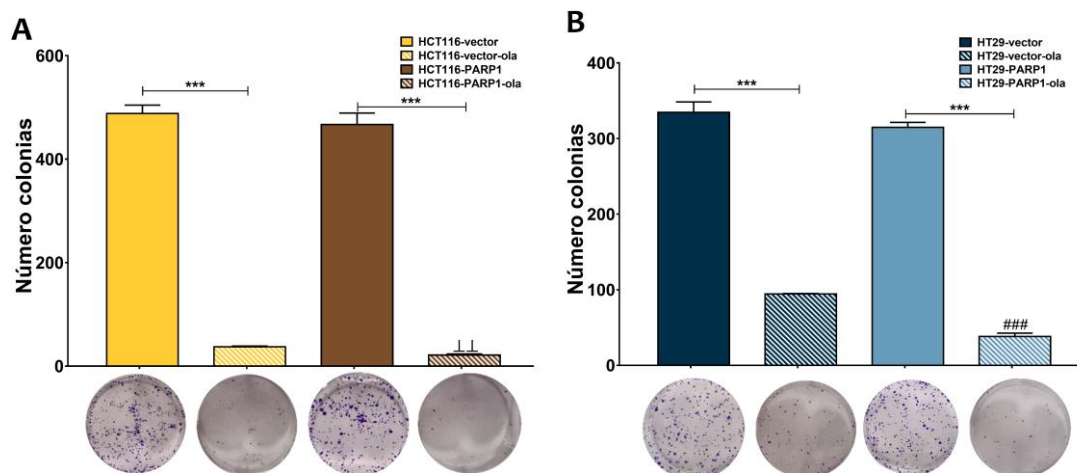


Figura 28. Número de colonias formadas tras el pre-tratamiento con olaparib o DMSO durante 72 horas en (A) las líneas HCT116-vector y HCT116-PARP1, y (B) las líneas HT29-vector y HT29-PARP1. Los resultados representan la media \pm SEM de 3 experimentos. *** $p < 0.001$ vs la misma línea celular tratada con DMSO, $\perp\perp$ $p < 0.01$ HCT116-vector-ola vs HCT116-PARP1-ola, ### $p < 0.001$ HT29-vector-ola vs HT29-PARP1-ola. Ola: olaparib

A partir del análisis de clonogenicidad se realizó también un análisis de la heterogeneidad fenotípica de las colonias en condiciones basales formadas clasificándolas en: holoclon derivadas de células madre, paraclon derivadas de células diferenciadas y meroclon compuestas por fenotipos intermedios entre holo- y paraclones (Anexo 3).

En la línea HCT116-PARP1 se observa una disminución en el porcentaje de colonias con origen paraclon y meroclon, y un aumento de aquellas con fenotipo holoclon, aunque en ninguno de los casos se observan diferencias significativas (Figura 29A y 29B). Por el contrario, en la línea HT29-PARP1 se observa un aumento significativo del porcentaje de colonias paraclon y meroclon, y una disminución significativa de aquellas con fenotipo holoclon ($p < 0.001$) (Figura 29C y 29D). En líneas generales, este análisis de heterogeneidad fenotípica muestra resultados similares a los obtenidos en los análisis de las CMCs previos.

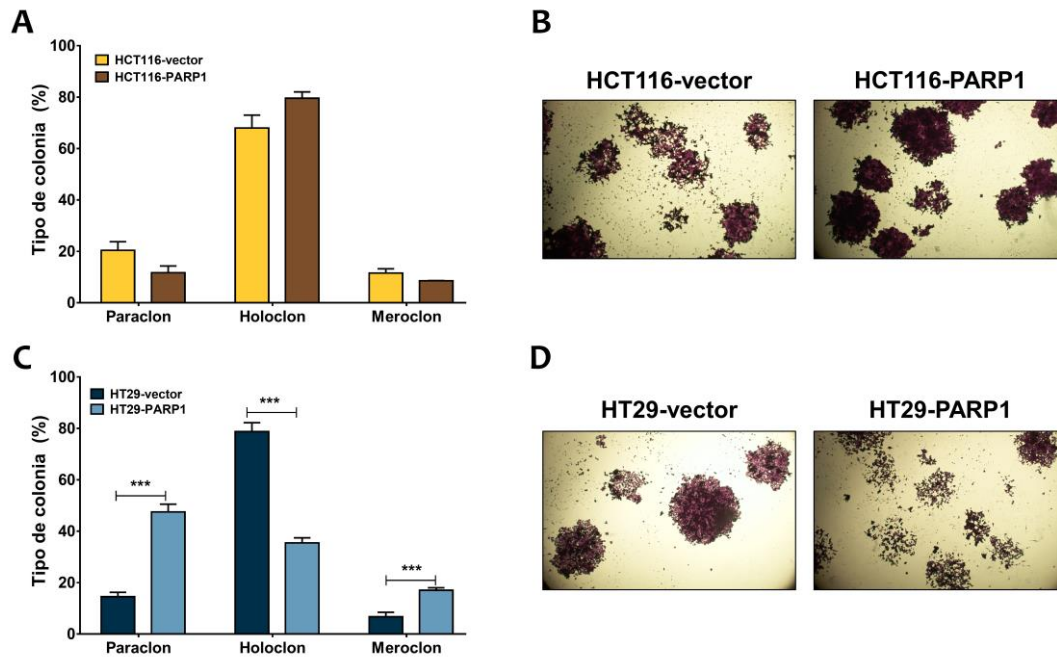


Figura 29. Análisis de la heterogeneidad fenotípica en el ensayo de clonogenicidad. Porcentaje de colonias paraclon, holoclon y meroclon en (A) HCT116-vector y HCT116-PARP1 y (B) su imagen representativa, y en (C) HT29-vector y HT29-PARP1 y (D) su imagen representativa. Los datos representan la media \pm SEM de tres experimentos. *** $p < 0.001$; frente al vector.

Este mismo análisis se repitió con el tratamiento con olaparib, sin embargo, las colonias formadas presentaban un fenotipo intermedio de meroclon.

9. El tratamiento con olaparib induce acumulación en G2/M y aumento de la tasa de apoptosis

El tratamiento con olaparib muestra una disminución de la viabilidad en las líneas celulares estudiadas. Esta disminución puede estar mediada a través de distintos mecanismos distintos y/o complementarios como la regulación del ciclo celular y del proceso de apoptosis.

El estudio del porcentaje de apoptosis mediante citometría de flujo muestra que el tratamiento con olaparib 10 μ M en la línea HCT-116 provoca un aumento del porcentaje de apoptosis, independientemente de la sobreexpresión de PARP-1 ($p < 0.05$) (Figura 30A). Este mismo efecto se observa al tratar la línea HT-29 con olaparib, produciéndose un aumento significativo de la apoptosis tanto en la línea HT29-vector como en la línea HT29-PARP-1 ($p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente) (Figura 30B). En el caso de la línea HT-29, se observa que la línea con sobreexpresión de PARP-1 presenta un menor porcentaje de apoptosis que la línea HT29-vector, en la condición sin tratamiento ($p < 0.05$) (Figura 30B).

El estudio de la distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular mediante citometría de flujo en función de la cantidad de ADN presente muestra que el tratamiento con olaparib 10 μ M induce cambios en todas las fases del ciclo celular en las líneas celulares estudiadas. Concretamente, en la línea HCT116-vector tras el tratamiento se produce una disminución de las fases G0/G1 y S ($p < 0.05$), acompañado por un aumento de la fase G2/M ($p < 0.01$). Del mismo modo, al sobreexpresar PARP-1 en esa línea celular se obtienen los mismos resultados, una disminución de las fases G0/G1 y S, y un aumento de la fase G2/M ($p < 0.01$) (Figura 30C). No se observan diferencias entre ambas líneas en condiciones sin tratamiento. Por su parte, el tratamiento con olaparib en la línea HT29-vector produce una disminución de la fase S ($p < 0.05$) y un aumento de la G2/M. Igualmente, en la línea HT29-PARP1 se observa una disminución de la fase G0/G1 ($p < 0.05$) y S ($p < 0.01$), y un aumento de la fase G2/M ($p < 0.001$) (Figura 30D). Al comparar el efecto de la sobreexpresión de PARP-1 en la línea HT-29 se aprecia una disminución significativa del porcentaje de células en fase G2/M con respecto a la línea vector en condiciones basales ($p < 0.05$) (Figura 30D).

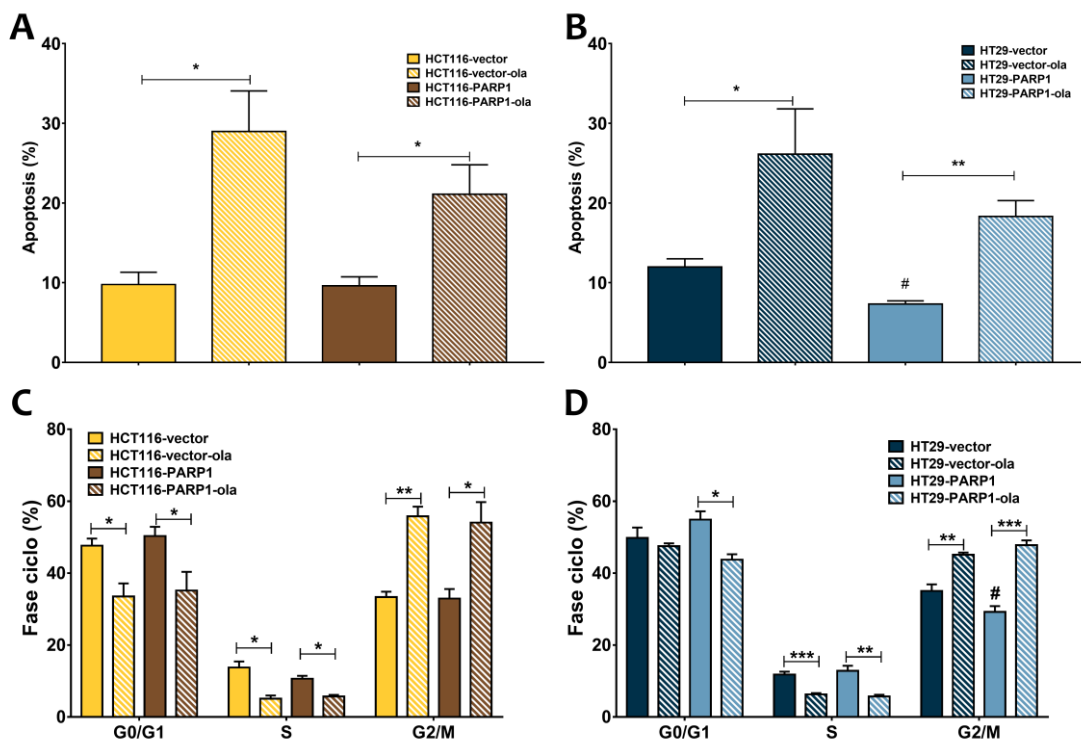


Figura 30. Efecto del tratamiento con olaparib 10 μ M durante 72 horas sobre el porcentaje de apoptosis en (A) las líneas HCT116-vector y HCT116-PARP1, y (B) las líneas HT29-vector y HT29-PARP1; y sobre la distribución en las fases del ciclo celular en (C) las líneas HCT116-vector y HCT116-PARP1, y (D) las líneas HT29-vector y HT29-PARP1. Los resultados representan la media \pm SEM de 3 experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs control tratado con DMSO, # $p < 0.05$ vs HT29-vector. Ola: olaparib

10. El olaparib afecta al fenotipo de CMCs según p53 y la sobreexpresión de PARP-1

Dado que el olaparib reduce la viabilidad independientemente del estado de p53 y de la sobreexpresión de PARP-1, y la regulación diferencial observada anteriormente de PARP-1 sobre las CMCs, a continuación, analizamos el efecto del olaparib sobre la población de CMCs.

El tratamiento con la dosis 10 μ M de olaparib durante 72 horas no provoca cambios significativos en la población CD44CD326^{ALTO} en la línea HCT116-vector, mientras que en la línea HCT116-PARP1 se produce una disminución significativa de ésta. En el caso de la línea HCT116-PARP1, el tratamiento con olaparib revierte el fenotipo provocado por la sobreexpresión de PARP-1 y se recuperan los valores basales de la línea HCT116-vector (Figura 31A). Del mismo modo, el tratamiento con olaparib no produce cambios en la población CD44CD326CD133^{ALTO} en la línea HCT116-vector, mientras que en HCT116-PARP1 se produce de nuevo una disminución significativa de dicha población. Además, el tratamiento con olaparib en la línea con sobreexpresión de PARP-1 revierte también el efecto sobre la población de CMCs recuperándose los valores de la línea vector (Figura 31B).

Por otro lado, en la línea HT29-vector el tratamiento con olaparib no produce cambios significativos en cuanto a la población CD44CD326^{ALTO}, aunque sí se produce una disminución cercana a la significancia ($p=0.07$), mientras que en la línea HT29-PARP1 no se observan cambios (Figura 31C). La población CD44CD326CD133^{ALTO} no se ve afectada en ninguno de los dos casos, vector y sobreexpresión de PARP-1, por el tratamiento de olaparib (Figura 31D).

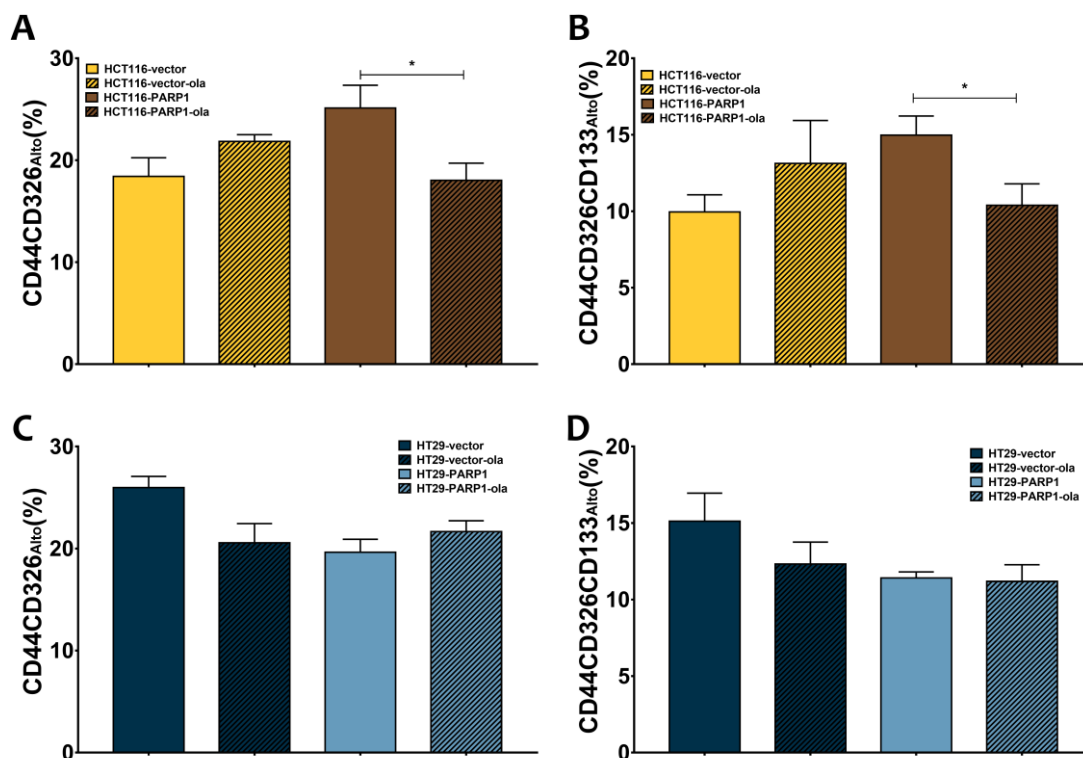


Figura 31. Efecto del tratamiento con olaparib 10 μ M durante 72 horas en las líneas HCT116-vector y HCT116-PARP1 sobre el porcentaje de células (A) CD44CD326^{ALTO} y (B) CD44CD326CD133^{ALTO}; y en las líneas HT29-vector y HT29-PARP1 sobre el porcentaje de células (C) CD44CD326^{ALTO} y (D) CD44CD326CD133^{ALTO}. Los resultados representan la media \pm SEM de 3 experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. * $p < 0.05$ vs control tratado con DMSO.

También se evaluó el efecto del olaparib a nivel funcional de las CMCs mediante el ensayo de formación de esferas. A través de este ensayo se evaluó la capacidad de formación de esferas tras el tratamiento durante 72 horas con la dosis 10 μ M de olaparib.

En la línea HCT-116, el tratamiento con olaparib durante 72 horas reduce la capacidad de formación de esferas post-tratamiento en un 94% y 91% en las líneas vector y con sobreexpresión de PARP-1, respectivamente (Figura 32A y 32B). Por otro lado, en la línea HT29-vector, la capacidad de formación de esferas post-tratamiento con olaparib se reduce en un 64%, mientras que en la línea con PARP-1 sobreexpresado, HT29-PARP1, se reduce en un 60% (Figura 32C). Sin embargo, en el caso de las líneas HT-29, aunque se produce una disminución de la capacidad de formación de esferas, ésta viene acompañada de un cambio fenotípico en las esferas. Tras el tratamiento, las esferas formadas presentan un aspecto de racimo de uvas, en lugar de esfera solida (Figura 32D)

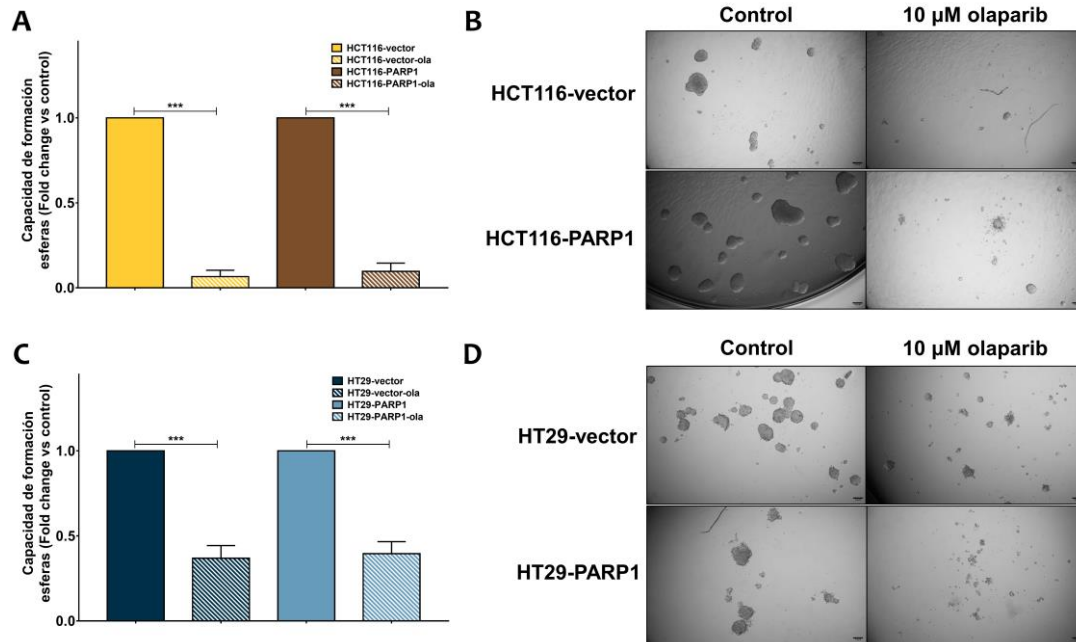


Figura 32. Análisis de la capacidad de formación de esferas post-tratamiento con 10 μM en (A) HCT116-vector y HCT116-PARP1 y (B) su imagen representativa, y en (C) HT29-vector y HT29-PARP1 y (D) su imagen representativa. Los datos representan la media ± SEM de seis experimentos independientes realizados por quintuplicado. *** $p < 0.001$ frente al control tratado con DMSO.

11. El olaparib altera el ritmo circadiano de *PER1* y *REV-ERBβ* en las líneas estudiadas

A continuación, se analizó el efecto del olaparib sobre la regulación de los ritmos observada previamente por parte de PARP-1 sobre los genes *PER1* y *REV-ERBβ*, que fueron los genes donde la sobreexpresión tuvo mayor impacto en ambas líneas celulares.

En la línea HCT-116-vector, el olaparib no tiene ningún efecto sobre los parámetros del ritmo circadiano estudiados de *PER1*, sin embargo, en la línea con sobreexpresión de PARP-1, el tratamiento provoca una disminución significativa de la amplitud ($p < 0.05$), y un adelanto significativo de la acrofase ($p < 0.01$). En términos de amplitud y MESOR, el olaparib provoca que en la línea sobreexpresada se alcancen valores similares a la línea vector sin tratar, revirtiendo en cierto modo el efecto de la sobreexpresión de PARP-1 (Tabla 16) (Figura 33A y 33B).

Tabla 16. Análisis de Cosinor de la expresión de los genes *PER1* y *REV-ERB β* en las líneas HCT116-vector y HCT116-PARP1 tratadas con y sin olaparib.

Gen	Condición	PR ¹	p-valor ²	Amplitud (U.A) ³	Acrofase (h) ⁴	MESOR (U.A) ³
PER1	HCT116-vector Control	56.53	0.0002	0.46 ± 0.09	0.99 ± 0.72	1.02 ± 0.06
	HCT116-vector Olaparib	91.31	<0.0001	0.51 ± 0.03	0.59 ± 0.19	1.00 ± 0.02
	HCT116-PARP1 Control	92.41	<0.0001	0.93 ± 0.04	23.22 ± 0.22	1.16 ± 0.04
	HCT116-PARP1 Olaparib	38.68	0.0059	0.32 ± 0.09##	4.41 ± 0.68##	0.99 ± 0.07
REV-ERBβ	HCT116-vector Control	71.25	<0.0001	0.48 ± 0.07	1.33 ± 0.53	1.06 ± 0.05
	HCT116-vector Olaparib	84.34	<0.0001	0.41 ± 0.04	1.35 ± 0.26	0.98 ± 0.03
	HCT116-PARP1 Control	43.24	0.0026	0.82 ± 0.20	21.77 ± 0.95	1.39 ± 0.14
	HCT116-PARP1 Olaparib	70.44	<0.0001	0.40 ± 0.06	1.69 ± 0.39###	1.02 ± 0.04

¹PR: porcentaje de ritmo, ²P-valor: amplitud test cero, ³U.A: unidad, ⁴h: horas. Comparación de los parámetros de ritmicidad en distintas condiciones llevada a cabo a partir de un estudio con un periodo de 24 horas. *** p<0.001 vs HCT116-vector control 1 ##p<0.01 vs HCT116-PARP1 control, ### p<0.001 vs HCT116-PARP1 control

El uso de olaparib sobre la línea HCT116-vector no tiene ningún impacto en el comportamiento circadiano de *REV-ERB β* sobre los parámetros estudiados con respecto a la línea no tratada. En la línea HCT116-PARP1, el olaparib provoca un adelanto significativo de la acrofase ($p<0.001$), así como una disminución, aunque no significativa de la amplitud, y una disminución del MESOR cercana a la significancia ($p=0.06$). Tras el tratamiento con olaparib, la línea HCT116-PARP1 recupera valores similares a los de la línea HCT116-vector (Tabla 16) (Figura 33C y 33D).

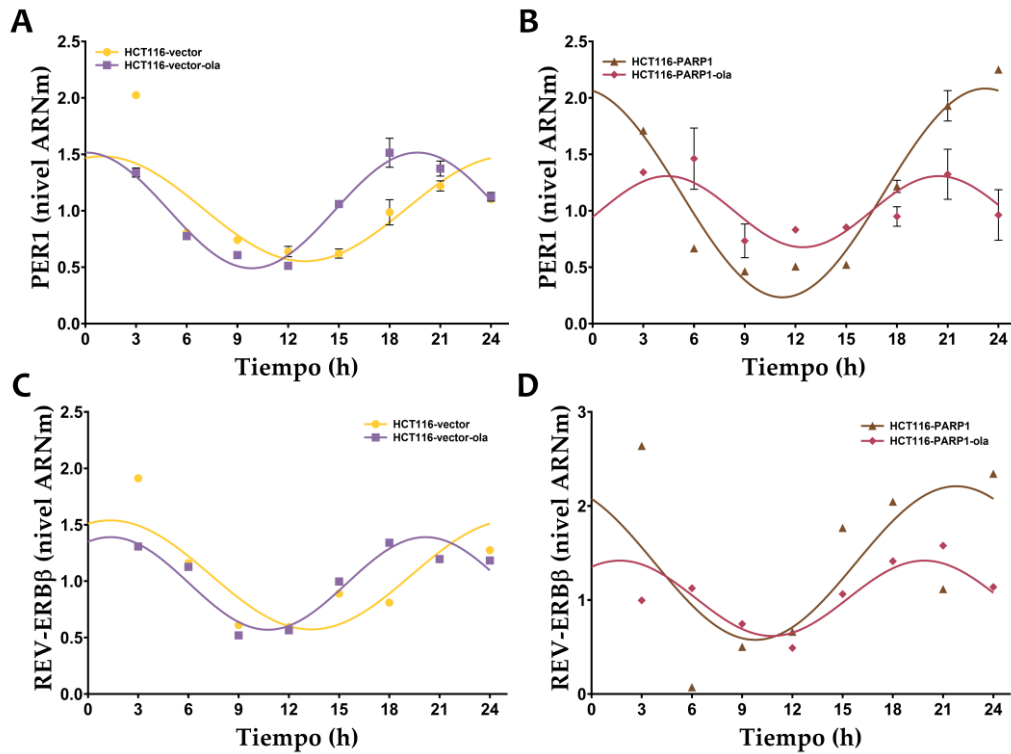


Figura 33. Ritmos circadianos de la expresión de los genes (A) *PER1* y (B) *REV-ERBβ* en las líneas HCT116-vector y HCT116-PARP1 con y sin tratamiento con olaparib.

En las líneas HT-29, tanto en el vector como en la línea PARP-1 sobreexpresada, el tratamiento con olaparib, provoca un cambio del periodo de *PER1* de 24 y 21.5 horas, respectivamente, a 3 horas lo cual impide el posterior análisis de cosinor para la obtención de la amplitud, acrofase y MESOR al considerar que no hay ritmicidad circadiana alguna (Tabla 17) (Figura 34A y 34B).

Tabla 17. Análisis de Cosinor de la expresión de los genes *PER1* y *REV-ERBβ* en las líneas HT29-vector y HT29-PARP1 tratadas con y sin olaparib

Gen	Condición	PR ¹	p-valor ²	Amplitud (U.A) ³	Acrofase (h) ⁴	MESOR (U.A) ³
PER1	HT29-vector Control	71.43	<0.0001	0.63 ± 0.09	22.80 ± 0.52	1.06 ± 0.06
	HT29-vector Olaparib	-	-	-	-	-
	HT29-PARP1 Control	79.96	<0.0001	0.16 ± 0.02**	20.29 ± 0.37	0.98 ± 0.01
	HT29-PARP1 Olaparib	-	-	-	-	-
REV-ERBβ	HT29-vector Control	73.54	<0.0001	0.71 ± 0.09	23.15 ± 0.50	1.13 ± 0.07
	HT29-vector Olaparib	69.35	<0.0001	0.40 ± 0.06*	20.55 ± 0.55*	0.89 ± 0.04*
	HT29-PARP1 Control	58.12	<0.0001	0.23 ± 0.04	0.23 ± 0.48	1.05 ± 0.03
	HT29-PARP1 Olaparib	20.47	0.0903	0.44 ± 0.185	9.89 ± 0.80###	1.16 ± 0.13

¹PR: porcentaje de ritmo, ²P-valor: amplitud test cero, ³U.A: unidad, ⁴h: horas. Comparación de los parámetros de ritmicidad en distintas condiciones llevada a cabo a partir de un estudio con un periodo de 24 horas. * p<0.05 vs HCT116-vector control 1 ##p<0.01 vs HCT116-PARP1 control.

El olaparib ejerce distinto efecto sobre *REV-ERBβ* según si hay sobreexpresión de PARP-1 en la línea p53 mutada. Mientras que, en el vector, el olaparib provoca una disminución significativa de la amplitud ($p<0.05$), un adelanto de la acrofase ($p<0.05$) y una disminución del MESOR ($p<0.05$); en la línea HT29-PARP-1 provoca un retraso de la acrofase ($p<0.001$) (Tabla 17) (Figura 34C y Figura 34D).

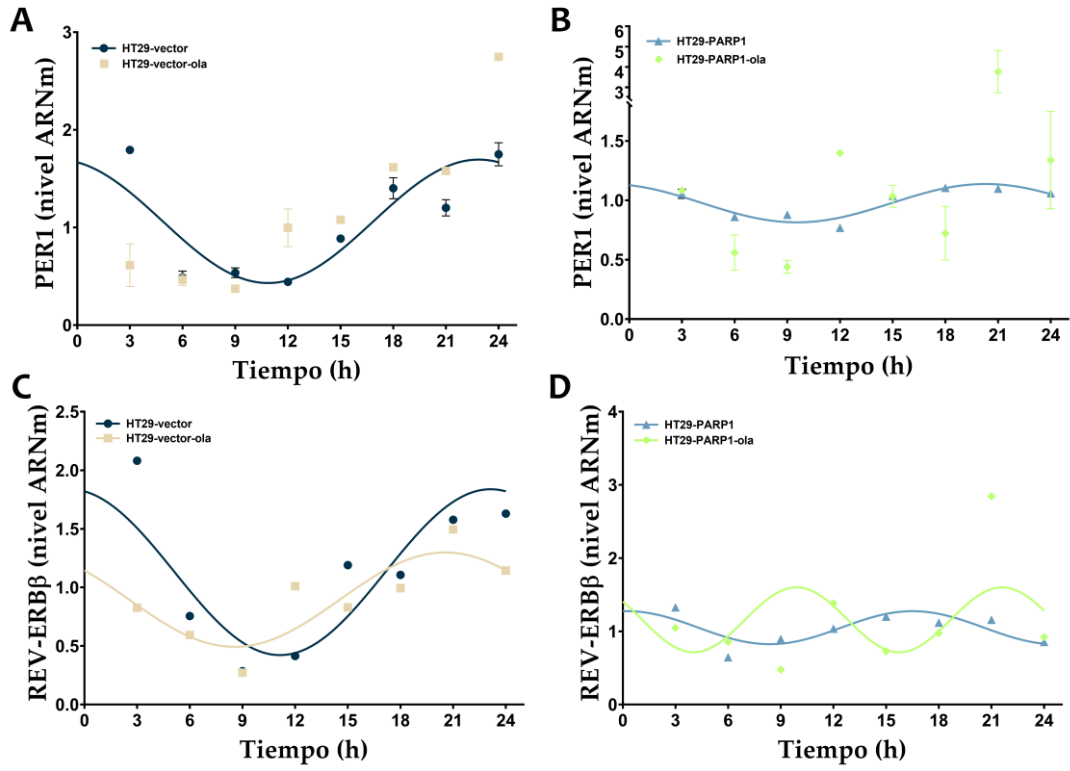


Figura 34. Figura16. Ritmos circadianos de la expresión de los genes (A) *PER1* y (B) *REV-ERBβ* en las líneas HT29-vector y HT29-PARP1 con y sin tratamiento con olaparib.

CAPÍTULO 3: ANÁLISIS DEL PERFIL DE PARP-1 EN LÍNEAS CELULARES DERIVADAS DE PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL Y LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON OLAPARIB Y OXALIPLATINO

Los resultados recogidos en este capítulo se han realizado en colaboración con el grupo “*signalisation, plasticité et cancer*” liderado por la Dr. Julie Pannequin del *Institut de Génomique Fonctionnelle* de Montpellier (Francia).

1. Evaluación del estado de TP53 en las líneas derivadas de pacientes

Se utilizaron 17 líneas celulares derivadas de pacientes con CCR de la región de Gard (Francia). Las líneas se establecieron a partir de tumores primarios (CRC1, CPP6, CPP14, CPP24, CPP25, CPP35, CPP42, CPP43 y CPP44), metástasis (CPP19, CPP30, CPP36 y CCPP45), y CTCs (CTC31, CTC41, CTC44 y CTC45). Además, las líneas CPP44 y CTC44, y CPP45 y CTC45, se establecieron del mismo paciente, respectivamente.

En primer lugar, se analizó el estado de *TP53* en las distintas líneas celulares mediante secuenciación *Sanger*. En las líneas derivadas de tumores primarios el 33% de ellas presentan un p53 salvaje frente al 67% mutadas; el 25% de las líneas derivadas de metástasis presentan un estado salvaje de p53 mientras que el 75% restante muestran mutaciones; y en el caso de las CTCs, el 50% de las líneas tienen mutaciones en *TP53* (Tabla 19).

Tabla 18. Análisis del estado de *TP53* en las líneas derivadas de pacientes.

		Origen		
		Primario	Metástasis	CTCs
Estado TP53	Salvaje	CRC1, CPP6, CPP14	CPP19	CTC31, CTC41
	Mutante	CPP24, CPP25, CPP35, CPP42, CPP43, CPP44	CPP30, CPP36, CPP45	CTC44, CTC45

CTC: Célula tumoral circulante.

2. Análisis de la expresión de PARP-1 en las líneas derivadas de pacientes

A continuación, se evaluó la expresión de *PARP-1* en las distintas líneas celulares derivadas de pacientes mediante RT-Q-PCR. La expresión de *PARP-1* es bastante heterogénea entre las distintas líneas celulares, especialmente entre las líneas celulares derivadas del tumor primario (Figura 35).

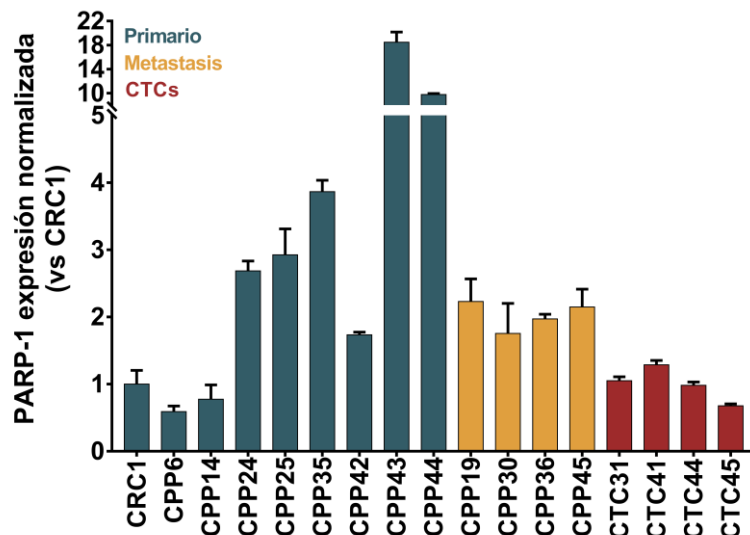


Figura 35. Análisis mediante RT-Q-PCR de la expresión de PARP-1 en las líneas celulares derivadas de pacientes normalizadas con respecto a la expresión de la línea CRC1. Los datos representan la media \pm SEM de tres replicas. CTC: célula tumoral circulante.

Dado que se disponía de los datos clínicos de los pacientes de los que se obtuvieron las líneas celulares, se intentó poner la expresión de *PARP-1* en el contexto de algunos de ellos. Sin embargo, el bajo número de muestras tras realizar la clasificación acorde con los datos clínicos lo impidió para alguna de ellas. No obstante, cuando se pone la expresión de *PARP-1* en el contexto del estado de *KRAS* en las líneas celulares derivadas de tumores primarios se observa una mayor expresión, aunque no significativa, en las líneas con *KRAS* mutado (Figura 36A). Del mismo modo, cuando se hace en el contexto del estado de p53 no se observan diferencias entre líneas metastásicas y CTCs, mutadas y salvajes, sin embargo, en las líneas derivadas de tumores primarios hay una expresión significativamente mayor en aquellas líneas con *mtp53* ($p < 0.05$) (Figura 36B). A pesar de todo es importante señalar que estos resultados se han obtenido con un número pequeño de muestras por grupo.

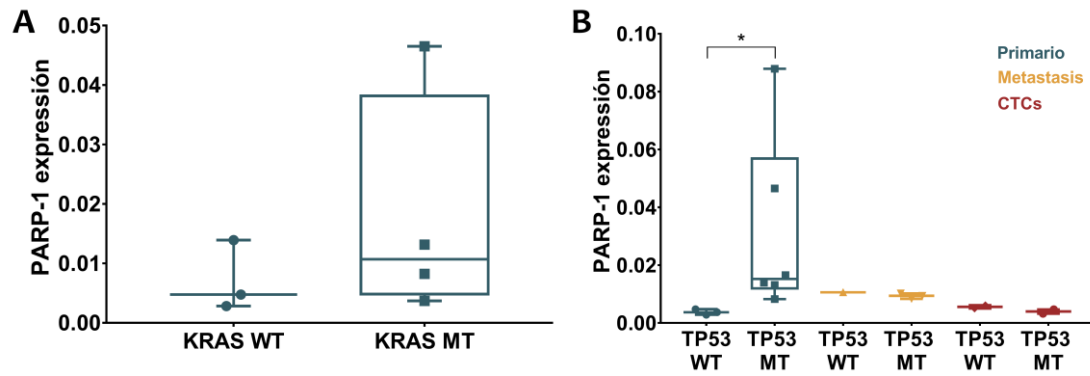


Figura 36. Diagramas de caja mostrando la expresión de *PARP-1* en (A) las líneas celulares derivadas de tumores primarios agrupadas según el estado de *KRAS*, salvaje (*KRAS* WT) y mutado (*KRAS* MT), y (B) las líneas derivadas de tumores primarios, metástasis y CTCs agrupadas según el estado de p53, salvaje (*TP53* WT) y mutado (*TP53* MT). Los datos representan la mediana y los valores máximos y mínimos; * $p < 0.05$. CTC: célula tumoral circulante.

3. Las CTCs presentan menores niveles de expresión de PARP-1

Al agrupar la expresión de las distintas líneas celulares según su origen tumoral, tumor primario, metástasis y CTCs se observan diferencias en los niveles de expresión de *PARP-1*. Al comparar la expresión entre las líneas metastásicas y las CTCs se observa una disminución significativa de la expresión *PARP-1* en las CTCs ($p < 0.05$). Sin embargo, al comparar la expresión de las líneas derivadas del tumor primario con las líneas metastásicas o con las CTCs, aunque se observa una mayor expresión de *PARP-1* en las líneas celulares derivadas del tumor primario, ésta no es significativa (Figura 37A).

Dado que del paciente 44 se pudieron aislar tanto células primarias como CTCs (CPP44 y CTC44) y del paciente 45 se pudieron aislar tanto células metastásicas como CTCs (CPP45, CTC45), se evaluó si existían diferencias entre ellas en términos de expresión de *PARP-1* similares a las obtenidas al agrupar todas las líneas celulares según su origen.

En las líneas derivadas del paciente 44 se observa que la CTC44 presenta niveles de expresión significativamente menores de *PARP-1* que la línea CPP44 obtenida de su tumor primario ($p < 0.001$). Igualmente, en las líneas derivadas del paciente 45 se observa que la CTC45 presenta una expresión significativamente menor de *PARP-1* que la línea CPP45 obtenida de su metástasis ($p < 0.01$) (Figura 37B).

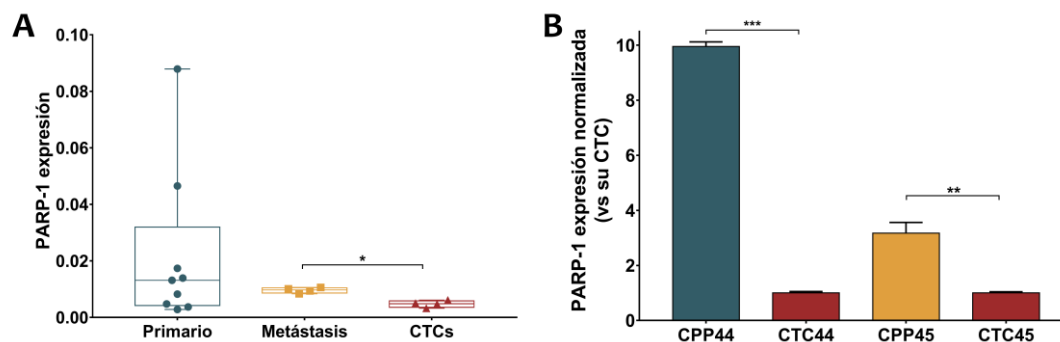


Figura 37. Comparación de la expresión de *PARP-1* en (A) las líneas celulares derivadas de paciente agrupadas según su origen tumoral y (B) entre las líneas celulares derivadas del paciente 44 y del paciente 45. Los datos de la figura A representan la mediana y los valores máximos y mínimos. La figura B representa la media \pm SEM de tres replicas. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$; *** $p < 0.001$.

Aunque los datos de las líneas celulares derivadas de pacientes indican una menor expresión de *PARP-1* en las CTCs en comparación con el tumor primario y la metástasis, el bajo número de muestras no permite confirmar estos resultados.

Por ese motivo, se utilizaron diferentes bases de datos de cohortes en los que se haya cuantificado la expresión de *PARP-1* en CTCs, tumores primarios, metástasis y mucosa normal.

A través del repositorio público de datos de genómica funcional *Gene Expression Omnibus* (GEO), se encontró el estudio GSE74369 en el cual la expresión de *PARP-1* se analizó por RNAseq en distintos tipos de muestras de CCR, incluyendo CTCs, mucosa normal y tumor primario. En dicho estudio hay datos de 7 pacientes con muestras de CTC, tejido normal, tejido tumoral (profundo, superficial, central), metástasis y tejido endotelial. Los resultados obtenidos son similares a los obtenidos en las líneas derivadas de pacientes, observándose una menor expresión de *PARP-1* en las CTCs de cada paciente comparado con el resto de tejidos tumorales primarios, e incluso con respecto al endotelio y tejido normal en la mayoría de los casos (Figura 38). Estos resultados se observan en prácticamente todos los pacientes de los que hay datos a excepción del paciente 21, donde la expresión de *PARP-1* es mayor en las CTCs que en el resto de tejidos.

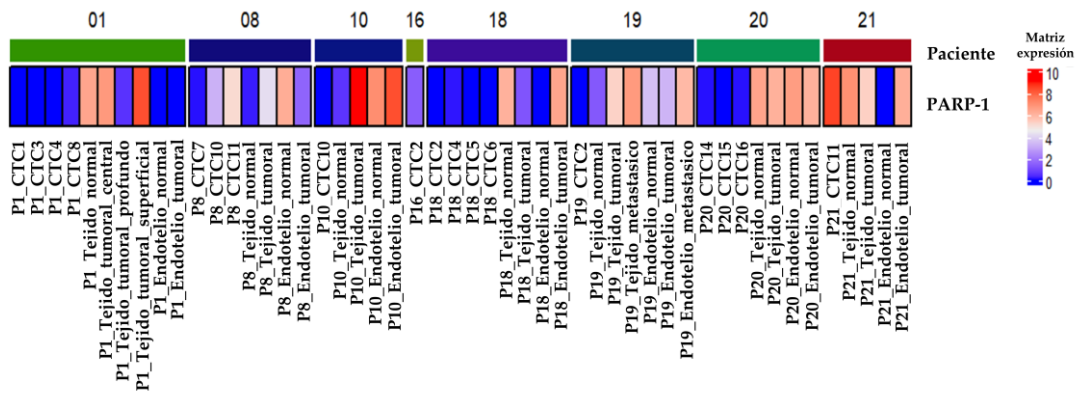


Figura 38. Análisis de mapas de calor que muestran la expresión de *PARP-1* en diferentes muestras de células tumorales circulantes (CTC), tejido normal, tumor, metástasis y endotelio. Acceso a los datos: GSE74369.

4. Selección de las líneas celulares para el estudio de respuesta al tratamiento con olaparib y oxaliplatino

Una vez analizado el perfil de *PARP-1* en las líneas derivadas de paciente se procedió al estudio de la respuesta al tratamiento con olaparib y oxaliplatino como terapia simple, y la combinación de ambos en el contexto de *PARP-1* y *p53*.

Dado que la mayor parte de los tumores primarios de CCR son extirpados mediante cirugía curativa, y que la metástasis es la principal causa de muerte por CCR, se seleccionaron líneas celulares derivadas de metástasis. Se seleccionó la línea CPP19 (wtp53), y la línea CPP45 (mtp53). Puesto que en los últimos años las CTCs han ganado relevancia al ser consideradas como las células tumorales que se desprenden del tumor primario al torrente sanguíneo e iniciar el proceso de metástasis, también se seleccionaron las líneas CTC31 (wtp53), y CTC45 (mtp53), procedente del mismo paciente que CPP45.

Las líneas CPP19 y CPP45 se cultivaron en monocapa 2D, mientras que las líneas CTC31 y CTC45 en 3D formando colonosferas, en forma de racimo de uva y de esfera sólida, respectivamente (Figura 39).

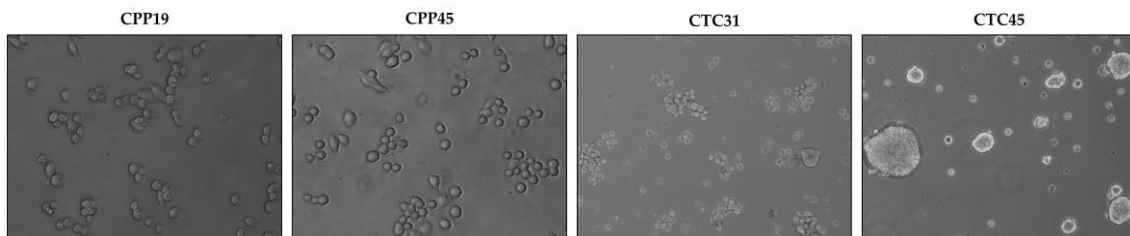


Figura 39. Imágenes de microscopio óptico que muestran las líneas celulares CPP19, CPP45, CTC31 y CTC45.

En las líneas celulares CPP45 y CTC45 se observa la mutación c818G>A(p.Arg273His) localizada en un *hotspot* que afecta al dominio de unión al ADN. La línea CPP45 presenta una segunda mutación c925C>T (cPro309Ser) que afecta a la secuencia de localización nuclear (Figura 40). Dado que ambas líneas proceden del mismo paciente, y que la mutación Arg273His está solo presente en la CTC se podría asumir que dicha mutación podría ser la original en el tumor primario y que una vez establecida la metástasis se desarrolló la segunda. Ambas mutaciones se consideran patológicas según la IARC.

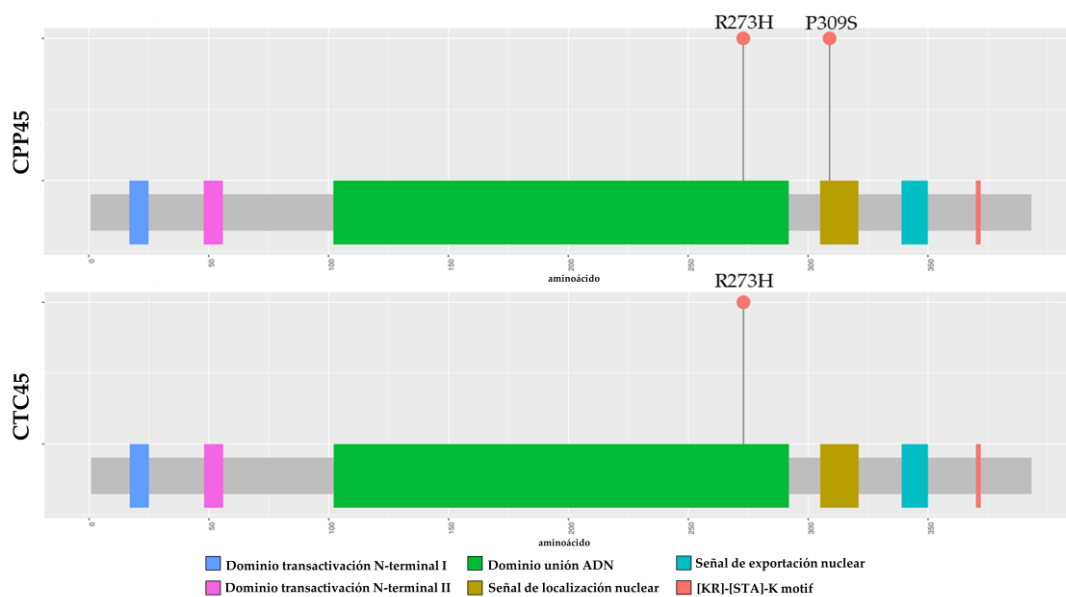


Figura 40. Representación en diagrama de lollipop de las mutaciones en TP53 en las líneas CPP45 y CTC45.

5. El oxaliplatino y el olaparib inhiben el crecimiento de células metastásicas

Las líneas metastásicas derivadas de pacientes CPP19 (wtp53) y CPP45 (mtp53) se utilizaron para evaluar el efecto citotóxico del olaparib y del oxaliplatino en ensayos *in vitro*. Estas dos líneas celulares se cultivaron en presencia de concentraciones crecientes de olaparib (0-10 μ M) y oxaliplatino (0-10 μ M) durante 72 horas.

El tratamiento con olaparib disminuye la viabilidad celular en ambas líneas de manera dosis-dependiente, siendo significativa a la dosis de 10 μ M en el caso de la línea CPP19, y desde la dosis de 2.5 μ M en el caso de CPP45. Solo se observan diferencias significativas entre CPP19 y CPP45 a la dosis de 5 μ M, a la cual la inhibición de la viabilidad es mayor en la línea CPP45 ($p < 0.05$) (Figura 41A).

El tratamiento con oxaliplatino también reduce la viabilidad celular en ambas líneas de manera dosis-dependiente, aunque en este caso en la línea CPP19 el efecto es significativo desde la dosis de 0.25 μM , mientras que en la línea CPP45 el efecto significativo no se observa hasta la dosis de 1 μM . En el caso del oxaliplatino, se encuentran diferencias significativas entre CPP19 y CPP45, siendo el efecto significativamente mayor en la línea CPP19 a todas las dosis ensayadas a partir de la 0.25 μM (Figura 41B). Los valores de IC_{50} para el oxaliplatino son de 1.30 ± 0.37 y 5.02 ± 0.14 , para CPP19 y CPP45, respectivamente.

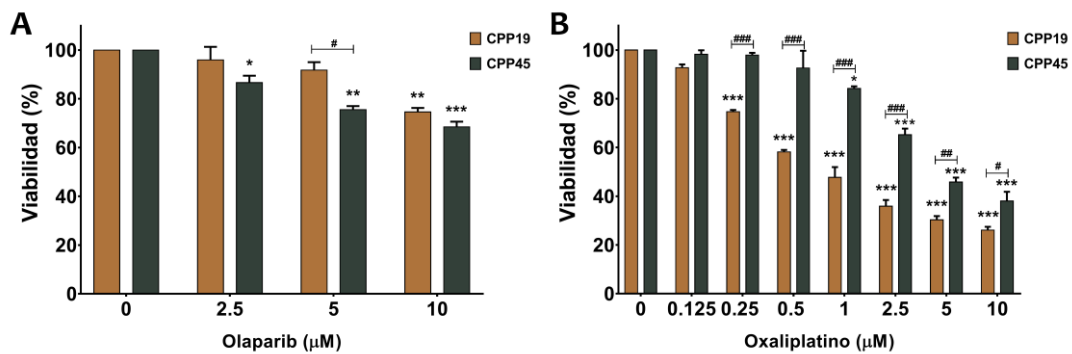


Figura 41. Inhibición de la viabilidad tras las 72 horas con los tratamientos de (A) olaparib y (B) oxaliplatino en las líneas CPP19 y CPP45. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. control tratado con DMSO, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ y ### $p < 0.001$ vs. la misma dosis entre CPP19 y CPP45. Las figuras representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes realizados por triplicados.

6. La combinación de olaparib y oxaliplatino ejerce un efecto sinérgico sobre la viabilidad en las células metastásicas

Tras evaluar el efecto de manera independiente de cada uno de los fármacos se analizó si la combinación de oxaliplatino con olaparib potenciaba el efecto de ambos fármacos por sí mismos, especialmente a bajas dosis. Para ello se combinaron las dosis de olaparib (0, 2.5, 5 y 10 μM) y de oxaliplatino (0, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5 y 10 μM) ensayadas previamente de manera individual.

En el caso de la línea CPP19, la combinación de 2.5 μM olaparib con oxaliplatino produce una disminución significativa de la viabilidad a todas las dosis de oxaliplatino con respecto al tratamiento solo con la misma dosis de olaparib; mientras que a las dosis 5 y 10 μM de olaparib, los efectos significativos se observan a partir de la combinación con la dosis 0.25 μM de oxaliplatino. A dosis por encima de 0.5 μM de oxaliplatino solo se observan diferencias significativas al combinar la dosis de 10 μM de olaparib con la dosis 1 μM de oxaliplatino, con respecto a la monoterapia con oxaliplatino. Por debajo de ésta, a la dosis de 0.125 μM , la viabilidad disminuye de manera significativa al

combinar el tratamiento de oxaliplatino con las dosis de 2.5, 5 y 10 μM de olaparib. Sin embargo, a la dosis de 0.25 μM de oxaliplatino, la disminución significativa de la viabilidad sólo se mantiene en la combinación con la dosis de 10 μM de olaparib (Figura 42A).

En términos de sinergia, ésta se analizó mediante el modelo de HSA (agente individual más alto), de manera que valores por encima de 0 indican sinergia entre los dos fármacos y valores negativos un efecto antagónico entre ambos. El análisis de sinergia en la línea CPP19 muestra un efecto sinérgico entre el olaparib y oxaliplatino a todas las dosis de olaparib, y dosis entre 0.125 y 0.5 μM de oxaliplatino, siendo la combinación más sinérgica a las dosis de 10 μM de olaparib y 0.25 μM de oxaliplatino (puntuación: 14). Más allá de la dosis de 1 μM de oxaliplatino la combinación con olaparib muestra una ligera sinergia, no efecto o un ligero antagonismo (Figura 42B). Sin embargo, al analizar la sinergia según los modelos de Loewe y Bliss, éstos señalan una tendencia antagónica entre ambos fármacos (Anexo 8).

En la línea CPP45, la combinación de olaparib y oxaliplatino reduce la viabilidad de manera significativa a partir de la dosis 2.5 μM de oxaliplatino, comparado con el monoterapia con olaparib a la misma dosis. Al combinar el tratamiento de oxaliplatino con la dosis 2.5 μM de olaparib solo se observan diferencias significativas con respecto al monoterapia con oxaliplatino en la a la dosis de 0.125 μM de oxaliplatino. Sin embargo, la combinación del oxaliplatino con las dosis 5 y 10 μM de olaparib reduce de manera significativa la viabilidad a las dosis entre 0.125 y 2.5 μM de oxaliplatino con respecto al tratamiento simple con oxaliplatino (Figura 42C).

En el caso de la línea CPP45, se observa una tendencia sinérgica en cuanto al efecto de ambos fármacos, observándose la mayor sinergia a las dosis de 1 μM de oxaliplatino, y 2.5 y 5 μM de olaparib (puntuación: 11 y 13, respectivamente), y 2.5 μM de oxaliplatino, y 5 y 10 de olaparib (puntuación: 12 y 11, respectivamente) (Figura 42D). El análisis de sinergia según el modelo de sinergia mantiene el efecto sinérgico señalado por el modelo HSA, mientras que el modelo de Bliss señala un efecto antagonista especialmente a altas dosis (Anexo 8).

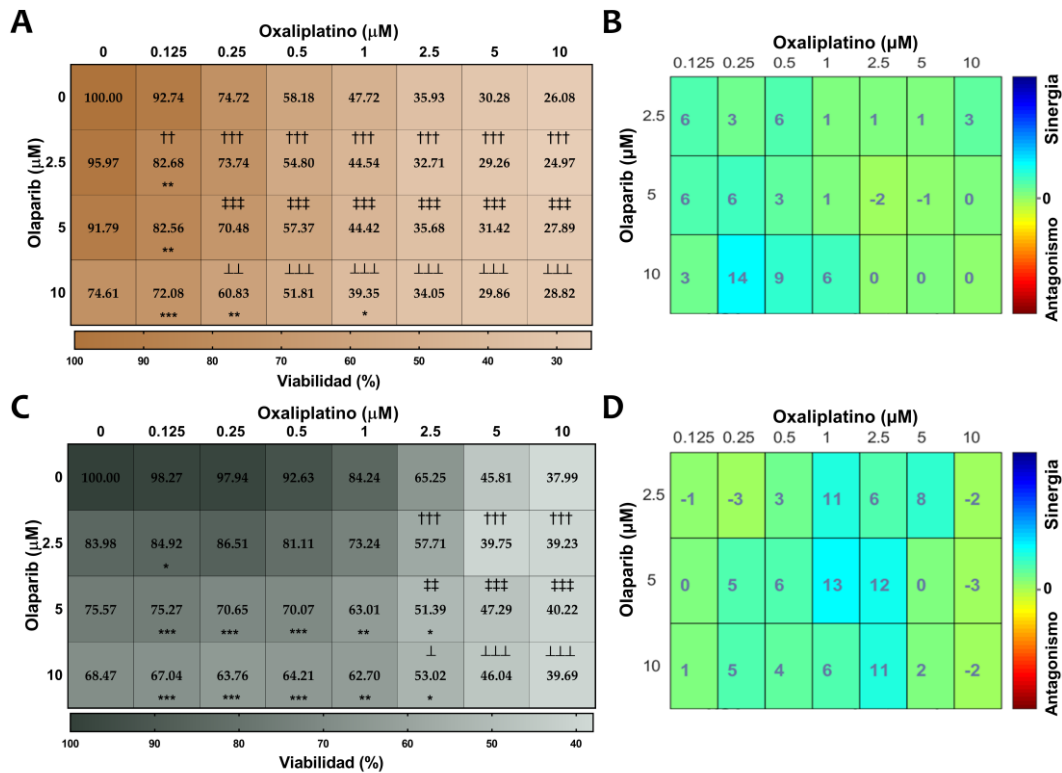


Figura 42. Mapas de calor de (A) la viabilidad de la línea CPP19 tratadas con la combinación de olaparib y oxaliplatin, (B) la puntuación del efecto sinérgico de la combinación de olaparib y oxaliplatin en la línea CPP19 según el modelo HSA, (C) la viabilidad de la línea CPP45 tratadas con la combinación de olaparib y oxaliplatin, y (D) la puntuación del efecto sinérgico de la combinación de olaparib y oxaliplatin en la línea CPP45 según el modelo HSA. $\dagger\dagger p < 0.01$, $\dagger\dagger\dagger p < 0.001$ vs. dosis 0 μM oxaliplatin y 2.5 μM olaparib; $\dagger\dagger p < 0.01$, $\dagger\dagger\dagger p < 0.001$ vs. dosis 0 μM oxaliplatin y 5 μM olaparib; $\perp p < 0.05$, $\perp\perp p < 0.01$, $\perp\perp\perp p < 0.001$ vs. dosis 0 μM oxaliplatin y 10 μM olaparib; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. olaparib 0 μM a la misma dosis de oxaliplatin. Las figuras representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes realizados por triplicados.

7. La combinación de olaparib y oxaliplatin ejerce un efecto sinérgico o antagónico sobre la población de CMCs en las células metastásicas según el estado de p53

Debido a que el uso de oxaliplatin presenta efectos secundarios relacionados con náuseas, leucopenia, trombocitopenia, anemia hemolítica y neuropatía periférica (Alcindor & Beauger 2011); y que pese a que el olaparib es el iPARP-1 con menos efectos secundarios, éstos están también relacionados con náuseas y efectos hematológicos (Roubaud et al. 2022), por lo que se seleccionaron dosis más bajas para analizar el efecto de la combinación de ambos sobre la población de CMCs. Las dosis de olaparib se mantuvieron, y se utilizaron las dosis entre 0.125 y 1 μM de oxaliplatin, en las que se observó previamente un efecto

sinérgico en cuanto a la viabilidad tras el tratamiento. La población CMC se caracterizó cuantificando la población ALDH⁺.

En la línea con wtp53, CPP19, el tratamiento con olaparib disminuye ligeramente la población ALDH⁺, aunque ésta no es significativa. Por el contrario, el tratamiento con oxaliplatino reduce significativamente la población ALDH⁺ a la dosis de 0.125 y 1 μ M. Al combinar ambos fármacos, se observa que la combinación de las dosis 0.25, 0.5 y 1 μ M de oxaliplatino con las dosis 2.5 y 5 μ M de olaparib reduce significativamente la población ALDH⁺ con respecto a la terapia simple de olaparib a esas mismas dosis. Ese mismo efecto sobre la reducción significativa de la población ALDH⁺ se observa con la dosis 10 μ M de olaparib al combinarlo con la dosis 0.5 y 1 μ M de oxaliplatino. Además, a la dosis de 0.5 μ M de oxaliplatino, la combinación con las distintas dosis de olaparib reduce significativamente la cantidad de células ALDH⁺ en comparación con el tratamiento simple con oxaliplatino a dicha dosis. Igualmente, a la dosis de 1 μ M de oxaliplatino, la dosis de 5 y 10 μ M de olaparib reducen significativamente la cantidad de CMCs tras el tratamiento comparado con el oxaliplatino por sí solo (Figura 43A). Todos estos cambios se manifiestan en la matriz de sinergia, observándose una sinergia global, excepto por las combinaciones 0.125-5 y 0.125-10 μ M de oxaliplatino-olaparib, entre ambos fármacos a la hora de reducir la población ALDH⁺, siendo las combinaciones más sinérgicas las de 1-5 y 1-10 μ M de oxaliplatino-olaparib (puntuación: 42 y 40, respectivamente) (Figura 43B). Tanto el modelo de Loewe como el de Bliss señalan también una fuerte sinergia (Anexo 9).

En el caso de la línea con mtp53, CPP45, el tratamiento con olaparib induce un aumento significativo de la población ALDH⁺ a todas las dosis ensayadas como tratamiento simple. Por su parte, el tratamiento único con oxaliplatino produce un aumento significativo de la cantidad de células ALDH⁺ a la dosis de 0.125 μ M. Aunque la combinación de oxaliplatino 0.5 y 1 μ M con la dosis 2.5 μ M supone una reducción significativa de la población ALDH⁺ con respecto al tratamiento simple con la misma dosis de olaparib, la cantidad de población CMC tras el tratamiento es mayor que cuando no se aplica ningún tratamiento. Lo mismo se observa a la dosis 0.5 μ M de oxaliplatino combinada con 10 μ M de olaparib con respecto al tratamiento solo con dicha dosis de olaparib. Además, a la dosis de 0.5 y 1 μ M de oxaliplatino combinado con 5 μ M y 10 μ M de olaparib, respectivamente, se produce un incremento significativo de la población ALDH⁺ con respecto al tratamiento simple con oxaliplatino a la misma dosis (Figura 43C).

En general se observa un aumento de la población de CMCs tras el tratamiento con olaparib y oxaliplatino que se refleja en la matriz de sinergia con puntuaciones muy negativas. Esto señala un potente antagonismo de ambos fármacos en la regulación de la población de CMCs en la línea CPP45 (Figura 43D). Estos mismos resultados se observan en el análisis de sinergia de los modelos de Loewe y Bliss (Anexo 9).

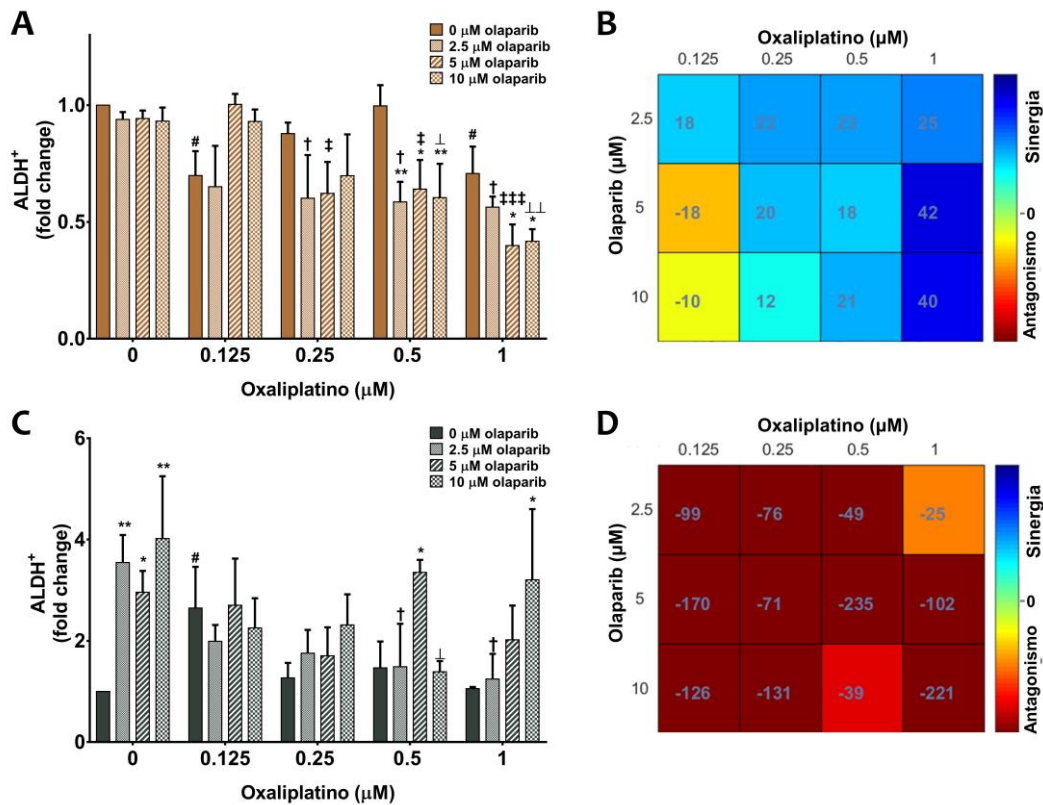


Figura 43. Efecto del oxaliplatino y olaparib en la población ALDH⁺ en (A) la línea CPP19 normalizada frente al control tratado con DMSO, (B) la puntuación del efecto sinérgico de la combinación del oxaliplatino y olaparib en la línea CPP19 según el modelo HSA, (C) la línea CPP45 normalizada frente al control tratado con DMSO, y (D) la puntuación del efecto sinérgico de la combinación del oxaliplatino y olaparib en la línea CPP45 según el modelo HSA. # $p < 0.05$ vs. dosis 0 μM oxaliplatino y 0 μM olaparib; † $p < 0.05$, vs. dosis 0 μM oxaliplatino y 2.5 μM olaparib; ‡ $p < 0.05$, ‡ ‡ ‡ $p < 0.001$ vs. dosis 0 μM oxaliplatino y 5 μM olaparib; ⊥ $p < 0.05$, ⊥ ⊥ $p < 0.01$, μM oxaliplatino y 10 μM olaparib; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. olaparib 0 μM a la misma dosis de oxaliplatino. Las figuras representan la media ± SEM de cuatro experimentos independientes.

8. El oxaliplatino y el olaparib reducen la viabilidad de las CTCs

Existen evidencias que señalan que las CTCs son más resistentes a los fármacos quimioterapéuticos, lo que las relaciona con los procesos de recaída tumoral y la adaptación tumoral a diferentes microambientes y tratamientos. Por

ese motivo, se repitieron los experimentos anteriores con oxaliplatino y olaparib para evaluar el efecto sobre la viabilidad de este tipo celular.

El tratamiento con olaparib reduce la viabilidad celular de manera significativa en ambas líneas celulares a la dosis de 10 μM ($p < 0.001$), no observándose efecto a dosis por debajo de ésta. Al comparar el efecto del fármaco entre ambas líneas celulares, se observa que a la dosis de 10 μM , la línea CTC31 presenta una disminución significativamente mayor de la viabilidad que la línea CTC45 ($p < 0.05$) (Figura 44A).

En el caso del tratamiento con oxaliplatino se experimenta una disminución significativa de la viabilidad de manera dosis-dependiente, observándose en la línea CTC31 desde la dosis 0.5 μM , y en la línea CTC45 desde la 0.25 μM . Entre la línea CTC31 y CTC 45 se observan diferencias significativas en cuanto al efecto del oxaliplatino sobre la viabilidad celular a distintas dosis. A la dosis 0.25 μM la reducción de la viabilidad es significativamente mayor en la línea CTC45 que en la línea CTC31 ($p < 0.05$). Sin embargo, a partir de la dosis de 1 μM este efecto se revierte, de manera que la reducción de la viabilidad es mayor en la línea CTC31 que en la línea CTC45, siendo significativa a la dosis de 1 μM ($p < 0.001$) y 10 μM ($p < 0.01$) (Figura 44B). Los valores de IC_{50} para el oxaliplatino son de 5.07 ± 0.43 para la línea CTC31, mientras que a la dosis de 10 μM , la línea CTC45 presenta una viabilidad del 51,7% de manera que no es posible el cálculo de la IC_{50} . La IC_{50} en las CTCs es mayor que en las líneas metastásicas estudiadas.

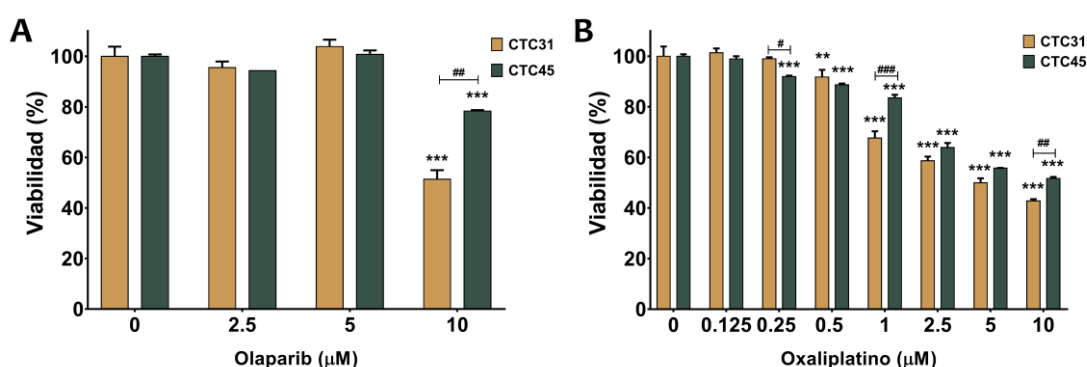


Figura 44. Inhibición de la viabilidad tras las 72 horas con los tratamientos de (A) olaparib y (B) oxaliplatino en las líneas CTC31 y CTC45. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. control tratado con DMSO, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ y ### $p < 0.001$ vs. la misma dosis entre CTC31 y CTC45. Las figuras representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes.

9. La combinación de olaparib y oxaliplatino ejerce un efecto sinérgico sobre la viabilidad en las CTCs a dosis elevadas

Posteriormente se evaluó en las CTCs si la combinación de ambos fármacos tenía un impacto positivo sobre la reducción de la viabilidad celular tras el tratamiento.

En el caso de la línea CTC31, la combinación de olaparib 2.5 y 5 μM con oxaliplatino produce una disminución significativa de la viabilidad a partir de la dosis 0.5 μM de oxaliplatino con respecto al tratamiento único con las mismas dosis de olaparib. En el caso de la dosis 10 μM , la reducción significativa de la viabilidad se observa a partir de la combinación con la dosis 2.5 μM de oxaliplatino. Por otra parte, la combinación de la dosis 10 μM de olaparib con cualquier dosis de oxaliplatino produce un descenso significativo de la viabilidad con respecto al uso de oxaliplatino por sí solo (Figura 45A).

Al trasladar estos resultados a la matriz de sinergia según el modelo HSA se observa que, aunque la combinación de olaparib a 2.5 μM con dosis de oxaliplatino entre 0.125-1 μM se obtienen resultados positivos, éstos no son muy altos. En general se observa un ligero antagonismo entre ambos fármacos, excepto a dosis elevadas de ambos fármacos donde se observa sinergia. Concretamente, en la combinación de olaparib 10 μM con las dosis 2,5, 5 y 10 μM de oxaliplatino, con puntuaciones de 11, 15 y 11, respectivamente (Figura 45B). El modelo de sinergia de Loewe muestra resultados similares a los de HSA, mientras que el de Bliss revela un antagonismo general entre ambos fármacos (Anexo 9).

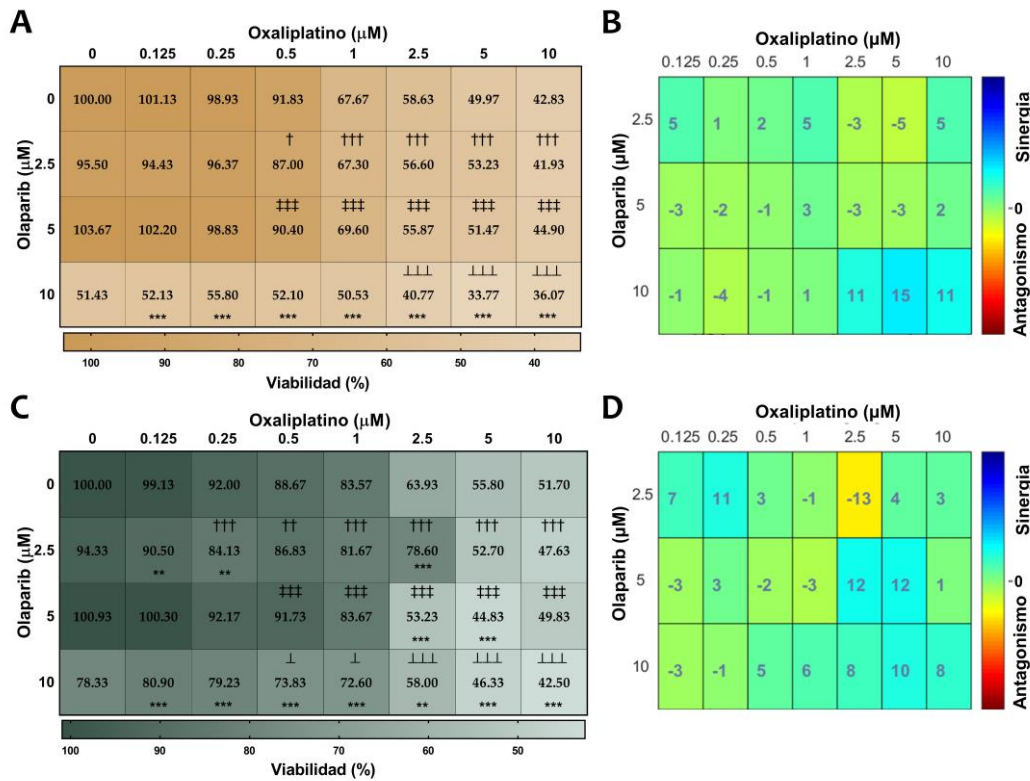


Figura 45. Mapas de calor de (A) la viabilidad de la línea CTC31 tratadas con la combinación de olaparib y oxaliplatino, (B) la puntuación del efecto sinérgico de la combinación de olaparib y oxaliplatino en la línea CTC31 según el modelo HSA, (C) la viabilidad de la línea CTC45 tratadas con la combinación de olaparib y oxaliplatino, y (D) la puntuación del efecto sinérgico de la combinación de olaparib y oxaliplatino en la línea CPP45 según el modelo HSA. † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$, ††† $p < 0.001$ vs. dosis 0 μM oxaliplatino y 2.5 μM olaparib; ‡ ‡ ‡ $p < 0.001$ vs. dosis 0 μM olaparib; † † † $p < 0.05$, † † † † $p < 0.001$ vs. dosis 0 μM oxaliplatino y 10 μM olaparib; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. olaparib 0 μM a la misma dosis de Oxaliplatino. Las figuras representan la media ± SEM de tres experimentos independientes.

En la línea CTC45, la combinación de olaparib y oxaliplatino reduce la viabilidad de manera significativa a partir de la dosis 0.25 μM de oxaliplatino comparado con el monoterapia con olaparib 2.5 μM, sin embargo, para la dosis de 5 y 10 μM de olaparib lo hace a partir de la combinación con la dosis 0.5 μM de oxaliplatino. Por su parte, la combinación con olaparib 2.5 μM reduce significativamente la viabilidad, combinado con las dosis de 0.125 y 0.25 μM de oxaliplatino, pero la aumenta cuando se combina con la dosis 2.5 μM con respecto al tratamiento simple solo con oxaliplatino. Por otra parte, la combinación con olaparib 5 μM reduce significativamente la viabilidad junto con las dosis 2.5 y 5 μM de oxaliplatino en relación con el tratamiento solo con oxaliplatino, mientras que la combinación de 10 μM de olaparib la reduce cuando se combina con todas las dosis de oxaliplatino (Figura 45C). Estos resultados se manifiestan en la matriz de sinergia según el modelo de HSA. De esta forma, se observa cierta sinergia en

la combinación de 2.5 μM olaparib con las dosis 0.125 y 5 μM de oxaliplatino, y un fuerte antagonismo con la dosis 2.5 μM de oxaliplatino (puntuación: -13). La dosis 5 μM de olaparib presenta la mayor sinergia con las dosis 2.5 y 5 μM de oxaliplatino (puntuación: 12). La dosis 10 μM de Olaparib presenta un ligero antagonismo a dosis bajas de oxaliplatino, pero sinergia al combinarse con dosis igual o superiores a 0.5 μM de oxaliplatino (Figura 45D). El modelo de Loewe por su parte señala un fuerte antagonismo a dosis bajas de oxaliplatino, excepto al combinarse con la dosis 2.5 μM de olaparib, y sinergia a las dosis más elevadas de oxaliplatino combinadas con las dosis más altas de olaparib. Sin embargo, el modelo de Bliss solo mantiene la sinergia observada en el modelo de HSA a la dosis de 2.5 y 5 μM de olaparib, y antagonismo a todas las dosis combinadas con 10 μM de olaparib (Anexo 10).

En líneas generales, en las CTCs se observa un desplazamiento de la sinergia hacia las dosis más elevadas de olaparib y oxaliplatino, en comparación con el análisis de la sinergia de las líneas derivadas de las metástasis.

10. El tratamiento con olaparib en CTCs aumenta el marcador de CMCs CD44v6 cuando p53 está mutado

Pese a que los efectos sinérgicos se encuentran a dosis elevadas de oxaliplatino, para el estudio del efecto de la combinación del tratamiento combinado de olaparib y oxaliplatino se volvieron a seleccionar las mismas dosis que las ensayadas previamente para el estudio sobre las CMCs en las líneas metastásicas.

En la línea wtp53, CTC31, cerca del 100% de la población es CD44v6⁺, y el tratamiento con oxaliplatino u olaparib, o su combinación, no produce cambios en la población CD44v6⁺ (Figura 46A).

En cambio, en la línea con mtp53, CTC45, la población CD44v6⁺ es del 72%, y mientras que el tratamiento con oxaliplatino parece reducir la población CD44v6⁺, el tratamiento con olaparib o la combinación de ambos fármacos la aumenta (Figura 46B). Sin embargo, ninguno de estos cambios es significativo.

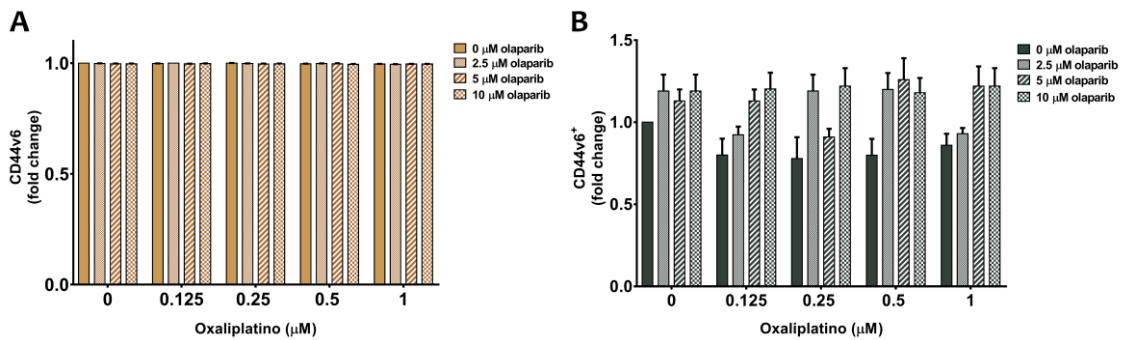


Figura 46. Efecto del oxaliplatino y olaparib en la población CD44v6 en (A) la línea CTC31 normalizada frente al control tratado con DMSO, y (B) la línea CTC45 normalizada frente al control tratado con DMSO. Las figuras representan la media \pm SEM de dos experimentos independientes.

Dado que en el caso de la línea CTC45, al tratar con olaparib, tanto individualmente como al combinarse con el oxaliplatino, provoca un aumento de la población CD44v6⁺, a continuación, analizamos qué ocurriría también en términos de intensidad al tratar solo con olaparib.

Curiosamente, en el caso de la línea CTC31, aunque no se producen cambios al tratar con olaparib en términos de porcentaje de población, si se produce una ligera disminución en términos de intensidad (Figura 47A). En la línea CTC45, además del aumento de la población CD44v6⁺ con el tratamiento, se observa un aumento de la intensidad del marcador CD44v6⁺ con todas las dosis del tratamiento con olaparib (Figura 47B).

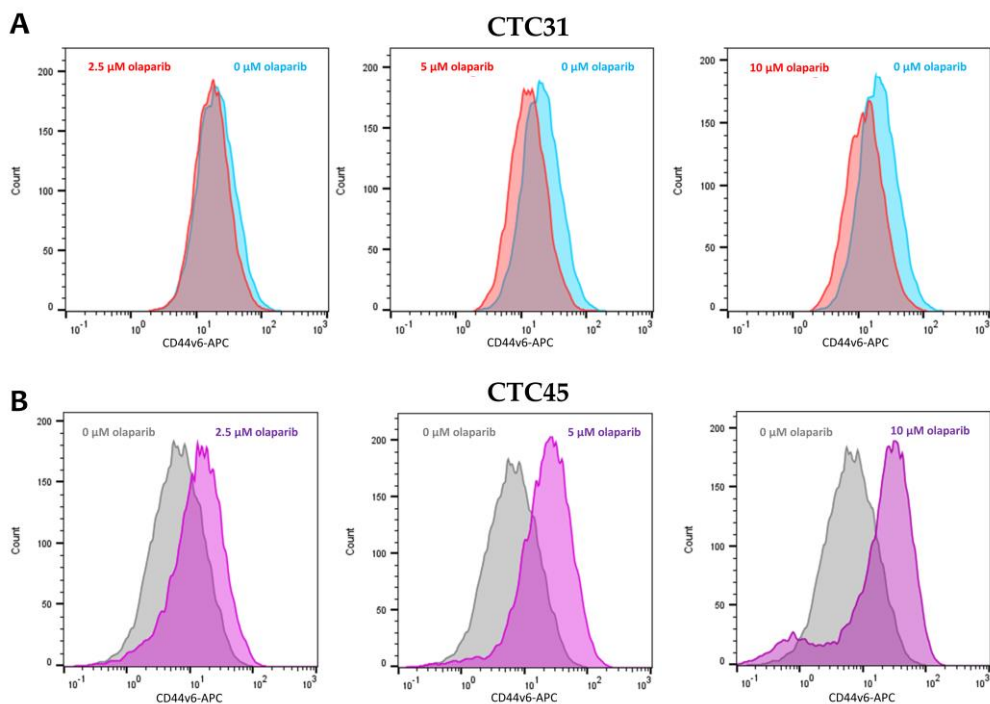


Figura 47. Histogramas para CD44v6-APC de células control tratadas con DMSO y tratadas con Olaparib 2,5, 5 y 10 μ M para las líneas (A) CTC31, y (B) CTC45.

DISCUSIÓN

El cáncer es una enfermedad compleja y heterogénea que puede afectar a cualquier tejido u órgano del organismo caracterizada por el crecimiento anómalo y descontrolado de células que además tienen la capacidad de diseminarse e invadir a otros órganos. Su desarrollo está relacionado con la transformación de células sanas en malignas a través de la alteración progresiva y secuencial de genes supresores de tumores y oncogenes. Como consecuencia de estas alteraciones se van a ver afectados distintos procesos biológicos como la proliferación celular, el metabolismo, la capacidad invasiva o la respuesta inmunitaria, entre otros, que acaba provocando la aparición y progreso de la enfermedad (Hanahan 2022). El cáncer, además de ser dinámico y evolucionar durante el transcurso de la enfermedad, puede surgir a partir de la alteración de distintos genes, incluso entre aquellos tumores clasificados dentro mismo tipo histológico, lo cual le proporciona diferentes características moleculares que van a dificultar su manejo clínico (Burrell et al. 2013).

Entre los órganos que se pueden ver afectados por la enfermedad se encuentra el intestino grueso, dando lugar al cáncer de colon y de recto, que, aunque son entidades diferentes suelen considerarse juntos, representando la suma de ambos el CCR. El CCR es el tercer cáncer más diagnosticado a nivel mundial, y el segundo en términos de mortalidad (Bray et al. 2024). A pesar de que en los últimos años se han hecho grandes avances en lo que respecta a la prevención, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad, éstos no se han traducido realmente en mejoras clínicas sustanciales, especialmente en estadios II y III en los que es más frecuente el diagnóstico de esta enfermedad (Rawla et al. 2019). A esta falta de mejora clínica, hay que sumarle el preocupante aumento de la incidencia en individuos menores de 50 años donde este tipo de tumor era poco frecuente, lo que supone un grave problema sanitario, social y económico (Loomans-Kropp & Umar 2019).

En la última década se ha puesto especial interés en establecer un sistema de estratificación con el poder predecir mejor la prognosis de la enfermedad y la elección de tratamientos. Sin embargo, pese a que se han descrito 4 posibles subtipos consensuados de CCR (CMS1-4), existen características compartidas entre subtipos, un alto porcentaje de los casos no pueden estratificarse en ninguno de ellos, y según una reciente revisión sistemática, la clasificación propuesta no puede ser utilizada en la práctica clínica (Guinney et al. 2015)(Alwers et al. 2019). Esto revela la necesidad de la búsqueda de nuevos marcadores biológicos con los que mejorar la detección y pronóstico de este tipo

de cáncer, así como la predicción de la posible respuesta al tratamiento a los fármacos actuales u otros fármacos que se encuentren actualmente en ensayos clínicos.

En este contexto, esta tesis de investigación se ha basado en el estudio de PARP-1, una poli-(ADP-Ribosa) polimerasa que originalmente se había asociado a los procesos de reparación del ADN, pero que en los últimos años se ha relacionado con la regulación de múltiples procesos como la respuesta inmunitaria, metabolismo, transcripción, proliferación o diferenciación celular entre otros (Rodríguez et al. 2015)(Demény & Virág 2021). Muchos de estos procesos, o al menos su alteración, están estrechamente relacionados con el proceso de carcinogénesis. Pese a que los estudios en modelos murinos y de análisis de polimorfismos señalan que esta proteína tendría un papel como supresor tumoral (Pazzaglia & Pioli 2019)(Li et al. 2020), se encuentra sobreexpresada en distintos tipos de cáncer incluyendo glioblastoma, leucemia, pulmón, mama, u ovario, entre otros, indicando un posible papel como protoncogen (Ossovskaya et al. 2010)(Pazzaglia & Pioli 2019)(Gonçalves et al. 2011). De hecho, en algunos tipos de tumores, concretamente en cáncer de ovario y de mama con deficiencias en *BRCA1/2*, la inhibición de PARP-1 ha resultado ser clínicamente relevante (Rose et al. 2020). Sin embargo, la contribución real de PARP-1 al inicio y progresión tumoral sigue sin estar clara, encontrándose asociaciones entre ésta y determinadas características clínico-patológicas que no son consistentes entre estudios, incluso dentro del mismo tipo de cáncer; o sobre el beneficio real del uso de iPARP-1 independientemente del estado de *BRCA1/2* (Bellio et al. 2019)(Jiao et al. 2017). En el caso del CCR, existen muy pocos estudios sobre la importancia de su expresión en este tumor, más allá de que se encuentra sobreexpresado con respecto a la mucosa normal (Nosho et al. 2006)(Dziaman et al. 2014)(Dörsam et al. 2018)(Lucena-Cacace et al. 2018)(Mabley et al. 2004).

En este trabajo de investigación se pretende esclarecer el papel que PARP-1 desempeña en el CCR. Para ello, el estudio se divide en tres partes principales: una sobre la contribución de PARP-1 y su efecto en el desarrollo del CCR, otra sobre el mecanismo a través del cual podría actuar y como se ve afectado por el uso de olaparib, y, por último, el análisis del perfil de PARP-1 en metástasis y CTCs, y el efecto del tratamiento combinado de oxaliplatino y olaparib.

En primer lugar, se analizó la expresión de *PARP-1* en una cohorte de pacientes con CCR. Al igual que en otros tipos de cáncer, incluyendo el CCR, la expresión de PARP-1 se encuentra sobreexpresada en el tejido tumoral con

respecto a la mucosa no tumoral adyacente (Ossovskaya et al. 2010)(Nosho et al. 2006)(Dziaman et al. 2014)(Dörsam et al. 2018)(Xu et al. 2024). Además, esta sobreexpresión es independiente del estado *TP53*, observándose tanto en individuos con tumores *mtp53* como con *wtp53*. El hecho de que se encuentre sobreexpresada sugiere un potencial papel como protooncogen, sin embargo, estudios en modelos murinos señalan que la ausencia de PARP-1 resulta en una mayor formación de tumores en el colon y de nódulos hepáticos, por lo que realmente podría tratarse de un supresor tumoral (Nozaki et al. 2003). Esto último se ve apoyado por estudios de polimorfismos genéticos en humanos que señalan que las variantes Lys933Asn y Lys945Asn se asocian con un mayor riesgo de desarrollar CCR (Alshammari et al. 2014), o la variante Val762Ala, que se asocia con un mayor riesgo de desarrollo cáncer gástrico, de útero y mama (Li et al. 2020). Dichas variantes se asocian a una disminución drástica de la actividad de PARP-1 (Alshammari et al. 2014)(Li et al. 2020). Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con otros supresores tumorales, las mutaciones o la pérdida de heterocigosidad raramente se observa en *PARP-1* (Nosho et al. 2006), sino que es más frecuente encontrar amplificaciones de brazo 1q donde se localiza su gen, lo que explicaría el motivo de su sobreexpresión (Jacobs & Norton 2021). Dörsam y col., en su trabajo señalan que esta dicotomía, entre anti-tumoral o protumoral, sería producida porque antes de iniciarse el proceso de carcinogénesis PARP-1 protege frente a éste, probablemente por su papel en el mantenimiento de la integridad genómica, pero que una vez iniciado, ésta podría contribuir a la progresión tumoral favoreciendo un estado pro-inflamatorio (Dörsam et al. 2018). No obstante, incluso una vez iniciado el proceso tumoral, PARP-1 podría ejercer funciones pro-tumorales o anti-tumorales según el contexto, sugiriendo que las características moleculares del tumor y del entorno podrían influir en su papel en el CCR (Weaver & Yang 2013).

De hecho, la relación de PARP-1 con las características clínico-patológicas no es del todo consistente entre estudios, observándose diferencias entre estos, ratificando que el papel de PARP-1 podría estar en gran medida influido por el contexto tumoral (Thakur et al. 2021). En nuestro trabajo, la expresión de *PARP-1* se correlaciona solamente con el grado de diferenciación, concretamente con tumores pobre o moderadamente diferenciados, mientras que en otros trabajos de CCR se asocia, además de con el grado de diferenciación, con estadios avanzados y metástasis distal e invasión (Xu et al. 2024), con la progresión tumoral (Dörsam et al. 2018); o simplemente con el tamaño del tumor (Nosho et al. 2006). Al extender la asociación de *PARP-1* con las características clínico-

patológicas de otros tipos tumorales, se observa una gran variabilidad en la asociación de la expresión de *PARP-1* con características como la edad, localización, metástasis, tamaño u otras características concretas de cada tipo de tumor. Sin embargo, en general se observa una asociación frecuente con el grado de diferenciación, especialmente en tumores pobre o moderadamente diferenciados, en cáncer de mama (Rojo et al. 2012), del sistema nervioso central (Barton et al. 2009), o gástrico (Liu et al. 2016). A diferencia de todos estos estudios, en nuestro trabajo estratificamos a la cohorte según el estado de p53 en mutados o salvaje, y observamos que la asociación con el grado de diferenciación se mantiene en aquellos casos wtp53, pero desaparece en los mtp53, lo cual revela que *PARP-1* podría tener un efecto diferente sobre las características clínico-patológicas según el contexto de p53. *TP53* es un supresor tumoral que se estima que se encuentra mutado en aproximadamente el 50% de los cánceres humanos, aunque su tasa de mutación varía ampliamente según el tipo de cáncer estudiado, siendo de aproximadamente un 43% en el CCR (Liebl & Hofmann 2021). Sin embargo, a pesar de ser uno de los genes más mutados en el cáncer, la mayoría de los estudios no suelen analizarse en el contexto de p53, pese a la relevancia de éste en el proceso de carcinogénesis, probablemente debido a que las mutaciones de este gen son variables y sus efectos diversos, lo que implica que dos mutaciones distintas no desencadenan necesariamente el mismo fenotipo (Butera & Amelio 2024).

Debido a la asociación con diferentes características clínico-patológicas, *PARP-1* también podría relacionarse con la prognosis y/o supervivencia en cáncer, y, por tanto, ser utilizado como biomarcador. En nuestra cohorte de estudio, una vez estratificada según el estado de p53, mutado y salvaje, y la expresión de *PARP-1* en base al valor de la mediana, *PARP-1* alto o bajo, se observa como en los pacientes con una elevada expresión de *PARP-1* y mtp53 presentan una mayor supervivencia global y libre de enfermedad que aquellos con baja expresión de *PARP-1*. Además, el análisis de regresión multivariado de Cox señala que la expresión alta de *PARP-1* es un factor de pronóstico independiente para la supervivencia en pacientes con mutaciones en p53. Por otro lado, en los pacientes wtp53 no se observa ninguna relación con la supervivencia. Estos datos vuelven a señalar que el estado de p53 podría ser clave para entender el posible efecto dual de *PARP-1* en un contexto tumoral. Hasta donde sabemos, este trabajo es el primero en relacionar la expresión, alta o baja, de *PARP-1* con la supervivencia global y libre de enfermedad en CCR, o al menos en una cohorte heterogénea de pacientes, aunque con la limitación de una infra-

representación de casos de cáncer rectal. No obstante, es cierto, que existe un estudio previo que señala que la expresión alta de *PARP-1* se asocia con peor prognosis y supervivencia, pero en pacientes con cáncer de recto localmente avanzado que han recibido terapia neoadyuvante. Además, en ese estudio señalan que la expresión de *XRCC2*, y no solo *PARP-1*, influirían en la supervivencia y la prognosis (Qin et al. 2022). Otro estudio más reciente, en CCR vuelve a señalar que la expresión de *PARP-1* se asocia con peor tasa de supervivencia, sin embargo, en este caso es importante señalar que en este trabajo sólo se determina la relación con la supervivencia en base a la presencia o ausencia de *PARP-1* y no con su nivel de expresión (Xu et al. 2024). Un meta-análisis sobre la expresión de *PARP-1* señala que, en líneas generales, una elevada expresión de *PARP-1* se relaciona con peor prognosis (Thakur et al. 2021). Trabajos más recientes en melanoma, señalan que, aunque una mayor expresión de *PARP-1* sí se asocia con un peor pronóstico, esto realmente solo ocurre en casos de melanoma metastásicos (Fröhlich et al. 2024). Del mismo modo, en el mismo metanálisis anterior se describen trabajos que señalan que la expresión elevada de *PARP-1* se asocia con mejor pronóstico en cáncer de páncreas y de mama (Aiad et al. 2015)(Klauschen et al. 2012). Otros trabajos más recientes y no incluidos, vuelven a señalar que la expresión alta de *PARP-1* en cáncer pancreático es un marcador de buen pronóstico de la enfermedad (Yim et al. 2024). Esta diversidad de resultados en cuanto a su papel como marcador de buen o mal pronóstico de la enfermedad queda patente en varios tipos de cáncer, como por ejemplo el gástrico, donde dos estudios diferentes señalan que la alta expresión de *PARP-1* se relaciona con un peor o mejor pronóstico (Liu et al. 2016)(Park et al. 2022). Las diferencias en términos de supervivencia entre los estudios podrían atribuirse a diferencias en el tipo de tumor estudiado, el diseño del estudio, a cómo se realiza el *cut-off* para determinar la expresión alta o baja, o probablemente por la influencia del contexto genómico. Con respecto a esto último, nuestro trabajo señala que el estado de *TP53*, que además no se ha tenido en cuenta en ninguno de los estudios mencionados, podría influir, y, por tanto, el número de individuos reclutados con mutaciones o no en este gen, podrían explicar el efecto de *PARP-1* y la discrepancia entre estudios. La importancia del estado de *p53* queda también patente en un estudio realizado en glioblastoma donde se señala que la expresión alta de *PARP-1* combinada con un estado salvaje de *p53* se asocia con tasas de supervivencia menores que la del resto de grupos estudiados (Murnyák et al. 2017). Sin embargo, el estado de *p53* podría no ser el único factor a la hora de determinar si la expresión de *PARP-1* podría usarse

como marcador de buen o mal pronóstico, ya que como señala un estudio en cáncer de ovario, la expresión alta de *PARP-1* se asocia con un peor pronóstico; sin embargo, al ponerlo también en el contexto de *EVI1*, un proto-oncogen relacionado con la vía TGF- β , la expresión elevada de *PARP-1* se asocia con un mejor pronóstico (Jank et al. 2023). Esto vuelve a reflejar la importancia del contexto tumoral a la hora de determinar el posible papel de *PARP-1* en el desarrollo tumoral.

La asociación de una elevada expresión de *PARP-1* con mejores tasas de supervivencia en pacientes con *mtp53* podría ser una consecuencia directa de dichas mutaciones. Las mutaciones en *p53* se relacionan con una mayor predisposición a la inestabilidad genómica (Janic, Abad, & Amelio 2024), de manera que un aumento de la inestabilidad genómica podría resultar en un aumento de la actividad de los sistemas de reparación del ADN, entre ellos *PARP-1*. De hecho, se ha descrito que se produce un aumento de la cantidad de proteínas PARiladas en el núcleo en contextos en los que *p53* está mutado (Polotskaia et al. 2015). Un aumento exacerbado de la actividad de *PARP-1* podría resultar en la depleción de ATP, niveles tóxicos de poli-ADP-ribosa, y disfunción mitocondrial que acabaría resultando en muerte celular por *parthanatos* (Huang et al. 2022). Esta estrategia la están utilizando actualmente algunos grupos para el tratamiento de algunos tipos de cáncer (Maru et al. 2023). En el caso concreto de CCR, se ha observado que el uso de inhibidores de *ETS1*, un proto-oncogen relacionado con las CMCs, resulta en una hiperPARilación y muerte por *parthanatos* especialmente en el contexto de mutaciones de *p53* (Dinhof et al. 2020). Esto sugiere que la hipótesis de que la mayor tasa de supervivencia en el contexto de mutaciones de *p53* y expresión alta de *PARP-1* por aumento de la PARilación y de la muerte por *parthanatos* es plausible, aunque son necesarios más estudios para corroborarlo.

Otra posible explicación a las diferencias en supervivencia observadas podría estar en la asociación de *PARP-1* con tumores pobre o moderadamente diferenciados en tumores con *wtp53*. El grado de diferenciación, concretamente los tumores indiferenciados, se relaciona con la presencia de CMCs (Zhao et al. 2016)(Ben-Porath et al. 2008)(Mohanta et al. 2017). Las CMCs son una subpoblación de células tumorales que se caracterizan por su capacidad de generar nuevos tumores, sostener el crecimiento del tumor, metástasis, resistencia al tratamiento y la recaída (Batlle & Clevers 2017). Como era esperable, el análisis de la expresión de *CD44* y *CD133*, dos marcadores de CMCs,

muestra una mayor expresión en el tejido tumoral que el tejido no tumoral adyacente (Ehteram et al. 2022)(Wang et al. 2019). En nuestra cohorte, la expresión de *PARP-1*, se correlaciona de forma positiva con la expresión de *CD44* y *CD133* sugiriendo que la expresión de *PARP-1* sería mayor en las CMCs. Esta mayor expresión de *PARP-1* en las CMCs se ha descrito anteriormente en CCR (Jarrar et al. 2019), cáncer de mama (Gilabert et al. 2014), y glioblastoma (Venere et al. 2013). Aunque esto podría ser una consecuencia del proceso de tumorigénesis y estar relacionado con éste, también podría ser una consecuencia de la biología de las CMCs y de las células madre en general o de su mantenimiento, ya que presentan sistemas de reparación del ADN mucho más robustos con el fin de mantener la integridad genómica (Rizvi et al. 2021)(Gillespie, Ward, & Davies 2023).

Dado que a nivel práctico la identificación de CMCs es compleja ya que este subtipo celular consiste en una población heterogénea, la aproximación más óptima para su identificación es la combinación de distintos marcadores y/o características de éstas (Lan & Behrens 2023). Por ese motivo se estratificó a los pacientes en base a la expresión de *PARP*, y la expresión de los marcadores de CMCs, *CD44*_{ALTO}*CD133*_{ALTO} y *CD44*_{BAJO}*CD133*_{BAJO}, según sus valores de la mediana. Al tener en cuenta todos los tumores, una expresión alta de *PARP-1* se asocia con niveles altos de *CD44CD133*. Sin embargo, en el contexto de p53, se observa que esta asociación solo se mantiene en aquellos tumores wtp53, en concordancia con los datos obtenidos en las características clínico-patológicas. Además, al analizar la expresión de *PARP-1* en el grupo *CD44*_{ALTO}*CD133*_{ALTO} se observa que es mayor que en el grupo *CD44*_{BAJO}*CD133*_{BAJO}, pero solamente al tener en cuenta todos los tumores o los tumores con wtp53. Estos resultados parecen confirmar que en las CMCs hay una mayor expresión de *PARP-1* (Jarrar et al. 2019)(Gilabert et al. 2014)(Venere et al. 2013). Sin embargo, al mismo tiempo sugieren que la expresión de *PARP-1* favorece el fenotipo de CMCs dependiendo del estado de p53.

Para validar estos resultados, se desarrolló un modelo *in vitro* utilizando dos líneas isogénicas de CCR, con diferente estado de p53, HCT-116 (p53 salvaje) y HCT-116 p53^{-/-} (p53 *knock-out*) en las que se sobreexpresó *PARP-1* de forma transitoria.

En este modelo se observa que la sobreexpresión de *PARP-1* aumenta el porcentaje de población ALDH1⁺, otro marcador de CMCs (Munro et al. 2018)(Najafi et al. 2019), en la línea HCT-116, mientras que en la línea HCT-116

p53^{-/-} la disminuye. Para hacer una mejor caracterización de la población de CMCs también se analizó el efecto sobre los marcadores de superficie de CMCs analizados en la cohorte de pacientes, además del marcador de CMCs CD326 (Munro et al. 2018). Se obtuvieron resultados similares, observándose un aumento de la población CD44CD326^{ALTO} y CD44CD326CD133^{ALTO} en la línea HCT-116 tras la sobreexpresión de PARP-1, pero una disminución de la población CD44CD326^{ALTO} en HCT116 p53^{-/-}. En ésta última no se pudo analizar el triple marcaje al no detectarse población CD133⁺ tal y como se ha descrito en otros estudios (Chen et al. 2018). Otra de las características de las CMCs en cultivo es su capacidad de formación de esferoides, relacionada con su capacidad de autorrenovación y generación de nuevos tumores (Chaicharoenaudomrung, Kunhorm, & Noisa 2019). A través de este ensayo funcional confirmamos que la sobreexpresión de PARP-1 en la línea con wtp53 aumenta las propiedades de las CMCs, mientras que en la línea mtp53 las reduce. De esta forma, los resultados *in vitro* confirman los resultados obtenidos en la cohorte de pacientes, sugiriendo que la sobreexpresión de PARP-1 ejerce efectos benignos o perjudiciales dependiendo del estado de p53 a través de la regulación diferencial del fenotipo de las CMCs en el CCR.

Este resultado podría ser específico de este tipo de cáncer, ya que no existen otros trabajos que evalúen el efecto de la sobreexpresión de PARP-1 sobre la población de CMCs en otros tipos de tumor. Los pocos trabajos existentes simplemente se centran en describir la mayor expresión de PARP-1 en CMCs (Jarrar et al. 2019)(Gilabert et al. 2014)(Venere et al. 2013), o en cómo el uso de iPARP-1 reduce la población CMCs en cáncer de mama (Shimo et al. 2014), sensibiliza a la población de CMCs al tratamiento con 5-FU/oxaliplatino/leucovorina en CCR (Jarrar et al. 2019), o reduce la población de CMCs además de sensibilizarla a la radiación (Venere et al. 2013). Por el contrario, también existen estudios que indican que las CMCs pese a presentar mayor nivel de PARP-1 son resistentes al tratamiento con olaparib en cáncer de mama (Gilabert et al. 2014). Sin embargo, realmente existen estudios que apoyan nuestros datos en varios tipos de cáncer, aunque éstos no se han analizado en el contexto de p53, lo que genera parte de la controversia que se aprecia en la literatura. Por un lado, un estudio en líneas de cáncer de páncreas en ratón señala que la inhibición o la eliminación genética de PARP-1 resulta en la reducción de las características de CMCs, similar al resultado obtenido en un estudio centrado en neuroblastoma en el que se observa que PARP-1 promueve el fenotipo stem (Quiñonero et al. 2022)(Long et al. 2018). Ambos estudios utilizan líneas con p53

salvaje. Por otro lado, un estudio en cáncer de ovario muestra que, aunque el tratamiento con inhibidores de PARP-1 reduce el tamaño del tumor, éste provoca un enriquecimiento de la población de CMCs (Bellio et al. 2019). Este último resultado inicia una controversia entre estudios, y puede llevar a la idea de que el enriquecimiento en CMCs puede ser característico de la subpoblación concreta que están estudiando, CD133⁺ y CD117⁺, sin embargo, este estudio utiliza líneas celulares con p53 mutado. Por tanto, esta controversia, puede no ser una controversia como tal, sino una consecuencia de la regulación diferencial de la población de CMCs descrita en nuestro trabajo. Esta aparente relación entre PARP-1 y p53 estaría apoyada por el hecho de que en CCR la respuesta a iPARP-1 dependería del estado de p53 (Smeby et al. 2020).

Todos estos resultados coinciden con nuestro estudio, que indica que PARP-1 regula de forma diferencial el fenotipo de CMC en función del estado de p53, con el consiguiente impacto en el pronóstico del paciente. Sin embargo, estos resultados no indican el mecanismo a través del cual se produce este efecto.

Por tanto, el uso de i-PARP-1 podría ser beneficioso para aquellos pacientes con una elevada expresión de PARP-1 y un wtp53, mientras que podría ser perjudicial para aquellos pacientes con una elevada expresión de PARP-1 y mtp53.

En la segunda parte se exploró el mecanismo, o al menos uno de los potenciales mecanismos, a través del cual PARP-1 podría ejercer su regulación diferencial sobre las CMCs según el estado de p53. En condiciones fisiológicas normales, PARP-1 participa en la regulación del funcionamiento del reloj circadiano a través de la fosforilación de CLOCK, lo cual reduce su afinidad por el ADN afectando a la parte negativa del bucle de retroalimentación que regula molecularmente el ritmo (Asher et al. 2010). Este hecho junto con la relación entre p53 y PARP-1 (Fischbach et al. 2018), y entre p53 y los ritmos circadianos (Jiang et al. 2016)(Gotoh et al. 2015), así como de la influencia de los ritmos circadianos en el fenotipo y cantidad de las CMCs en el tumor (De et al. 2020), nos llevó a la hipótesis de que el efecto descrito anteriormente podría estar mediado por una regulación diferencial de los ritmos circadianos según p53, y el subsiguiente efecto sobre las CMCs.

Comparado con el tejido no tumoral adyacente, las muestras tumorales de los pacientes de CCR presentan una alteración general de los genes del reloj circadiano. Concretamente, se observa una disminución de los niveles de expresión de *BMAL1*, *PER1*, *PER2*, *PER3* y *REV-ERBβ*. Este tipo de alteraciones

se ha observado, en líneas generales, en otros tipos de tumores, sugiriendo un posible papel como supresores de tumores de estos genes (Ye et al. 2018). En el contexto del estado de p53 se mantienen estas alteraciones, a excepción del caso de *REV-ERB β* , ya que en aquellos tumores con mtp53 las diferencias significativas dejan de observarse. Al comparar la expresión de estos genes entre los tumores con wtp53 y mtp53 se observa una tendencia general de una mayor expresión de estos genes en los tumores con wtp53, siendo significativa en el caso de *PER1*, probablemente relacionada con la compleja regulación bidireccional en el eje p53 – ritmos circadianos (Valafar, Zaravinos, & Bonavida 2021).

Una menor expresión de *BMAL1*, y *PER1-3* se asocia con un peor pronóstico en CCR (Liu et al. 2023), por lo que, según los datos de nuestra cohorte en los que se observa una menor expresión o tendencia a ésta en los tumores mtp53, podría explicar que la peor prognosis descrita en algunos estudios en tumores con mutaciones en p53 (Nakayama & Oshima 2019), podría estar mediada en parte por los ritmos circadianos.

A continuación, con el objetivo de poder determinar la potencial relación de los genes del reloj y las CMCs, asociamos la expresión alta o baja de los genes del reloj con la expresión alta o baja de la combinación de los marcadores de CMCs *CD44* y *CD133*, en los pacientes estratificados según el estado de p53.

En el caso de los pacientes con mtp53 no se encuentran asociaciones significativas entre la expresión alta o baja de los genes del reloj y los marcadores de CMCs, mientras que en los tumores con wtp53 se observan con los genes *PER1*, *PER3*, *CLOCK* y *REV-ERB β* . Estos resultados sugieren un potencial papel diferencial del reloj circadiano en relación con las CMCs según el contexto de p53. La relevancia del estado de p53 en la regulación circadiana diferencial de diferentes funciones fisiológicas, como la actividad locomotora, ha sido descrita, aunque su contribución a la mayoría de los procesos biológicos sigue siendo desconocida (Hamada, Niki, & Ishida 2014).

Concretamente en los tumores con wtp53 se observa como la expresión alta de *PER1* se asocia con la expresión baja de los marcadores *CD44CD133*. En diversos tumores, la baja expresión de *PER1* se asocia con peor pronóstico, mayor capacidad de invasión o proliferación, características estrechamente relacionadas con la presencia de CMCs (Liu et al. 2021)(Yang et al. 2020). En el caso concreto del CCR, menores niveles de *PER1* se asocian con un peor pronóstico y metástasis hepáticas, características relacionadas también con la biología de las CMCs (Mazzoccoli et al. 2011)(Oshima et al. 2011). En el caso de *PER3*, en nuestra

cohorta de estudio se observa como la expresión baja de *PER3* se asocia con niveles altos de *CD44CD133*. Al igual que ocurre con *PER1*, niveles bajos de *PER3* se asocian con mayores tasas de proliferación, peor pronóstico, metástasis, resistencia al tratamiento, o directamente sobre la regulación de las propias CMCs (Y. Liu et al. 2022)(Cai et al. 2018)(Q. Li et al. 2021). Estos mismos efectos se observan en el CCR, asociándose niveles bajos de *PER3* con un peor pronóstico (Mazzoccoli et al. 2011), un enriquecimiento en la expresión de los marcadores *CD133*, *CD44*, *LGR5* y *SOX2*, asociados con las CMCs y la resistencia al tratamiento (Zhang et al. 2017). Curiosamente, la otra isoforma de PER, *PER2*, pese a que también se ha asociado con las CMCs o sus propiedades (Ma et al. 2020)(Xiong et al. 2022), no presenta asociación significativa alguna en nuestra cohorte de estudio. Por su parte, niveles bajos de *CLOCK* se asocian con una baja expresión de *CD44CD133*. La expresión de *CLOCK* se ha descrito como indispensable, junto con *BMAL1*, en hepatocarcinoma para sostener el crecimiento tumoral (Qu et al. 2023), y el crecimiento de las células leucémicas (Puram et al. 2016); o para el mantenimiento de las CMCs en glioblastoma (Dong et al. 2019), o algunas de las propiedades de éstas como la migración celular (Li et al. 2013). En el CCR, la sobreexpresión de *CLOCK* se ha descrito que contribuye al proceso de metástasis (Yaping et al. 2017). Por lo que se refiere a *REV-ERB β* , una baja expresión de ésta se asocia con una baja expresión de *CD44CD133*. En el caso de glioblastoma y hepatocarcinoma, *REV-ERB β* es necesario para la proliferación de dichas células tumorales y favorecer sus procesos de migración y metástasis, relacionados con las CMCs (Tong et al. 2020)(Yu et al. 2018). En CCR, una mayor expresión de este gen se ha relacionado con un riesgo mayor de recaída de la enfermedad, proceso vinculado con las CMCs (Aroca-Siendones et al. 2021).

PARP-1 regula los ritmos circadianos en condiciones fisiológicas normales a través de la fosforilación de *CLOCK*, lo que va a reducir su capacidad de unión al ADN afectando a la transcripción de sus genes dianas (Kumar & Takahashi 2010). Pese a que entre los genes dianas se encuentran los elementos del bucle de retroalimentación negativa, *CRY_{1/2}* y *PER₁₋₃*, y del bucle secundario *REV-ERB β* , estos parecen no verse afectados de la misma forma, siendo la expresión de las isoformas de Per las más sensible a la disminución de la afinidad de *CLOCK* al ADN (Asher et al. 2010).

Para ver la potencial regulación de los ritmos por *PARP-1* sobre las CMCs en el contexto de p53, a continuación, estudiamos la relación de *PARP-1* y los genes

del reloj en los tumores CD44CD133, altos y bajos, estratificados por el estado de p53.

Nuevamente se observa una relación diferencial, en este caso entre PARP-1 y genes del reloj circadiano, en los tumores con la expresión de los marcadores de CMCs, según el estado de p53.

En los tumores mtp53, *PARP-1* se correlaciona de forma positiva con *CRY1* en los tumores con baja expresión de los marcadores *CD44CD133*. Previamente en nuestra cohorte de estudio, aunque no observamos relación significativa de una elevada expresión de *PARP-1* con respecto a los marcadores *CD44CD133*, en nuestro modelo *in vitro* se observa una disminución de las características de las CMCs tras la sobreexpresión de PARP-1 en las células mtp53. El rol de CRY en relación con las CMCs, y con el cáncer en general, es complejo. Por un lado, es posible encontrar estudios que señalan que CRY1 se asocia con quimioresistencia y una mayor proliferación (Han et al. 2021); mientras que otros trabajos indican que inhiben la proliferación o reducen la viabilidad de las CMCs (Dong et al. 2019). Las diferencias en cuanto al posible papel de CRY podría deberse a diferentes modificaciones a nivel de proteína, aunque dichos estudios se han realizado con la isoforma CRY2 (Xia et al. 2023).

En los tumores wtp53, *PARP-1* se correlaciona de forma positiva con *REV-ERB β* , y de forma negativa con *PER1* y *PER2* en los tumores con elevada expresión de *CD44CD133*. En la misma cohorte de pacientes, y en los resultados *in vitro* previos, encontramos que una elevada expresión de *PARP-1* se asocia con un incremento en las características de las CMCs, lo que además concuerda en cierto modo con lo descrito en la bibliografía, tal y como se discutió previamente. Del mismo modo, tal y como se discutió anteriormente, niveles bajos de *PER1* y *PER2*, así como niveles elevados de *REV-ERB β* se asocian en bibliografía con un incremento en las CMCs y/o en sus propiedades (Liu et al. 2021)(Yang et al. 2020) (Mazzoccoli et al. 2011)(Oshima et al. 2011)(Tong et al. 2020)(Yu et al. 2018) (Aroca-Siendones et al. 2021).

Las relaciones positivas o negativas observadas con PARP-1 son coherentes con lo descrito por Asher y col., que señalan que PARP-1 modifica a CLOCK, y eso provoca una menor afinidad de éste por el ADN, repercutiendo en la expresión de sus genes diana, afectando principalmente a las isoformas de PER (Asher et al. 2010).

Las asociaciones observadas son coherentes con lo descrito en la bibliografía y lo obtenido en la cohorte de estudio. Además, los resultados en la cohorte de estudio sugieren una relación entre PARP-1 y los distintos genes del reloj que puede influir sobre las CMCs según el estado de p53. Sin embargo, solo con los datos de tejido no es posible determinar la dirección de esta relación, su causalidad o la funcionalidad del ritmo circadiano, por lo que posteriormente desarrollamos un modelo *in vitro* con el que validar y extender los resultados de la cohorte de pacientes, y del capítulo anterior, en el contexto de los ritmos circadianos.

Para validar nuevamente estos resultados y estudiar la potencial regulación diferencial de PARP-1 sobre los ritmos circadianos, y su efecto sobre las CMCs, se desarrolló un modelo *in vitro* utilizando dos líneas de CCR, con diferente estado de p53, HCT-116 (p53 salvaje) y HT-29 (p53 mutado, p.Arg273His) en las que se sobreexpresó PARP-1 de forma estable. El cambio de la línea isogénica HCT-116 -/- por HT-29 se realizó para extender los resultados anteriores a otras mutaciones de p53, ya que diferentes mutaciones en p53 pueden tener distinto efecto sobre la interacción de p53 con distintas proteínas, y por tanto sobre características moleculares y fenotípicas de las células tumorales (Polotskaia et al. 2015). Además, HT-29 posee la mutación p.Arg273His uno de los *hotspot* más mutados del gen *TP53* en el CCR (Hassin et al. 2022).

PARP-1 se ha asociado en condiciones fisiológicas normales con el proceso de proliferación, favoreciéndolo en casos como la regeneración de cardiomiocitos, hepatocitos y células madre neuronales (Shu et al. 2024)(Son et al. 2020)(Ju et al. 2019). Si bien es cierto, que en otros tipos celulares como linfocitos se ha comprobado que la ausencia de esta proteína no repercute en su proliferación normal (Ambrose et al. 2009), o incluso, como en el caso de fibroblastos pulmonares, favorece su proliferación (Pagano et al. 2007). En un contexto tumoral, este mismo efecto dual en cuanto a su papel pro- y anti-proliferativo también se observa, encontrando estudios que señalan que PARP-1 participa potencialmente en la proliferación celular de las células tumorales (Kim et al. 2019), y por el contrario que su ausencia resulta en una mayor tasa de proliferación y crecimiento (Yang et al. 2021). Para evaluar, si la posible dualidad observada en cuanto al papel de PARP-1 en términos de proliferación se asocian de modo alguno con el estado de p53, evaluamos en nuestros modelos *in vitro* el efecto de la sobreexpresión de PARP-1 sobre el crecimiento a través de dos métodos distintos. A través de un ensayo de MTT durante 6 días se comprobó el

efecto del crecimiento con una densidad baja de células, y mediante el ensayo de CFSE con una densidad normal de células. Como era esperable en base a los resultados previos, se observa que en la línea HCT-116 con wtp53, la sobreexpresión de PARP-1 induce un aumento de la tasa de proliferación, mientras que en la línea mtp53, HT-29, la sobreexpresión de PARP-1 provoca el efecto contrario, observándose una disminución de la proliferación de dichas células, a excepción del día 4 a través del ensayo de MTT, cuando se observa una mayor cantidad de células. Los datos en la línea HCT-116 concuerdan con otros trabajos en los que señalan que el silenciamiento de PARP-1 en ésta línea da lugar a una menor capacidad proliferativa, mostrando la importancia de PARP-1 en el crecimiento celular (Ghosh, Roy, & Franco 2018). Sin embargo, los resultados en la línea mtp53 no concuerdan con los de otros trabajos de CCR, que observan que la sobreexpresión de PARP-1 en las líneas SW480 y SW620 resulta en un aumento de la proliferación celular, mientras que su silenciamiento resulta en una disminución (Xu et al. 2024). Dichas líneas celulares proceden del mismo individuo, procediendo una del tumor primario y la otra del secundario, y poseen una doble mutación para *TP53*, p.Arg273His, idéntica a HT-29, y p.Pro309Ser, lo que sugiere un posible efecto diferente según la mutación de p53 o de la doble mutación de éste. No obstante, al extrapolar nuestros datos a otros tipos de cáncer, como el cáncer de mama observamos resultados similares del efecto de p53. El silenciamiento de PARP-1 en la línea MCF-7, wtp53, resulta en una disminución de la proliferación (Kim et al. 2019), mientras que el silenciamiento en MDA-MB-231, mtp53 p.Arg280Lys, resulta en un aumento de la proliferación (Yang et al. 2021). Este mismo efecto se observa en el trabajo de García-Parra, en las mismas líneas celulares, y al silenciar en la línea BT-474, mtp53 p.Glu285Lys (García Parra 2012). Estos resultados concuerdan con los nuestros en cuanto a la relación PARP-1 – estado de p53 descrita en este trabajo. Los datos de crecimiento/proliferación se confirman en el ensayo de capacidad de tumorigenicidad llevados a cabo en un modelo xenografo subcutáneo, donde se observa que la sobreexpresión de PARP-1 en la línea wtp53 induce tumores más grandes, mientras que en la línea mtp53, éstos presentan un menor tamaño.

A continuación, evaluamos el efecto de la sobreexpresión estable de PARP-1 sobre el fenotipo y características de las CMCs, previa sincronización de los ritmos circadianos, con el fin de confirmar los resultados de la sobreexpresión transitoria y extender el efecto a otros estados de p53 en el contexto de los ritmos circadianos.

Al igual que ocurre con la sobreexpresión transitoria de PARP-1, la sobreexpresión estable en la línea HCT-116 produce un aumento de la población ALDH1⁺, así como de la población CD44CD326^{ALTO} y la CD44CD326CD133^{ALTO}. Por el contrario, la sobreexpresión de PARP-1 en la línea con *mtp53*, al igual que observamos anteriormente en la línea *p53^{-/-}*, se observa que disminuye la población ALDH1⁺, y la población CD44CD326^{ALTO}. Además, en este caso, encontramos marcaje para CD133, por lo que observamos también una disminución en la población CD44CD326CD133^{ALTO}. De esta forma, se confirma una regulación diferencial del fenotipo de CMCs mediado por PARP-1 según el estado de *p53*, estando favorecido en el caso de los tumores *wtp53* y deteriorado en aquellos con mutaciones.

En el caso de la sobreexpresión estable de PARP-1 también se evaluó a nivel fenotípico otros marcadores relacionados con las CMCs como son LGR5, SOX2, NANOG, y OCT3/4 (Munro et al. 2018). Si bien es cierto, que estos marcadores, pese a encontrarse en niveles superiores en las CMCs, también son marcadores de células madre y pluripotentes, en general (Andrews & Gokhale 2024), y células madre intestinales, en el caso específico de LGR5 (Gehart & Clevers 2018). En la línea con *wtp53*, la sobreexpresión de PARP-1 produce un aumento de los marcadores SOX2, NANOG, OCT3/4 y LGR5, mientras que en la línea HT-29, la sobreexpresión de PARP-1 no provoca cambios en éstos. Estos resultados están en la línea con los observados anteriormente, en los que PARP-1 provoca un aumento del fenotipo *stem* en el contexto de *wtp53*, pero no cuando éste está mutado. Además, estos resultados se encuentran en concordancia con diferentes trabajos de biología del desarrollo que señalan que PARP-1 es necesario para el mantenimiento de células madre neuronales (Son et al. 2020)(Plane, Grossenbacher, & Deng 2012), o mediante el control, independiente de su actividad catalítica, de la expresión de los genes relacionados con la pluripotencia (Liu & Kraus 2017). Hay que resaltar que todos estos trabajos utilizan líneas de células madre con *wtp53*.

Finalmente, para ver el efecto de la sobreexpresión estable de PARP-1 a nivel funcional de las CMCs se realizó un ensayo de formación de esferas. Como era esperable a partir de los resultados de caracterización fenotípica, se observa que la expresión de PARP-1 en la línea HCT-116 aumenta la capacidad de formación de esferas, pero en la línea mutada HT-29 la disminuye. Estos datos además concuerdan con lo observado en la línea HCT-116 *p53^{-/-}*, confirmando

nuevamente el efecto adverso de PARP-1 en el contexto de la ausencia de un *wtp53* sobre las CMCs.

Todos nuestros resultados indican que PARP-1 favorece el fenotipo de las CMCs en *wtp53*, pero que en el contexto de *mtp53* se desencadenan mecanismos que reducen o no modifican las características de las CMCs. Para comprobar y validar nuestra hipótesis basada en la potencial regulación diferencial de los ritmos circadianos, se analizó el ritmo circadiano durante 24 horas de los genes *PER₁₋₃* y *REV-ERB β* en las distintas líneas celulares. Se analizó la amplitud, una medida de la fuerza de la actividad del ritmo, el MESOR, el nivel medio de la actividad, y la acrofase, momento del día de máxima actividad (Reid 2019).

El análisis del ritmo circadiano muestra un comportamiento distinto tras la sobreexpresión de PARP-1 en la línea con *wtp53* y la línea con *mtp53*.

En la línea *wtp53*, HCT-116, se observa como la sobreexpresión de PARP-1 provoca un aumento de la amplitud de *PER1*, es decir potencia su ritmo; y provoca un adelanto en el pico de actividad de *PER2*, así como un retraso del pico de actividad de *PER3* y *REV-ERB β* . Además, en el caso concreto de *REV-ERB β* , aunque no es significativo, se ve también una tendencia a una mayor actividad media y potencia del ritmo de ésta. Por el contrario, en la línea *mtp53*, HT-29, la sobreexpresión de PARP-1 provoca una disminución de la amplitud de todos los genes estudiados, es decir una disminución global de la potencia del ritmo; además de un adelanto del pico de actividad de *PER1-3*; y una disminución de la actividad media de *PER3*. En general se observa que PARP-1 potencia los ritmos en la línea HCT-116, mientras que en la línea *mtp53* HT-29 los debilita. Esto podría tener un impacto directo sobre el fenotipo de las CMCs. Cada vez hay más estudios que señalan ya no solo que las células tumorales presentan ritmos funcionales, sino que las CMCs presentan ritmos potentes y tienen una fuerte dependencia de éstos (Malik et al. 2022)(De et al. 2020)(Puram et al. 2016)(Dong et al. 2019). De esta forma se ha observado que la pérdida o reducción del ritmo circadiano funcional resulta en la pérdida de CMCs en glioblastoma y en leucemia (Puram et al. 2016)(Dong et al. 2019). Además, en cáncer de mama se ha observado que la presencia de ritmos circadianos más potentes se relaciona con una menor tasa de supervivencia a 5 años y mayor riesgo de metástasis, características estrechamente relacionadas con la presencia de CMCs (Li et al. 2024).

Todos estos resultados concuerdan con el efecto diferencial sobre las CMCs ejercido por PARP-1 observado. Cuando se sobreexpresa PARP-1 en *wtp53*, se

potencian el ritmo circadiano y esto resulta en un aumento del fenotipo de CMCs; mientras que por el contrario cuando ocurre en *mtp53*, la sobreexpresión resulta en una disminución de la potencia del ritmo circadiano, provocando una disminución de las características de las CMCs. Además, esa menor potencia de los ritmos circadianos observada cuando la expresión de PARP-1 es elevada, y su relación con la supervivencia mencionada anteriormente, explicaría las diferencias en la supervivencia libre de enfermedad y global observada en los tumores *mtp53* de nuestra cohorte de estudio.

Visto el efecto de la sobreexpresión de PARP-1 sobre las CMCs según el estado de *p53*, y uno de los potenciales mecanismos a través de los cuales se ejerce, a continuación, analizamos si dichos efectos se podían revertir mediante el uso de un iPARP-1 como el olaparib.

El olaparib ha sido el primer iPARP-1 aprobado por la FDA, para el tratamiento de cáncer de ovario avanzado con mutaciones en BRCA. En los últimos años se han aprobado el uso de otros iPARP-1 como son el rucaparib, niraparib y talazorib, para el tratamiento del cáncer de mama, ovario, próstata y páncreas con deficiencias en BRCA o en los sistemas de reparación por recombinación homóloga (Bastos et al. 2024). En CCR, el uso de los iPARP-1 en cultivos *in vitro* presenta un efecto citotóxico y antitumoral por sí mismo (C. Wang et al. 2017), o cuando se combina con otros fármacos como el 5-FU o el oxaliplatino, o incluso con radiación (de Castro e Gloria et al. 2021)(Ren et al. 2019). Al utilizarlo en modelos *in vivo* combinado con quimioterapia o radioterapia también presenta un efecto antitumoral, pese a la falta de efecto cuando se utiliza como monoterapia (Qin et al. 2022)(Shelton et al. 2013). Resultados similares se han obtenido en ensayos clínicos desarrollados en CCR, en los que el uso del olaparib no ha proporcionado beneficios significativos en términos de supervivencia, tanto en su uso como monoterapia independientemente del estado de los sistemas de reparación u otras mutaciones en otros genes implicados en cáncer como *ATM* (Leichman et al. 2016)(Behl et al. 2023); ni cuando se combina con irinotecan o inmunoterapia en tumores con deficiencias en los sistemas de reparación del ADN (Chen et al. 2016)(Hernando-Calvo et al. 2024). Uno de los posibles motivos de la falta de respuesta en los ensayos clínicos se debe a que en CCR la respuesta a los iPARP-1 en CCR no dependería del estado de los sistemas de reparación del ADN, sino que necesitarían un *p53* funcional, lo cual volvería a estar en concordancia con los resultados obtenidos en la primera y segunda parte de este trabajo (Smeby et al.

2020). Sin embargo, es importante señalar que, aunque en otros tumores, como el cáncer de ovario, para el cual el uso de iPARP-1 está aprobado, cada vez está más cuestionado el uso de estos fármacos debido a la falta de respuesta en casos para los que está prescrito, lo que está provocando la restricción de su uso a casos muy concretos o incluso el cese de su uso en algunos casos (Walsh 2024).

En nuestro modelo *in vitro*, tanto las líneas wtp53 como mtp53 responden de manera dosis-dependiente al tratamiento con olaparib a las 72 horas, similar al efecto descrito por otros autores (C. Wang et al. 2017). Además, la respuesta fue similar tanto en la línea wp53 como mtp53, por lo que no observamos el efecto diferencial del estado de p53 sugerido por Smeby y col, al menos en términos de viabilidad y en las condiciones ensayadas (Smeby et al. 2020). Al comparar entre aquellas líneas que sobreexpresan PARP-1 y las que no, observamos que tampoco se observan diferencias en cuanto a la respuesta al olaparib en términos de viabilidad. Existen estudios que muestran que aquellas células con mayor expresión de PARP-1 son más sensibles al tratamiento con iPARP-1 (Fröhlich et al. 2024), aunque esto contrasta con otros que señalan lo opuesto, que el silenciamiento de PARP-1 las hace más sensibles al olaparib (Quiñonero et al. 2022). Nuestros resultados señalan que la expresión de PARP-1 no influye en la sensibilidad al tratamiento, al menos en cuanto a la viabilidad a las 72 horas. Algunos fármacos, aunque pueden ejercer su efecto citotóxico a corto plazo, también pueden provocar daño que no se manifiesta hasta varias divisiones celulares más tarde. Mediante un ensayo de formación de colonias, observamos que el número de colonias tras un pretratamiento con olaparib 10 μ M durante 72 horas reduce el número de colonias, con respecto a los controles tratados con DMSO, mostrando el efecto citotóxico del olaparib nuevamente. No se observan diferencias en cuanto a la formación de colonias entre las líneas con expresión basal y sobreexpresión de PARP-1 en condiciones sin tratamiento. Sin embargo, sí se observa como las líneas con sobreexpresión de PARP-1 forman menos colonias que las líneas con expresión basal. Esto sugiere que, a largo plazo, el olaparib genera un mayor efecto citotóxico en las líneas con mayor expresión de PARP-1 como indican algunos estudios (Fröhlich et al. 2024)(Bianchi et al. 2019).

A partir de este mismo ensayo de clonogenicidad se evaluó el fenotipo de las colonias formadas, ya que está estrechamente relacionado con el origen, CMC o célula tumoral diferenciada, definiéndolas en meroclon, paraclon y holoclon tal y como describen Lucena-Cacace y col., (Lucena-Cacace et al. 2018). Al sobreexpresar PARP-1 en la línea con wtp53, HCT-116, se produce un aumento

del número de colonias holoclon, cuyo origen son las CMCs, una disminución de aquellas paraclon, con origen en las células diferenciadas, y de aquellas meroclon, fenotipo intermedio. Si bien, es cierto que en esta línea celular las diferencias observadas no son significativas, aunque concuerdan con lo observado en el análisis de las CMCs discutido anteriormente. En la línea mtp53, HT-29, se observa un aumento significativo de las colonias paraclon y meroclon, así como una disminución de las colonias holoclon, lo cual era de esperar de acuerdo con el análisis de las CMCs previo. Este tipo de análisis se repitió tras el tratamiento con olaparib, presentando todas las colonias un fenotipo intermedio, lo que no permite ver a través de este ensayo el efecto sobre las CMCs.

El tratamiento con olaparib tiene un efecto directo a nivel de apoptosis y ciclo celular. El tratamiento con la dosis 10 μ M provoca un aumento de la apoptosis a las 72 horas del tratamiento. Este aumento de la apoptosis en todas las líneas celulares con el olaparib coincide con los resultados descritos en otros trabajos en distintos tipos de tumores, incluido CCR (de Castro e Gloria et al. 2021)(Quiñonero et al. 2022)(Moon et al. 2022). Además, el uso de olaparib, aunque por sí mismo es capaz de inducir apoptosis, su combinación con otros agentes quimioterapéuticos potencia sus efectos (de Castro e Gloria et al. 2021)(Quiñonero et al. 2022). Curiosamente, la sobreexpresión de PARP-1 en la línea mtp53 HT-29 provoca una menor apoptosis en condiciones sin tratamiento. Aunque una menor tasa de apoptosis en condiciones normales, en principio puede parecer perjudicial para el paciente por estar asociado con una menor muerte espontánea de las células tumorales, una mayor tasa de apoptosis espontánea se relaciona con una peor prognosis para el paciente en el CCR (Schimek et al. 2022), o con acelerar los procesos de crecimiento, metástasis o recurrencia (Haak, Huang, & Panigrahy 2021). Estos resultados de apoptosis en condiciones basales, podrían por tanto explicar o al menos relacionarse con las diferencias observadas en crecimiento y las propiedades del fenotipo *stem* observadas en la línea mtp53, y con la supervivencia en la cohorte de estudio. A nivel del ciclo celular, el tratamiento con olaparib induce un aumento de la fase G2/M en todas las líneas celulares estudiadas, independientemente del estado de p53 y la sobreexpresión de PARP-1, sugiriendo un arresto celular en dicha fase, acompañados por descensos del porcentaje de células en las otras fases. Este mismo efecto se ha descrito en otros trabajos (Quiñonero et al. 2022)(Lin et al. 2018). El arresto en G2/M tras la administración de un agente genotóxico es uno de los mecanismos de respuesta celular tras producirse daño en el ADN, esperable tras la inhibición de PARP-1 por su relación con la reparación de éste

(Qin et al. 2022). Por tanto, el olaparib parece generar daño o estrés replicativo, probablemente al inhibir los sistemas de reparación al ADN mediados por PARP-1, por lo que su combinación con agentes alquilantes podrían potenciar el efecto de ambos. En el caso de la línea HT-29 se observa también una menor cantidad de células en fase G2/M en condiciones sin tratamiento tras la sobreexpresión de PARP-1, lo que podría en cierto modo explicar la menor proliferación de dichas células.

Mediante el análisis fenotípico del ensayo de clonogenicidad no se pudieron extraer conclusiones al observarse un fenotipo intermedio tras el tratamiento con olaparib, por lo que se procedió a realizar los ensayos de marcadores CD44CD133CD326 y el ensayo de formación de esferas para analizar el efecto del tratamiento.

El tratamiento con olaparib no provoca cambios en la línea HCT-116 en sus condiciones basales, aunque en aquella con sobreexpresión de PARP-1 se reduce tanto el porcentaje de la población CD44CD326^{ALTO} como el de la población CD44CD326CD133^{ALTO}. Además, en este caso concreto, se observa como en la línea con sobreexpresión de PARP-1 se revierte el efecto de la sobreexpresión sobre las CMCs tras el tratamiento con el iPARP-1, recuperando valores similares a los de HCT-116 en su condición normal. En la línea HT-29 no se ven diferencias significativas, ni el esperado aumento de los marcadores de CMCs, dado el papel observado de PARP-1 en el contexto de mutaciones de p53, y el aumento descrito por Bellio y col., al inhibir PARP-1 en líneas mtp53 de ovario (Bellio et al. 2019). Curiosamente, aunque no es significativo, en la línea HCT116-vector se ve un aumento de la población CMCs, mientras que en HT29-vector se observa una tendencia a una menor cantidad de CMCs. Este efecto coincide con el observado tras sobreexpresar PARP-1. Diversos estudios señalan que el tratamiento con olaparib a corto plazo induce una sobreexpresión de PARP-1 (Quiñonero et al. 2022)(Bianchi et al. 2019), por lo que podría inducir en cierto modo a corto plazo, un efecto intermedio entre la sobreexpresión e inhibición de PARP-1 en dicho caso.

Para terminar de validar el posible uso diferencial del olaparib según p53, se realizó un estudio funcional sobre las CMCs. En el caso de la línea wtp53 HCT-116, el pre-tratamiento con olaparib reduce de forma casi total la capacidad de formación de esferas como era esperado debido a la relación observada de PARP-1 y las CMCs en el contexto de wp53. En la línea mtp53 se observa también una reducción de la capacidad de formación de tumoresferas, siendo ligeramente más

acusada en la línea con expresión basal de PARP-1. Este resultado no era esperado debido a la relación adversa de PARP-1 sobre el fenotipo de CMCs observado en el contexto de mtp53. Sin embargo, el pretratamiento con olaparib provoca un cambio fenotípico en las tumoresferas formadas, pasando de un aspecto esferoide a uno en forma de racimo de uvas. Este fenotipo en forma de racimo de uvas está relacionado con una menor interacción célula con célula, asociado con un fenotipo más mesenquimal con mayor capacidad invasiva y agresividad que podría ir precedida de la ganancia de características *stem* (Borgna et al. 2012) (Shichi et al. 2019)(Minami et al. 2021)(Kenny et al. 2007)(Vogiatzoglou et al. 2023). De esta forma, el tratamiento con olaparib en la línea mtp53 induciría un fenotipo más agresivo.

Aunque existe una aceptación general sobre el uso de iPARP-1 para la terapia específica frente a las CMCs, realmente existen muy pocos trabajos que estudien qué ocurre con las CMCs tras el tratamiento con estos tipos de fármacos (Zeniou, Nguekeu-Zebaze, & Dantzer 2019). De hecho, gran parte de la conclusión de que los iPARP-1 son positivos proceden de trabajos en los que se observa que estos iPARP-1 sensibilizan a las CMCs a otros tratamientos, reduciendo su resistencia a éstos (Jarrar et al. 2019)(Venere et al. 2013). Sin embargo, también existen estudios que indican que, aunque el tratamiento con iPARP-1 reduzca la proliferación o provoque la muerte celular de las células tumorales, éste produce un aumento de los marcadores de CMCs como demuestran Bellio y col, en su trabajo con líneas mtp53 de cáncer de ovario, lo que puede llegar a ser perjudicial para el paciente (Bellio et al. 2019). En glioblastoma es posible encontrar trabajos que evalúen el efecto de la inhibición de PARP-1 sobre las propiedades de las CMCs, aunque con la dificultad de ponerlo en el contexto de p53 al ser líneas derivadas de pacientes y no proporcionarse información del estado de *TP53*. Aun así, es posible encontrar artículos donde se observa que la inhibición de PARP-1 reduce la capacidad de formación de esferas, en líneas con wtp53, SH-EP, SH-SY5Y y SK-N-SH (Long et al. 2018). Otros señalan que la fracción de neuroesferas supervivientes en sus líneas derivadas de paciente tras el tratamiento con iPARP-1 no se ven afectadas por el tratamiento, E2 o G7, o que se ven reducidas, aunque no de manera significativa, R10 (Carruthers et al. 2018). Las líneas E2 y G7 presentan alteraciones en p53, aunque de R10 no hay información disponible (Ahmed et al. 2015). En otro trabajo de glioblastoma, el uso de iPARP reduce la formación de esferas, sin embargo, no hay datos del estado de p53, por lo que no se pueden poner los resultados en el contexto de éste (Venere et al. 2013). Si bien es cierto que *TP53* se encuentra mutado en el 22% de los glioblastomas, siendo

por tanto más probable encontrar casos wtp53, pero sin poder asegurarlo para extraer conclusiones (Zhang et al. 2018). En general se observan resultados que respaldan el efecto sobre las CMCs observado en nuestro estudio al tratar con olaparib. En la línea wtp53, no se observan cambios o disminuyen, al sobreexpresar PARP-1, en los marcadores de CMCs estudiados con el tratamiento con olaparib, pero se ve reducida casi completamente la capacidad de formación de tumoresferas. Por el contrario, en la línea mtp53, aunque no se observan cambios de ningún tipo en los marcadores y se observa una reducción de la capacidad de formación de esferas, éstas sufren un cambio fenotípico con el tratamiento asociado con mayor agresividad.

Finalmente, debido a la implicación del reloj circadiano en la regulación de las CMCs por PARP-1 en nuestro modelo, analizamos el efecto del olaparib sobre el ritmo circadiano.

En HCT116-vector el tratamiento con olaparib no provoca cambios significativos en ninguno de los parámetros analizados; sin embargo, en la misma línea con sobreexpresión de PARP-1 se observa cómo se produce una disminución de la amplitud de *PER1* y, de *REV-ERB β* , aunque ésta última no significativa, así como un adelanto de la acrofase de ambos. Se observa, como el tratamiento con el iPARP-1 revierte los cambios producidos por la sobreexpresión de PARP-1, lo cual explica la reversión del efecto observada también a nivel de la población CD44CD326^{ALTO} y CD44CD326CD133^{ALTO}, mediante el debilitamiento del ritmo circadiano, y la dependencia de las CMCs de éste (Dong et al. 2019)(Puram et al. 2016).

En HT-29, el tratamiento con olaparib provoca un periodo de *PER1* de aproximadamente 3 horas lo que impide el posterior análisis del ritmo circadiano, sugiriendo la pérdida del ritmo circadiano y su sustitución por un ritmo ultradiano (Coskun, Zarepour, & Zarrabi 2023). En el caso de *REV-ERB β* , se observa cómo se producen diferentes efectos según la sobreexpresión o no de PARP-1. La línea con sobreexpresión basal de PARP-1 tras el tratamiento experimenta un debilitamiento de la fuerza del ritmo de *REV-ERB β* , así como un retraso de su acrofase y disminución del MESOR; mientras que en aquella con sobreexpresión se observa un fortalecimiento del ritmo, así como un retraso de la acrofase. Con respecto al efecto sobre la sobreexpresión del tratamiento con olaparib, el efecto producido a nivel del ritmo circadiano podría explicar esa posible mayor agresividad observada en las esferas, sin embargo, no se recuperan los valores de la línea HT-29 basal.

En líneas generales se observa como el tratamiento con olaparib revierte el fenotipo provocado por la sobreexpresión de PARP-1 en la línea wtp53 tanto a nivel de las CMCs como a nivel del ritmo circadiano, sin embargo, esto no ocurre completamente en la línea mtp53. Esto podría indicar que el mecanismo a través el cual ocurren los efectos producidos por la sobreexpresión de PARP-1 es a través de la regulación de los ritmos circadianos, pero en la línea mtp53 podrían intervenir más mecanismos. Sin embargo, en las condiciones sin tratamiento, el efecto de PARP-1 sobre los ritmos sí explica lo que ocurre a nivel de las CMCs en esa línea celular, por lo que realmente lo que podría ocurrir en esta línea para que no se observe el efecto esperado con el tratamiento con olaparib es que el olaparib tenga otros efectos no derivados directamente de la inhibición de PARP-1.

Entre los *off-target* del olaparib, según su análisis con la herramienta *swisstarget* (<http://www.swisstargetprediction.ch/>), se encuentran fundamentalmente, y con una probabilidad muy alta, otros miembros de la familia de las PARPs como las tankirasas, PARP-2, PARP-3 o PARP-6. Muchas de ellas apenas se han estudiado en contexto tumoral o incluso su relevancia apenas se conoce (Martí et al. 2020). En este sentido, en CCR, PARP-6 participa en el proceso tumoral ejerciendo funciones pro y antitumorales (H. Wang et al. 2017)(Qi et al. 2016), de forma que su inhibición no específica con el olaparib puede afectar a su función, con el consiguiente impacto sobre los potenciales efectos esperados de la inhibición de PARP-1 con el tratamiento con olaparib. Por otro lado, la inhibición de PARP-1 provocaría que el NAD⁺, que utiliza PARP-1 para llevar a cabo su función catalítica, quedase a disposición total de otra deacetilasa dependiente de NAD, como es SIRT-1. De hecho, la inhibición de PARP-1 resulta en un aumento de la actividad de SIRT-1 (Bai et al. 2011)(Sahar & Sassone-Corsi 2009). SIRT-1 regula también los ritmos circadianos, por lo que el uso de iPARP-1 puede tener impacto sobre los ritmos no solo a través de la inhibición de la actividad de PARP-1, sino también por un aumento de la actividad de SIRT-1 (Sahar & Sassone-Corsi 2009). Además, SIRT-1, presenta un papel dual en el proceso de carcinogénesis, sin conocerse aún qué contextos hacen que actúe como pro o anti-tumoral (Carafa, Altucci, & Nebbioso 2019).

Por tanto, la ausencia del efecto esperable a nivel de los ritmos circadianos o sobre las CMCs observado en algunos experimentos en el contexto de mtp53 podría no ser debido a la inhibición de PARP-1 como tal, sino, o bien a través de la inhibición inespecífica, o bien a través de la modulación de la actividad de SIRT-1 tras el tratamiento con olaparib.

Por consiguiente, el uso de iPARP-1 podría ser beneficioso no solo en aquellos pacientes con *wtp53* y elevada expresión de PARP-1, sino en aquellos con *wtp53* en general; mientras que podría ser perjudiciales en aquellos con *mtp53*, no solo con elevada expresión de PARP-1.

En la parte final se analizó el perfil de expresión de *PARP-1* en líneas derivadas de pacientes con distinto origen tumoral, siendo estas derivadas del tumor primario, metástasis o de CTCs. La expresión de *PARP-1* en estas líneas es bastante heterogénea y variable, especialmente entre las líneas derivadas del tumor primario. Este resultado es similar al obtenido en la cohorte de pacientes estudiada en este trabajo, a otros estudios centrados en CCR (Dziaman et al. 2014)(Dörsam et al. 2018)(Xu et al. 2024), u otros tipos de cáncer (Ossovskaya et al. 2010). Además, esta heterogeneidad en términos de expresión no solo se observa en pacientes, sino también en líneas celulares comerciales de distintos tipos tumorales (Zaremba et al. 2009), incluido CCR (Tentori et al. 2006) (Xu et al. 2024), lo cual refleja que la heterogeneidad observada no surge durante el establecimiento de la línea celular si no que recapitula la característica observada en el tumor original.

Aunque la sobreexpresión de PARP-1 en el tejido tumoral es un hecho más que probado en diferentes estudios, sigue sin saberse la causa exacta de esta sobreexpresión, o si diferentes contextos fenotípicos afectan a ésta. La expresión de PARP-1 podría estar influida por el estado de distintos genes, por ejemplo, en cáncer de mama, la expresión de PARP-1 es mayor en aquellos tumores y líneas celulares con mutaciones o ausencia de *BRCA1* (Li et al. 2014). En cáncer hepático, PARP-1 está sobreexpresado en hepatocarcinoma y colangiocarcinoma, asociándose en éste último con la expresión de *KRAS*. Además, en líneas celulares de colangiocarcinoma la expresión de PARP-1 es mayor cuando *KRAS* está mutado (Keggenhoff et al. 2024). Otro estudio, pero en este caso de leucemia, muestra un resultado similar, observándose un aumento de la expresión de PARP-1, aunque también de otras proteínas relacionadas con la reparación del ADN alt-NHEJ, en las líneas U937 y CCRF-HSB2 al expresar la forma *KRAS*^{G13D} (Hähnel et al. 2014). En las líneas derivadas de tumores de CCR primario estudiadas se obtiene un resultado similar, siendo mayor la expresión cuando *KRAS* está mutado, aunque en nuestro estudio no es significativa. Al ponerlo en el contexto de *p53*, observamos que, en nuestras líneas derivadas de tumor primario, la expresión es mayor en las líneas mutadas, lo cual no concuerda con lo observado en los pacientes de nuestra cohorte de estudio en la que no se

observan diferencias significativas. Sin embargo, es importante señalar que estos resultados utilizando líneas celulares, tanto para KRAS como p53, deben tomarse con cautela al utilizar un número relativamente bajo de líneas celulares, aunque podrían sugerir que el contexto genómico influiría en la expresión de PARP-1, lo cual explicaría la heterogeneidad en la expresión observada en los distintos tipos tumorales.

PARP-1 se ha asociado con el proceso de metástasis debido a su relación con los procesos de angiogénesis, transición epitelio-mesénquima, invasión y migración (Frederick et al. 2024). De hecho, el uso de iPARP-1 reduce la capacidad metastásica a través de la inhibición del proceso de angiogénesis y la transición epitelio-mesénquima (Rodríguez et al. 2013), así como la expresión de MMP-9 y MMP-2 (Li et al. 2009). Aunque esto parece sugerir un papel directo de PARP-1 en el proceso de metástasis, también existen estudios que señalan que tanto la sobreexpresión de PARP-1 como su silenciamiento en líneas celulares de melanoma no provoca cambios en la capacidad migratoria e invasiva de estas células, de forma que el efecto de PARP-1 sobre la metástasis podría estar influido por el microentorno o incluso ser dependiente del tipo de cáncer estudiado (Fröhlich et al. 2024). Además, el papel de los iPARP-1 como agentes antimetastásicos no está del todo claro. Estudios en cáncer de pulmón señalan que el silenciamiento o inhibición de PARP-1 reduce la metástasis en huesos o cerebro (Choi et al. 2016), mientras que estudios en osteosarcoma señalan que el uso de iPARP-1 aumenta las metástasis pulmonares (F. Li et al. 2022), reflejando nuevamente que el efecto podría estar influido por el tipo de tumor estudiado o el contexto.

En estudios de cohorte de pacientes, una mayor expresión de *PARP-1* se ha asociado con una mayor probabilidad para el desarrollo de metástasis en diferentes tipos tumorales (Liu et al. 2016)(Pan et al. 2024)(Yano et al. 2002). Sin embargo, dicha asociación depende de los niveles de expresión del tumor primario, y no de las metástasis (Pan et al. 2024)(Yano et al. 2002). Tan solo unos pocos estudios analizan la expresión de *PARP-1* en muestras metastásicas, observándose una mayor expresión de *PARP-1* en metástasis hepáticas de CCR, en metástasis cerebrales de pulmón y en metástasis de melanoma (Jarrar et al. 2019)(Choi et al. 2016)(Fröhlich et al. 2024), o en el caso de metástasis de sarcomas de tejido blando, en el que no se observa ninguna diferencia aunque sí una tendencia a una menor expresión de *PARP-1* (Bertucci et al. 2019). Al agrupar la expresión de *PARP-1* en las líneas derivadas de paciente utilizadas según su

origen, no se observan diferencias entre metastásicas y primarias, aunque se observa una tendencia de una menor expresión en las metastásicas. Tampoco se encontraron diferencias en la expresión entre las CTCs y el tumor primario, aunque la tendencia de una mayor expresión en las líneas procedentes de los primarios se mantiene al igual que ocurre con las metastásicas. Sin embargo, al comparar la expresión de *PARP-1* entre CTCs y metastásicas se observa que la expresión en CTCs es significativamente menor, lo cual sugiere que esa disminución de *PARP-1* podría ser una característica de la biología de las CTCs. Este hecho se vería apoyado al analizar la expresión pareada en las líneas CPP45 (metastásica) y CTC45, y en las líneas CPP44 (primario) y CTC44 procedentes del mismo paciente, en las que se observa una menor expresión de *PARP-1* en las CTCs con respecto a su tumor primario o su metástasis. Debido al bajo número de muestras se recurrió a la base de datos GEO, concretamente al estudio GSE74369 con datos de expresión pareados de CTCs, células endoteliales, metástasis, mucosa normal y tumoral en pacientes con CCR con el fin de corroborar los datos observados en las líneas derivadas de pacientes. En 6/7 pacientes los *clusters* de CTCs presentan menor expresión que el tejido tumoral, o incluso que las células endoteliales y el tejido sano, confirmando los resultados obtenidos en nuestro estudio. Estos datos sugieren que la expresión de *PARP-1* puede variar para adaptarse al contexto tumoral, y que la disminución de *PARP-1* en las CTCs podría ser uno de los mecanismos para sobrevivir en el torrente sanguíneo.

Las CTCs son células tumorales que se liberan del tumor primario, o incluso de la metástasis, al torrente sanguíneo y linfático, y que poseen la capacidad de expandirse a otros tejidos. En líneas generales, el número de CTCs en sangre aumenta conforme aumenta el estadio tumoral, su volumen o la presencia de micrometástasis, asociándose con enfermedades más agresivas o mayor riesgo de recurrencia (Nguyen et al. 2023). Sin embargo, a pesar de que el número de CTCs es variable y es posible encontrarlas en sangre, el proceso de diseminación es muy ineficiente, estimándose que solamente el 0.02% de las CTCs sobrevive en el torrente sanguíneo y es capaz de formar tumores secundarios (Kahounová et al. 2023). Estas CTCs, además, pueden poseer características intermedias entre el tumor primario y las metástasis por lo que su estudio es relevante para entender el proceso de metástasis y cómo evitarlo (Shimada et al. 2022). En nuestro estudio en líneas derivadas de pacientes se observa como las CTCs presentan niveles menores de *PARP-1* que las procedentes de tumores primarios o metástasis. Además, si se analiza en conjunto y de manera secuencial según el

proceso de metástasis se puede observar cómo los niveles de PARP-1 son mayores en líneas de tumores primarios, disminuyen en CTCs para aumentar en las metastásicas, sugiriendo que esa disminución de PARP-1 podría ser uno de los mecanismos empleados para sobrevivir en el torrente sanguíneo, y que posteriormente la expresión de *PARP-1* se recupera al establecer el tumor secundario. Sin embargo, al no tener muestras pareadas de tumor primario, CTCs y metástasis, no es posible confirmar estos resultados y son necesarios nuevos estudios para confirmar esta hipótesis. No obstante, el estudio de la expresión de *PARP-1* en el estudio GSE74369 parece confirmar esa menor expresión de PARP-1 en CTCs.

La expresión de PARP-1 en CTCs apenas se ha estudiado, siendo descrita solamente en dos estudios de cáncer de mama. En uno de ellos se describe la presencia de PARP-1 tanto en núcleo como en citoplasma de CTCs, aunque con diferencias entre pacientes con cáncer luminal y triple negativo, y una mayor expresión de *PARP-1* en CTCs de cáncer luminal y estadios tempranos de cáncer de mama en comparación con CTCs de pacientes metastásicos y triples negativos (Sklias et al. 2022). El otro estudio señala que la expresión de *PARP-1* es menor en el perfil de expresión enriquecido en CTCs de pacientes con cáncer de mama comparado con el de individuos sanos, así como en células mononucleares de sangre periférica (Hensler et al. 2016). La menor expresión de *PARP-1* podría estar asociada con una mayor capacidad de inmunotolerancia y evasión del sistema inmune. Una baja expresión de *PARP-1* resulta en una mayor expresión de *FOXO3*, lo cual resulta en un aumento del fenotipo de Treg, asociado con inmunosupresión (Zhang et al. 2013)(Schlöder et al. 2022)(Huppert et al. 2021). Un aumento de *FOXO3* se ha descrito también en el mismo perfil de expresión enriquecido en CTCs (Hensler et al. 2016), por lo que éste podría ser uno de los mecanismos de supervivencia de las CTCs en sangre, sin embargo, se necesitan estudios adicionales para confirmarlo. Otro mecanismo de supervivencia en sangre de las CTCs mediado por PARP-1 podría ser a través de PD-L1. PARP-1 suprime la transcripción de *PD-L1*, mientras que su inhibición resulta en un aumento de éste (Ding et al. 2019)(Jiao et al. 2017)(Cui et al. 2024). PD-L1 es reconocido por linfocitos T, reduciendo su actividad citotóxica, y en el contexto tumoral favoreciendo la evasión inmunitaria (Cui et al. 2024). De hecho, existen estudios que señalan que el uso de olaparib se ha asociado con un mayor número de CTCs y de micrometástasis (F. Li et al. 2022). Estos datos apoyarían la hipótesis de que los menores niveles de PARP-1 en CTCs podrían ser uno de los

mecanismos de supervivencia en el torrente sanguíneo a través del aumento de los niveles de PD-L1 y del fenotipo Treg.

Aproximadamente el 50% de los pacientes detectados con CCR acaban desarrollando metástasis, siendo esta la principal causa de muerte. Estos tumores metastásicos presentan características distintas a las de los tumores originales, destacando una elevada resistencia al tratamiento (Filip et al. 2020). Aunque el uso de quimioterapia ha mejorado la supervivencia de estos pacientes, se estima que aproximadamente el 90% de los pacientes con metástasis acaba no respondiendo a la terapia (Ma et al. 2023). Esto revela la necesidad del desarrollo de estrategias que permitan abordar el tratamiento de este tipo de tumores.

Tal y como se discutió anteriormente, el uso de olaparib tanto en modelos *in vitro*, *in vivo* o incluso en ensayos clínicos está extendido para el tratamiento de tumores primarios de diferentes tipos de cáncer, así como para evaluar la capacidad metastásica de las células tras el tratamiento. Sin embargo, su estudio para el tratamiento de los tumores secundarios está menos explorado.

En nuestro estudio ambas líneas metastásicas responden de manera dosis-dependiente al tratamiento con olaparib, mostrando una disminución de la viabilidad *in vitro*. No se encuentran otros estudios que utilicen líneas celulares metastásicas, aunque sí organoides derivados de pacientes (PTDO). Concretamente en CCR, un estudio señala que de los 8 PTDO desarrollados del tejido metastásico, solo uno de ellos, que presentaba mutaciones en *BRC1*, presentaba sensibilidad al olaparib *in vitro*, aunque nunca se pudo testear en el paciente (Martini et al. 2023). Otro estudio con 17 PTDO metastásicos de CCR muestra una baja sensibilidad al olaparib en todos ellos (Cartry et al. 2023). Al extender este tipo de estudios a otros tumores como el cáncer de mama se observa también una baja sensibilidad de los PTDO metastásicos al tratamiento con olaparib (Önder et al. 2023). Curiosamente, pese a la falta de sensibilidad en PTDO metastásicos de cáncer de mama, ensayos clínicos en fase III muestran que el uso de olaparib como monoterapia aumenta la supervivencia y disminuye el riesgo de muerte o progresión de la enfermedad en pacientes con mutaciones en *BRCA* (Robson et al. 2017). Resultados similares a éste se han obtenido en cáncer de páncreas, próstata y ovario (Moore et al. 2018)(Mateo et al. 2024)(Golan et al. 2019). Sin embargo, los ensayos clínicos desarrollados en CCR no han obtenido resultados positivos (Takashima et al. 2024)(Behl et al. 2023). La falta de resultados en estos estudios puede deberse a que en CCR las mutaciones en *BRCA1/2*, asociadas con la respuesta al olaparib, se encuentran en apenas un 1%

de los casos (Kupfer et al. 2020). Las mutaciones en otros genes relacionados con los sistemas de reparación del ADN también presentan una menor incidencia en CCR en comparación con los tumores con resultados positivos para el tratamiento con olaparib (Moretto et al. 2022). Sin embargo, cuando se tiene en cuenta el estado de los sistemas de reparación al ADN en CCR, tampoco se tienen resultados positivos para el uso del olaparib para el tratamiento del CCR metastásico (Leichman et al. 2016). Estos estudios no tienen en cuenta el estado de p53, que como se discutió anteriormente, según un estudio desarrollado por Smeby y col es el factor determinante en la sensibilidad a la respuesta al olaparib en CCR (Smeby et al. 2020). Sin embargo, en nuestro trabajo no observamos diferencias en la reducción de la viabilidad entre la línea con p53 salvaje y mutado.

El tratamiento del CCR metastásico es complicado debido a que existe un número muy limitado de agentes quimioterapéuticos que proporcionen una respuesta positiva y prolongada en el tiempo. Los principales agentes utilizados para el tratamiento de este tipo de tumor son el 5-FU y el oxaliplatino. El uso de este último presenta una respuesta moderada, obteniéndose una ratio de respuesta positiva entre un 10-24%, que se ve incrementada a un 20-50% al combinarse con 5-FU y leucovorina (FOLFOX) (Comella et al. 2009). Con éste tratamiento combinado aumenta la tasa de supervivencia global de la enfermedad, sin embargo, al porcentaje de pacientes que no responden, se le suman aquellos que tienen que abandonarlo por la aparición de efectos secundarios significativos, y aquellos que acaban desarrollando resistencias (Comella et al. 2009)(M. Zhou et al. 2022)(Narayan et al. 2022). Actualmente se están utilizando dosis más bajas de oxaliplatino, ya que su acumulación en tejidos sanos está estrechamente relacionada con el desarrollo de resistencias y con el fin de reducir los efectos secundarios (Linares et al. 2023)(Park et al. 2018) ; o el uso o combinación con otros fármacos basados en dianas moleculares con resultados muy heterogéneos en ensayos *in vitro* y preclínicos (Kumar et al. 2023). Esto revela la necesidad del desarrollo de nuevas estrategias para salvar estas limitaciones.

En nuestro trabajo, realizamos una primera aproximación tratando las líneas metastásicas solamente con oxaliplatino. Ambas líneas celulares, tanto la wtp53 como la mtp53, mostraron respuesta dosis-dependiente al tratamiento con oxaliplatino. Si bien es cierto que la línea CPP19 con p53 funcional presenta una mayor sensibilidad al tratamiento con oxaliplatino. La necesidad de un p53

funcional para que el oxaliplatino ejerza su función anti-tumoral se ha descrito en otros estudios (Toscano et al. 2007).

El oxaliplatino es un compuesto alquilante el cual entre sus mecanismos de acción anti-tumoral provoca el daño en el ADN, con la consiguiente activación de distintos mecanismos de reparación del ADN (Alcindor & Beauger 2011), lo cual unido a la inhibición de PARP-1 podría tener un efecto sinérgico. En ese sentido, en cáncer gástrico PARP-1 está estrechamente relacionado con la resistencia al tratamiento con oxaliplatino (H. Li et al. 2021). La resistencia al oxaliplatino puede surgir a través de distintos mecanismos como METTL3 o KIAA1199, en el cáncer gástrico o CCR, respectivamente, que resultan en la estabilización de PARP-1 y la posterior intensificación de los mecanismos de reparación al ADN (H. Li et al. 2022)(Hua et al. 2023). La combinación del oxaliplatino, u otros derivados de platino con el mismo mecanismo de acción, con iPARP-1 presenta un efecto sinérgico en diferentes tipos de cáncer incluyendo gástrico (H. Li et al. 2021), hepático (Liang et al. 2015), ovario (Nicoletto et al. 2023), y pulmón (Michels et al. 2013). Sin embargo, también es posible encontrar estudios que señalan que no existe sinergia entre ambos fármacos (Andreidesz et al. 2021). El oxaliplatino, al menos en cáncer oral, induce la expresión de PARP-1 y muerte por *parthanatos* que se ve atenuada por el silenciamiento o inhibición de PARP-1 (D. Li et al. 2021). En nuestro estudio observamos un efecto sinérgico a bajas dosis entre ambos fármacos en ambas líneas celulares, aunque con ligeras diferencias entre ambas. En la línea celular CPP19, wtp53, el principal efecto sinérgico se observa en la combinación de todas las dosis de olaparib con las dosis 0.125-0.5 μM de oxaliplatino, mientras que en la línea CPP45, mtp53, es mayor en la combinación con las dosis 0.5-2.5 μM de oxaliplatino. Esta diferencia, obteniéndose la sinergia a dosis más bajas en el caso de la línea CPP19, podría estar relacionada con el estado de p53, ya que como se discutió previamente ambos fármacos necesitarían de un p53 funcional para ejercer su función (Toscano et al. 2007)(Smeby et al. 2020). Este resultado positivo en la combinación de ambos fármacos en términos de viabilidad se ha descrito en otros estudios de CCR (Ren et al. 2019)(Xu et al. 2015).

La combinación de olaparib y oxaliplatino presenta un efecto positivo en cuanto a la viabilidad, sin embargo, uno de los principales problemas para su instauración a nivel clínico podría estar en sus efectos secundarios. El oxaliplatino puede provocar náuseas, vómitos, diarrea, neuropatías periféricas, así como mielotoxicidad resultando en neutropenia, anemia hemolítica o

trombocitopenia (Alcindor & Beauger 2011). Muchos de estos efectos secundarios son compartidos con el olaparib, pese a ser éste el iPARP-1 más seguro (Y. Zhou et al. 2022). Este factor debería tenerse en cuenta en posteriores estudios preclínicos para validar realmente el efecto positivo de ambos fármacos siendo especialmente importante el efecto combinado en términos de mielotoxicidad, ya que los estudios realizados hasta ahora han sido *in vitro* o en pacientes, pero no combinando ambos fármacos simultáneamente (Nicoletto et al. 2023).

Aunque un tratamiento sea capaz de inducir la muerte o reducción de la masa tumoral, el tratamiento ideal sería aquel que elimina de manera total las células tumorales. El tumor está compuesto por células heterogéneas con distintas características moleculares, una de las subpoblaciones que lo componen son las CMCs. Estas células son más resistentes al tratamiento, y son consideradas las responsables de los posteriores procesos de resistencia y recaída tumoral (Hermann et al. 2010). Gran parte de los tratamientos actuales no son específicos y por las propias características de las CMCs, éstas tienden a no verse afectadas por éstos, de forma que la masa tumoral no se ve eliminada o permanecen en estado latente o quiescente dando lugar posteriormente a la recaída y crecimiento de nuevas masas tumorales (Liu, Lv, & Yang 2015). En nuestro estudio el tratamiento combinado de olaparib y oxaliplatino reduce la viabilidad de las células tumorales, por lo que evaluamos también el efecto sobre la población de CMCs.

En el caso de la línea CPP19 con wtp53 se observa que el tratamiento solo con olaparib no tiene ningún efecto sobre la población positiva para el marcador de CMCs estudiado, ALDH1, mientras que el tratamiento con oxaliplatino la reduce en las dosis 0.125 y 1 μM . La combinación de ambos fármacos presenta un efecto sinérgico en la reducción de la población de CMCs estudiada, lo que indicaría que este tratamiento combinado reduciría la viabilidad de las células tumorales, así como la población de CMCs. En el caso de la línea CPP45 con mtp53, el tratamiento con olaparib induce un aumento de la población ALDH⁺, y el oxaliplatino a la dosis de 0.125 μM . La combinación de ambos fármacos tiene un efecto antagónico en la reducción de la población de CMCs, viéndose aumentada la población de CMCs, lo que indicaría que pese a reducir la viabilidad, las células restantes poseen un mayor carácter *stem* con el consiguiente detrimento para el paciente. Este último resultado se ha obtenido en otros estudios como el ya mencionado anteriormente desarrollado por Bellio y col., que observaron que, aunque el tratamiento con olaparib reduce la viabilidad y el volumen tumoral, se

produce un enriquecimiento en CMCs (Bellio et al. 2019). Al igual que en nuestro caso, dicho efecto se observa en células con mutaciones en p53, lo que sugiere que el tratamiento con olaparib no es beneficioso en estos casos, lo cual concuerda con el resto de los resultados obtenidos en este trabajo sobre la relación de PARP-1 con las CMCs.

La formación de metástasis requiere un paso previo mediado por la liberación de CTCs al torrente sanguíneo. Tradicionalmente y según el modelo clásico de metástasis, la diseminación de las células tumorales ocurre en estadios avanzados, sin embargo, cada vez hay más evidencias de que este proceso ocurre en etapas tempranas de la enfermedad (Lawrence et al. 2023). A esto habría que sumarle el hecho de que los tratamientos con quimioterapia parecen aumentar la liberación de CTCs al torrente sanguíneo (Ortiz-Otero et al. 2020). Estos dos factores sugieren que un abordaje terapéutico que también actúe sobre las CTCs puede ser relevante para el manejo del CCR. Por estos motivos, en nuestro trabajo se evaluó la respuesta de las líneas derivadas de CTCs a los tratamientos con olaparib y oxaliplatino, así como su combinación.

El tratamiento con olaparib fue efectivo solamente a la dosis de 10 μ M, observándose diferencias entre las líneas con wtp53 y mtp53, siendo mayor el efecto en aquella con wtp53. Este mismo efecto se observa con el tratamiento con oxaliplatino, reduciendo la viabilidad en ambos casos, aunque el efecto es mayor en la línea con wtp53. Este mayor efecto en ambos tratamientos, podría estar relacionado con la ya mencionada necesidad de un p53 funcional para ejercer su función (Toscano et al. 2007)(Smeby et al. 2020). Cuando se analizan estos resultados en comparación con los obtenidos en las líneas metastásicas se observa una menor sensibilidad al tratamiento con oxaliplatino en las CTCs. Esta mayor resistencia al tratamiento queda patente al comparar las líneas con mtp53, CTC45 y CPP45, procedentes del mismo paciente, observándose una IC_{50} de 5.02 μ M en la línea metastásica, mientras que en la CTC a la dosis de 10 μ M todavía no se alcanzan viabilidades inferiores al 50%. Sin embargo, hay que tener cuidado al interpretar estos resultados, debido a que la viabilidad se analizó por métodos distintos, y en las líneas metastásicas se hizo en cultivos 2D, mientras que en las CTCs se hizo en 3D. No obstante, existen estudios que señalan resultados similares a éstos, observándose en CTCs de CCR una mayor resistencia al tratamiento con FIRI (5-FU + irinotecan) (Grillet et al. 2017), o en cáncer de mama al tratamiento con epirubicina y cisplatino (Gong et al. 2015).

La combinación de ambos fármacos tiene un efecto sinérgico en cuanto a la disminución de la viabilidad; aunque a diferencia de lo que ocurre en las líneas metastásicas, en las CTCs la sinergia se observa en la combinación de las dosis más altas de olaparib, 5 y 10 μM , y de oxaliplatino, 2.5-10 μM . Este desplazamiento de la sinergia a dosis más altas podría estar relacionado con la mayor resistencia al tratamiento mencionado anteriormente.

En el caso de las CTCs se evaluó el efecto del tratamiento sobre la población positiva para el marcador CD44v6. El marcador CD44v6 es una isoforma del marcador CD44, considerado un marcador de CMCs. Concretamente, CD44v6 es responsable de inducir la expresión de genes relacionados con la resistencia al tratamiento, así como facilitar los procesos de colonización, invasión y metástasis (Ma, Dong, & Chang 2019). El tratamiento con olaparib y oxaliplatino no produce ningún cambio en la población CD44v6⁺ en la línea CTC31 con wtp53, mientras que en el caso de la línea con mtp53, CTC45, se observa una tendencia hacia el aumento de la población CD44v6 al utilizar el olaparib. Al evaluar que ocurre en términos de intensidad, observamos que al utilizar olaparib en la línea CTC31 se observa una ligera disminución de ésta, mientras que en CTC45 se produce el efecto contrario, aumentando. Estos datos sugieren que el tratamiento con olaparib sería perjudicial en los pacientes con mutaciones en p53. En el caso de los pacientes con wtp53, el tratamiento sí podría ser beneficioso, aunque habría que evaluar otras características moleculares, ya que como se discutió anteriormente, la inhibición de PARP-1 resulta en un aumento de PD-L1 que podría proporcionarles a éstas células capacidad de evadir al sistema inmune.

Los resultados obtenidos tanto en CTCs y líneas metastásicas concuerdan con los descritos en la cohorte de pacientes estudiada y el efecto de la sobreexpresión de PARP-1 que sugieren una regulación diferencial de las CMCs mediada por PARP-1, y el potencial efecto distinto de su inhibición según el estado de p53. Estos datos, además podrían explicar la falta de respuesta en ensayos clínicos realizados en CCR, pese a los resultados positivos en ensayos preclínicos, en los que no se ha tenido en cuenta el estado de p53 (Leichman et al. 2016)(Smeby et al. 2020). Tampoco se han obtenido resultados positivos en ensayos clínicos que combinen iPARP-1 con FOLFIRI, irinotecan o fluoropirimidinas, en los que igualmente no se valora el estado de p53 (Chen et al. 2016)(Gorbunova et al. 2018)(Takashima et al. 2024). Sin embargo, la falta de respuesta en ensayos clínicos no ha impedido la administración de iPARP-1 a pacientes de CCR, pudiendo encontrar casos clínicos basados en el estado de los sistemas de

reparación del ADN. En 2021 se utilizó el tratamiento con olaparib e irinotecan en un paciente con deficiencias en ATM consiguiendo la estabilización de la enfermedad y disminución de marcadores tumorales (Papageorgiou et al. 2021), aunque no dan datos sobre el estado de p53. Previamente, en 2016, dos pacientes con mutaciones en distintos genes relacionados con la reparación homóloga fueron tratados con olaparib, obteniendo solamente en uno de ellos respuesta al tratamiento, lo que vuelve a revelar que simplemente el estado de los sistemas de reparación no es suficiente para predecir la posible respuesta a iPARP-1. Curiosamente, entre los dos pacientes se encuentran diferencias en el estado de *TP53BP1*, siendo el paciente con *TP53BP1* salvaje el que respondió al tratamiento (Ghiringhelli et al. 2016). Aunque *TP53BP1* está asociado con la reparación del ADN, se ha descrito que es necesario para la acumulación de p53 (Wang et al. 2002), por lo que el efecto observado podría ser en cierto modo debido a p53, como describimos en este trabajo, sin embargo, no se puede asegurar al no proporcionar el caso clínico datos sobre el estado de p53. En futuros ensayos clínicos sería interesante, por tanto, utilizar el estado de p53 como herramienta de estratificación con el fin de evaluar el beneficio de la terapia según si p53 se encuentra mutado o salvaje.

En resumen, en este trabajo describimos como PARP-1 se encuentra sobreexpresado en el CCR, asociándose con tumores pobre y moderadamente diferenciados cuando p53 está salvaje. En aquellos tumores con *mtp53*, una elevada expresión de PARP-1 es un factor pronóstico independiente para la supervivencia. Estas diferencias observadas se deberían a una regulación diferencial de PARP-1 sobre las CMCs, favoreciéndolas en el caso de los tumores *wtp53*, y perjudicándolas en aquellos con *mtp53*. Este efecto dual estaría producido por una regulación diferencial de los ritmos circadianos, que se ven potenciados por la acción de PARP-1 en los tumores *wtp53* favoreciendo el fenotipo de CMCs, mientras que se ven debilitados en aquellos *mtp53* con el consiguiente detrimento para las CMCs. El tratamiento con olaparib, aunque tiene efecto citotóxico y antitumoral en términos de viabilidad, su efecto sobre las CMCs depende de p53. En las células tumorales *wtp53*, además de revertir el efecto de PARP-1, reduce la capacidad de las CMCs, sin embargo, en las células *mtp53*, estimularía un fenotipo más agresivo. La expresión de PARP-1 varía entre tumor primario, metástasis y CTCs, siendo menor en las CTCs lo que podría estar relacionado con la supervivencia en el torrente sanguíneo promoviendo su escape inmunitario. El tratamiento con olaparib y/o oxaliplatino tiene un efecto citotóxico y antitumoral en términos de viabilidad tanto en CTCs

como en células metastásicas independientemente del estado de p53, además de presentar un efecto sinérgico. Sin embargo, en el contexto de las CMCs, el tratamiento combinado de ambos fármacos tendría un impacto positivo sobre este tipo de células cuando existe un p53 funcional, reduciéndolas; pero por el contrario aumenta la población al tratar aquellas células con mutaciones en este gen. Por tanto, en este trabajo señalamos una regulación diferencial de las CMCs mediada por PARP-1 a través de la regulación del ritmo circadiano, con el consiguiente impacto en el desarrollo y progresión del CCR, así como su papel como potencial biomarcador para determinar qué pacientes podrían desarrollar una respuesta positiva al tratamiento con iPARP-1.

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en este trabajo de tesis doctoral y la discusión de éstos se extraen las siguientes conclusiones:

1. PARP-1 se encuentra sobreexpresado en el tejido tumoral con respecto al tejido no tumoral adyacente en pacientes con CCR, independientemente del estado de p53.
2. En pacientes con CCR, en los tumores wtp53, la expresión de PARP-1 se asocia con tumores pobre y moderadamente diferenciados; mientras que en los tumores mtp53, una elevada expresión de PARP-1 es un factor pronóstico independiente para la supervivencia.
3. La sobreexpresión de PARP-1 en células wtp53 produce un aumento de la tasa de proliferación y favorece el fenotipo y funcionalidad de las CMCs. Sin embargo, su sobreexpresión en el contexto de mtp53 disminuye la proliferación celular y disminuye el carácter troncal de las CMCs.
4. En los pacientes con CCR, los genes del reloj circadiano se encuentran alterados y se relacionan de forma diferencial con PARP-1 dependiendo de los niveles de expresión de los marcadores de CMCs y del estado de p53.
5. La regulación diferencial ejercida por la sobreexpresión PARP-1 sobre las CMCs según el estado de p53 está producida por una regulación diferencial de los ritmos circadianos y la dependencia de las CMCs hacia ellos, potenciándose la robustez del ritmo circadiano en las células wtp53 y debilitándose en aquellas mtp53.
6. El tratamiento con olaparib presenta un efecto citotóxico independiente del estado de p53 y la expresión de PARP-1 mediante la inducción de apoptosis y parada del ciclo celular. Además, el olaparib revierte los efectos causados por la sobreexpresión de PARP-1 en las células wtp53, y reduce las propiedades funcionales de las CMCs en todas las líneas celulares, aunque en las líneas mtp53 produce un cambio fenotípico hacia otro más agresivo.
7. La expresión de PARP-1 varía según el origen de la célula tumoral, tumor primario, metástasis y CTCs, presentando las CTCs una menor expresión de PARP-1, lo cual puede ser uno de los mecanismos de este tipo de células para sobrevivir en el torrente sanguíneo.

Conclusiones

8. En líneas metastásicas de CCR, aunque el tratamiento combinado de olaparib y oxaliplatino presenta un efecto sinérgico antitumoral en términos de viabilidad celular a dosis bajas, disminuye el fenotipo de CMCs en el contexto de un p53 funcional, pero produce un enriquecimiento de éstas cuando se encuentra mutado.
9. En las CTCs de CCR, el tratamiento combinado de olaparib y oxaliplatino presenta cierto efecto sinérgico antitumoral en términos de viabilidad celular a dosis bajas, sin embargo, en el contexto mtp53 produce un enriquecimiento de la población de CMCs.

CONCLUSIONS

Based on the results obtained and discussed in this doctoral thesis, the following conclusions can be drawn:

1. PARP-1 is overexpressed in tumour tissue compared to adjacent non-tumour tissue in patients with CRC, regardless of p53 status.
2. In patients with CRC, in wtp53 tumours, PARP-1 expression is associated with poorly and moderately differentiated tumours, whereas in mtp53 tumours, high PARP-1 expression is an independent prognostic factor for survival.
3. PARP-1 overexpression in wtp53 cells leads to an increase in the proliferation rate and promotes the phenotype and properties of CSCs. However, its overexpression in the context of mtp53 decreases cell proliferation and decreases the features of CSCs.
4. In CRC patients, circadian clock genes are altered and differentially related to PARP-1 depending on the expression levels of CSCs markers and p53 status
5. The differential regulation exerted by PARP-1 overexpression on CSCs according to p53 status is due to differential regulation of circadian rhythms and the CSCs' dependence on them, with the circadian rhythm being strengthened in wtp53 cells and weakened in mtp53
6. Olaparib treatment has a cytotoxic effect regardless of p53 status and PARP-1 expression by inducing apoptosis and cell cycle arrest. Additionally, olaparib reverses the effects caused by PARP-1 overexpression in wtp53 cells and reduces the functional properties of CSCs in all cell lines, although in mtp53 cells, it induces a phenotypic shift towards a more aggressive one.
7. PARP-1 expression differs depending on the origin of the tumour cell, whether primary tumor, metastasis, or CTCs, with CTCs showing lower PARP-1 expression, which may be one of the mechanisms these cells use to survive in the bloodstream.
8. In metastatic CRC cell lines, although the combined treatment of olaparib and oxaliplatin presents a synergistic antitumor effect on terms of cell viability at low doses, it reduces the CSCs phenotype in the context of functional p53, but leads to an enrichment of these cells when p53 is mutated.

Conclusions

9. In CRC CTCs, the combined treatment of olaparib and oxaliplatin shows a certain synergistic antitumor effect in terms of cell viability at low doses, however, in the mtp53 context, it leads to an enrichment of the CSC population.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, Shafiq U., Ross Carruthers, Lesley Gilmour, Salih Yildirim, Colin Watts, and Anthony J. Chalmers. 2015. "Selective Inhibition of Parallel DNA Damage Response Pathways Optimizes Radiosensitization of Glioblastoma Stem-like Cells." *Cancer Research* 75(20):4416–28.
- Aiad, Hayam A., Mona A. H. Kandil, Mohammed A. El-Tahmody, Iman L. Abulkheir, Fatma M. Abulkasem, Asma A. Elmansori, and Mohammed A. Aleskandarany. 2015. "The Prognostic and Predictive Significance of PARP-1 in Locally Advanced Breast Cancer of Egyptian Patients Receiving Neoadjuvant Chemotherapy." *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology* 23(8):571–79.
- Alcindor, T. and N. Beauger. 2011. "Oxaliplatin: A Review in the Era of Molecularly Targeted Therapy." *Current Oncology* 18(1):18.
- Alemasova, Elizaveta E. and Olga I. Lavrik. 2019. "Poly(ADP-Ribosyl)ation by PARP1: Reaction Mechanism and Regulatory Proteins." *Nucleic Acids Research* 47(8):3811.
- Alshammari, Atika Hazzaa, Manal Aly Shalaby, Mohammad Saud Alanazi, and Hesham Mahmoud Saeed. 2014. "Novel Mutations of the PARP-1 Gene Associated with Colorectal Cancer in the Saudi Population." *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP* 15(8):3667–73.
- Alwers, Elizabeth, Min Jia, Matthias Kloor, Hendrik Bläker, Hermann Brenner, and Michael Hoffmeister. 2019. "Associations Between Molecular Classifications of Colorectal Cancer and Patient Survival: A Systematic Review." *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 17(3):402-410.e2.
- Ambrose, Helen E., Shaun Willimott, Richard W. Beswick, Françoise Dantzer, Josiane Ménissier De Murcia, José Yelamos, and Simon D. Wagner. 2009. "Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 (Parp-1)-Deficient Mice Demonstrate Abnormal Antibody Responses." *Immunology* 127(2):178.
- Andreidesz, Kitti, Balazs Koszegi, Dominika Kovacs, Viola Bagone Vantus, Ferenc Gallyas, and Krisztina Kovacs. 2021. "Effect of Oxaliplatin, Olaparib and LY294002 in Combination on Triple-Negative Breast Cancer Cells." *International Journal of Molecular Sciences* 22(4):1–15.
- Andrews, Peter W. and Paul J. Gokhale. 2024. "A Short History of Pluripotent Stem Cells Markers." *Stem Cell Reports* 19(1):1–10.
- Aroca-Siendones, María I., Sara Moreno-Sanjuan, Jose D. Puentes-Pardo, Michela Verbeni, Javier Arnedo, Julia Escudero-Feliu, María García-Costela, Adelina García-Robles, Ángel Carazo, and Josefa León. 2021. "Core Circadian Clock Proteins as Biomarkers of Progression in Colorectal Cancer." *Biomedicines* 9(8):967.
- Asher, Gad, Hans Reinke, Matthias Altmeyer, Maria Gutierrez-Arcelus, Michael O. Hottiger, and Ueli Schibler. 2010. "Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 Participates in the Phase Entrainment of Circadian Clocks to Feeding." *Cell* 142(6):943–53.
- Augustine, Titto, Radhashree Maitra, Jinghang Zhang, Jay Nayak, and Sanjay Goel. 2019. "Sensitization of Colorectal Cancer to Irinotecan Therapy by PARP Inhibitor Rucaparib." *Investigational New Drugs* 37(5):948–60.
- Ayyar, Vivaswath S. and Siddharth Sukumaran. 2021. "Circadian Rhythms: Influence on Physiology, Pharmacology, and Therapeutic Interventions." *Journal of*

Bibliografia

- Pharmacokinetics and Pharmacodynamics* 2021 48:3 48(3):321–38.
- Bai, Peter. 2015. "Biology of Poly(ADP-Ribose) Polymerases: The Factotums of Cell Maintenance." *Molecular Cell* 58(6):947–58.
- Bai, Péter, Carles Cantó, Hugues Oudart, Attila Brunyánszki, Yana Cen, Charles Thomas, Hiroyasu Yamamoto, Aline Huber, Borbála Kiss, Riekelt H. Houtkooper, Kristina Schoonjans, Valérie Schreiber, Anthony A. Sauve, Josiane Menissier-De Murcia, and Johan Auwerx. 2011. "PARP-1 Inhibition Increases Mitochondrial Metabolism through SIRT1 Activation." *Cell Metabolism* 13(4):461.
- Barton, Valerie N., Andrew M. Donson, B. K. Kleinschmidt-DeMasters, Lia Gore, Arthur K. Liu, and Nicholas K. Foreman. 2009. "PARP1 Expression in Pediatric Central Nervous System Tumors." *Pediatric Blood & Cancer* 53(7):1227–30.
- Barwick, Benjamin G., Vikas A. Gupta, Paula M. Vertino, and Lawrence H. Boise. 2019. "Cell of Origin and Genetic Alterations in the Pathogenesis of Multiple Myeloma." *Frontiers in Immunology* 10(MAY):458658.
- Bastos, Inês M., Sandra Rebelo, and Vera L. M. Silva. 2024. "A Review of Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP1) Role and Its Inhibitors Bearing Pyrazole or Indazole Core for Cancer Therapy." *Biochemical Pharmacology* 221:116045.
- Battle, Eduard and Hans Clevers. 2017. "Cancer Stem Cells Revisited." *Nature Medicine* 2017 23:10 23(10):1124–34.
- Battaglin, Francesca, Priscilla Chan, Yuanzhong Pan, Shivani Soni, Meng Qu, Erin R. Spiller, Sofi Castanon, Evanthia T. Roussos Torres, Shannon M. Mumenthaler, Steve A. Kay, and Heinz Josef Lenz. 2021. "Clocking Cancer: The Circadian Clock as a Target in Cancer Therapy." *Oncogene* 2021 40:18 40(18):3187–3200.
- Bedard, Philippe L., Aaron R. Hansen, Mark J. Ratain, and Lillian L. Siu. 2013. "Tumour Heterogeneity in the Clinic." *Nature* 2013 501:7467 501(7467):355–64.
- Behl, Deepti, Michael Rothe, Pam K. Mangat, Elizabeth Garrett-Mayer, Laura Catherine Farrington, Oxana V. Crysler, Elie G. Dib, Herbert Leon Duvivier, Michael J. Hall, John Stuart Salmon, Olatunji B. Alese, Alissa S. Marr, Isa Ngirailemesang, Latha Polavaram, Ramya Thota, Eddy Shih-Hsin Yang, Raegan O'Lone, Gina N. Grantham, Susan Halabi, and Richard L. Schilsky. 2023. "Olaparib (O) in Patients (Pts) with Colorectal Cancer (CRC) with ATM Mutation (Mut): Results from the Targeted Agent and Profiling Utilization Registry (TAPUR) Study." https://doi.org/10.1200/JCO.2023.41.4_suppl.122 41(4_suppl):122–122.
- Bellio, Chiara, Celeste DiGloria, Rosemary Foster, Kaitlyn James, Panagiotis A. Konstantinopoulos, Whitfield B. Growdon, and Bo R. Rueda. 2019. "PARP Inhibition Induces Enrichment of DNA Repair-Proficient CD133 and CD117 Positive Ovarian Cancer Stem Cells." *Molecular Cancer Research* 17(2):431–45.
- Ben-Porath, Ittai, Matthew W. Thomson, Vincent J. Carey, Ruping Ge, George W. Bell, Aviv Regev, and Robert A. Weinberg. 2008. "An Embryonic Stem Cell-like Gene Expression Signature in Poorly Differentiated Aggressive Human Tumors." *Nature Genetics* 40(5):499.
- Benitah, Salvador Aznar and Patrick Simon Welz. 2020. "Circadian Regulation of Adult Stem Cell Homeostasis and Aging." *Cell Stem Cell* 26(6):817–31.

- Bertucci, François, Pascal Finetti, Audrey Monneur, Delphine Perrot, Christine Chevreau, Axel Le Cesne, Jean Yves Blay, Olivier Mir, and Daniel Birnbaum. 2019. "PARP1 Expression in Soft Tissue Sarcomas Is a Poor-Prognosis Factor and a New Potential Therapeutic Target." *Molecular Oncology* 13(7):1577–88.
- Beumer, Joep and Hans Clevers. 2016. "Regulation and Plasticity of Intestinal Stem Cells during Homeostasis and Regeneration." *Development* 143(20):3639–49.
- Bhamidipati, Deepak, Jaime I. Haro-Silerio, Timothy A. Yap, and Natalie Ngoi. 2023. "PARP Inhibitors: Enhancing Efficacy through Rational Combinations." *British Journal of Cancer* 2023 129:6 129(6):904–16.
- Bi, Fang Fang, Da Li, and Qing Yang. 2013. "Hypomethylation of ETS Transcription Factor Binding Sites and Upregulation of PARP1 Expression in Endometrial Cancer." *BioMed Research International* 2013.
- Bianchi, Anna, Salvatore Lopez, Gary Altwerger, Stefania Bellone, Elena Bonazzoli, Luca Zammataro, Aranzazu Manzano, Paola Manara, Emanuele Perrone, Burak Zeybek, Chanhee Han, Gulden Menderes, Elena Ratner, Dan Arin Silasi, Gloria S. Huang, Masoud Azodi, Justin Y. Newberg, Dean C. Pavlick, Julia Elvin, Garrett M. Frampton, Peter E. Schwartz, and Alessandro D. Santin. 2019. "PARP-1 Activity (PAR) Determines the Sensitivity of Cervical Cancer to Olaparib." *Gynecologic Oncology* 155(1):144–50.
- Bidard, F. C., F. R. Ferrand, F. Huguet, P. Hammel, C. Louvet, D. Malka, V. Boige, M. Ducreux, T. Andre, A. de Gramont, P. Mariani, and J. Y. Pierga. 2012. "Disseminated and Circulating Tumor Cells in Gastrointestinal Oncology." *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 82(2):103–15.
- Biller, Leah H. and Deborah Schrag. 2021. "Diagnosis and Treatment of Metastatic Colorectal Cancer: A Review." *JAMA* 325(7):669–85.
- Borgna, Silvia, Michela Armellin, Alessandra Di Gennaro, Roberta Maestro, and Manuela Santarosa. 2012. "Mesenchymal Traits Are Selected along with Stem Features in Breast Cancer Cells Grown as Mammospheres." *Cell Cycle* 11(22):4242.
- Bray, Freddie, Mathieu Laversanne, Hyuna Sung, Jacques Ferlay, Rebecca L. Siegel, Isabelle Soerjomataram, and Ahmedin Jemal. 2024. "Global Cancer Statistics 2022: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries." *CA: A Cancer Journal for Clinicians*.
- Brenner, Hermann, Lutz Altenhofen, Christian Stock, and Michael Hoffmeister. 2013. "Natural History of Colorectal Adenomas: Birth Cohort Analysis among 3.6 Million Participants of Screening Colonoscopy." *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 22(6):1043–51.
- Brenner, Hermann and Chen Chen. 2018. "The Colorectal Cancer Epidemic: Challenges and Opportunities for Primary, Secondary and Tertiary Prevention." *British Journal of Cancer* 2018 119:7 119(7):785–92.
- Burrell, Rebecca A., Nicholas McGranahan, Jiri Bartek, and Charles Swanton. 2013. "The Causes and Consequences of Genetic Heterogeneity in Cancer Evolution." *Nature* 2013 501:7467 501(7467):338–45.
- Butera, Alessio and Ivano Amelio. 2024. "Deciphering the Significance of P53 Mutant

- Proteins." *Trends in Cell Biology* 0(0).
- Cai, D. W., D. Chen, S. P. Sun, Z. J. Liu, F. Liu, S. Z. Xian, P. S. Wu, and G. Q. Kong. 2018. "Overexpression of PER3 Reverses Paclitaxel Resistance of Prostate Cancer Cells by Inhibiting the Notch Pathway." *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 22(9):2572–79.
- Carafa, Vincenzo, Lucia Altucci, and Angela Nebbioso. 2019. "Dual Tumor Suppressor and Tumor Promoter Action of Sirtuins in Determining Malignant Phenotype." *Frontiers in Pharmacology* 9(JAN):416687.
- Carruthers, Ross D., Shafiq U. Ahmed, Shaliny Ramachandran, Karen Strathdee, Kathreena M. Kurian, Ann Hedley, Natividad Gomez-Roman, Gabriela Kalna, Mathew Neilson, Lesley Gilmour, Katrina H. Stevenson, Ester M. Hammond, and Anthony J. Chalmers. 2018. "Replication Stress Drives Constitutive Activation of the DNA Damage Response and Radioresistance in Glioblastoma Stem-like Cells." *Cancer Research* 78(17):5060–71.
- Cartry, Jérôme, Sabrina Bedja, Alice Boilève, Jacques R. R. Mathieu, Emilie Gontran, Maxime Annereau, Bastien Job, Ali Mouawia, Pierre Mathias, Thierry De Baère, Antoine Italiano, Benjamin Besse, Isabelle Sourrouille, Maximiliano Gelli, Mohamed Amine Bani, Peggy Dartigues, Antoine Hollebecque, Cristina Smolenschi, Michel Ducreux, David Malka, and Fanny Jaulin. 2023. "Implementing Patient Derived Organoids in Functional Precision Medicine for Patients with Advanced Colorectal Cancer." *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 42(1):1–17.
- de Castro e Gloria, Helena, Laura Jesuino Nogueira, Patrícia Bencke Grudzinski, Paola Victória da Costa Ghignatti, Temenouga Nikolova Guecheva, Natalia Motta Leguisamo, and Jenifer Saffi. 2021. "Olaparib-Mediated Enhancement of 5-Fluorouracil Cytotoxicity in Mismatch Repair Deficient Colorectal Cancer Cells." *BMC Cancer* 21(1):1–13.
- Chaicharoenaudomrung, Nipha, Phongsakorn Kunhorm, and Parinya Noisa. 2019. "Three-Dimensional Cell Culture Systems as an in Vitro Platform for Cancer and Stem Cell Modeling." *World Journal of Stem Cells* 11(12):1065.
- Chang, Daniel T., Christopher H. Chapman, Jeffrey A. Norton, Brendan Visser, George A. Fisher, Pamela Kunz, James M. Ford, Albert C. Koong, and Reetesh K. Pai. 2010. "Expression of P16INK4A but Not Hypoxia Markers or Poly Adenosine Diphosphate-Ribose Polymerase Is Associated with Improved Survival in Patients with Pancreatic Adenocarcinoma." *Cancer* 116(22):5179–87.
- Cheasley, Dane, Kathleen Pishas, Dongha Kim, and Hye Jin Nam. 2022. "PARP Inhibitors: Clinical Limitations and Recent Attempts to Overcome Them." *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol. 23, Page 8412 23(15):8412.
- Chen, Eric X., Derek J. Jonker, Lillian L. Siu, Karyn McKeever, Deborah Keller, Julie Wells, Linda Hagerman, and Lesley Seymour. 2016. "A Phase I Study of Olaparib and Irinotecan in Patients with Colorectal Cancer: Canadian Cancer Trials Group IND 187." *Investigational New Drugs* 34(4):450–57.
- Chen, X. I. A., H. U. A. Guan, Xiao Dan Liu, Da Fei Xie, Y. U. Wang, Teng Ma, B. O.

- Huang, and Ping Kun Zhou. 2018. "P53 Positively Regulates the Expression of Cancer Stem Cell Marker CD133 in HCT116 Colon Cancer Cells." *Oncology Letters* 16(1):431–38.
- Chen, Xiaohua, Taotao Zhang, Wei Su, Zhihui Dou, Dapeng Zhao, Xiaodong Jin, Huiwen Lei, Jing Wang, Xiaodong Xie, Bo Cheng, Qiang Li, Hong Zhang, and Cuixia Di. 2022. "Mutant P53 in Cancer: From Molecular Mechanism to Therapeutic Modulation." *Cell Death & Disease* 2022 13:11 13(11):1–14.
- Choi, E. B., A. Y. Yang, S. C. Kim, J. Lee, J. K. Choi, C. Choi, and M. Y. Kim. 2016. "PARP1 Enhances Lung Adenocarcinoma Metastasis by Novel Mechanisms Independent of DNA Repair." *Oncogene* 2016 35:35 35(35):4569–79.
- Chun, Sung Kook, Bridget M. Fortin, Rachel C. Fellows, Amber N. Habowski, Amandine Verlande, Wei A. Song, Alisa L. Mahieu, Austin E. Y. T. Lefebvre, Jason N. Sterrenberg, Leandro M. Velez, Michelle A. Digman, Robert A. Edwards, Nicholas R. Pannunzio, Marcus M. Seldin, Marian L. Waterman, and Selma Masri. 2022. "Disruption of the Circadian Clock Drives Apc Loss of Heterozygosity to Accelerate Colorectal Cancer." *Science Advances* 8(32):2389.
- Comella, Pasquale, Rossana Casaretti, Claudia Sandomenico, Antonio Avallone, and Luca Franco. 2009. "Role of Oxaliplatin in the Treatment of Colorectal Cancer." *Therapeutics and Clinical Risk Management* 5(1):229.
- Cooks, Tomer, Ioannis S. Pateras, Lisa M. Jenkins, Keval M. Patel, Ana I. Robles, James Morris, Tim Forshew, Ettore Appella, Vassilis G. Gorgoulis, and Curtis C. Harris. 2018. "Mutant P53 Cancers Reprogram Macrophages to Tumor Supporting Macrophages via Exosomal MiR-1246." *Nature Communications* 2018 9:1 9(1):1–15.
- Coskun, Abdurrahman, Atefeh Zarepour, and Ali Zarrabi. 2023. "Physiological Rhythms and Biological Variation of Biomolecules: The Road to Personalized Laboratory Medicine." *International Journal of Molecular Sciences* 24(7).
- Cui, Jia Wen, Yao Li, Yang Yang, Hai Kui Yang, Jia Mei Dong, Zhi Hua Xiao, Xin He, Jia Hao Guo, Rui Qi Wang, Bo Dai, and Zhi Ling Zhou. 2024. "Tumor Immunotherapy Resistance: Revealing the Mechanism of PD-1 / PD-L1-Mediated Tumor Immune Escape." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 171:116203.
- Dadheech, Nidheesh, Abhay Srivastava, Rashmi G. Shah, Girish M. Shah, and Sarita Gupta. 2022. "Role of Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 in Regulating Human Islet Cell Differentiation." *Scientific Reports* 2022 12:1 12(1):1–16.
- Dagogo-Jack, Ibiayi and Alice T. Shaw. 2017. "Tumour Heterogeneity and Resistance to Cancer Therapies." *Nature Reviews Clinical Oncology* 2017 15:2 15(2):81–94.
- Daly, Gordon R., Maen Monketh AlRawashdeh, Jason McGrath, Gavin P. Dowling, Luke Cox, Sindhuja Naidoo, Damir Vareslija, Arnold D. K. Hill, and Leonie Young. 2024. "PARP Inhibitors in Breast Cancer: A Short Communication." *Current Oncology Reports* 26(2):103–13.
- De, Arpan, Dilshan H. Beligala, Vishal P. Sharma, Christian A. Burgos, Angelia M. Lee, and Michael E. Geusz. 2020. "Cancer Stem Cell Generation during Epithelial-Mesenchymal Transition Is Temporally Gated by Intrinsic Circadian Clocks." *Clinical and Experimental Metastasis* 37(5):617–35.

- Demény, Máté A. and László Virág. 2021. "The Parp Enzyme Family and the Hallmarks of Cancer Part 1. Cell Intrinsic Hallmarks." *Cancers* 13(9):2042.
- Derwinger, Kristoffer, Karl Kododa, Elinor Bexe-Lindskog, and Helena Taflin. 2010. "Tumour Differentiation Grade Is Associated with TNM Staging and the Risk of Node Metastasis in Colorectal Cancer." *Acta Oncologica* 49(1):57–62.
- Dias, Mariana Paes, Sarah C. Moser, Shridar Ganesan, and Jos Jonkers. 2021. "Understanding and Overcoming Resistance to PARP Inhibitors in Cancer Therapy." *Nature Reviews Clinical Oncology* 2021 18:12 18(12):773–91.
- Dierickx, Pieterjan, Linda W. Van Laake, and Niels Geijsen. 2018. "Circadian Clocks: From Stem Cells to Tissue Homeostasis and Regeneration." *EMBO Reports* 19(1):18–28.
- Ding, Ling, Xi Chen, Xiaqing Xu, Yuli Qian, Guikai Liang, Fengqi Yao, Zhangting Yao, Honghai Wu, Jieqiong Zhang, Qiaojun He, and Bo Yang. 2019. "PARP1 Suppresses the Transcription of PD-L1 by Poly(ADP-Ribosyl)ating STAT3." *Cancer Immunology Research* 7(1):136–49.
- Dinhof, Carina, Christine Pirker, Philipp Kroiss, Dominik Kirchofer, Lisa Gabler, Johannes Gojo, Daniela Lötsch-Gojo, Mirjana Stojanovic, Gerald Timelthaler, Franziska Ferk, Siegfried Knasmüller, Johannes Reisecker, Sabine Spiegl-Kreinecker, Peter Birner, Matthias Preusser, and Walter Berger. 2020. "P53 Loss Mediates Hypersensitivity to ETS Transcription Factor Inhibition Based on PARylation-Mediated Cell Death Induction." *Cancers* 12(11):1–21.
- Dong, Zhen, Guoxin Zhang, Meng Qu, Ryan C. Gimple, Qiulian Wu, Zhixin Qiu, Briana C. Prager, Xiuxing Wang, Leo J. Y. Kim, Andrew R. Morton, Deobrat Dixit, Wenchao Zhou, Haidong Huang, Bin Li, Zhe Zhu, Shideng Bao, Stephen C. Mack, Lukas Chavez, Steve A. Kay, and Jeremy N. Rich. 2019. "Targeting Glioblastoma Stem Cells through Disruption of the Circadian Clock." *Cancer Discovery* 9(11):1556.
- Dörsam, Bastian, Nina Seiwert, Sebastian Foersch, Svenja Stroh, Georg Nagel, Diana Begaliew, Erika Diehl, Alexander Kraus, Maureen McKeague, Vera Minneker, Vassilis Roukos, Sonja Reißig, Ari Waisman, Markus Moehler, Anna Stier, Aswin Mangerich, Françoise Dantzer, Bernd Kaina, and Jörg Fahrner. 2018. "PARP-1 Protects against Colorectal Tumor Induction, but Promotes Inflammation-Driven Colorectal Tumor Progression." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115(17):E4061–70.
- Dziaman, Tomasz, Hubert Ludwiczak, Jaroslaw M. Ciesla, Zbigniew Banaszkiwicz, Alicja Winczura, Mateusz Chmielarczyk, Ewa Wisniewska, Andrzej Marszalek, Barbara Tudek, and Ryszard Olinski. 2014. "PARP-1 Expression Is Increased in Colon Adenoma and Carcinoma and Correlates with OGG1." *PLOS ONE* 9(12):e115558.
- Ebrahimi, Nasim, Maral Afshinpour, Siavash Seifollahy Fakhr, Paniz Ghasempour Kalkhoran, Vida Shadman-Manesh, Samaneh Adelian, Sheida Beiranvand, Fatemeh Rezaei-Tazangi, Roya Khorrarn, Michael R. Hamblin, and Amir Reza Aref. 2023. "Cancer Stem Cells in Colorectal Cancer: Signaling Pathways Involved in Stemness and Therapy Resistance." *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 182:103920.

- Ehteram, Hassan, Fatemeh Aslanbeigi, Ebrahim Ghoochani Khorasani, Mohammad Tolouee, and Hamed Haddad Kashani. 2022. "Expression and Prognostic Significance of Stem Cell Marker CD133 in Survival Rate of Patients with Colon Cancer." *Oncology and Therapy* 10(2):451.
- Erener, Süheda, Mareike Hesse, Radina Kostadinova, and Michael O. Hottiger. 2012. "Poly(ADP-Ribose)Polymerase-1 (PARP1) Controls Adipogenic Gene Expression and Adipocyte Function." *Molecular Endocrinology* 26(1):79–86.
- Fagiani, Francesca, Daniele Di Marino, Alice Romagnoli, Cristina Travelli, Davide Voltan, Lorenzo Di Cesare Mannelli, Marco Racchi, Stefano Govoni, and Cristina Lanni. 2022. "Molecular Regulations of Circadian Rhythm and Implications for Physiology and Diseases." *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2022 7:1 7(1):1–20.
- Fares, Jawad, Mohamad Y. Fares, Hussein H. Khachfe, Hamza A. Salhab, and Youssef Fares. 2020. "Molecular Principles of Metastasis: A Hallmark of Cancer Revisited." *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2020 5:1 5(1):1–17.
- Filip, Stanislav, Veronika Vymetalkova, Jiri Petera, Ludmila Vodickova, Ondrej Kubecek, Stanislav John, Filip Cecka, Marketa Krupova, Monika Manethova, Klara Cervena, and Pavel Vodicka. 2020. "Distant Metastasis in Colorectal Cancer Patients—Do We Have New Predicting Clinicopathological and Molecular Biomarkers? A Comprehensive Review." *International Journal of Molecular Sciences* 2020, Vol. 21, Page 5255 21(15):5255.
- Fischbach, Arthur, Annika Krüger, Stephanie Hampp, Greta Assmann, Lisa Rank, Matthias Hufnagel, Martin T. Stöckl, Jan M. F. Fischer, Sebastian Veith, Pascal Rossatti, Magdalena Ganz, Elisa Ferrando-May, Andrea Hartwig, Karin Hauser, Lisa Wiesmüller, Alexander Bürkle, and Aswin Mangerich. 2018. "The C-Terminal Domain of P53 Orchestrates the Interplay between Non-Covalent and Covalent Poly(ADP-Ribosyl)ation of P53 by PARP1." *Nucleic Acids Research* 46(2):804.
- Frederick, Mallory I., Djihane Abdesselam, Anna Clouvel, Laurent Croteau, and Saima Hassan. 2024. "Leveraging PARP-1/2 to Target Distant Metastasis." *International Journal of Molecular Sciences* 2024, Vol. 25, Page 9032 25(16):9032.
- Fröhlich, Lisa Marie, Ana Villar-Miyar, Tamara Heintze, Birgit Sauer, and Birgit Schittek. 2024. "PARP1 Expression Predicts PARP Inhibitor Sensitivity and Correlates with Metastatic Potential and Overall Survival in Melanoma." *International Journal of Cancer* 155(2):203–10.
- Gaggianesi, Miriam, Simone Di Franco, Vincenzo Davide Pantina, Gaetana Porcelli, Caterina D'Accardo, Francesco Verona, Veronica Veschi, Lorenzo Colarossi, Naida Faldetta, Giuseppe Pistone, Maria Rita Bongiorno, Matilde Todaro, and Giorgio Stassi. 2021. "Messing Up the Cancer Stem Cell Chemoresistance Mechanisms Supported by Tumor Microenvironment." *Frontiers in Oncology* 11:702642.
- García-Costela, María, Julia Escudero-Feliú, Jose D. Puentes-Pardo, Sara Moreno San Juan, Sonia Morales-Santana, Sandra Ríos-Arrabal, Angel Carazo, and Josefa León. 2020. "Circadian Genes as Therapeutic Targets in Pancreatic Cancer." *Frontiers in Endocrinology* 11:556480.

Bibliografia

- García Parra, Jetzabel. 2012. "PARP1 Expression in Breast Cancer and Effects of Its Inhibition in Preclinical Models." *TDX (Tesis Doctorals En Xarxa)*.
- Gehart, Helmuth and Hans Clevers. 2018. "Tales from the Crypt: New Insights into Intestinal Stem Cells." *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2018 16:1 16(1):19–34.
- Ghaleb, Amr, Malik Padellan, and Natalia Marchenko. 2020. "Mutant P53 Drives the Loss of Heterozygosity by the Upregulation of Nek2 in Breast Cancer Cells." *Breast Cancer Research* 22(1):1–17.
- Ghatak, Dishari, Damayanti Das Ghosh, and Susanta Roychoudhury. 2021. "Cancer Stemness: P53 at the Wheel." *Frontiers in Oncology* 10:604124.
- Ghiringhelli, Francois, Corentin Richard, Sandy Chevrier, Frédérique Végran, and Romain Boidot. 2016. "Efficiency of Olaparib in Colorectal Cancer Patients with an Alteration of the Homologous Repair Protein." *World Journal of Gastroenterology* 22(48):10680.
- Ghosh, Rajib, Sanchita Roy, and Sonia Franco. 2018. "PARP1 Depletion Induces RIG-I-Dependent Signaling in Human Cancer Cells." *PLOS ONE* 13(3):e0194611.
- Gilabert, Marine, Simon Launay, Christophe Ginestier, François Bertucci, Stéphane Audebert, Mathieu Pophillat, Yves Toiron, Emilie Baudalet, Pascal Finetti, Tetsuro Noguchi, Hagay Sobol, Daniel Birnbaum, Jean Paul Borg, Emmanuelle Charafe-Jauffret, and Anthony Gonçalves. 2014. "Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 (PARP1) Overexpression in Human Breast Cancer Stem Cells and Resistance to Olaparib." *PLoS ONE* 9(8).
- Gillespie, Matthew S., Ciara M. Ward, and Clare C. Davies. 2023. "DNA Repair and Therapeutic Strategies in Cancer Stem Cells." *Cancers* 15(6):1897.
- Golan, Talia, Pascal Hammel, Michele Reni, Eric Van Cutsem, Teresa Macarulla, Michael J. Hall, Joon-Oh Park, Daniel Hochhauser, Dirk Arnold, Do-Youn Oh, Anke Reinacher-Schick, Giampaolo Tortora, Hana Algül, Eileen M. O'Reilly, David McGuinness, Karen Y. Cui, Katia Schlienger, Gershon Y. Locker, and Hedy L. Kindler. 2019. "Maintenance Olaparib for Germline BRCA -Mutated Metastatic Pancreatic Cancer ." *New England Journal of Medicine* 381(4):317–27.
- Gonçalves, Anthony, Pascal Finetti, Renaud Sabatier, Marine Gilabert, José Adelaide, Jean Paul Borg, Max Chaffanet, Patrice Viens, Daniel Birnbaum, and François Bertucci. 2011. "Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 MRNA Expression in Human Breast Cancer: A Meta-Analysis." *Breast Cancer Research and Treatment* 127(1):273–81.
- Gong, Chang, Bodu Liu, Yandan Yao, Shaohua Qu, Wei Luo, Weige Tan, Qiang Liu, Herui Yao, Lee Zou, Fengxi Su, and Erwei Song. 2015. "Potentiated DNA Damage Response in Circulating Breast Tumor Cells Confers Resistance to Chemotherapy." *The Journal of Biological Chemistry* 290(24):14811.
- Gorbunova, Vera, J. Thaddeus Beck, Ralf Dieter Hofheinz, Pilar Garcia-Alfonso, Marina Nechaeva, Antonio Cubillo Gracian, Laszlo Mangel, Elena Elez Fernandez, Dustin A. Deming, Ramesh K. Ramanathan, Alison H. Torres, Danielle Sullivan, Yan Luo, and Jordan D. Berlin. 2018. "A Phase 2 Randomised Study of Veliparib plus

- FOLFIRI±bevacizumab versus Placebo plus FOLFIRI±bevacizumab in Metastatic Colorectal Cancer." *British Journal of Cancer* 2018 120:2 120(2):183–89.
- Gotoh, Tetsuya, Marian Vila-Caballer, Jingjing Liu, Samuel Schiffhauer, and Carla V. Finkielstein. 2015. "Association of the Circadian Factor Period 2 to P53 Influences P53's Function in DNA-Damage Signaling." *Molecular Biology of the Cell* 26(2):359.
- Grillet, Fanny, Elsa Bayet, Olivia Villeronce, Luke Zappia, Ebba Louise Lagerqvist, Sebastian Lunke, Emmanuelle Charafe-Jauffret, Kym Pham, Christina Molck, Nathalie Rolland, Jean François Bourgaux, Michel Prudhomme, Claire Philippe, Sophie Bravo, Jean Christophe Boyer, Lucile Canterel-Thouennon, Graham Roy Taylor, Arthur Hsu, Jean Marc Pascussi, Frédéric Hollande, and Julie Pannequin. 2017. "Circulating Tumour Cells from Patients with Colorectal Cancer Have Cancer Stem Cell Hallmarks in Ex Vivo Culture." *Gut* 66(10):1802–10.
- Guinney, Justin, Rodrigo Dienstmann, Xin Wang, Aurélien De Reyniès, Andreas Schlicker, Charlotte Sonesson, Laetitia Marisa, Paul Roepman, Gift Nyamundanda, Paolo Angelino, Brian M. Bot, Jeffrey S. Morris, Iris M. Simon, Sarah Gerster, Evelyn Fessler, Felipe De Sousa .E Melo, Edoardo Missiaglia, Hena Ramay, David Barras, Krisztian Homicsko, Dipen Maru, Ganiraju C. Manyam, Bradley Broom, Valerie Boige, Beatriz Perez-Villamil, Ted Laderas, Ramon Salazar, Joe W. Gray, Douglas Hanahan, Josep Tabernero, Rene Bernards, Stephen H. Friend, Pierre Laurent-Puig, Jan Paul Medema, Anguraj Sadanandam, Lodewyk Wessels, Mauro Delorenzi, Scott Kopetz, Louis Vermeulen, and Sabine Tejpar. 2015. "The Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer." *Nature Medicine* 21:11 21(11):1350–56.
- Guo, Yuhan, Boyang Fan, and · Mo Li. 2023. "PARP Molecular Functions and Applications of PARP Inhibitors in Cancer Treatment." *Genome Instability & Disease* 2023 4:3 4(3):137–53.
- Gupte, Rebecca, Ziyang Liu, and W. Lee Kraus. 2017. "PARPs and ADP-Ribosylation: Recent Advances Linking Molecular Functions to Biological Outcomes." *Genes & Development* 31(2):101.
- Gustavsson, Bengt, Göran Carlsson, David MacHover, Nicholas Petrelli, Arnaud Roth, Hans Joachim Schmoll, Kjell Magne Tveit, and Fernando Gibson. 2015. "A Review of the Evolution of Systemic Chemotherapy in the Management of Colorectal Cancer." *Clinical Colorectal Cancer* 14(1):1–10.
- Haak, Victoria M., Sui Huang, and Dipak Panigrahy. 2021. "Debris-Stimulated Tumor Growth: A Pandora's Box?" *Cancer and Metastasis Reviews* 2021 40:3 40(3):791–801.
- Hähnel, Patricia S., Birgit Enders, Daniel Sasca, Wynand P. Roos, Bernd Kaina, Lars Bullinger, Matthias Theobald, and Thomas Kindler. 2014. "Targeting Components of the Alternative NHEJ Pathway Sensitizes KRAS Mutant Leukemic Cells to Chemotherapy." *Blood* 123(15):2355–66.
- Hamada, Toshiyuki, Tomoko Niki, and Norio Ishida. 2014. "Role of P53 in the Entrainment of Mammalian Circadian Behavior Rhythms." *Genes to Cells* 19(5):441–48.
- Han, Gwan Hee, Julie Kim, Hee Yun, Hanbyoul Cho, Joon Yong Chung, Jae Hoon Kim,

- and Stephen M. Hewitt. 2021. "CRY1 Regulates Chemoresistance in Association With NANOG by Inhibiting Apoptosis via STAT3 Pathway in Patients With Cervical Cancer." *Cancer Genomics & Proteomics* 18(6):699.
- Hanahan, Douglas. 2022. "Hallmarks of Cancer: New Dimensions." *Cancer Discovery* 12(1):31–46.
- Hassin, Ori, Nishanth Belugali Nataraj, Michal Shreberk-Shaked, Yael Aylon, Rona Yaeger, Giulia Fontemaggi, Saptaparna Mukherjee, Martino Maddalena, Adi Avioz, Ortal Iancu, Giuseppe Mallel, Anat Gershoni, Inna Grosheva, Ester Feldmesser, Shifra Ben-Dor, Ofra Golani, Ayal Hendel, Giovanni Blandino, David Kelsen, Yosef Yarden, and Moshe Oren. 2022. "Different Hotspot P53 Mutants Exert Distinct Phenotypes and Predict Outcome of Colorectal Cancer Patients." *Nature Communications* 2022 13:1 13(1):1–15.
- Hassin, Ori and Moshe Oren. 2022. "Drugging P53 in Cancer: One Protein, Many Targets." *Nature Reviews Drug Discovery* 2022 22:2 22(2):127–44.
- Hensler, Michal, Irena Vančurová, Etienne Becht, Ondřej Palata, Pavel Strnad, Petra Tesařová, Michaela Čabiňáková, David Švec, Mikael Kubista, Jiřina Bartůňková, Radek Špíšek, and Luděk Sojka. 2016. "Gene Expression Profiling of Circulating Tumor Cells and Peripheral Blood Mononuclear Cells from Breast Cancer Patients." *OncoImmunology* 5(4).
- Hermann, Patrick C., Sonu Bhaskar, Michele Cioffi, and Christopher Heeschen. 2010. "Cancer Stem Cells in Solid Tumors." *Seminars in Cancer Biology* 20(2):77–84.
- Hernando-Calvo, Alberto, Ming Han, Olubukola Ayodele, Ben X. Wang, Jeffrey P. Bruce, Farnoosh Abbas-Aghababazadeh, Maria Vila-Casadesús, Enriquer Sanz-Garcia, S. Y. Cind. Yang, Hal K. Berman, Ana Vivancos, Bernard Lam, Ilinca Lungu, Abdulazeez Salawu, Lee Anne Stayner, Benjamin Haibe-Kains, Philippe L. Bedard, Lisa Avery, Albiruni R. A. Razak, Trevor J. Pugh, Anna Spreafico, Lillian L. Siu, and Aaron R. Hansen. 2024. "A Phase II, Open-Label, Randomized Trial of Durvalumab With Olaparib or Cediranib in Patients With Mismatch Repair–Proficient Colorectal or Pancreatic Cancer." *Clinical Colorectal Cancer* 23(3):272-284.e9.
- Hervieu, Céline, Niki Christou, Serge Battu, and Muriel Mathonnet. 2021. "The Role of Cancer Stem Cells in Colorectal Cancer: From the Basics to Novel Clinical Trials." *Cancers* 2021, Vol. 13, Page 1092 13(5):1092.
- Ho, Teresa, Ban Xiong Tan, and David Lane. 2020. "How the Other Half Lives: What P53 Does When It Is Not Being a Transcription Factor." *International Journal of Molecular Sciences* 21(1).
- Hopp, Ann Katrin, Patrick Grüter, and Michael O. Hottiger. 2019. "Regulation of Glucose Metabolism by NAD⁺ and ADP-Ribosylation." *Cells* 2019, Vol. 8, Page 890 8(8):890.
- Hossain, Md Sanower, Hidayah Karuniawati, Ammar Abdulrahman Jairoun, Zannat Urbi, Der Jiun Ooi, Akbar John, Ya Chee Lim, K. M. Kaderi Kibria, A. K. M. Mohiuddin, Long Chiau Ming, Khang Wen Goh, and Muhammad Abdul Hadi. 2022. "Colorectal Cancer: A Review of Carcinogenesis, Global Epidemiology, Current Challenges, Risk Factors, Preventive and Treatment Strategies." *Cancers*

- 14(7):1732.
- Hua, Qingling, Yuanyuan Lu, Dingxiang Wang, Jie Da, Wanren Peng, Guoping Sun, Kangsheng Gu, Hua Wang, and Yanzhe Zhu. 2023. "KIAA1199 Promotes Oxaliplatin Resistance and Epithelial Mesenchymal Transition of Colorectal Cancer via Protein O-GlcNAcylation." *Translational Oncology* 28:101617.
- Huang, Ping, Guangwei Chen, Weifeng Jin, Kunjun Mao, Haitong Wan, and Yu He. 2022. "Molecular Mechanisms of Parthanatos and Its Role in Diverse Diseases." *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol. 23, Page 7292 23(13):7292.
- Huisman, Sander A., Malgorzata Oklejewicz, Ali R. Ahmadi, Filippo Tamanini, Jan N. M. Ijzermans, Gijsbertus T. J. Van Der Horst, and Ron W. F. De Bruin. 2015. "Colorectal Liver Metastases with a Disrupted Circadian Rhythm Phase Shift the Peripheral Clock in Liver and Kidney." *International Journal of Cancer* 136(5):1024–32.
- Huppert, Laura A., Michael D. Green, Luke Kim, Christine Chow, Yan Leyfman, Adil I. Daud, and James C. Lee. 2021. "Tissue-Specific Tregs in Cancer Metastasis: Opportunities for Precision Immunotherapy." *Cellular & Molecular Immunology* 2021 19:1 19(1):33–45.
- Idogawa, Masashi, Tesshi Yamada, Kazufumi Honda, Satoshi Sato, Kohzoh Imai, and Setsuo Hirohashi. 2005. "Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 Is a Component of the Oncogenic T-Cell Factor-4/Beta;-Catenin Complex." *Gastroenterology* 128(7):1919–36.
- Jacobs, Nathan R. and Pamela A. Norton. 2021. "Role of Chromosome 1q Copy Number Variation in Hepatocellular Carcinoma." *World Journal of Hepatology* 13(6):662.
- Janic, Ana, Etna Abad, and Ivano Amelio. 2024. "Decoding P53 Tumor Suppression: A Crosstalk between Genomic Stability and Epigenetic Control?" *Cell Death & Differentiation* 2024 1–8.
- Jank, Paul, Jonas Leichsenring, Svenja Kolb, Inga Hoffmann, Philip Bischoff, Catarina Alisa Kunze, Mihnea P. Dragomir, Moritz Gleitsmann, Moritz Jesinghaus, Wolfgang D. Schmitt, Hagen Kulbe, Christine Sers, Albrecht Stenzinger, Jalid Sehoul, Ioana Elena Braicu, Christina Westhoff, David Horst, Carsten Denkert, Stefan Gröschel, and Eliane T. Taube. 2023. "High EVI1 and PARP1 Expression as Favourable Prognostic Markers in High-Grade Serous Ovarian Carcinoma." *Journal of Ovarian Research* 16(1):150.
- Jarrar, Awad, Fiorenza Lotti, Jennifer DeVecchio, Sylvain Ferrandon, Gerald Gantt, Adam Mace, Georgios Karagkounis, Matthew Orloff, Monica Venere, Masahiro Hitomi, Justin Lathia, Jeremy N. Rich, and Matthew F. Kalady. 2019. "Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibition Sensitizes Colorectal Cancer-Initiating Cells to Chemotherapy." *Stem Cells* 37(1):42–53.
- Jiang, Weiliang, Senlin Zhao, Xiaohua Jiang, Erquan Zhang, Guoyong Hu, Bin Hu, Ping Zheng, Junhua Xiao, Zhanjun Lu, Yingying Lu, Jianbo Ni, Congying Chen, Xingpeng Wang, Lijuan Yang, and Rong Wan. 2016. "The Circadian Clock Gene Bmal1 Acts as a Potential Anti-Oncogene in Pancreatic Cancer by Activating the P53 Tumor Suppressor Pathway." *Cancer Letters* 371(2):314–25.

Bibliografia

- Jiao, Shiping, Weiya Xia, Hirohito Yamaguchi, Yongkun Wei, Mei Kuang Chen, Jung Mao Hsu, Jennifer L. Hsu, Wen Hsuan Yu, Yi Du, Heng Huan Lee, Chia Wei Li, Chao Kai Chou, Seung Oe Lim, Shih Shin Chang, Jennifer Litton, Banu Arun, Gabriel N. Hortobagyi, and Mien Chie Hung. 2017. "PARP Inhibitor Upregulates PD-L1 Expression and Enhances Cancer-Associated Immunosuppression." *Clinical Cancer Research* 23(14):3711–20.
- Ju, Chenhui, Chang Liu, Shu Yan, Yilong Wang, Xiaoxiang Mao, Minglu Liang, and Kai Huang. 2019. "Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 Is Required for Hepatocyte Proliferation and Liver Regeneration in Mice." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 511(3):531–35.
- Jubin, T., A. Kadam, M. Jariwala, S. Bhatt, S. Sutariya, A. R. Gani, S. Gautam, and R. Begum. 2016. "The PARP Family: Insights into Functional Aspects of Poly (ADP-Ribose) Polymerase-1 in Cell Growth and Survival." *Cell Proliferation* 49(4):421–37.
- Ka, Na Lee, Tae Young Na, Hyelin Na, Min Ho Lee, Han Su Park, Sewon Hwang, Il Yong Kim, Je Kyung Seong, and Mi Ock Lee. 2017. "NR1D1 Recruitment to Sites of DNA Damage Inhibits Repair and Is Associated with Chemosensitivity of Breast Cancer." *Cancer Research* 77(9):2453–63.
- Kahounová, Zuzana, Markéta Pícková, Stanislav Drápela, Jan Bouchal, Eva Szczyrbová, Jiří Navrátil, and Karel Souček. 2023. "Circulating Tumor Cell-Derived Preclinical Models: Current Status and Future Perspectives." *Cell Death & Disease* 2023 14:8 14(8):1–12.
- Kanai, Masayuki, Kazuhiko Hanashiro, Song Hee Kim, Shuji Hanai, A. Hamid Boulares, Masanao Miwa, and Kenji Fukasawa. 2007. "Inhibition of Crm1-P53 Interaction and Nuclear Export of P53 by Poly(ADP-Ribosyl)ation." *Nature Cell Biology* 9(10):1175–83.
- Kastenhuber, Edward R. and Scott W. Lowe. 2017. "Putting P53 in Context." *Cell* 170(6):1062–78.
- Keggenhoff, Friederike L., Darko Castven, Diana Becker, Stojan Stojkovic, Jovana Castven, Carolin Zimpel, Beate K. Straub, Tiemo Gerber, Harald Langer, Patricia Hähnel, Thomas Kindler, Jörg Fahrner, Colm J. O'Rourke, Ursula Ehmer, Anna Saborowski, Lichun Ma, Xin Wei Wang, Timo Gaiser, Matthias S. Matter, Christian Sina, Stefanie Derer, Ju Seog Lee, Stephanie Roessler, Bernd Kaina, Jesper B. Andersen, Peter R. Galle, and Jens U. Marquardt. 2024. "PARP-1 Selectively Impairs KRAS-Driven Phenotypic and Molecular Features in Intrahepatic Cholangiocarcinoma." *Gut* 0:1–13.
- Kennedy, Margaret C. and Scott W. Lowe. 2022. "Mutant P53: It's Not All One and the Same." *Cell Death & Differentiation* 2022 29:5 29(5):983–87.
- Kenny, Paraic A., Genee Y. Lee, Connie A. Myers, Richard M. Neve, Jeremy R. Semeiks, Paul T. Spellman, Katrin Lorenz, Eva H. Lee, Mary Helen Barcellos-Hoff, Ole W. Petersen, Joe W. Gray, and Mina J. Bissell. 2007. "The Morphologies of Breast Cancer Cell Lines in Three-Dimensional Assays Correlate with Their Profiles of Gene Expression." *Molecular Oncology* 1(1):84–96.
- Keum, Na Na and Edward Giovannucci. 2019. "Global Burden of Colorectal Cancer:

- Emerging Trends, Risk Factors and Prevention Strategies." *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2019 16:12 16(12):713–32.
- Kim, Dae Seok, Cristel V. Camacho, Anusha Nagari, Venkat S. Malladi, Sridevi Challa, and W. Lee Kraus. 2019. "Activation of PARP-1 by SnoRNAs Controls Ribosome Biogenesis and Cell Growth via the RNA Helicase DDX21." *Molecular Cell* 75(6):1270-1285.e14.
- Klauschen, Frederick, Moritz von Winterfeld, Albrecht Stenzinger, Bruno V. Sinn, Jan Budczies, Carsten Kamphues, Marcus Bahra, Daniel Wittschieber, Wilco Weichert, Jana Striefler, Hanno Riess, Manfred Dietel, and Carsten Denkert. 2012. "High Nuclear Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase Expression Is Prognostic of Improved Survival in Pancreatic Cancer." *Histopathology* 61(3):409–16.
- Ko, Hui Ling and Ee Chee Ren. 2012. "Functional Aspects of PARP1 in DNA Repair and Transcription." *Biomolecules* 2(4):524.
- Kogevinas, Manolis, Ana Espinosa, Adela Castelló, Inés Gómez-Acebo, Marcela Guevara, Vicente Martin, Pilar Amiano, Juan Alguacil, Rosana Peiro, Victor Moreno, Laura Costas, Guillermo Fernández-Tardón, Jose Juan Jimenez, Rafael Marcos-Gragera, Beatriz Perez-Gomez, Javier Llorca, Conchi Moreno-Iribas, Tania Fernández-Villa, Madalen Oribe, Nuria Aragones, Kyriaki Papantoniou, Marina Pollán, Gemma Castano-Vinyals, and Dora Romaguera. 2018. "Effect of Mistimed Eating Patterns on Breast and Prostate Cancer Risk (MCC-Spain Study)." *International Journal of Cancer* 143(10):2380–89.
- Koritala, Bala S. C., Kenneth I. Porter, Osama A. Arshad, Rajendra P. Gajula, Hugh D. Mitchell, Tarana Arman, Mugimane G. Manjanatha, Justin Teegarden, Hans P. A. Van Dongen, Jason E. McDermott, and Shobhan Gaddameedhi. 2021. "Night Shift Schedule Causes Circadian Dysregulation of DNA Repair Genes and Elevated DNA Damage in Humans." *Journal of Pineal Research* 70(3):e12726.
- Krüger, Annika, Anna Stier, Arthur Fischbach, Alexander Bürkle, Karin Hauser, and Aswin Mangerich. 2019. "Interactions of P53 with Poly(ADP-Ribose) and DNA Induce Distinct Changes in Protein Structure as Revealed by ATR-FTIR Spectroscopy." *Nucleic Acids Research* 47(9):4843–58.
- Kuipers, Ernst J., William M. Grady, David Lieberman, Thomas Seufferlein, Joseph J. Sung, Petra G. Boelens, Cornelis J. H. Van De Velde, and Toshiaki Watanabe. 2015. "Colorectal Cancer." *Nature Reviews Disease Primers* 2015 1:1 1(1):1–25.
- Kumar, Anil, Vipasha Gautam, Arushi Sandhu, Kajal Rawat, Antika Sharma, and Lekha Saha. 2023. "Current and Emerging Therapeutic Approaches for Colorectal Cancer: A Comprehensive Review." *World Journal of Gastrointestinal Surgery* 15(4):495.
- Kumar, Vivek and Joseph S. Takahashi. 2010. "PARP Around the Clock." *Cell* 142(6):841.
- Kupfer, Sonia S., Samir Gupta, Jeffrey N. Weitzel, and Jewel Samadder. 2020. "AGA Clinical Practice Update on Colorectal and Pancreatic Cancer Risk and Screening in BRCA1 and BRCA2 Carriers: Commentary." *Gastroenterology* 159(2):760–64.
- Lan, Linxiang and Axel Behrens. 2023. "Are There Specific Cancer Stem Cell Markers?" *Cancer Research* 83(2):170–72.
- Latchman, Jessica, Ann Guastella, and Cindy Tofthagen. 2014. "5-Fluorouracil Toxicity

- and Dihydropyrimidine Dehydrogenase Enzyme: Implications for Practice." *Clinical Journal of Oncology Nursing* 18(5):581.
- Lathia, Justin, Huiping Liu, and Daniela Matei. 2020. "The Clinical Impact of Cancer Stem Cells." *The Oncologist* 25(2):123.
- Lawrence, Rachel, Melissa Watters, Caitlin R. Davies, Klaus Pantel, and Yong Jie Lu. 2023. "Circulating Tumour Cells for Early Detection of Clinically Relevant Cancer." *Nature Reviews Clinical Oncology* 2023 20:7 20(7):487–500.
- Lee, Yool and Alfian Shan Tanggono. 2022. "Potential Role of the Circadian Clock in the Regulation of Cancer Stem Cells and Cancer Therapy." *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol. 23, Page 14181 23(22):14181.
- Lehner, Maike, Sonja Rieth, Eva Höllmüller, Daniel Spliesgar, Bastian Mertes, Florian Stengel, and Andreas Marx. 2022. "Profiling of the ADP-Ribosylome in Living Cells." *Angewandte Chemie International Edition* 61(18):e202200977.
- Leichman, Lawrence, Susan Groshen, Bert H. O'Neil, Wells Messersmith, Jordan Berlin, Emily Chan, Cynthia G. Leichman, Steven J. Cohen, Deirdre Cohen, Heinz-Josef Lenz, Philip Gold, Bruce Boman, Anitra Fielding, Gershon Locker, Ronald C. Cason, Stan R. Hamilton, and Howard S. Hochster. 2016. "Phase II Study of Olaparib (AZD-2281) After Standard Systemic Therapies for Disseminated Colorectal Cancer." *The Oncologist* 21(2):172.
- Li, Aihua, Xihua Lin, Xiaochao Tan, Bin Yin, Wei Han, Jizong Zhao, Jiangang Yuan, Boqin Qiang, and Xiaozhong Peng. 2013. "Circadian Gene Clock Contributes to Cell Proliferation and Migration of Glioma and Is Directly Regulated by Tumor-Suppressive MiR-124." *FEBS Letters* 587(15):2455–60.
- Li, Da, Fang Fang Bi, Na Na Chen, Ji Min Cao, Wu Ping Sun, Yi Ming Zhou, Chun Yan Li, and Qing Yang. 2014. "A Novel Crosstalk between BRCA1 and Poly (ADP-Ribose) Polymerase 1 in Breast Cancer." *Cell Cycle* 13(21):3442.
- Li, Dongfang, Yuying Kou, Yuan Gao, Shanshan Liu, Panpan Yang, Tomoka Hasegawa, Rongjian Su, Jie Guo, and Minqi Li. 2021. "Oxaliplatin Induces the PARP1-Mediated Parthanatos in Oral Squamous Cell Carcinoma by Increasing Production of ROS." *Aging (Albany NY)* 13(3):4242.
- Li, Fangfei, Xiaoqi Wu, Xuekun Fu, Jin Liu, Wangze Song, Gary Guishan Xiao, Aiping Lu, and Ge Zhang. 2022. "Poly (ADP-Ribose) Polymerase 1 (PARP1) Inhibition Promotes Pulmonary Metastasis of Osteosarcoma by Boosting Ezrin Phosphorylation." *International Journal of Biological Sciences* 18(3):1238.
- Li, Huaifu, Chunming Wang, Linxiang Lan, Wenhui Wu, Ian Evans, E. Josue Ruiz, Leping Yan, Zhijun Zhou, Joaquim M. Oliveira, Rui L. Reis, Zhenran Hu, Wei Chen, Axel Behrens, Yulong He, and Changhua Zhang. 2021. "PARP1 Inhibitor Combined With Oxaliplatin Efficiently Suppresses Oxaliplatin Resistance in Gastric Cancer-Derived Organoids via Homologous Recombination and the Base Excision Repair Pathway." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9:719192.
- Li, Huaifu, Chunming Wang, Linxiang Lan, Leping Yan, Wuguo Li, Ian Evans, E. Josue Ruiz, Qiao Su, Guangying Zhao, Wenhui Wu, Haiyong Zhang, Zhijun Zhou, Zhenran Hu, Wei Chen, Joaquim M. Oliveira, Axel Behrens, Rui L. Reis, and

- Changhua Zhang. 2022. "METTL3 Promotes Oxaliplatin Resistance of Gastric Cancer CD133+ Stem Cells by Promoting PARP1 mRNA Stability." *Cellular and Molecular Life Sciences* 79(3):1–22.
- Li, Hunian, Yongjiu Zha, Fang Du, Jie Liu, Xiaoquan Li, and Xu Zhao. 2020. "Contributions of PARP-1 Rs1136410 C>T Polymorphism to the Development of Cancer." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 24(24):14639–44.
- Li, Ming, Michael D. Threadgill, Yalan Wang, Li Cai, and Xiao Lin. 2009. "Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibition Down-Regulates Expression of Metastasis-Related Genes in CT26 Colon Carcinoma Cells." *Pathobiology* 76(3):108–16.
- Li, Qilin, Ding Xia, Zhihua Wang, Bo Liu, Jing Zhang, Ping Peng, Qiujun Tang, Jie Dong, Juan Guo, Dong Kuang, Weimin Chen, Jing Mao, Qiuhui Li, and Xin Chen. 2021. "Circadian Rhythm Gene PER3 Negatively Regulates Stemness of Prostate Cancer Stem Cells via WNT/ β -Catenin Signaling in Tumor Microenvironment." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9:656981.
- Li, Shi Yang, Jan A. Hammarlund, Gang Wu, Jia Wen Lian, Sacha J. Howell, Robert B. Clarke, Antony D. Adamson, Cátia F. Gonçalves, John B. Hogenesch, Ron C. Anafi, and Qing Jun Meng. 2024. "Tumor Circadian Clock Strength Influences Metastatic Potential and Predicts Patient Prognosis in Luminal A Breast Cancer." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 121(7):e2311854121.
- Liang, Bin Yong, Min Xiong, Gui Bao Ji, Er Lei Zhang, Zun Yi Zhang, Ke Shuai Dong, Xiao Ping Chen, and Zhi Yong Huang. 2015. "Synergistic Suppressive Effect of PARP-1 Inhibitor PJ34 and HDAC Inhibitor SAHA on Proliferation of Liver Cancer Cells." *Journal of Huazhong University of Science and Technology - Medical Science* 35(4):535–40.
- Liao, Wen Ting, Ya Ping Ye, Yong Jian Deng, Xiu Wu Bian, and Yan Qing Ding. 2014. "Metastatic Cancer Stem Cells: From the Concept to Therapeutics." *American Journal of Stem Cells* 3(2):46.
- Liebl, Magdalena C. and Thomas G. Hofmann. 2021. "The Role of P53 Signaling in Colorectal Cancer." *Cancers* 13(9):2125.
- Lin, Xiaoting, Dongshao Chen, Cheng Zhang, Xiaotian Zhang, Zhongwu Li, Bin Dong, Jing Gao, and Lin Shen. 2018. "Augmented Antitumor Activity by Olaparib plus AZD1775 in Gastric Cancer through Disrupting DNA Damage Repair Pathways and DNA Damage Checkpoint." *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 37(1):1–11.
- Linares, Jenniffer, Anna Sallent-Aragay, Jordi Badia-Ramentol, Alba Recort-Bascuas, Ana Méndez, Noemí Manero-Rupérez, Daniele Lo Re, Elisa I. Rivas, Marc Guiu, Melissa Zwick, Mar Iglesias, Carolina Martinez-Ciarpaglini, Noelia Tarazona, Monica Varese, Xavier Hernando-Momblona, Adrià Cañellas-Socias, Mayra Orrillo, Marta Garrido, Nadia Saoudi, Elena Elez, Pilar Navarro, Josep Tabernero, Roger R. Gomis, Eduard Batlle, Jorge Pisonero, Andres Cervantes, Clara Montagut, and Alexandre Calon. 2023. "Long-Term Platinum-Based Drug Accumulation in Cancer-Associated Fibroblasts Promotes Colorectal Cancer Progression and Resistance to Therapy." *Nature Communications* 2023 14:1 14(1):1–18.

Bibliografía

- Liu, Can, Kevin Kelnar, Bigang Liu, Xin Chen, Tammy Calhoun-Davis, Hangwen Li, Lubna Patrawala, Hong Yan, Collene Jeter, Sofia Honorio, Jason F. Wiggins, Andreas G. Bader, Randy Fagin, David Brown, and Dean G. Tang. 2011. "The MicroRNA MiR-34a Inhibits Prostate Cancer Stem Cells and Metastasis by Directly Repressing CD44." *Nature Medicine* 2011 17:2 17(2):211–15.
- Liu, Haiguang, Lin Lv, and Kai Yang. 2015. "Chemotherapy Targeting Cancer Stem Cells." *American Journal of Cancer Research* 5(3):880.
- Liu, Jiaqi, Qing Xiao, Jiani Xiao, Chenxi Niu, Yuanyuan Li, Xiaojun Zhang, Zhengwei Zhou, Guang Shu, and Gang Yin. 2022. "Wnt/ β -Catenin Signalling: Function, Biological Mechanisms, and Therapeutic Opportunities." *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2021 7:1 7(1):1–23.
- Liu, Yanhong, Zeqin Wang, Hankun Hao, Yaping Wang, and Luchun Hua. 2023. "Insight into Immune Checkpoint Inhibitor Therapy for Colorectal Cancer from the Perspective of Circadian Clocks." *Immunology* 170(1):13–27.
- Liu, Yinfeng, Jun Hao, Guanli Yuan, Mengyu Wei, Yuhui Bu, Tingting Jin, and Li Ma. 2021. "PER1 as a Tumor Suppressor Attenuated in the Malignant Phenotypes of Breast Cancer Cells." *International Journal of General Medicine* 14:7077.
- Liu, Yinfeng, Zizheng Wu, Yanli Li, Jing Zhang, Yang Gao, Guanli Yuan, and Meng Han. 2022. "PER3 Plays Anticancer Roles in the Oncogenesis and Progression of Breast Cancer via Regulating MEK/ERK Signaling Pathway." *Journal of the Chinese Medical Association : JCMA* 85(11):1051–60.
- Liu, Ying, Yu Zhang, Ying Zhao, Dongna Gao, Jing Xing, and Hui Liu. 2016. "High PARP-1 Expression Is Associated with Tumor Invasion and Poor Prognosis in Gastric Cancer." *Oncology Letters* 12(5):3825–35.
- Liu, Ziyang and W. Lee Kraus. 2017. "Catalytic-Independent Functions of PARP-1 Determine Sox2 Pioneer Activity at Intractable Genomic Loci." *Molecular Cell* 65(4):589-603.e9.
- Long, Wenyong, Wei Zhao, Bo Ning, Jing Huang, Junjun Chu, Linfeng Li, Qianqian Ma, Changsheng Xing, Helen Y. Wang, Qing Liu, and Rong Fu Wang. 2018. "PHF20 Collaborates with PARP1 to Promote Stemness and Aggressiveness of Neuroblastoma Cells through Activation of SOX2 and OCT4." *Journal of Molecular Cell Biology* 10(2):147.
- Loomans-Kropp, Holli A. and Asad Umar. 2019. "Increasing Incidence of Colorectal Cancer in Young Adults." *Journal of Cancer Epidemiology* 2019.
- López Salas, Mario, Diego De Haro Gázquez, Belén Fernández Sánchez, and María Luz Amador Muñoz. 2023. "Knowledge, Compliance, and Inequities in Colon Cancer Screening in Spain: An Exploratory Study." *Healthcare (Switzerland)* 11(18):2475.
- Lucena-Cacace, Antonio, Daniel Otero-Albiol, Manuel P. Jimenez-García, Sandra Muñoz-Galvan, and Amancio Carnero. 2018. "NAMPT Is a Potent Oncogene in Colon Cancer Progression That Modulates Cancer Stem Cell Properties and Resistance to Therapy through Sirt1 and PARP." *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 24(5):1202–15.
- Luo, Xin, Keun Woo Ryu, Dae Seok Kim, Tulip Nandu, Carlos J. Medina, Rebecca Gupte,

- Bryan A. Gibson, Raymond E. Soccio, Yonghao Yu, Rana K. Gupta, and W. Lee Kraus. 2017. "PARP-1 Controls the Adipogenic Transcriptional Program by PARylating C/EBP β and Modulating Its Transcriptional Activity." *Molecular Cell* 65(2):260–71.
- Ma, Dede, Li Hou, Hechun Xia, Hailiang Li, Heng Fan, Xiaoxiong Jia, and Zhanfeng Niu. 2020. "PER2 Inhibits Proliferation and Stemness of Glioma Stem Cells via the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway." *Oncology Reports* 44(2):533.
- Ma, Lixin, Lihua Dong, and Pengyu Chang. 2019. "CD44v6 Engages in Colorectal Cancer Progression." *Cell Death & Disease* 2018 10:1 10(1):1–13.
- Ma, Shu Chang, Jia Qi Zhang, Tian Hua Yan, Ming Xing Miao, Ye Min Cao, Yong Bing Cao, Li Chao Zhang, and Ling Li. 2023. "Novel Strategies to Reverse Chemoresistance in Colorectal Cancer." *Cancer Medicine* 12(10):11073.
- Mabley, Jon G., Pál Pacher, Peter Bai, Rebecca Wallace, Sunali Goonesekera, Laszlo Virag, Garry J. Southan, and Csaba Szabó. 2004. "Suppression of Intestinal Polyposis in Apcmin/+ Mice by Targeting the Nitric Oxide or Poly(ADP-Ribose) Pathways." *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 548(1–2):107–16.
- Malik, Astha, Shreya Nalluri, Arpan De, Dilshan Beligala, and Michael E. Geusz. 2022. "The Relevance of Circadian Clocks to Stem Cell Differentiation and Cancer Progression." *NeuroSci* 2022, Vol. 3, Pages 146-165 3(2):146–65.
- Manco, Giuseppe, Giuseppina Lacerra, Elena Porzio, and Giuliana Catara. 2022. "ADP-Ribosylation Post-Translational Modification: An Overview with a Focus on RNA Biology and New Pharmacological Perspectives." *Biomolecules* 12(3):443.
- Mantovani, Fiamma, Licio Collavin, and Giannino Del Sal. 2018. "Mutant P53 as a Guardian of the Cancer Cell." *Cell Death & Differentiation* 2018 26:2 26(2):199–212.
- Marei, Hany E., Asmaa Althani, Nahla Afifi, Anwarul Hasan, Thomas Caceci, Giacomo Pozzoli, Andrea Morrione, Antonio Giordano, and Carlo Cenciarelli. 2021. "P53 Signaling in Cancer Progression and Therapy." *Cancer Cell International* 21(1):1–15.
- Martí, Juan Manuel, Mónica Fernández-Cortés, Santiago Serrano-Sáenz, Esteban Zamudio-Martinez, Daniel Delgado-Bellido, Angel Garcia-Diaz, and Francisco Javier Oliver. 2020. "The Multifactorial Role of PARP-1 in Tumor Microenvironment." *Cancers* 12(3).
- Martini, G., V. Belli, S. Napolitano, V. Ciaramella, D. Ciardiello, A. Belli, F. Izzo, A. Avallone, F. Selvaggi, F. Menegon Tasselli, W. Santaniello, R. Franco, I. Puig, L. Ramirez, I. Chicote, F. Mancuso, G. Caratu, X. Serres, R. Fasani, J. Jimenez, J. Ros, I. Baraibar, N. Mulet, C. M. Della Corte, T. Troiani, A. Vivancos, R. Dienstmann, E. Elez, H. G. Palmer, J. Taberner, E. Martinelli, F. Ciardiello, and G. Argilés. 2023. "Establishment of Patient-Derived Tumor Organoids to Functionally Inform Treatment Decisions in Metastatic Colorectal Cancer." *ESMO Open* 8(3):101198.
- Maru, Bruktawit, Alessandra Messikommer, Linhui Huang, Katja Seipel, Olivia Kovecses, Peter J. M. Valk, Alexandre P. A. Theocharides, Francois E. Mercier, Thomas Pabst, Maureen McKeague, and Nathan W. Luedtke. 2023. "PARP-1 Improves Leukemia Outcomes by Inducing Parthanatos during Chemotherapy."

- Cell Reports Medicine* 4(9):101191.
- Masutani, Mitsuko, Akemi Gunji, Masahiro Tsutsumi, Kumiko Ogawa, Nobuo Kamada, Tomoyuki Shirai, Kou-ichi Jishage, Hitoshi Nakagama, and Takashi Sugimura. 2006. "Role of Poly-ADP-Ribosylation in Cancer Development." Pp. 203–17 in *Poly(ADP-Ribosylation)*, edited by A. Bürkle. Boston, MA: Springer US.
- Mateo, Joaquin, Johann S. De Bono, Karim Fizazi, Fred Saad, Neal Shore, Shahneen Sandhu, Kim N. Chi, Neeraj Agarwal, David Olmos, Antoine Thiery-Vuillemin, Mustafa Özgüroğlu, Niven Mehra, Nobuaki Matsubara, Jae Young Joung, Charles Padua, Ernesto Korbenfeld, Jinyu Kang, Helen Marshall, Zhongwu Lai, Alan Barnicle, Christian Poehlein, Natalia Lukashchuk, and Maha Hussain. 2024. "Olaparib for the Treatment of Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer and Alterations in BRCA1 and/or BRCA2 in the PROfound Trial." *Journal of Clinical Oncology* 42(5):571–83.
- Matsuda, Takeru, Kimihiro Yamashita, Hiroshi Hasegawa, Taro Oshikiri, Masayoshi Hosono, Nobuhide Higashino, Masashi Yamamoto, Yoshiko Matsuda, Shingo Kanaji, Tetsu Nakamura, Satoshi Suzuki, Yasuo Sumi, and Yoshihiro Kakeji. 2018. "Recent Updates in the Surgical Treatment of Colorectal Cancer." *Annals of Gastroenterological Surgery* 2(2):129.
- Matteini, Francesca, Oriella Andresini, Stefano Petrai, Cecilia Battistelli, Marianna Nicoletta Rossi, and Rossella Maione. 2020. "Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 (PARP1) Restrains MyoD-Dependent Gene Expression during Muscle Differentiation." *Scientific Reports* 2020 10:1 10(1):1–18.
- Mazzoccoli, G., A. Panza, M. R. Valvano, O. Palumbo, M. Carella, V. Paziienza, G. Biscaglia, F. Tavano, P. Di Sebastiano, A. Andriulli, and A. Piepoli. 2011. "Clock Gene Expression Levels and Relationship With Clinical and Pathological Features in Colorectal Cancer Patients." *Chronobiology International* 28(10):841–51.
- Michel, Maurice, Leonard Kaps, Annett Maderer, Peter R. Galle, and Markus Moehler. 2021. "The Role of P53 Dysfunction in Colorectal Cancer and Its Implication for Therapy." *Cancers* 2021, Vol. 13, Page 2296 13(10):2296.
- Michels, Judith, Ilio Vitale, Laura Senovilla, David P. Enot, Pauline Garcia, Delphine Lissa, Ken A. Olaussen, Catherine Brenner, Jean Charles Soria, Maria Castedo, and Guido Kroemer. 2013. "Synergistic Interaction between Cisplatin and PARP Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer." *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 12(6):877–83.
- Minami, Fuuka, Norihiko Sasaki, Yuuki Shichi, Fujiya Gomi, Masaki Michishita, Kozo Ohkusu-Tsukada, Masashi Toyoda, Kimimasa Takahashi, and Toshiyuki Ishiwata. 2021. "Morphofunctional Analysis of Human Pancreatic Cancer Cell Lines in 2- and 3-Dimensional Cultures." *Scientific Reports* 2021 11:1 11(1):1–10.
- Mohanta, Simple, Gangotri Siddappa, Sindhu Govindan Valiyaveedan, Ravindra Dodda Thimmasandra Ramanjanappa, Debashish Das, Ramanan Pandian, Samanta Sekhar Khora, Moni Abraham Kuriakose, and Amritha Suresh. 2017. "Cancer Stem Cell Markers in Patterning Differentiation and in Prognosis of Oral Squamous Cell Carcinoma." *Tumor Biology* 39(6).

- Montero, J., C. Dutta, D. Van Bodegom, D. Weinstock, and A. Letai. 2013. "P53 Regulates a Non-Apoptotic Death Induced by ROS." *Cell Death & Differentiation* 20:11 20(11):1465–74.
- Moon, Sung Ho, Nam Sook Park, Min Hye Noh, Yeong Seok Kim, Soon Ho Cheong, and Dae Young Hur. 2022. "Olaparib-Induced Apoptosis Through EBNA1-ATR-P38 MAPK Signaling Pathway in Epstein-Barr Virus-Positive Gastric Cancer Cells." *Anticancer Research* 42(1):555–63.
- Moore, Kathleen, Nicoletta Colombo, Giovanni Scambia, Byoung-Gie Kim, Ana Oaknin, Michael Friedlander, Alla Lisyanskaya, Anne Floquet, Alexandra Leary, Gabe S. Sonke, Charlie Gourley, Susana Banerjee, Amit Oza, Antonio González-Martín, Carol Aghajanian, William Bradley, Cara Mathews, Joyce Liu, Elizabeth S. Lowe, Ralph Bloomfield, and Paul DiSilvestro. 2018. "Maintenance Olaparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer." *New England Journal of Medicine* 379(26):2495–2505.
- Moretto, Roberto, Andrew Elliott, Jian Zhang, Hiroyuki Arai, Marco Maria Germani, Veronica Conca, Joanne Xiu, Phillip Stafford, Matthew Oberley, Jim Abraham, David Spetzler, Daniele Rossini, Carlotta Antoniotti, John Marshall, Anthony Shields, Gilberto Lopes, Sara Lonardi, Filippo Pietrantonio, Gianluca Tomasello, Alessandro Passardi, Emiliano Tamburini, Daniele Santini, Giuseppe Aprile, Gianluca Masi, Alfredo Falcone, Heinz Josef Lenz, Michael Korn, and Chiara Cremolini. 2022. "Homologous Recombination Deficiency Alterations in Colorectal Cancer: Clinical, Molecular, and Prognostic Implications." *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 114(2):271–79.
- Morgan, R. G., E. Mortenson, and A. C. Williams. 2018. "Targeting LGR5 in Colorectal Cancer: Therapeutic Gold or Too Plastic?" *British Journal of Cancer* 2018 118:11 118(11):1410–18.
- de Morree, Antoine and Thomas A. Rando. 2023. "Regulation of Adult Stem Cell Quiescence and Its Functions in the Maintenance of Tissue Integrity." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2023 24:5 24(5):334–54.
- Munro, Matthew J., Susrutha K. Wickremesekera, Lifeng Peng, Swee T. Tan, and Tinte Itinteang. 2018. "Cancer Stem Cells in Colorectal Cancer: A Review." *Journal of Clinical Pathology* 71(2):110–16.
- Murnyák, Balázs, Mahan C. Kouhsari, Rotem Hershkovitch, Bernadette Kálmán, György Marko-Varga, Álmos Klekner, Tibor Hortobágyi, Balázs Murnyák, Mahan C. Kouhsari, Rotem Hershkovitch, Bernadette Kálmán, György Marko-Varga, Álmos Klekner, and Tibor Hortobágyi. 2017. "PARP1 Expression and Its Correlation with Survival Is Tumour Molecular Subtype Dependent in Glioblastoma." *Oncotarget* 8(28):46348–62.
- Najafi, Masoud, Bagher Farhood, and Keywan Mortezaee. 2019. "Cancer Stem Cells (CSCs) in Cancer Progression and Therapy." *Journal of Cellular Physiology* 234(6):8381–95.
- Nakayama, Mizuho and Masanobu Oshima. 2019. "Mutant P53 in Colon Cancer." *Journal of Molecular Cell Biology* 11(4):267.

Bibliografia

- Narayan, Satya, Asif Raza, Iqbal Mahmud, Nayeong Koo, Timothy J. Garrett, Mary E. Law, Brian K. Law, and Arun K. Sharma. 2022. "Sensitization of FOLFOX-Resistant Colorectal Cancer Cells via the Modulation of a Novel Pathway Involving Protein Phosphatase 2A." *IScience* 25(7):104518.
- Nguyen, Thi Ngoc Anh, Po Shuan Huang, Po Yu Chu, Chia Hsun Hsieh, and Min Hsien Wu. 2023. "Recent Progress in Enhanced Cancer Diagnosis, Prognosis, and Monitoring Using a Combined Analysis of the Number of Circulating Tumor Cells (CTCs) and Other Clinical Parameters." *Cancers* 15(22).
- Nicoletto, Maria Ornella, Alessandra Baldoni, Francesco Cavallin, Andrea Grego, Cristina Falci, Margherita Nardin, Enzo Mammano, Eleonora Lai, and Valter Torri. 2023. "Oxaliplatin Prior to PARP Inhibitor in BRCA-Mutated Ovarian Cancer." *Therapeutic Advances in Medical Oncology* 15.
- Nosho, Katsuhiko, Hiroyuki Yamamoto, Masashi Mikami, Hiroaki Taniguchi, Taiga Takahashi, Yasushi Adachi, Akimichi Imamura, Kohzoh Imai, and Yasuhisa Shinomura. 2006. "Overexpression of Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP-1) in the Early Stage of Colorectal Carcinogenesis." *European Journal of Cancer* 42(14):2374–81.
- Nozaki, Tadashige, Hisako Fujihara, Masatoshi Watanabe, Masahiro Tsutsumi, Kentaro Nakamoto, Osamu Kusuoka, Nobuo Kamada, Hiroshi Suzuki, Hitoshi Nakagama, Takashi Sugimura, and Mitsuko Masutani. 2003. "Parp-1 Deficiency Implicated in Colon and Liver Tumorigenesis Induced by Azoxymethane." *Cancer Science* 94(6):497–500.
- Ogino, Takashi, Naoya Matsunaga, Takahiro Tanaka, Tomohito Tanihara, Hideki Terajima, Hikari Yoshitane, Yoshitaka Fukada, Akito Tsuruta, Satoru Koyanagi, and Shigehiro Ohdo. 2021. "Post-Transcriptional Repression of Circadian Component Clock Regulates Cancer-Stemness in Murine Breast Cancer Cells." *ELife* 10.
- Ohishi, Tomokazu, Mika K. Kaneko, Yukihiro Yoshida, Atsuo Takashima, Yukinari Kato, and Manabu Kawada. 2023. "Current Targeted Therapy for Metastatic Colorectal Cancer." *International Journal of Molecular Sciences* 2023, Vol. 24, Page 1702 24(2):1702.
- Okamoto-Uchida, Yoshimi, Junko Izawa, Akari Nishimura, Atsuhiko Hattori, Nobuo Suzuki, and Jun Hirayama. 2019. "Post-Translational Modifications Are Required for Circadian Clock Regulation in Vertebrates." *Current Genomics* 20(5):332.
- Okuda, Akiko, Suguru Kurokawa, Masanori Takehashi, Aika Maeda, Katsuya Fukuda, Yukari Kubo, Hyuma Nogusa, Tomoka Takatani-Nakase, Shujiro Okuda, Kunihiro Ueda, and Seigo Tanaka. 2017. "Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitors Activate the P53 Signaling Pathway in Neural Stem/Progenitor Cells." *BMC Neuroscience* 18(1):1–18.
- Önder, Cansu E., Teresa J. Ziegler, Ronja Becker, Sara Y. Brucker, Andreas D. Hartkopf, Tobias Engler, and André Koch. 2023. "Advancing Cancer Therapy Predictions with Patient-Derived Organoid Models of Metastatic Breast Cancer." *Cancers* 15(14):3602.

- Onuma, Kunishige, Masako Ochiai, Kaoru Orihashi, Mami Takahashi, Toshio Imai, Hitoshi Nakagama, and Yoshitaka Hippo. 2013. "Genetic Reconstitution of Tumorigenesis in Primary Intestinal Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(27):11127–32.
- Ortiz-Otero, Nerymar, Jocelyn R. Marshall, Bradley Lash, and Michael R. King. 2020. "Chemotherapy-Induced Release of Circulating-Tumor Cells into the Bloodstream in Collective Migration Units with Cancer-Associated Fibroblasts in Metastatic Cancer Patients." *BMC Cancer* 20(1):1–13.
- Oshima, Takashi, Seiich Takenoshita, Makoto Akaike, Chikara Kunisaki, Shoich Fujii, Akito Nozaki, Kazushi Numata, Manabu Shiozawa, Yasushi Rino, Katsuaki Tanaka, Munetaka Masuda, and Toshio Imada. 2011. "Expression of Circadian Genes Correlates with Liver Metastasis and Outcomes in Colorectal Cancer." *Oncology Reports* 25(5):1439–46.
- Ossovskaya, Valeria, Ingrid Chou Koo, Eric P. Kaldjian, Christopher Alvares, and Barry M. Sherman. 2010. "Upregulation of Poly (ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP1) in Triple-Negative Breast Cancer and Other Primary Human Tumor Types." *Genes & Cancer* 1(8):812.
- Ozaki, Toshinori and Akira Nakagawara. 2011. "Role of P53 in Cell Death and Human Cancers." *Cancers 2011, Vol. 3, Pages 994-1013* 3(1):994–1013.
- Pagano, Alessandra, Isabelle Métrailler-Ruchonnet, Michel Aurrand-Lions, Monica Lucattelli, Yves Donati, and Constance Barazzone Argiroffo. 2007. "Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP-1) Controls Lung Cell Proliferation and Repair after Hyperoxia-Induced Lung Damage." *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 293(3):619–29.
- De Palma, Fatima Domenica Elisa, Valeria D'argenio, Jonathan Pol, Guido Kroemer, Maria Chiara Maiuri, and Francesco Salvatore. 2019. "The Molecular Hallmarks of the Serrated Pathway in Colorectal Cancer." *Cancers* 11(7).
- Pan, Kaiyong, Xiabin Li, Junfang He, Yuxi Lei, Yongxin Yang, Deyong Jiang, and Yan Tang. 2024. "Value of the NF-KB Signalling Pathway and the DNA Repair Gene PARP1 in Predicting Distant Metastasis after Breast Cancer Surgery." *Scientific Reports* 2024 14:1 14(1):1–14.
- Pan, Minggui, Chen Jiang, Pam Tse, Ninah Achacoso, Stacey Alexeeff, Aleyda V. Solorzano, Elaine Chung, Wenwei Hu, Thach Giao Truong, Amit Arora, Tilak Sundaresan, Jennifer Marie Suga, Sachdev Thomas, and Laurel A. Habel. 2022. "TP53 Gain-of-Function and Non-Gain-of-Function Mutations Are Differentially Associated With Sidedness-Dependent Prognosis in Metastatic Colorectal Cancer." *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 40(2):171–79.
- Papageorgiou, Georgios I., Evangelos Fergadis, Nikos Skouteris, Evridiki Christakos, Sergios A. Tsakatikas, Evangelos Lianos, and Christos Kosmas. 2021. "Case Report: Combination of Olaparib With Chemotherapy in a Patient With ATM-Deficient Colorectal Cancer." *Frontiers in Oncology* 11.
- Park, Dawon, Se Jin Baek, Jung Myun Kwak, Jin Kim, and Seon Hahn Kim. 2018.

Bibliografija

- "Analysis of Reduced-Dose Administration of Oxaliplatin as Adjuvant FOLFOX Chemotherapy for Colorectal Cancer." *Annals of Surgical Treatment and Research* 94(4):196.
- Park, Song Ee, Hee Sung Kim, Eun Jung Jung, Ja Hee Suh, Hyeyoung Min, Kyong Choun Chi, Jong Won Kim, Joong Min Park, and In Gyu Hwang. 2022. "Low PARP-1 Expression Level Is an Indicator of Poor Prognosis in Patients with Stage II and III Gastric Cancer." *Journal of Cancer* 13(3):869.
- Patke, Alina, Michael W. Young, and Sofia Axelrod. 2019. "Molecular Mechanisms and Physiological Importance of Circadian Rhythms." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2019 21:2 21(2):67–84.
- Pazzaglia, Simonetta and Claudio Pioli. 2019. "Multifaceted Role of PARP-1 in DNA Repair and Inflammation: Pathological and Therapeutic Implications in Cancer and Non-Cancer Diseases." *Cells* 2020, Vol. 9, Page 41 9(1):41.
- Petrik, József, Donatella Verbanac, Marija Fabijanec, Andrea Hulina-Tomašković, Andrea Čeri, Anita Somborac-Baćura, Roberta Petlevski, Marija Grdić Rajković, Lada Rumora, Božo Krušlin, Mario Štefanović, Neven Ljubičić, Neven Baršić, Antonija Hanžek, Luka Bočkor, Ivana Čelap, Alma Demirović, and Karmela Barišić. 2022. "Circulating Tumor Cells in Colorectal Cancer: Detection Systems and Clinical Utility." *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol. 23, Page 13582 23(21):13582.
- Plane, Jennifer M., Steven K. Grossenbacher, and Wenbin Deng. 2012. "PARP-1 Deletion Promotes Subventricular Zone Neural Stem Cells toward a Glial Fate." *Journal of Neuroscience Research* 90(8):1489.
- Polotskaia, Alla, Gu Xiao, Katherine Reynoso, Che Martin, Wei Gang Qiu, Ronald C. Hendrickson, and Jill Bargonettia. 2015. "Proteome-Wide Analysis of Mutant P53 Targets in Breast Cancer Identifies New Levels of Gain-of-Function That Influence PARP, PCNA, and MCM4." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(11):E1220–29.
- Portero de la Cruz, Silvia and Jesús Cebrino. 2023. "Uptake Patterns and Predictors of Colorectal Cancer Screening among Adults Resident in Spain: A Population-Based Study from 2017 to 2020." *Frontiers in Public Health* 11:1151225.
- Powell, Ashley A., Amir Ali H. Talasaz, Haiyu Zhang, Marc A. Coram, Anupama Reddy, Glenn Deng, Melinda L. Telli, Ranjana H. Advani, Robert W. Carlson, Joseph A. Mollick, Shruti Sheth, Allison W. Kurian, James M. Ford, Frank E. Stockdale, Stephen R. Quake, R. Fabian Pease, Michael N. Mindrinos, Gyan Bhanot, Shanaz H. Dairkee, Ronald W. Davis, and Stefanie S. Jeffrey. 2012. "Single Cell Profiling of Circulating Tumor Cells: Transcriptional Heterogeneity and Diversity from Breast Cancer Cell Lines." *PLOS ONE* 7(5):e33788.
- Pu, Hongjiang, Yaxue Chen, Ruoxia Shen, Yin Zhang, Duan Yang, Lizhu Liu, Xingxiang Dong, and Guangjun Yang. 2023. "Influence of the Initial Recurrence Site on Prognosis after Radical Surgery for Colorectal Cancer: A Retrospective Cohort Study." *World Journal of Surgical Oncology* 21(1):1–12.
- Puram, Rishi V., Monika S. Kowalczyk, Carl G. De Boer, Rebekka K. Schneider, Peter G.

- Miller, Marie McConkey, Zuzana Tothova, Héctor Tejero, Dirk Heckl, Marcus Järås, Michelle C. Chen, Hubo Li, Alfred Tamayo, Glenn S. Cowley, Orit Rozenblatt-Rosen, Fatima Al-Shahrour, Aviv Regev, and Benjamin L. Ebert. 2016. "Core Circadian Clock Genes Regulate Leukemia Stem Cells in AML." *Cell* 165(2):303–16.
- Purandare, Nilendu, Sumeet Dua, Abhishek Arora, Sneha Shah, and Venkatesh Rangarajan. 2010. "Colorectal Cancer - Patterns of Locoregional Recurrence and Distant Metastases as Demonstrated by FDG PET / CT." *Indian Journal of Radiology and Imaging* 20(4):284–88.
- Qi, Guangying, Yasusei Kudo, Bo Tang, Tian Liu, Shengjian Jin, Jing Liu, Xiaoxu Zuo, Sisi Mi, Wenhuan Shao, Xiaojuan Ma, Takaaki Tsunematsu, Naozumi Ishimaru, Sien Zeng, Masaaki Tatsuka, Fumio Shimamoto, Guangying Qi, Yasusei Kudo, Bo Tang, Tian Liu, Shengjian Jin, Jing Liu, Xiaoxu Zuo, Sisi Mi, Wenhuan Shao, Xiaojuan Ma, Takaaki Tsunematsu, Naozumi Ishimaru, Sien Zeng, Masaaki Tatsuka, and Fumio Shimamoto. 2016. "PARP6 Acts as a Tumor Suppressor via Downregulating Survivin Expression in Colorectal Cancer." *Oncotarget* 7(14):18812–24.
- Qin, Changjiang, Zhiyu Ji, Ertao Zhai, Kaiwu Xu, Yijie Zhang, Quanying Li, Hong Jing, Xiaoliang Wang, and Xinming Song. 2022. "PARP Inhibitor Olaparib Enhances the Efficacy of Radiotherapy on XRCC2-Deficient Colorectal Cancer Cells." *Cell Death & Disease* 2022 13:5 13(5):1–8.
- Qu, Meng. 2023. "Molecular Crosstalk between Circadian Clock and Cancer and Therapeutic Implications." *Frontiers in Nutrition* 10:1143001.
- Qu, Meng, Guoxin Zhang, Han Qu, Alexander Vu, Raymond Wu, Hidekazu Tsukamoto, Zhenyu Jia, Wendong Huang, Heinz Josef Lenz, Jeremy N. Rich, and Steve A. Kay. 2023. "Circadian Regulator BMAL1::CLOCK Promotes Cell Proliferation in Hepatocellular Carcinoma by Controlling Apoptosis and Cell Cycle." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 120(2):e2214829120.
- Quiñonero, Francisco, Cristina Mesas, Jose A. Muñoz-Gámez, Cristina Jiménez-Luna, Gloria Perazzoli, Jose Prados, Consolación Melguizo, and Raul Ortiz. 2022. "PARP1 Inhibition by Olaparib Reduces the Lethality of Pancreatic Cancer Cells and Increases Their Sensitivity to Gemcitabine." *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 155.
- Rao, Xiwu and Lizhu Lin. 2022. "Circadian Clock as a Possible Control Point in Colorectal Cancer Progression (Review)." *International Journal of Oncology* 61(6).
- Rawla, Prashanth, Tagore Sunkara, and Adam Barsouk. 2019. "Epidemiology of Colorectal Cancer: Incidence, Mortality, Survival, and Risk Factors." *Przegląd Gastroenterologiczny* 14(2):89.
- Reid, Kathryn J. 2019. "Assessment of Circadian Rhythms." *Neurologic Clinics* 37(3):505.
- Ren, Fei, Wei Qi Sheng, and Xiang Du. 2013. "CD133: A Cancer Stem Cells Marker, Is Used in Colorectal Cancers." *World Journal of Gastroenterology : WJG* 19(17):2603.
- Ren, Hui, Wenhui Wu, Mingzhe Li, Shaohua Yang, Jingyao Chen, Hong Chen, Liang Li, Changhua Zhang, and Yulong He. 2019. "Combined Olaparib and Oxaliplatin Inhibits Tumor Proliferation by Cell Cycle Arrest and Cell Apoptosis in XRCC2-

- Defecient Colorectal Cancer." *Digestive Medicine Research* 2(0):41–41.
- Rizvi, Asim, Marine A. Merlin, and Girish M. Shah. 2021. "Poly (ADP-Ribose) Polymerase (PARP) Inhibition in Cancer: Potential Impact in Cancer Stem Cells and Therapeutic Implications." *European Journal of Pharmacology* 911:174546.
- Robinson, I. and A. B. Reddy. 2014. "Molecular Mechanisms of the Circadian Clockwork in Mammals." *FEBS Letters* 588(15):2477–83.
- Robson, Mark, Seock-Ah Im, Elżbieta Senkus, Binghe Xu, Susan M. Domchek, Norikazu Masuda, Suzette Delaloge, Wei Li, Nadine Tung, Anne Armstrong, Wenting Wu, Carsten Goessl, Sarah Runswick, and Pierfranco Conte. 2017. "Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation ." *New England Journal of Medicine* 377(6):523–33.
- Rodríguez, María Isabel, Jara Majuelos-Melguizo, Juan Manuel Martí Martín-Consuegra, Mariano Ruiz de Almodóvar, Abelardo López-Rivas, and Francisco Javier Oliver. 2015. "Deciphering the Insights of Poly(ADP-Ribosylation) in Tumor Progression." *Medicinal Research Reviews* 35(4):678–97.
- Rodríguez, María Isabel, Andreína Peralta-Leal, Francisco O'Valle, José Manuel Rodríguez-Vargas, Ariannys Gonzalez-Flores, Jara Majuelos-Melguizo, Laura López, Santiago Serrano, Antonio García de Herreros, Juan Carlos Rodríguez-Manzanque, Rubén Fernández, Raimundo G. del Moral, José Mariano de Almodóvar, and F. Javier Oliver. 2013. "PARP-1 Regulates Metastatic Melanoma through Modulation of Vimentin-Induced Malignant Transformation." *PLOS Genetics* 9(6):e1003531.
- Roeder, F., E. Meldolesi, S. Gerum, V. Valentini, and C. Rödel. 2020. "Recent Advances in (Chemo-)Radiation Therapy for Rectal Cancer: A Comprehensive Review." *Radiation Oncology* 2020 15:1 15(1):1–21.
- Rojo, F., J. García-Parra, S. Zazo, I. Tusquets, J. Ferrer-Lozano, S. Menendez, P. Eroles, C. Chamizo, S. Servitja, N. Ramírez-Merino, F. Lobo, B. Bellosillo, J. M. Corominas, J. Yelamos, S. Serrano, A. Lluch, A. Rovira, and J. Albanell. 2012. "Nuclear PARP-1 Protein Overexpression Is Associated with Poor Overall Survival in Early Breast Cancer." *Annals of Oncology* 23(5):1156–64.
- Roper, Stephen J., Stephanie Chrysanthou, Claire E. Senner, Arnold Sienerth, Stefano Gnan, Alexander Murray, Mitsuko Masutani, Paulina Latos, and Myriam Hemberger. 2014. "ADP-Ribosyltransferases Parp1 and Parp7 Safeguard Pluripotency of ES Cells." *Nucleic Acids Research* 42(14):8914–27.
- Rose, Maddison, Joshua T. Burgess, Kenneth O'Byrne, Derek J. Richard, and Emma Bolderson. 2020. "PARP Inhibitors: Clinical Relevance, Mechanisms of Action and Tumor Resistance." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8:564601.
- Roubaud, Guilhem, Mustafa Özgüroğlu, Nicolas Penel, Nobuaki Matsubara, Niven Mehra, Michael P. Kolinsky, Giuseppe Procopio, Susan Feyerabend, Jae Young Joung, Gwenaëlle Gravis, Kazuo Nishimura, Craig Gedye, Charles Padua, Neal Shore, Antoine Thiery-Vuillemin, Fred Saad, Robbert van Alphen, Michael A. Carducci, Chintu Desai, Neil Brickel, Christian Poehlein, Paula Del Rosario, and Karim Fizazi. 2022. "Olaparib Tolerability and Common Adverse-Event

- Management in Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: Further Analyses from the PROfound Study." *European Journal of Cancer* 170:73–84.
- Ruan, Wei, Xiaoyi Yuan, and Holger K. Eltzschig. 2021. "Circadian Rhythm as a Therapeutic Target." *Nature Reviews Drug Discovery* 20(4):287–307.
- Sahar, Saurabh and Paolo Sassone-Corsi. 2009. "Metabolism and Cancer: The Circadian Clock Connection." *Nature Reviews Cancer* 9(12):886–96.
- Sawicki, Tomasz, Monika Ruskowska, Anna Danielewicz, Ewa Niedźwiedzka, Tomasz Arłukowicz, and Katarzyna E. Przybyłowicz. 2021. "A Review of Colorectal Cancer in Terms of Epidemiology, Risk Factors, Development, Symptoms and Diagnosis." *Cancers* 2021, Vol. 13, Page 2025 13(9):2025.
- Schimek, Vanessa, Katharina Strasser, Andrea Beer, Samantha Göber, Natalie Walterskirchen, Christine Brostjan, Catharina Müller, Thomas Bachleitner-Hofmann, Michael Bergmann, Helmut Dolznig, and Rudolf Oehler. 2022. "Tumour Cell Apoptosis Modulates the Colorectal Cancer Immune Microenvironment via Interleukin-8-Dependent Neutrophil Recruitment." *Cell Death & Disease* 2022 13(2):1–13.
- Schlöder, Janine, Fatemeh Shahneh, Franz Joseph Schneider, and Björn Wieschendorf. 2022. "Boosting Regulatory T Cell Function for the Treatment of Autoimmune Diseases – That's Only Half the Battle!" *Frontiers in Immunology* 13:973813.
- Shafi, Ayesha A. and Karen E. Knudsen. 2019. "Cancer and the Circadian Clock." *Cancer Research* 79(15):3806.
- Shelton, Joseph W., Timothy V. Waxweiler, Jerome Landry, Huiying Gao, Yanbo Xu, Lanfang Wang, Bassel El-Rayes, and Hui Kuo G. Shu. 2013. "In Vitro and In Vivo Enhancement of Chemoradiation Using the Oral PARP Inhibitor ABT-888 in Colorectal Cancer Cells." *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics* 86(3):469–76.
- Shichi, Yuuki, Norihiko Sasaki, Masaki Michishita, Fumio Hasegawa, Yoko Matsuda, Tomio Arai, Fujiya Gomi, Junko Aida, Kaiyo Takubo, Masashi Toyoda, Hisashi Yoshimura, Kimimasa Takahashi, and Toshiyuki Ishiwata. 2019. "Enhanced Morphological and Functional Differences of Pancreatic Cancer with Epithelial or Mesenchymal Characteristics in 3D Culture." *Scientific Reports* 2019 9(1):1–10.
- Shimada, Yutaka, Tetsuo Sudo, Shusuke Akamatsu, Takuro Sunada, Akira Myomoto, Kiyoshi Okano, and Kazuharu Shimizu. 2022. "Cell Lines of Circulating Tumor Cells: What Is Known and What Needs to Be Resolved." *Journal of Personalized Medicine* 12(5):666.
- Shimo, Toshiro, Junichi Kurebayashi, Naoki Kanomata, Tetsumasa Yamashita, Yuji Kozuka, Takuya Moriya, and Hiroshi Sonoo. 2014. "Antitumor and Anticancer Stem Cell Activity of a Poly ADP-Ribose Polymerase Inhibitor Olaparib in Breast Cancer Cells." *Breast Cancer* 21(1):75–85.
- Shin, Alice E., Filippo G. Giancotti, and Anil K. Rustgi. 2023. "Metastatic Colorectal Cancer: Mechanisms and Emerging Therapeutics." *Trends in Pharmacological Sciences* 44(4):222.
- Shu, Jiangcheng, Shu Yan, Chenhui Ju, Long Chen, Minglu Liang, Cheng Wang, and Kai

Bibliografia

- Huang. 2024. "PARP1 Promotes Heart Regeneration and Cardiomyocyte Proliferation." *International Journal of Biological Sciences* 20(5):1602.
- Simbulan-Rosenthal, Cynthia M., Dean S. Rosenthal, Rui Bai Luo, Raed Samara, Mira Jung, Anatoly Dritschilo, Alexander Spoonde, and Mark E. Smulson. 2001. "Poly(ADP-Ribosyl)ation of P53 In Vitro and In Vivo Modulates Binding to Its DNA Consensus Sequence." *Neoplasia (New York, N.Y.)* 3(3):179.
- Singh, Sasha A., Shiori Kuraoka, Diego Vinicius Santinelli Pestana, Waqas Nasir, Bernard Delanghe, and Masanori Aikawa. 2022. "The RiboMaP Spectral Annotation Method Applied to Various ADP-Ribosylome Studies Including INF- γ -Stimulated Human Cells and Mouse Tissues." *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 9:851351.
- Sklias, Thodoris, Vasileios Vardas, Evangelia Pantazaka, Athina Christopoulou, Vassilis Georgoulas, Athanasios Kotsakis, Yiannis Vasilopoulos, and Galatea Kallergi. 2022. "PARP-1 Expression and BRCA1 Mutations in Breast Cancer Patients' CTCs." *Cancers* 14(7):1731.
- Smeby, Jørgen, Kushtrim Kryeziu, Kaja C. G. Berg, Ina A. Eilertsen, Peter W. Eide, Bjarne Johannessen, Marianne G. Guren, Arild Nesbakken, Jarle Bruun, Ragnhild A. Lothe, and Anita Sveen. 2020. "Molecular Correlates of Sensitivity to PARP Inhibition beyond Homologous Recombination Deficiency in Pre-Clinical Models of Colorectal Cancer Point to Wild-Type TP53 Activity." *EBioMedicine* 59:102923.
- Sobczak, Maciej, Marharyta Zyma, and Agnieszka Robaszkiewicz. 2020. "The Role of PARP1 in Monocyte and Macrophage Commitment and Specification: Future Perspectives and Limitations for the Treatment of Monocyte and Macrophage Relevant Diseases with PARP Inhibitors." *Cells* 9(9):1–33.
- Son, Dae Ik, Seokheon Hong, Ki Soon Shin, and Shin Jung Kang. 2020. "PARP-1 Regulates Mouse Embryonic Neural Stem Cell Proliferation by Regulating PDGFR α Expression." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 526(4):986–92.
- Stoffel, Elena M. and Fay Kastrinos. 2014. "Familial Colorectal Cancer, beyond Lynch Syndrome." *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 12(7):1059–68.
- Stokes, Kyle, Malika Nunes, Chantelle Trombley, Danilo E. F. L. Flôres, Gang Wu, Zainab Taleb, Abedalrhman Alkhateeb, Suhrid Banskota, Chris Harris, Oliver P. Love, Waliul I. Khan, Luis Rueda, John B. Hogenesch, and Phillip Karpowicz. 2021. "The Circadian Clock Gene, Bmal1, Regulates Intestinal Stem Cell Signaling and Represses Tumor Initiation." *CMGH* 12(5):1847-1872.e0.
- Sulli, Gabriele, Michael Tun Yin Lam, and Satchidananda Panda. 2019. "Interplay between Circadian Clock and Cancer: New Frontiers for Cancer Treatment." *Trends in Cancer* 5(8):475–94.
- Szántó, Magdolna and Peter Bai. 2020. "The Role of ADP-Ribose Metabolism in Metabolic Regulation, Adipose Tissue Differentiation, and Metabolism." *Genes & Development* 34(5–6):321.
- Szántó, Magdolna, Rebecca Gupte, W. Lee Kraus, Pal Pacher, and Peter Bai. 2021. "PARPs in Lipid Metabolism and Related Diseases." *Progress in Lipid Research*

84:101117.

- Takashima, Atsuo, Pilar García-Alfonso, Raimundo Manneh, Ali Ayberk Beşen, Yong Sang Hong, Pieter Jan Cuyle, Patricio Yanez, Matthew Burge, Takayuki Yoshino, Tae Won Kim, Karen Cui, Chenxiang Li, Rishi Jain, David Adelberg, and Julien Taieb. 2024. "Olaparib with or without Bevacizumab versus Bevacizumab plus a Fluoropyrimidine as Maintenance Therapy in Advanced Colorectal Cancer: The Randomized Phase 3 LYNK-003 Study." *European Journal of Cancer* 205:114036.
- Tárraga López, Pedro J., Juan Solera Albero, and José Antonio Rodríguez-Montes. 2014. "Primary and Secondary Prevention of Colorectal Cancer." <https://doi.org/10.4137/CGast.S14039> 7:33–46.
- Tentori, Lucio, Carlo Leonetti, Marco Scarsella, Alessia Muzi, Emanuela Mazzon, Matteo Vergati, Olindo Forini, Rena Lapidus, Weizheng Xu, Annalisa Susanna Dorio, Jie Zhang, Salvatore Cuzzocrea, Grazia Graziani, Lucio Tentori, Carlo Leonetti, Marco Scarsella, Alessia Muzi, Emanuela Mazzon, Matteo Vergati, Olindo Forini, Rena Lapidus, Weizheng Xu, Annalisa Susanna Dorio, Jie Zhang, Salvatore Cuzzocrea, and Grazia Grazia. 2006. "Inhibition of Poly(ADP-ribose) Polymerase Prevents Irinotecan-induced Intestinal Damage and Enhances Irinotecan/Temozolomide Efficacy against Colon Carcinoma." *The FASEB Journal* 20(10):1709–11.
- Thakur, Nishant, Kwangil Yim, Jamshid Abdul-Ghafar, Kyung Jin Seo, and Yosep Chong. 2021. "High Poly(ADP-Ribose) Polymerase Expression Does Relate to Poor Survival in Solid Cancers: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Cancers* 13(2):5594.
- Tong, Hui, Xiaohui Liu, Tao Li, Weihua Qiu, Chenghong Peng, Baiyong Shen, and Zhecheng Zhu. 2020. "NR1D2 Accelerates Hepatocellular Carcinoma Progression by Driving the Epithelial-to-Mesenchymal Transition." *OncoTargets and Therapy* 13:3931.
- Toscano, Florent, Béatrice Parmentier, Zineb El Fajoui, Yann Estornes, Jean Alain Chayvialle, Jean Christophe Saurin, and Jacques Abello. 2007. "P53 Dependent and Independent Sensitivity to Oxaliplatin of Colon Cancer Cells." *Biochemical Pharmacology* 74(3):392–406.
- Valafar, Brandon, Apostolos Zaravinos, and Benjamin Bonavida. 2021. "Cross Talk between the Circadian Clock Proteins and TP53 in Cancer and Therapeutic Significance." *Critical Reviews in Oncogenesis* 26(4):19–36.
- Vasefifar, Parisa, Rouhollah Motafakkerazad, Leili Aghebati Maleki, Souzan Najafi, Farid Ghrobaninezhad, Basira Najafzadeh, Hajar Alemohammad, Mohammad Amini, Amir Baghbanzadeh, and Behzad Baradaran. 2022. "Nanog, as a Key Cancer Stem Cell Marker in Tumor Progression." *Gene* 827:146448.
- Venere, M., P. Hamerlik, Q. Wu, R. D. Rasmussen, L. A. Song, A. Vasanji, N. Tenley, W. A. Flavahan, A. B. Hjelmeland, J. Bartek, and J. N. Rich. 2013. "Therapeutic Targeting of Constitutive PARP Activation Compromises Stem Cell Phenotype and Survival of Glioblastoma-Initiating Cells." *Cell Death & Differentiation* 21(2):258–69.
- Di Veroli, Giovanni Y., Chiara Fornari, Dennis Wang, Séverine Mollard, Jo L. Bramhall,

Bibliografia

- Frances M. Richards, and Duncan I. Jodrell. 2016. "Combeneft: An Interactive Platform for the Analysis and Visualization of Drug Combinations." *Bioinformatics* 32(18):2866–68.
- Vilar, Eduardo, Catherine M. Bartnik, Stephanie L. Stenzel, Leon Raskin, Jaeil Ahn, Victor Moreno, Bhramar Mukherjee, Maria D. Iniesta, Meredith A. Morgan, Gad Rennert, and Stephen B. Gruber. 2011. "MRE11 Deficiency Increases Sensitivity to Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibition in Microsatellite Instable Colorectal Cancers." *Cancer Research* 71(7):2632.
- Vodenkova, Sona, Tomas Buchler, Klara Cervena, Veronika Veskrnova, Pavel Vodicka, and Veronika Vymetalkova. 2020. "5-Fluorouracil and Other Fluoropyrimidines in Colorectal Cancer: Past, Present and Future." *Pharmacology & Therapeutics* 206:107447.
- Vogiatzoglou, Amalia P., Syrago Spanou, Nikoleta Sachini, Elias Drakos, Christoforos Nikolaou, Takis Makatounakis, Androniki Kretsovali, and Joseph Papamatheakis. 2023. "Promyelocytic Leukemia Protein Regulates Angiogenesis and Epithelial–Mesenchymal Transition to Limit Metastasis in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells." *Molecular Oncology* 17(10):2090–2108.
- Walsh, Christine. 2024. "Genetic Implications for Cancer Management: The Changing Landscape of Poly (ADP-Ribose) Polymerase Inhibitor Indications in the Treatment of Ovarian Cancer." *Clinical Obstetrics & Gynecology*.
- Wang, Bin, Shuhei Matsuoka, Phillip B. Carpenter, and Stephen J. Elledge. 2002. "53BP1, a Mediator of the DNA Damage Checkpoint." *Science (New York, N.Y.)* 298(5597):1435–38.
- Wang, Chen, Nicholas Jette, Daniel Moussienko, D. Gwyn Bebb, and Susan P. Lees-Miller. 2017. "ATM-Deficient Colorectal Cancer Cells Are Sensitive to the PARP Inhibitor Olaparib." *Translational Oncology* 10(2):190–96.
- Wang, Haipeng, Shengguo Li, Xishun Luo, Zhike Song, Xiangkai Long, and Xijia Zhu. 2017. "Knockdown of PARP6 or Survivin Promotes Cell Apoptosis and Inhibits Cell Invasion of Colorectal Adenocarcinoma Cells." *Oncology Reports* 37(4):2245–51.
- Wang, Yan, Yanhong Zhang, Sheng Zhang, Bokyung Kim, Vanessa L. Hull, Jie Xu, Preeti Prabhu, Maria Gregory, Veronica Martinez-Cerdeno, Xinhua Zhan, Wenbin Deng, and Fuzheng Guo. 2021. "PARP1-Mediated PARylation Activity Is Essential for Oligodendroglial Differentiation and CNS Myelination." *Cell Reports* 37(1):109695.
- Wang, Zhenpeng, Yufei Tang, Lei Xie, Aiping Huang, Chunchun Xue, Zhen Gu, Kaiqiang Wang, and Shaoqi Zong. 2019. "The Prognostic and Clinical Value of CD44 in Colorectal Cancer: A Meta-Analysis." *Frontiers in Oncology* 9(APR):309.
- Weaver, Alice N. and Eddy S. Yang. 2013. "Beyond DNA Repair: Additional Functions of PARP-1 in Cancer." *Frontiers in Oncology* 3 NOV:69195.
- Węsierska-Gądek, Józefa and Gerald Schmid. 2001. "Overexpressed Poly(ADP-Ribose) Polymerase Delays the Release of Rat Cells from P53-Mediated G1 Checkpoint." *Journal of Cellular Biochemistry* 80(1):85–103.
- Wieler, Sonya, Jean Philippe Gagné, Homayoun Vaziri, Guy G. Poirier, and Samuel Benchimol. 2003. "Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 Is a Positive Regulator of the

- P53-Mediated G1 Arrest Response Following Ionizing Radiation." *Journal of Biological Chemistry* 278(21):18914–21.
- Won, Jungyeon, So Young Chung, Seung Beom Kim, Boo Hyeong Byun, Yoo Sik Yoon, and Cheol O. Joe. 2006. "Dose-Dependent UV Stabilization of P53 in Cultured Human Cells Undergoing Apoptosis Is Mediated by Poly(ADP-Ribosyl)ation." *Molecules and Cells* 21(2):218–23.
- Xia, Kangkai, Shujing Li, Yuxi Yang, Xiaoxia Shi, Binggong Zhao, Linlin Lv, Zhiqiang Xin, Jie Kang, Ping Ren, and Huijian Wu. 2023. "Cryptochrome 2 Acetylation Attenuates Its Antiproliferative Effect in Breast Cancer." *Cell Death & Disease* 2023 14:4 14(4):1–10.
- Xie, Si, Oliver Mortusewicz, Hoi Tang Ma, Patrick Herr, Randy R. Y. Poon, Thomas Helleday, and Chengmin Qian. 2015. "Timeless Interacts with PARP-1 to Promote Homologous Recombination Repair." *Molecular Cell* 60(1):163–76.
- Xiong, Yubo, Yifan Zhuang, Mengya Zhong, Wenjuan Qin, Boyi Huang, Jiabao Zhao, Zhi Gao, Jingsong Ma, Zhengxin Wu, Xuehui Hong, Zhicao Yue, and Haijie Lu. 2022. "Period 2 Suppresses the Malignant Cellular Behaviors of Colorectal Cancer Through the Epithelial-Mesenchymal Transformation Process." *Cancer Control: Journal of the Moffitt Cancer Center* 29:1–12.
- Xu, Kaiwu, Zhihui Chen, Yi Cui, Changjiang Qin, Yulong He, and Xinming Song. 2015. "Combined Olaparib and Oxaliplatin Inhibits Tumor Proliferation and Induces G2/M Arrest and γ -H2AX Foci Formation in Colorectal Cancer." *OncoTargets and Therapy* 8:3047.
- Xu, Kaiwu, Zhige Yu, Tailiang Lu, Wei Peng, Yongqiang Gong, and Chaowu Chen. 2024. "PARP1 Bound to XRCC2 Promotes Tumor Progression in Colorectal Cancer." *Discover Oncology* 15(1):1–11.
- Yadav, Alka, Ashok Kumar, and Mohammad Haris Siddiqui. 2021. "Detection of Circulating Tumour Cells in Colorectal Cancer: Emerging Techniques and Clinical Implications." *World Journal of Clinical Oncology* 12(12):1169–81.
- Yan, Kelley S., Olivier Gevaert, Grace X. Y. Zheng, Benedict Anchang, Christopher S. Probert, Kathryn A. Larkin, Paige S. Davies, Zhuan fen Cheng, John S. Kaddis, Arnold Han, Kelly Roelf, Ruben I. Calderon, Esther Cynn, Xiaoyi Hu, Komal Mandleywala, Julie Wilhelmy, Sue M. Grimes, David C. Corney, Stéphane C. Boutet, Jessica M. Terry, Phillip Belgrader, Solongo B. Ziraldo, Tarjei S. Mikkelsen, Fengchao Wang, Richard J. von Furstenberg, Nicholas R. Smith, Parthasarathy Chandrakesan, Randal May, Mary Ann S. Chrissy, Rajan Jain, Christine A. Cartwright, Joyce C. Niland, Young Kwon Hong, Jill Carrington, David T. Breault, Jonathan Epstein, Courtney W. Houchen, John P. Lynch, Martin G. Martin, Sylvia K. Plevritis, Christina Curtis, Hanlee P. Ji, Linheng Li, Susan J. Henning, Melissa H. Wong, and Calvin J. Kuo. 2017. "Intestinal Enteroendocrine Lineage Cells Possess Homeostatic and Injury-Inducible Stem Cell Activity." *Cell Stem Cell* 21(1):78-90.e6.
- Yang, A. Yeong, Eun Bee Choi, Mi So Park, Seon Kyu Kim, Min Seok Park, and Mi Young Kim. 2021. "PARP1 and PRC2 Double Deficiency Promotes BRCA-Proficient Breast Cancer Growth by Modification of the Tumor Microenvironment." *The FEBS Journal* 288(9):2888–2910.

Bibliografia

- Yang, Guojun, Yixin Yang, Hong Tang, and Kai Yang. 2020. "Loss of the Clock Gene Per1 Promotes Oral Squamous Cell Carcinoma Progression via the AKT/MTOR Pathway." *Cancer Science* 111(5):1542–54.
- Yang, Tianshu, Wei Huang, Tianyu Ma, Xin Yin, Jingyao Zhang, Miaomiao Huo, Ting Hu, Tianyang Gao, Wei Liu, Die Zhang, Hefen Yu, Xu Teng, Min Zhang, Hao Qin, Yunkai Yang, Baowen Yuan, and Yan Wang. 2023. "The PRMT6/PARP1/CRL4B Complex Regulates the Circadian Clock and Promotes Breast Tumorigenesis." *Advanced Science* 10(14):2202737.
- Yang, Xiaoming, Patricia A. Wood, Christine M. Ansell, Masami Ohmori, Eun Yeong Oh, Yin Xiong, Franklin G. Berger, Maria Marjorette O. Peña, and William J. M. Hrushesky. 2009. "Beta-Catenin Induces Beta-TrCP-Mediated PER2 Degradation Altering Circadian Clock Gene Expression in Intestinal Mucosa of ApcMin/+ Mice." *Journal of Biochemistry* 145(3):289–97.
- Yano, Hiroshi, Takashi Tsuji, Masatoshi Haseba, Hideaki Komatsu, Shigekazu Hidaka, Terumitsu Sawai, Hiroyuki Yamaguchi, Toru Yasutake, Tohru Nakagoe, and Yutaka Tagawa. 2002. "Elevated Expression of Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 Is Associated with Liver Metastasis in Colorectal Cancer." *Acta Medica Nagasakiensia* 47(3–4):111–15.
- Yaping, Wang, Ning Sun, Chao Lu, Yibing Bei, Ruizhe Qian, and Luchun Hua. 2017. "Upregulation of Circadian Gene 'hClock' Contribution to Metastasis of Colorectal Cancer." *International Journal of Oncology* 50(6):2191–99.
- Ye, Youqiong, Yu Xiang, Fatma Muge Ozcuc, Yoonjin Kim, Chun Jie Liu, Peter K. Park, Qingsong Hu, Lixia Diao, Yanyan Lou, Chunru Lin, An Yuan Guo, Bingying Zhou, Li Wang, Zheng Chen, Joseph S. Takahashi, Gordon B. Mills, Seung Hee Yoo, and Leng Han. 2018. "The Genomic Landscape and Pharmacogenomic Interactions of Clock Genes in Cancer Chronotherapy." *Cell Systems* 6(3):314–328.e2.
- Yélamos, José, Lucia Moreno-Lama, Jaime Jimeno, and Syed O. Ali. 2020. "Immunomodulatory Roles of PARP-1 and PARP-2: Impact on PARP-Centered Cancer Therapies." *Cancers* 12(2).
- Yim, Kwangil, Kyung Jin Seo, Jamshid Abdul-Ghafar, Mohammad Rizwan Alam, Kwang Yeol Paik, Yosep Chong, and Ok Ran Shin. 2024. "Poly (ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP-1) Is a Good Prognostic Marker for Pancreatic/Periampullary Cancers." *Pancreas*.
- Yu, Min, Wenjing Li, Qianqian Wang, Yan Wang, and Fei Lu. 2018. "Circadian Regulator NR1D2 Regulates Glioblastoma Cell Proliferation and Motility." *Oncogene* 2018 37:35 37(35):4838–53.
- Zada, David, Yaniv Sela, Noa Matosevich, Adir Monsonogo, Tali Lerer-Goldshtein, Yuval Nir, and Lior Appelbaum. 2021. "Parp1 Promotes Sleep, Which Enhances DNA Repair in Neurons." *Molecular Cell* 81(24):4979.
- Zaremba, T., P. Ketzer, M. Cole, S. Coulthard, E. R. Plummer, and N. J. Curtin. 2009. "Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 Polymorphisms, Expression and Activity in Selected Human Tumour Cell Lines." *British Journal of Cancer* 2009 101:2 101(2):256–62.

- Zeki, Sebastian S., Trevor A. Graham, and Nicholas A. Wright. 2011. "Stem Cells and Their Implications for Colorectal Cancer." *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2011 8:2 8(2):90–100.
- Zeniou, M., L. Nguekeu-Zebaze, and F. Dantzer. 2019. "Therapeutic Considerations of PARP in Stem Cell Biology: Relevance in Cancer and Beyond." *Biochemical Pharmacology* 167:107–15.
- Zhai, Lili, Shuai Li, Huilan Li, Yi Zheng, Ronggang Lang, Yu Fan, Feng Gu, Xiaojing Guo, Xinmin Zhang, and Li Fu. 2015. "Polymorphisms in Poly (ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP1) Promoter and 3' Untranslated Region and Their Association with PARP1 Expression in Breast Cancer Patients." *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 8(6):7059.
- Zhang, Feng, Hong Sun, Sai Zhang, Xin Yang, Guogang Zhang, and Tao Su. 2017. "Overexpression of PER3 Inhibits Self-Renewal Capability and Chemoresistance of Colorectal Cancer Stem-Like Cells via Inhibition of Notch and β -Catenin Signaling." *Oncology Research* 25(5):709–19.
- Zhang, Pin, Takashi Maruyama, Joanne E. Konkel, Brittany Abbatiello, Brian Zamarron, Zhao qi Wang, and Wanjun Chen. 2013. "PARP-1 Controls Immunosuppressive Function of Regulatory T Cells by Destabilizing Foxp3." *PLOS ONE* 8(8):e71590.
- Zhang, Ying, Collin Dube, Myron Gibert, Nichola Cruickshanks, Baomin Wang, Maeve Coughlan, Yanzhi Yang, Initha Setiady, Ciana Deveau, Karim Saoud, Cassandra Grello, Madison Oxford, Fang Yuan, and Roger Abounader. 2018. "The P53 Pathway in Glioblastoma." *Cancers* 10(9).
- Zhang, Yuan, Aurore Devocelle, Christophe Desterke, Lucas Eduardo Botelho de Souza, Éva Hadadi, Hervé Acloque, Adlen Foudi, Yao Xiang, Annabelle Ballesta, Yunhua Chang, and Julien Giron-Michel. 2021. "Bmal1 Knockdown Leans Epithelial–Mesenchymal Balance toward Epithelial Properties and Decreases the Chemoresistance of Colon Carcinoma Cells." *International Journal of Molecular Sciences* 22(10):5247.
- Zhang, Yuan, Aurore Devocelle, Lucas Souza, Adlen Foudi, Sabrina Tenreira Bento, Christophe Desterke, Rachel Sherrard, Annabelle Ballesta, Rene Adam, Julien Giron-Michel, and Yunhua Chang. 2020. "BMAL1 Knockdown Triggers Different Colon Carcinoma Cell Fates by Altering the Delicate Equilibrium between AKT/MTOR and P53/P21 Pathways." *Aging* 12(9):8067–83.
- Zhao, Chaofen, Xi Meng, Yuanyuan Li, Lina Liu, Qianyong He, Jieqing Jiang, Yue Chen, Xiaomei Li, Yuxin Li, Yaxue Tang, Dingan Zhou, Jianjiang Zhou, and Feng Jin. 2022. "Circadian Clock Gene BMAL1 Inhibits the Proliferation and Tumor-Formation Ability of Nasopharyngeal Carcinoma Cells and Increases the Sensitivity of Radiotherapy." *Chronobiology International* 39(10):1340–51.
- Zhao, Yang, Jing Peng, Enlong Zhang, Ning Jiang, Jiang Li, Qi Zhang, Xuening Zhang, Yuanjie Niu, Yang Zhao, Jing Peng, Enlong Zhang, Ning Jiang, Jiang Li, Qi Zhang, Xuening Zhang, and Yuanjie Niu. 2016. "CD133 Expression May Be Useful as a Prognostic Indicator in Colorectal Cancer, a Tool for Optimizing Therapy and Supportive Evidence for the Cancer Stem Cell Hypothesis: A Meta-Analysis." *Oncotarget* 7(9):10023–36.

Bibliografia

- Zheng, Shuhua and Wensi Tao. 2020. "Neoadjuvant Chemotherapy for Colon Cancer." *Cancers* 2020, Vol. 12, Page 2368 12(9):2368.
- Zhou, Meijiao, Trevor D. Thompson, Hui Yi Lin, Vivien W. Chen, Jordan J. Karlitz, Elizabeth T. H. Fontham, Katherine P. Theall, Lu Zhang, Mei Chin Hsieh, Lori A. Pollack, and Xiao Cheng Wu. 2022. "Impact of Relative Dose Intensity of FOLFOX Adjuvant Chemotherapy on Risk of Death Among Stage III Colon Cancer Patients." *Clinical Colorectal Cancer* 21(2):e62.
- Zhou, Yujing, Shengwen Zhao, Tong Wu, and Han Zhang. 2022. "Comparison of Adverse Reactions Caused by Olaparib for Different Indications." *Frontiers in Pharmacology* 13.
- Zhu, Yin, Shimiao Huang, Shengyuan Chen, Jiaxuan Chen, Zhiqing Wang, Yadong Wang, and Haoxuan Zheng. 2021. "SOX2 Promotes Chemoresistance, Cancer Stem Cells Properties, and Epithelial–Mesenchymal Transition by β -Catenin and Beclin1/Autophagy Signaling in Colorectal Cancer." *Cell Death & Disease* 2021 12:5 12(5):1–16.

ANEXOS

a. Materiales y Métodos

Anexo 1: Modelo consentimiento informado

Consentimiento informado – Información al paciente

Antes de proceder a la firma de este consentimiento informado, lea atentamente la información que a continuación se le facilita y realice las preguntas que considere oportunas.

Naturaleza:

Importancia:

Implicaciones para el donante/paciente:

- La donación/participación es totalmente voluntaria.
- El donante/paciente puede retirarse del estudio cuando así lo manifieste, sin dar explicaciones y sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.
- Todos los datos de carácter personal, obtenidos en este estudio son confidenciales y se tratarán conforme a la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99
- La donación/información obtenida se utilizará exclusivamente para los fines específicos de este estudio.

Riesgos de la investigación para el donante/paciente:

Si requiere información adicional se puede poner en contacto con nuestro personal de XXXXXX en el teléfono XXX XXX XXX o en el correo electrónico XXX@XXX.XX

Consentimiento informado – Consentimiento por escrito del paciente

<TÍTULO>

Yo (Nombre y Apellidos):

- He leído el documento informativo que acompaña a este consentimiento (Información al paciente).
- He podido hacer preguntas sobre el estudio <TÍTULO>.
- He recibido suficiente información sobre el estudio <TÍTULO>. He hablado con el profesional sanitario informador:
- Comprendo que mi participación es voluntaria y soy libre de participar o no en el estudio.
- Se me ha informado que todos los datos obtenidos en este estudio serán confidenciales y se tratarán conforme establece la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.
- Se me ha informado de que la donación/información obtenida solo se utilizará para los fines específicos del estudio.
- Deseo ser informado/a de mis datos genéticos y otros de carácter personal que se obtengan en el curso de la investigación, incluidos los descubrimientos inesperados que se puedan producir siempre que esta información sea necesaria para evitar un grave perjuicio para mi salud o la de mis familiares biológicos:

Sí

No

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera.
- Sin tener que dar explicaciones.
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el proyecto titulado <TÍTULO>

Firma del paciente

Firma del profesional

(O representante legal)

sanitario informador

Nombre y apellidos:.....

Nombre y apellidos:.....

Fecha:.....

Fecha:.....

Anexo 2: Datos clínicos de los pacientes de las líneas derivadas de pacientes

Tabla S1. Características clínicas de las células derivadas de pacientes.

Identificación	CRC1	CPP6	CPP14	CPP19	CPP24	CPP25	CPP30	CPP35	CPP36	CPP42	CPP43	CPP44	CPP45
Año nacimiento	1932	1940	1948	1948	1945	1937	1944	1933	1932	1951	1924	1948	1934
Origen celular	Primario	Primario	Primario	Metástasis	Primario	Primario	Metástasis	Primario	Metástasis	Primario	Primario	Primario	Metástasis
Sexo	M	M	F	M	M	M	M	M	M	M	M	F	M
Edad (en la cirugía)	76	71	65	65	68	77	69	81	81	63	90	66	80
Historial de cáncer	No	No	No	No	No	No	No	No	Sí	No	Sí	No	No
TNM	PT4N0Mx	T4N2M1	NI	TXN+M1	NI	T3bN1M0	TXNXM+	T4aN0M0	TXNXM1	TXXN+M1	TXN0M0	TXNXM1	T3N1M1
KRAS mutación	No	No	Sí	Sí	Sí	No	No	N/A	Sí	Sí	N/A	Sí	Sí
Localización tumor primario	Colon transversal	Colon Sigmoido	Colon descendente	Colon ascendente	Recto	Recto	Colon Sigmoido	Colon Transversal	Colon Sigmoido	Colon Ascendente	Colon Descendente	Colon Ascendente	Recto
Metástasis sincrónica	N/A	Sí	No	Sí	Sí	No	Sí	No	Sí	Sí	No	Sí	Sí
Metástasis	N/A	Pulmón	-	Hígado	Pulmón	-	Hígado	-	Hígado	Otras	-	Hígado	Hígado
Radioterapia pre-cirugía	N/A	No	No	No	N/A	Sí	N/A	No	No	Sí	No	No	No
Quimioterapia pre-cirugía	N/A	Sí, pero desconocida	No	Bevacizumab Folfiri	Bevacizumab Cetuximab Folfiri	Capecitabina	Bevacizumab Folfiri Xelox	No	Bevacizumab Folfiri	Bevacizumab Folfiri	No	No	No
Fecha cirugía	2008	22/11/2012	08/03/2013	26/06/2013	13/09/2013	18/09/2013	27/01/2014	12/05/2014	18/06/2014	28/08/2014	15/09/2014	22/09/2014	22/09/2014
Cirugía curativa	N/A	Sí	Sí	Sí	No	Sí	Sí	Sí	No	No	No	No	No
Resección completa R0	N/A	Sí	Sí	Sí	No	Sí	Sí	Sí	No	Sí	Sí	Sí	Sí
Metastasectomía	N/A	Sí	No	Sí	No	No	Sí	No	Sí	No	No	Sí	Sí
TNM (2)	N/A	NI	T2NM0	T3N2aM1	NI	T2M0N0	TXNXM1	T4aN0M0	NI	T4N2bM+	T3N0MX	T4N2bM1	T3N1cM1
Seguimiento clínico	N/A	Fallecido 2012 por fallo multiorgánico durante hepatectomía	Remisión desde 2018	Fallecido 22/10/2013 debido a la enfermedad	Fallecido en febrero 2016 debido a cáncer rectal metastásico	Sigue vivo y con remisión completa	Muerte en marzo de 2022 debido a CCR metastásico	Sigue vivo y en remisión	Fallecido en 2014 por fallo multiorgánico durante hepatectomía	Fallecido en 2015 debido a CCR metastásico	Fallecido en 2019 debido a melanoma metastásico. CCR curado	Fallecido en 2016 debido a CCR metastásico	N/A
Respuesta a quimioterapia	N/A	N/A	N/A	No	Sí	Sí	Sí	N/A	No	No	N/A	N/A	N/A

Anexo 3: Caracterización fenotípica ensayo clonogenicidad

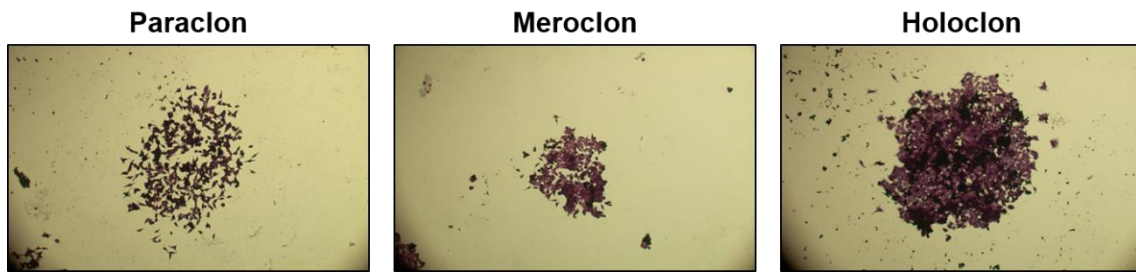


Figura A1. Fenotipos analizados en el ensayo de clonogenicidad: paraclon, meroclon y holoclon.

b. Resultados

Anexo 4: Mutaciones en TP53

Tabla S2. Mutaciones en TP53 en los pacientes de la cohorte de estudio

Mutación TP53	Pacientes con la mutación	Localización	Efecto
c.375G>A (p.T125T)	1	Exón 4	<i>Splicing</i>
c.404G>T (p.C135F)	2	Exón 5	Cambio sentido
c.422G>A (p.C141Y)	1	Exón 5	Cambio sentido
c.423C>G (p.C141W)	1	Exón 5	Cambio sentido
c.438G>A (p.W146*)	1	Exón 5	Sin sentido
c.455C>T (p.P152L)	2	Exón 5	Cambio sentido
c.481G>T (p.A161S)	1	Exón 5	Cambio sentido
c.488A>G (p.Y163C)	4	Exón 5	Cambio sentido
c.510delG (p.T170*)	1	Exón 5	Sin sentido
c.515T>G (p.V172G)	1	Exón 5	Cambio sentido
c.517G>T (p.V173L)	2	Exón 5	Cambio sentido
c.520A>T (p.R174W)	1	Exón 5	Cambio sentido
c.524G>A (p.R175H)	8	Exón 5	Cambio sentido
c.526_52del (p.C176*)	1	Exón 5	Sin sentido
c.527G>T (p.C176F)	1	Exón 5	Cambio sentido
c.536A>G (p.H179R)	1	Exón 5	Cambio sentido
c.584T>C (p.I195T)	1	Exón 6	Cambio de sentido
c.632C>T (p.T211I)	1	Exón 6	Cambio de sentido
c.637C>T (p.R213*)	5	Exón 6	Sin sentido
c.659A>G (p.Y220C)	1	Exón 6	Cambio de sentido
c.672+2T (p ?)	1	Intron 6	<i>Splicing</i>
c.713G>A (p.C238Y)	2	Exón 7	Cambio de sentido
c.733G>A (p.G245S)	4	Exón 7	Cambio de sentido
c.734G>A (p.G245D)	2	Exón 7	Cambio de sentido
c.742C>T (p.R248W)	2	Exón 7	Cambio de sentido
c.743G>A (p.R248Q)	4	Exón 7	Cambio de sentido
c.745A>T p.R249W	1	Exón 7	Cambio de sentido
c.757_75del (p.T253*)	1	Exón 7	Sin sentido
c.775G>T (p.D259Y)	1	Exón 7	Cambio de sentido
c.783-1G (p?)	1	Intron 7	<i>Splicing</i>
c.797G>A (p.G266E)	1	Exón 8	Cambio de sentido
c.811G>A (p.E271K)	2	Exón 8	Cambio de sentido
c.814G>A (p.V272M)	2	Exón 8	Cambio de sentido
c.817C>T (p.R273C)	4	Exón 8	Cambio de sentido
c.818G>A (p.R273H)	5	Exón 8	Cambio de sentido
c.818G>C (p.R273P)	1	Exón 8	Cambio de sentido
c.844C>T (p.R282W)	2	Exón 8	Cambio de sentido
c.853G>A (p.E285K)	1	Exón 8	Cambio de sentido
c.904G>T (p.G302W)	1	Exón 8	Cambio de sentido
c.919+1G (p?)	1	Intron 8	<i>Splicing</i>

Anexo 5: Estadística descriptiva de PARP-1

Tabla S3. Estadística descriptiva de PARP-1 en la cohorte de estudio

PARP-1	Mediana	Percentiles		
		25	50	75
Tejido no Tumoral Adyacente	550.5650	145.8250	550.5650	1189.4118
Tejido Tumoral	784.7600	323.9925	784.7600	1666.1900

Anexo 6: Estadística descriptiva de CD44 y CD133

Tabla S4. Estadística descriptiva de CD44 en la cohorte de estudio

CD44	Mediana	Percentiles		
		25	50	75
Tejido no Tumoral Adyacente	12.4817	4.0650	12.4817	41.4950
Tejido Tumoral	76.7104	32.7119	76.7104	186.8831

Tabla S5. Estadística descriptiva de CD133 en la cohorte de estudio

CD133	Mediana	Percentiles		
		25	50	75
Tejido no Tumoral Adyacente	845.5000	84.6336	845.5000	1855.1250
Tejido Tumoral	1582.0100	225.3676	1582.0100	4775.8900

Anexo 7: Expresión transitoria de PARP-1 a las 48 horas

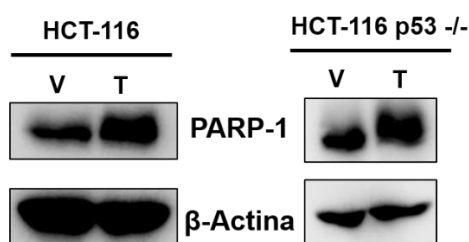


Figura S2. Expresión de PARP-1 y β -actina a las 48 horas post-transfección en las células transfectadas con el plásmido de vector vacío (V) y sobreexpresión de PARP-1 (T), para cada una de las líneas celulares.

Anexo 8: Modelos de sinergia de Loewe y Bliss para la viabilidad celular en las líneas metastásicas derivadas de paciente

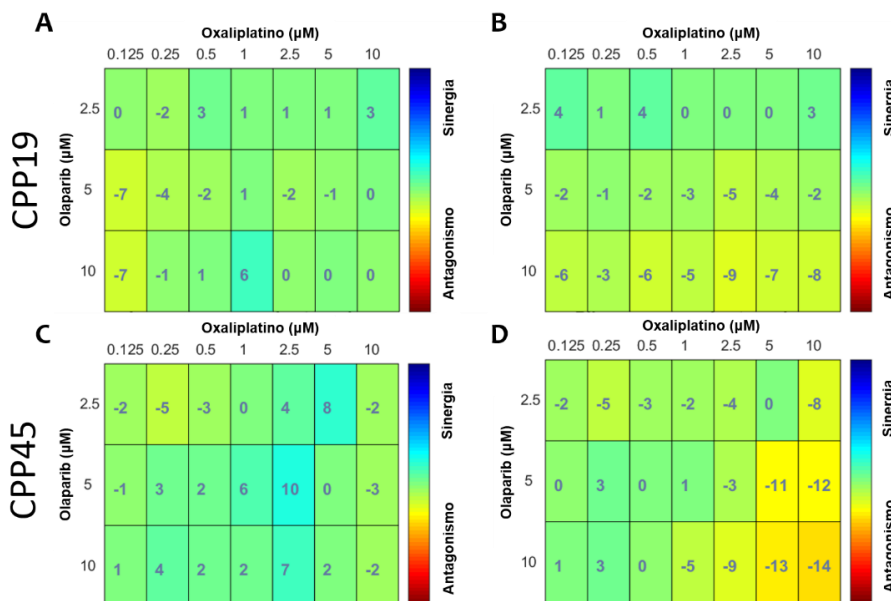


Figura S3. Modelos de sinergia de Loewe y Bliss para la reducción de la viabilidad en las líneas metastásicas. Puntuación del efecto sinérgico (A) según el modelo de Loewe y (B) Bliss en la línea CPP19. Puntuación del efecto sinérgico (C) según el modelo de Loewe y (D) Bliss en la línea CPP45.

Anexo 9: Modelos de sinergia de Loewe y Bliss para la población ALDH⁺ en las líneas metastásicas derivadas de paciente

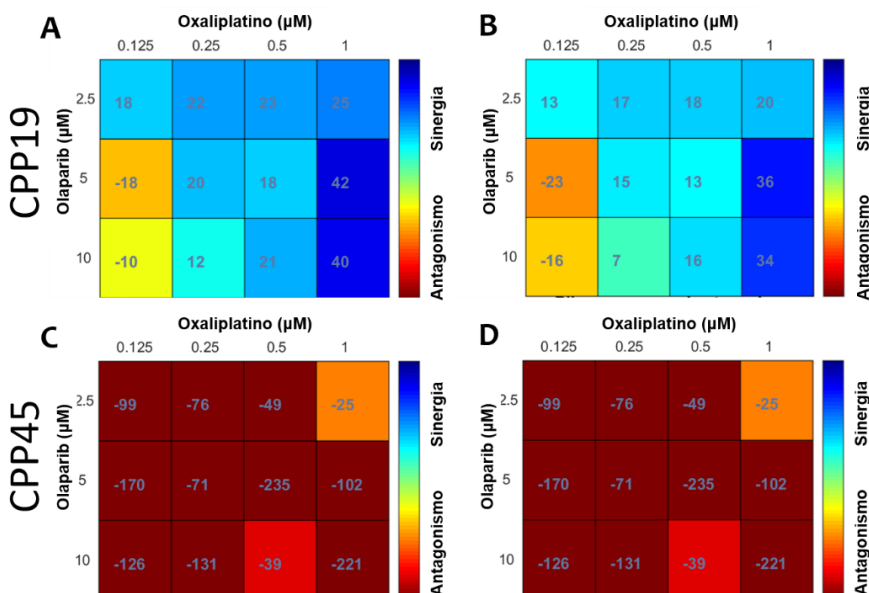


Figura S4. Modelos de sinergia de Loewe y Bliss para la reducción de la población ALDH⁺ en las líneas metastásicas. Puntuación del efecto sinérgico (A) según el modelo de Loewe y (B) Bliss en la línea CPP19. Puntuación del efecto sinérgico (C) según el modelo de Loewe y (D) Bliss en la línea CPP45.

Anexo 10: Modelos de sinergia de Loewe y Bliss para la viabilidad celular en las CTCs derivadas de paciente

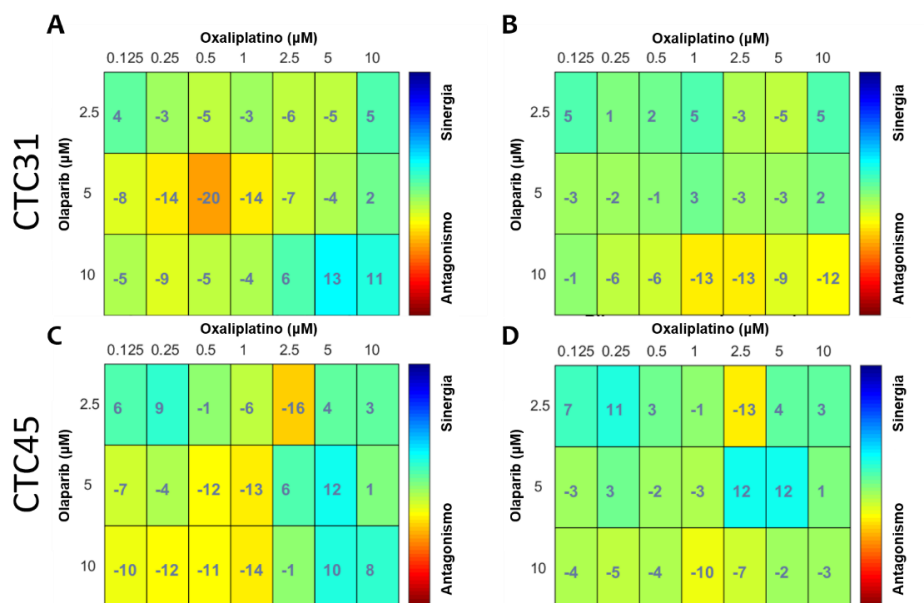


Figura S5. Modelos de sinergia de Loewe y Bliss para la reducción de la viabilidad en las líneas CTCs. Puntuación del efecto sinérgico (A) según el modelo de Loewe y (B) Bliss en la línea CTC31. Puntuación del efecto sinérgico (C) según el modelo de Loewe y (D) Bliss en la línea CTC45.

c. Publicaciones

1. **Puentes-Pardo, J.D.**; Moreno-SanJuan, S.; Carazo, Á.; León, J. Heme Oxygenase-1 in Gastrointestinal Tract Health and Disease. *Antioxidants* 2020,9, 1214. doi:10.3390/antiox9121214
2. Lopez-Perez D.; Redruello-Romero A.; Garcia-Rubio J.; Garcia-Escudero L.A; Tamayo F.; **Puentes-Pardo J.D.**; Moreno-SanJuan S.; Salmeron J.; Blanco A.; Galvez J.; Leon J.; Carazo A. 2021. In patients with obesity, the number of adipose tissue mast cells is significantly lower in subjects with type 2 diabetes. *Frontiers in Immunology*. *Frontiers*. 2021 May 21;12:664576. doi: 10.3389/fimmu.2021.664576.
3. Ríos-Arrabal, S.; **Puentes-Pardo, J.D.**; Moreno-SanJuan, S.; Szuba, Á.; Casado, J.; García-Costela, M.; Escudero-Feliu, J.; Verbeni, M.; Cano, C.; González-Puga, C.; Martín-Lagos Maldonado, A.; Carazo, Á.; León, J. Endothelin-1 as a Mediator of Heme Oxygenase-1-Induced Stemness in Colorectal Cancer: Influence of p53. *J. Pers. Med.* 2021,11, 509. doi:10.3390/jpm11060509
4. Aroca-Siendones, M.I.; Moreno-SanJuan, S.; **Puentes-Pardo, J.D.**; Verbeni, M.; Arnedo, J.; Escudero-Feliu, J.; García-Costela, M.; García-Robles, A.; Carazo, Á.;

- León, J. Core Circadian Clock Proteins as Biomarkers of Progression in Colorectal Cancer. *Biomedicines* 2021, 9, 967. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9080967>
5. Escudero-Feliu, J.; García-Costela, M.; Moreno-SanJuan, S.; **Puentes-Pardo, J.D.**; Arrabal, S.R.; González-Novoa, P.; Núñez, M.I.; Carazo, Á.; Jimenez-Lopez, J.C.; León, J. Narrow Leafed Lupin (*Lupinus Angustifolius* L.) β - Conglutin Seed Proteins as a New Natural Cytotoxic Agents against Breast Cancer Cells. *Nutrients* 2023, 15, 523, doi:10.3390/nu15030523.
 6. Moreno-SanJuan, S.; **Puentes-Pardo, J.D.**; Casado, J.; Escudero-Feliu, J.; Khaldy, H.; Arnedo, J.; Carazo, Á.; León, J. Agomelatine, a Melatonin-Derived Drug, as a New Strategy for the Treatment of Colorectal Cancer. *Antioxidants* 2023, 12, 926, doi:10.3390/antiox12040926.
 7. **Puentes-Pardo, J.D.**; Moreno-SanJuan, S.; Casado, J.; Escudero-Feliu, J.; López-Pérez, D.; Sánchez-Uceta, P.; González- Novoa, P.; Gálvez, J.; Carazo, Á.; León, J. PARP-1 Expression Influences Cancer Stem Cell Phenotype in Colorectal Cancer Depending on P53. *International Journal of Molecular Sciences* 2023, 24, 4787, doi:10.3390/ijms24054787
 8. Redruello-Romero A, Benitez-Cantos MS, Lopez-Perez D, García-Rubio J, Tamayo F, Pérez-Bartivas D, Moreno-SanJuan S, Ruiz-Palmero I, **Puentes-Pardo JD**, Vilchez JR, López-Nevot MÁ, García F, Cano C, León J and Carazo Á (2023) Human adipose tissue as a major reservoir of cytomegalovirus-reactive T cells. *Front. Immunol.* 14:1303724. doi: 10.3389/fimmu.2023.1303724
 9. Pérez-Regalado, S., León, J., Padial, P., Benavente, C., **Puentes-Pardo, J.D.**, Almeida, F., Feriche, B.. Effect of a resistance exercise at acute moderate altitude on muscle health biomarkers. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 476, 49–57 (2024). <https://doi.org/10.1007/s00424-023-02868-y>

d. Estancias de investigación

- Estancia de investigación en el Institut de Génomique Fonctionnelle (IGF) bajo la supervisión de la Dra. Julie Pannequin con una duración de 3 meses realizada entre 01/05/2023-31/07/2023.

d. Cursos y otros meritos

- Curso de capacitación en formación y experimentación animal Categorías A, B y C. 147.5 horas. Fecha titulación: 13/10/2021.
- Realización del curso “V Jornadas de Iniciación a la Docencia Universitaria para Contratados/as Predoctorales FPU y FPI” organizado por UGR. 17-18 diciembre 2020. 20 h
- Participación en la actividad divulgativa “Viendo lo invisible” durante la Noche europea de los investigadores 2021.

Anexos

- Participación en la actividad divulgativa “Viendo lo invisible” durante la Noche europea de los investigadores 2022.
- Realización de la actividad formativa “Divulgación Científica” realizado los días 20 y 22 de febrero 2024 de 20 horas de duración, organizado por la UGR.
- Realización del curso “Introducción a la farmacovigilancia” celebrado del 19-20 marzo con 4 horas de duración organizado por la UGR y PVpharm.
- Realización de la actividad formativa “Desarrollo preclínico de fármacos: estrategias de descubrimiento y desarrollo de fármacos y el uso de herramientas de inteligencia artificial” realizado entre los días 17-21 de junio 2024 de 20 horas de duración.
- Impartición de 180 horas de docencia en el Grado de Farmacia durante los cursos académicos 2020-21, 2021-22, 2022-23 y 2023-24.

