

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Programa de Doctorado en Medicina Clínica y Salud Pública



INFLUENCE OF P53 ON MELATONIN ONCOSTATIC EFFECTS IN COLORECTAL CANCER

Almudena M Íñigo Chaves

Granada 2019

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Almudena María Íñigo Chaves
ISBN: 978-84-1306-438-3
URI: <http://hdl.handle.net/10481/59618>

AGRACEDIMIENTOS

A mis padres, porque con su motivación constante y su apoyo incondicional me han traído hasta aquí. A mis hermanas y sobrinos, porque a pesar de estar siempre lejos son los que, en realidad, están más cerca.

A mi marido, por todos los sacrificios hechos y por todo lo conseguido juntos. Porque con una sola palabra sabe levantarme. RELENTLESS.

A mis compañeros de residencia, por ser como una familia que sigue unida sin fronteras y por estar siempre cuando se les necesita.

Agradecer a mis directores de tesis su colaboración y ayuda infinita. Gracias por haberme brindado la oportunidad de trabajar en este magnífico proyecto con vosotros. A Javier Salmerón por creer y confiar siempre en mí. A Josefa León, Pepi, por tu paciencia conmigo, por apoyarme a conseguir cosas que nunca imaginé con conseguiría, por las conversaciones en tu despacho y por tus audios, gracias por haber estado ahí desde el primer momento.

Al Departamento de Medicina de la Universidad de Granada por aceptar el facilitarme la realización de este proyecto.

A los adjuntos de la Unidad Clínica de Aparato Digestivo del Hospital Universitario San Cecilio. Formarme con vosotros ha sido una suerte.

Por último, quiero agradecer a todos los miembros de la Unidad de Apoyo a la Investigación del Hospital Universitario San Cecilio de Granada (CIBERehd), sin su increíble trabajo diario nada de esto sería posible.

ÍNDICE

LISTADO ABREVIATURAS	1
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	8
1. Cáncer Colorrectal	9
1.1 Epidemiología y generalidades	9
1.2 Etiopatogenia y factores de riesgo	10
1.2.1 Factores genéticos	10
1.2.2 Factores ambientales	11
1.3 Clínica del cáncer colorrectal	13
1.4 Diagnóstico	15
1.4.1 Estadificación	17
1.5 Screening del cáncer colorrectal	18
1.6 Tratamiento del cáncer colorrectal	19
2. P53	20
2.1 Generalidades	20
2.2 Estructura de p53	22
2.3 Funciones de p53	24
2.4 P53 y cáncer colorrectal	27
2.5 P53 y microARNs	29
3. Células madre y células madre cancerosas	32
3.1 Generalidades	32
3.1.1 Células madre	32
3.1.2 Células madre cancerosas	36
3.2 Identificación y aislamiento de células madre cancerosas	38
3.3 Mecanismos de resistencia a terapias	40
3.4 Células madre cancerosas y cáncer colorrectal	42

3.5 Células madre cancerosas y p53	47
3.6 Células madre cancerosas y microARNs	48
4. Melatonina	49
4.1 Generalidades	49
4.2 Síntesis y metabolismo	50
4.3 Receptores de melatonina	53
4.3.1 Receptores de membrana	53
4.3.2 Receptores nucleares	55
4.3.3 Mecanismos independientes de receptor	56
4.4 Melatonina y tracto gastrointestinal	57
4.5 Melatonina y cáncer	59
4.6 Melatonina y cáncer colorrectal	60
4.7 Melatonina y células madre	62
4.8 Melatonina y células madre cancerosas	63
4.9 Melatonina y p53	64
HYPOTHESIS & OBJECTIVES.....	66
MATERIALES Y MÉTODOS.....	70
1. Muestras de cáncer colorrectal humano	71
2. Aislamiento de ARN y síntesis de ADNc	72
3. PCR en tiempo real	72
4. Extracción de ADN	73
5. Determinación de las mutaciones de p53	73
5.1 Extracción de ADN	73
5.2 Amplificación de ADN con primers que flanquean los exones en regiones intrónicas	73
5.3 Secuenciación de los exones	75
6. Western Blotting	75
7. Análisis estadístico	76

RESULTADOS	77
1. Mutaciones de p53 en el cáncer colorrectal	78
2. Evaluación de la expresión de la arilalquilamina-N-acetiltransferasa (AA-NAT), MT1 y MT2 en muestras de cáncer colorrectal humano con diferentes estatus de p53	80
3. Evaluación de la expresión de los marcadores de células madre cancerosas en muestras de cáncer colorrectal humano con diferentes estatus de p53	82
4. Correlación entre los marcadores de células madre cancerosas y los genes relacionados con la síntesis y señalización de melatonina en el cáncer colorrectal	85
5. Resultados obtenidos en bases de datos públicas	87
DISCUSIÓN	91
CONCLUSIONS	97
BIBLIOGRAFÍA	97
ANEXO	124

LISTADO DE ABREVIATURAS

5-FU: 5-fluoracilo

5HTP: 5- hidroxitriptófano

AANAT: Aralkilamin N-acetiltransferasa

ABC: transportadores de membrana dependiente de ATP

AND: ácido desoxirribonucleico

AJCC: American Joint Committee for Cancer

ALCAM: activated leukocyte cell adhesion molecule o molécula de adhesión celular a leucocitos

ALDH: aldehído deshidrogenasa

AMP: adenosin monofosfato

APC: adenomatous polyposis coli

AR: receptores de andrógenos

ARNm: acido ribonucleico mensajero

ASMT: acetilserotonina O- metiltransferasa

ATM: ataxia teleangiesctasia

ATP: trifosfato de adenosina

CBCs: células columnares de la base de la cripta

CCHNP: Cáncer colorrectal hereditario no asociado a poliposis

CCR: cáncer colorrectal

CIN: inestabilidad cromosómica

CM: células madre

CMC: células madre cancerosas

CME: células madre embrionarias

CML: células madre leucémicas

CMM: células madre multipotentes

CRC: colorectal cancer

CSCs: cancer stem cells

CTD: Dominio básico desestructurado

DBD: dominio altamente preservado de unión al ADN

EC: células enterocromafines

ECM: matriz extracelular

EII: enfermedad inflamatoria intestinal

EMR: enfermedad mínima residual

EMT: Epithelial to mesenchymal transition o transición epitelio mesénquima

EpCAM: Molécula epitelial de adhesión celular

ER: receptores de estrógenos

ERN: especies reactivas del nitrógeno

EROS: especies reactivas de oxígeno

ESGE: sociedad europea de endoscopia gastrointestinal

ET-1: péptido endotelina-1

FOXO1: Forkhead box protein O1

GI: gastrointestinal

GMP: glucosa monofosfato

GOF: gain of function o ganancia de función

GSH: glutation

HGVS: Human Gene Variation Society

HIOMT: hidroxindol-O-metil transferasa

ICIs: inmune checkpoint inhibitors

iPs: células madre pluripotentes inducidas

ISEMFs: miofibroblastos intestinales subepiteliales

LGR-5: receptor 5 acoplado a la proteína G que contiene repeticiones ricas en leucina

M: metástasis

MAPK: mitogen-activated protein kinasa

MDM2: murine doble minute 2 o doble minuto murina 2

MDM4: murine doble minute 4 o doble minuto murina 4

MDMx: murine doble minute X o doble minuto murina X

miARN: micro ácido ribonucleico

MIC: masa celular interna

MMR: mismatch repair o sistema de reparación de bases desapareadas

MT: receptores de membrana de la melatonina

Mtp53: p53 mutado

N: adenopatías locorregionales

NE: norepinefrina

NF- κ B: Factor nuclear potenciadores de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NOC: compuestos N- nitrosos

NOD/SCID: nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency mice o ratones diabéticos no obesos/ratones con inmunodeficiencia combinada severa

OncomiRs: oncogenes

PAF: Poliposis adenomatosa familiar

PML: promyelocytic leukemia

PRD: región rica en prolina

PrP^c: cellular prion protein

QR2: quinona reductasa 2

QT: quimioterapia

RBTA: red de bancos de tumores de Andalucía

RM: resonancia magnética

ROR: receptores retinoides “huérfanos”

RT: radioterapia

RT- PCR: PCR en tiempo real

RZR: receptores Z retinoides

SHH: vía de señalización Sonic HedgeHog

SP: side population

T: afectación transmural

TAC: tomografía axial computarizada

TAD: transactivación N terminal

TGCA: The cancer Genome Atlas

TGI: tracto gastrointestinal

UBC: ubiquitina C

UICC: International Union for Cancer

Wtp53: p53 wild type o no mutado

RESUMEN

El cáncer colorrectal (CCR) es el tercer tipo de cáncer más común y la segunda causa de muerte por esta enfermedad en el mundo desarrollado. Por ello, es necesario encontrar biomarcadores útiles que nos ayuden a reconocer qué pacientes presentan peor pronóstico y/o mayor o menor posibilidad de resistencia a un tratamiento determinado. En este sentido, las células madre cancerosas (CMC) han adquirido gran importancia en los últimos años. Independientemente de su origen, las CMC tienen un importante significado clínico ya que se ha demostrado que son las responsables de la iniciación del tumor, la aparición de metástasis, y resistencia a la quimioterapia e irradiación. Por ello, un mejor conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en su regulación podría ayudarnos a conseguir terapias más eficaces.

La mutación en el gen p53 o su pérdida de función juega un papel fundamental en la transición de adenoma a carcinoma en el CCR y la frecuencia de alteraciones del gen aumenta con la progresión de la lesión. Las distintas mutaciones en p53 juegan un papel fundamental en el comportamiento biológico del CCR, como la invasión en profundidad, el lugar de metástasis e incluso el pronóstico del paciente. Las mutaciones con ganancia de función de este gen también se han asociado con un aumento de expresión de marcadores de CSC en tumores de pacientes con CCR.

Los microARNs (miARNs) son ARNs endógenos no codificantes que regulan negativamente la expresión genética a nivel post-transcripcional. Se ha sugerido que estas moléculas están involucradas en cáncer, tanto como supresoras de tumores como oncogenes (también llamados oncomir). Existe una relación muy importante entre el gen p53 y los miARNs. Por un lado, estos últimos actúan como efectores finales de la cascada de señalización de p53. P53 regula la transcripción, el procesamiento y maduración de determinados miRNAs. Por otro lado, los miARNs pueden regular negativamente los niveles de proteína p53 a través de una inhibición directa de la expresión del gen, o bien pueden aumentar la actividad de p53 de forma indirecta mediante inhibición de reguladores negativos del mismo.

Los cambios en la expresión de miARNs se han relacionado con el desarrollo y la progresión del CCR. La alteración de su expresión se ha vinculado con el estadio tumoral, diagnóstico y pronóstico. Los miARN son muy importantes para el desarrollo de CM. Debido a esto se ha estudiado su papel regulador en los procesos de autorenovación, proliferación y quimioresistencia de CMCs. Una de las funciones fisiológicas de los miARN es la regulación del crecimiento y diferenciación de CM embrionarias. Recientemente, se ha demostrado la implicación de los miARN en la regulación de las CMC en varios tipos de tumores.

La melatonina se sintetiza a partir de triptófano bajo el control de arilalkilamina-N-acetiltransferasa (AA-NAT) y N-acetilsertonin O-metiltransferasa (ASMT). Algunas de sus funciones son mediadas por receptores de membrana (MT1 y MT2) y receptores nucleares (RZR-RORa). Esta indolamina juega un papel muy importante como molécula oncostática en el cáncer, inhibiendo el crecimiento tumoral y las metástasis a través de distintas vías de señalización. Recientemente, algunos estudios han sugerido que los efectos oncostáticos de la melatonina podrían estar relacionados con su habilidad para regular el fenotipo de las CMCs. Aunque aún no hay datos que relacionen las mutaciones de p53 con la síntesis y señalización de melatonina en el cáncer, la melatonina activa la vía supresora de tumores de p53 en el CCR. Algunas de las funciones oncostáticas de la melatonina están mediadas por miARNs, tanto en el CCR como en otros tipos de tumores.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, los objetivos de nuestro estudio son: (1) 1. Analizar la expresión de marcadores de CMCs y de los genes de síntesis y señalización de melatonina en muestras de tumores procedentes de pacientes de CCR del entorno hospitalario de Andalucía; (2) Estudiar las mutaciones del gen p53 en las mismas muestras mediante secuenciación; (3) Correlacionar los resultados con otros parámetros patológicos tumorales y del paciente; (4) Contrastar nuestros resultados con bases de datos públicas para encontrar conexiones moleculares entre p53, células madre y melatonina en el CCR, principalmente a través de miARNs.

Los resultados obtenidos han sido los siguientes: La frecuencia de mutaciones de p53 en muestras de CCR es mayor en estadios tumorales avanzados (estadio III y IV). La expresión de AA-NAT, MT1 y MT2 disminuye en muestras de tumor versus muestras de tejido normal. Si estratificamos según el estadio de p53, la expresión de AA-NAT, MT1 y MT2 fue menor en paciente con mtp53. La expresión de AA-NAT, MT1 y MT2 fue mayor en muestras de mucosa normal que en muestras de tumor con wtp53. Cuando estratificamos por estadio tumoral y estatus de p53, la expresión de AA-NAT disminuye significativamente en estadios avanzados. En tumores wtp53 hallamos diferencias en los niveles de expresión de AA-NAT y MT2 entre tumores en estadio temprano y avanzado. La expresión de CD44 y CD66c fue significativamente mayor en muestras de tumores wtp53 que en muestras mtp53. La expresión de CD44 era mayor en estadios avanzados comparada con estadio tempranos, sin embargo, la expresión de CD66c fue similar en ambos estadios de la enfermedad; ambos independientemente de p53. La expresión de AA-NAT, MT1, MT2, CD44, y CD66c de acuerdo al estadio tumoral y al estatus de p53 reveló una correlación significativamente negativa entre CD44 y AA-NAT en tumores en estadios avanzados independientemente del estado de p53. Se halló también una correlación negativa entre CD66c y AA-NAT tanto en tumores en estadios tempranos como avanzados, pero solo en tumores wtp53, y entre CD66c y MT2 en estadios avanzados, solo en tumores wtp53. En nuestra cohorte de pacientes, el 32.2% de los tumores mostraron alta

expresión de ambos marcadores CD44 y CD66c, mientras que el 21.9% de los tumores mostraron una expresión baja. Los tumores CD44^{high}CD66c^{high} se correlacionaron con una baja expresión de AA-NAT y MT2, en tumores wtp53 y estadios avanzados de la enfermedad.

En nuestro análisis de bases de datos públicas, hemos encontrado varios miRNAs cuya expresión que se correlaciona al mismo tiempo con marcadores de CMC y algún gen relacionado con la síntesis o señalización de melatonina. Hay que destacar que, al menos en esta base de datos, no hemos encontrado ningún miRNA relacionado con MT2

En conclusión, podemos decir que: (1) En nuestra cohorte de estudio, la presencia de mutaciones en p53 se correlacionan con la progresión de la enfermedad; (2) La presencia de mutaciones del gen p53 conlleva a una disminución de los niveles de expresión de los genes de síntesis y señalización de melatonina en estadios tempranos de la enfermedad; (3) En tumores en los que no aparecen mutaciones del gen p53, la progresión del CCR conduce a una disminución los niveles de expresión de los genes de síntesis y señalización de melatonina; (4) La presencia de mutaciones del gen p53 provoca una disminución de la expresión de los marcadores de CSCs. En el caso de CD44, esta disminución no depende del estadio de la enfermedad, mientras que para CD66c solo aparece en estadios avanzados de CCR; (5) La progresión del CCR da lugar a un aumento de la expresión de CD44, marcador de CSCs, independientemente del estado (mutado o no mutado) del gen p53, (6) Los tumores con elevada expresión de CD44 y CD66c se correlacionan con baja expresión de NAT y MT2, aunque únicamente en tumores que no presentan mutaciones en el gen p53, lo que se podría utilizar como una aproximación terapéutica de la enfermedad; (7) El análisis de bases de datos públicas demuestra vías moleculares de regulación comunes de los marcadores de CSCs y los genes relacionados con la síntesis y señalización de melatonina a través de miRNAs, aunque este punto necesita un análisis in vitro e in vivo en mayor profundidad para poder ser demostrado. Esto, a su vez, abriría un nuevo campo de estudio en relación a la regulación de la subpoblación de CSCs en el CCR.

INTRODUCCIÓN

1. CÁNCER COLORRECTAL

1.1 EPIDEMIOLOGÍA Y GENERALIDADES

Es una de las neoplasias más frecuentes en nuestro medio. Alrededor de 1-2 millones de pacientes son diagnosticados cada año de cáncer colorrectal (CCR) y aproximadamente 600.000 mueren a causa de este (Brenner, Kloor, and Pox 2014). Actualmente es el tercer cáncer más frecuentemente diagnosticado en hombres y el segundo en mujeres.

Se han observado grandes variaciones en la distribución geográfica de la incidencia del CCR. Sus cifras varían notablemente entre los distintos territorios, siendo las zonas más desarrolladas las que registran mayores incidencias, como Europa, América del Norte y Oceanía. Por el contrario, las tasas de incidencia más bajas se registraron en Asia, África y América del Sur (Jemal, Smith, and Ward 2009).

Sin embargo, se ha notificado un aumento de la incidencia de CCR en países que previamente presentaban riesgo bajo, hecho que se ha atribuido a un aumento en los factores de riesgo, incluidos cambios en la dieta, obesidad y tabaco (Torre et al. 2015). Por otro lado en EE.UU. y otros países desarrollados, tanto la incidencia como la mortalidad por CCR se ha estabilizado o bien ha comenzado a disminuir, hecho que probablemente esté en relación con la reducción de la prevalencia de factores de riesgo, el uso de programas de cribado de CCR y la mejora en los tratamientos (Brenner, Kloor, and Pox 2014; Jemal, Smith, and Ward 2009).

El pronóstico de los pacientes con CCR ha ido mejorando en las últimas décadas en muchos países, con una supervivencia relativa a los 5 años del 65% en países desarrollados y del 50% en países en vía de desarrollo. Hay factores que modifican la supervivencia de estos pacientes, como la edad al diagnóstico, siendo el estadio tumoral uno de los factores pronósticos más importantes (Brenner, Kloor, and Pox 2014).

El desarrollo del CCR es lento, con un período de entre 10 a 20 años. Los adenomas representan la morfología precursora de la mayoría de los CCR. Aunque los adenomas tienen la capacidad de malignizar, gran parte de ellos pueden estabilizarse o incluso regresar. La regresión de los adenomas está bien establecida histológicamente, siendo

este un proceso dinámico, con fases cíclicas de crecimiento y regresión. En la historia natural de los adenomas ciertos factores patológicos son predictivos en términos de potencial maligno e intervalo de tiempo para malignizar (Risio 2012).

Por todo ello, podemos decir que el CCR supone un gran problema de salud a día de hoy, siendo necesario continuar estudiando el comportamiento de esta patología, tanto a nivel clínico como a nivel molecular, con el fin de conseguir un mejor manejo de la patología, que permita tanto un diagnóstico preciso y precoz como terapias que permitan altas tasas de supervivencia libre de enfermedad.

1.2 ETIOPATOGENIA Y FACTORES DE RIESGO

La etiología del CCR es compleja y tiene un origen multifactorial. Su alta incidencia es debida tanto a factores modificables o ambientales, tales como la inactividad física, obesidad, el alto consumo de carnes procesadas, etc. (Tabla 1), así como a factores no modificables o genéticos en los que se incluye la historia familiar de CCR o personal de enfermedad inflamatoria intestinal (EII) (Society, American Cancer 2014).

La incidencia es baja en personas menores de 50 años, aumentando considerablemente con la edad. El 90% de los casos se diagnostican después de los 50 años, siendo la edad media al diagnóstico de 70 años (Torre et al. 2015). Las tasas son mayores en hombres que en mujeres en la mayor parte del mundo. El sexo es otro factor de riesgo, siendo más frecuente en hombre que en mujer, pudiendo explicarse este hecho por complejas interacciones hormonales (Murphy et al. 2011).

1.2.1 FACTORES GENÉTICOS.

El 90% de los CCR son esporádicos, aunque se encuentra un aumento de la incidencia en familiares de pacientes diagnosticados, lo que nos lleva a pensar en alteraciones genéticas subyacentes.

En 1990, Vogelstein y Fearon proponen un modelo de carcinogénesis en la que se correlacionan distintos eventos genéticos que conllevan a un cambio en la morfología de los tejidos. Así distintas mutaciones en un adenoma conllevan finalmente a la aparición del CCR (Fearon and Vogelstein 1990).

En los últimos años se han descrito tres vías diferentes a partir de las cuales puede surgir el CCR:

- Inestabilidad de los cromosomas (CIN)

Los factores más importantes en estos tumores con inestabilidad de los cromosomas son la aneuploidía y la pérdida de heterocigosis. En este grupo incluimos no sólo al 85% de los CCR esporádicos sino que también están implicados los casos de poliposis adenomatosa familiar asociados a la mutación del gen APC (Tariq et al. 2016).

- Fenotipo de metilación de islotes CpG

Esta vía se caracteriza por la hipermetilación del genoma, que resulta en el bloqueo de genes supresores de tumores, de forma más importante al MGMT y MLH 1. Esta hipermetilación se asocia frecuentemente con la mutación del gen BRAF y a la inestabilidad de los microsatélites (Mojarad et al. 2013).

- Inestabilidad de los microsatélites

Esta vía supone la inactivación de alteraciones genéticas en secuencias repetidas cortas. Esto ocurre en el CCR y en los genes del sistema mismatch repair (MMR), y es un sello distintivo en los casos familiares de síndrome de Lynch, aunque también aparece en el 15% de los CCR esporádicos (Tariq et al. 2016).

1.2.2 FACTORES AMBIENTALES

- Dieta

La dieta juega un papel muy importante en el desarrollo del CCR. Las células del colon se adaptan rápidamente a los cambios en la dieta y en este proceso acumulan gran cantidad de cambios genéticos y epigenéticos que conllevan a una inestabilidad del genoma, requisito fundamental para la formación del CRC.

El consumo de carne ha demostrado un aumento del riesgo del CCR. Tanto la carne roja como la carne procesada suponen un aumento del riesgo del 10% con cada 30 g consumidos al día.

Los compuestos sin digerir de la dieta proteica y otros compuestos nitrogenados experimentan una degradación bacteriana o fermentación produciendo amonio, fenoles y ácido sulfhídrico. Estos nitritos y nitratos los encontramos en nuestra dieta habitual, sobre todo en las carnes procesadas. Estos compuestos químicos en el colon han demostrado causar inflamación y daño de la mucosa. El amonio libre es considerado una de las sustancias más tóxicas. La presencia de nitrógeno facilita la formación de compuestos N-nitrosos (NOC). Estos últimos forman

puentes químicos con el ADN, los cuales causan mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores (Raskov et al. 2014).

La ingesta de fibra en la dieta de niños y adultos a través de varios alimentos (productos integrales, frutas y verduras..) juega un papel muy importante en la reducción del riesgo y en la disminución de la incidencia de gran cantidad de enfermedades (Maćkowiak, Torlińska-Walkowiak, and Torlińska 2016). Una revisión sistemática y un meta-análisis de estudio observacionales prospectivos mostró que la ingesta 10 g de fibra diaria de cereales y alimentos integrales estaba asociada con una disminución del 10% del riesgo de CCR (Aune et al. 2011).

- Tabaco y alcohol

El consumo de tabaco no solo aumenta el riesgo de cáncer de pulmón, sino también de otros órganos como riñón, vejiga, cérvix, tracto urinario bajo, páncreas y colorrectal, pudiendo aumentar el riesgo de padecer adenomas colorrectales al doble. Los componentes químicos carcinogénicos del humo del tabaco, tales como acetaldehído, benzopirenos, aminas aromáticas y N-nitrosaminas forman puentes de unión a las moléculas de ADN interrumpiendo la función normal de los genes y su replicación (Raskov et al. 2014).

Del mismo modo que el tabaco, aproximadamente el 10% de todos los cáncer en hombres y el 3% en mujeres se atribuyen al consumo de alcohol (Raskov et al. 2014). Así mismo, estudios epidemiológicos han hallado que el alcohol también es responsable de un aumento considerable del riesgo de CCR, donde 10 g al día aumenta el riesgo un 10% y 100 g semanales supone un aumento del riesgo del 18% (Moskal et al. 2007).

- Enfermedad inflamatoria intestinal

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) se asocia con un aumento del riesgo de CCR. Este riesgo aumenta con la duración más prolongada de la enfermedad, la historia familiar de CCR y la historia de colangitis esclerosante. Los pacientes con EII presentan de 2 a 5 veces más riesgo de padecer este tipo de neoplasia que la población general a su misma edad. Además el desarrollo del cáncer se suele producir a edades más tempranas comparadas con los CCR esporádicos (40-50 años vs 60 años) y tienen tasas mayores de tumores sincrónicos y metacrónicos (Althumairi, Lazarev, and Gearhart 2016).

- Factores preventivos

Existen factores preventivos bien establecidos, como son la actividad física, el uso de terapia hormonal sustitutiva en mujeres postmenopáusicas, el uso de aspirina y la resección de lesiones precancerosas por vía endoscópica (Brenner, Kloor, and Pox 2014).

La evidencia de los efectos anticancerosos de la aspirina ha surgido de estudios in vitro y modelos animales, estudios epidemiológicos y datos aleatorizados, con la mayor evidencia en el cáncer colorrectal. Investigaciones recientes sugieren que la aspirina es efectiva como prevención primaria, reduciendo los riesgos de adenomas y de CCR. Existe también evidencia de su papel en el tratamiento del cáncer, particularmente a nivel de tratamiento adyuvante, previniendo las recurrencias y disminuyendo la probabilidad de aparición de metástasis tras un tratamiento potencialmente curativo (Coyle, Cafferty, and Langley 2016).

1.3 CLÍNICA DEL CCR

Suele ser asintomático en estadios iniciales, pudiendo debutar de formas diferentes (1) Pacientes asintomáticos con diagnóstico en estadios temprano, en parte debido a los programas de cribado; (2) Aparición de signos y síntomas de alarma como hematoquecia o melena, dolor abdominal o anemia de larga evolución; que aparecen debido al crecimiento del tumor tanto hacia la luz como a estructuras adyacentes; habitualmente la presencia de sintomatología refleja tumores en estadios más avanzados (Adelstein et al. 2011); (3) Aparición de cuadros obstructivos, peritonitis o de forma más rara hemorragias agudas que requieren tratamiento urgente, habitualmente quirúrgico.

En función de la localización anatómica, los síntomas pueden variar y además servirnos de orientación inicial. La detección de anemia ferropénica no conocida está asociada con neoplasias de colon derecho. Los cambios de hábito intestinal son más frecuentes en CCR derecho e izquierdo, siendo rara la patología obstructiva.

Tabla 1. Factores de riesgo de CCR

	Riesgo Relativo*
<u>Factores que aumentan el riesgo:</u>	
Herencia e historia clínica	
Historia familiar	
Familiar de primer grado	2.2
Más de un familiar	4.0
Familiar con diagnóstico antes de los 45	3.9
Enfermedad inflamatoria intestinal	
Enfermedad de Crohn (colon)	2.6
Colitis ulcerosa	
Colon	2.8
Recto	1.2
Diabetes	1.2
Hábitos personales	
Consumo de alcohol	1.6
Obesidad	1.2
Consumo de carne roja	1.2
Consumo de carnes procesadas	1.2
Tabaco	1.2
<u>Factores que disminuyen el riesgo</u>	
Actividad física (colon)	0.7
Consumo diario	0.8
Consumo de fruta	0.9
Consumo de verduras	0.9
Fibra total en la dieta (10g/día)	0.9
*El riesgo relativo compara el riesgo entre personas con una exposición concreta con personas sin esa exposición. El riesgo relativo para los factores dietéticos compara el mayor consumo con el menor consumo. Si el riesgo relativo es mayor de 1.0, el riesgo es mayor en expuestos.	

*Extraído de Colorectal Cancer Facts and Figures 2014-2016. American Cancer Society.

El dolor abdominal puede aparecer en CCR de cualquier localización. La aparición de rectorragia o hematoquecia es más frecuentemente causa de tumores izquierdos o rectales. Por otro lado, las neoplasias de recto causan tenesmo, dolor anal o cambio en

la forma de las heces, y de forma más frecuente, síntomas obstructivos (Saidi, Karuri, and Nyaim 2008).

Aproximadamente el 25% de los pacientes con CCR presentan metástasis en el momento del diagnóstico. La presencia de dolor en cuadrante superior derecho, distensión abdominal, saciedad precoz, adenopatías supraclaviculares son habitualmente signos de enfermedad metastásica (Van Cutsem et al. 2014).

1.4. DIAGNÓSTICO

El proceso diagnóstico del CCR es un desafío ya que habitualmente la forma de presentación es a partir de síntomas muy inespecíficos, tales como anemia ferropénica o dolor abdominal, síntomas muy comunes y relaciones con gran variedad de patología no tumorales.

El estadio de tumor en el momento de su diagnóstico se considera el factor predictivo más importante, precisando una serie de estrategias que permitan el diagnóstico temprano de esta patología. Actualmente existen dos estrategias ampliamente extendidas para mejorar el pronóstico del CCR, son los programas de screening poblaciones y estrategias de diagnóstico temprano en pacientes sintomáticos (Vega, Valentín, and Cubiella 2015).

Ante la sospecha clínica es fundamental realizar una anamnesis y exploración física completas, recogiendo los datos de la historia clínica como los antecedentes familiares de cáncer, así como la presencia de síntomas guía, como rectorragia, cambios de ritmo intestinal, tenesmo rectal, dolor, sensación de masa abdominal o pélvica y existencia de cuadro constitucional.

El diagnóstico final del CCR se realiza mediante estudio histológico de biopsias obtenidas del tumor. La colonoscopia es la prueba de elección con una sensibilidad del 90-95% y un índice de complicaciones en torno al 2% en las terapéuticas, permite visualizar, localizar, caracterizar la lesión mediante la toma de muestra, así como la detección de tumores sincrónicos, definidos como dos o más primarios distintos, diagnosticados dentro de los seis primeros meses del diagnóstico del CCR y que no está relacionado con la extensión de este o con metástasis, presentes un 2-4% de los pacientes (Brenner, Kloor, and Pox 2014).

El enema de bario es otra opción ampliamente disponible y que puede utilizarse para el despistaje de CCR en pacientes con síntomas. Aun así, tanto el diagnóstico tanto del enema de bario con doble contraste solo, o combinado con recto-sigmoidoscopia flexible son menos útiles que la colonoscopia completa o la colonoscopia virtual para la evaluación de los síntomas del tracto digestivo inferior (Halligan et al. 2013).

En cuando a la colonoscopia virtual, la sociedad europea de endoscopia gastrointestinal (ESGE) recomienda la colonoscopia virtual como estudio radiológico para el diagnóstico de CCR. Se recomienda en casos de cáncer obstructivos, previo a la cirugía, permitiendo así una mejor localización y/o estadiaje. En casos en los que la colonoscopia está contraindicada o no es posible realizarla o es incompleta, la ESGE recomienda la colonoscopia virtual como una alternativa aceptable e igualmente sensible para paciente con síntomas que sugieran cáncer colorrectal. No se recomienda esta prueba como test de screening o en pacientes con historia familiar de primer grado de CCR (Spada et al. 2014).

Tanto para el cáncer de colon como el cáncer de recto, las metástasis a distancia deberían ser estudiadas. La localización más frecuente de éstas son las hepáticas. Por tanto, realización de distintas pruebas de imagen complementarias nos permitirán la caracterización de la lesión primaria y por tanto ayudarán a su estadificación, así como a identificar la presencia de diseminación a distancia.

La TAC abdominal es útil para la valoración de la extensión regional del tumor, metástasis linfáticas regionales y a distancia, invasión de estructuras vasculares, y complicaciones secundarias al crecimiento tumoral (obstrucción, perforación, fístulas). La sensibilidad para la detección de metástasis viscerales está en torno al 75-87% por lo que estaría indicada para la evaluación de la existencia de metástasis a distancia.

La RM de alta resolución es el “gold standard” para valorar la afectación transmural, determinar los márgenes de resección e identificar los ganglios mesorrectales afectados, independientemente de la distancia al margen anal del tumor. Además, es la única técnica que consigue detectar afectación vascular extramural, que está asociada a una alta tasa de recurrencia y mortalidad.

La ultrasonografía endoscópica es de las técnicas más precisas para determinación del tamaño y extensión del tumor primario (T) en los cánceres de recto, y por tanto es

el método de elección por su gran precisión para diferenciar entre tumores invasivos y no invasivos (Brenner, Kloor, and Pox 2014).

1.4.1 Estadificación.

La estadificación locorregional y la presencia o no de enfermedad a distancia, son de gran importancia para el manejo de cada paciente. Actualmente el sistema TNM está ampliamente aceptado mundialmente. Clasifica la extensión tumoral en base a la tamaño y extensión del tumor (T), la invasión linfática locorregional (N), y la presencia de metástasis (M) (Obrocea et al. 2011).

Actualmente la International Union for Cancer Control (UICC) junto con la American Joint Committee for Cancer (AJCC) son las encargadas de revisar, actualizar y publicar periódicamente los cambios en estas clasificaciones (AJCC 2009).

- Tumor primario (T)

- TX: No se puede determinar el tumor primario.
- T0: No existe evidencia de tumor primario.
- Tis: Carcinoma in situ: intraepitelial o invasión de la lámina propia.
- T1: Tumor que invade la submucosa.
- T2: Tumor que invade la muscularis propia.
- T3: Tumor que invade los tejidos peri-colorrectales a través de la lámina propia.
- T4a: Tumor penetra en la superficie del peritoneo visceral.
- T4b: Tumor invade directamente o está adheridos a otros órganos o estructuras.

- Afectación ganglionar (N)

- NX: No se pueden evaluar ganglios linfáticos regionales.
- N0: No existe diseminación hacia otros ganglios linfáticos.
- N1: Metástasis en 1–3 ganglios linfáticos regionales.
 - N1a: Metástasis in 1 ganglio linfático.
 - N1b: Metástasis in 2–3 ganglios linfáticos.
 - N1c: El tumor ha invadido la subserosa, el mesenterio o los tejidos pericólicos o perirrectales retroperitoneales sin evidencia de metástasis en ganglios regionales.
- N2: Metástasis en 4 o más ganglios linfáticos regionales.

N2a: Metástasis en 4–6 ganglios linfáticos regionales.

N2b: Metástasis en 7 o más ganglios linfáticos regionales.

- Metástasis a distancia (M)

- M0: No metástasis a distancia.

- M1: Metástasis a distancia:

M1a: Metástasis confinada a un órgano.

M1b Metástasis en más de un órgano o en peritoneo.

- Grupos pronóstico

	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1-2	N1/N1c	M0
	T1	N2a	M0
IIIB	T3-T4a	N1/N1c	M0
	T2-T3	N2a	M0
	T1-T2	N2b	M0
IIIC	T4a	N2a	M0
	T3-T4a	N2b	M0
	T4b	N1-N2	M0
IVA	Cualquier T	Cualquier N	M1 a
IVB	Cualquier T	Cualquier N	M1 b

1.5 SCREENING DEL CCR

El mejor método para prevenir el CCR es la colonoscopia. Aunque se considera una prueba invasiva, tiene una alta sensibilidad y especificidad y ofrecer el potencial de extirpar lesiones precursoras. La población de alto riesgo, aquellos con colitis ulcerosa de larga evolución y aquellos con adenomas en estudios previos o historia de CCR, se les recomienda una vigilancia periódica con colonoscopia. Para el screening del

CCR, el cual se realiza en población a partir de cierta edad, existen otros métodos disponibles, sin embargo, pocas alcanzan la sensibilidad y especificidad para detectar CCR y sus lesiones precursoras. Existen tests cuya función es detectar marcadores potenciales que puedan indicar CCR, como por ejemplo sangre o marcadores moleculares en heces. Aquellos con un resultado positivo, deberían realizarse una colonoscopia según los programas de cribado de cada región. Entre las alternativas no invasivas para el screening del CCR, existen análisis de sangre. Aunque en algunos sitios están disponibles, su uso sistemático dentro de los programas de screening requiere mejorar la sensibilidad para la detección de cáncer y adenomas avanzados (Dekker et al. 2019)

1.6 TRATAMIENTO DEL CCR

El tratamiento del CCR incluye manejo endoscópico y resección quirúrgica del segmento afectado, terapias neoadyuvantes y adyuvantes con radioterapia y quimioterapia (RT y QT), o extensas intervenciones quirúrgicas para tumores con invasión locorregional o metástasis. En el caso de enfermedad metastásica, las opciones varían desde terapias ablativas locales hasta tratamiento quimioterápico paliativo y/o inmunoterapia.

Aunque las nuevas opciones de tratamiento han conseguido duplicar la supervivencia global para enfermedad avanzada a 3 años, la supervivencia sigue siendo mejor para aquellos con enfermedad no metastásica (Dekker et al. 2019)

2. P53

2.1 GENERALIDADES

En las últimas décadas, estudios moleculares y genéticos han revelado mutaciones subyacentes en la patogénesis del CCR. Oncogenes y genes supresores de tumores (de forma frecuente APC, gen KRAS y gen p53) se encuentran mutados en una gran cantidad de cánceres colorrectales. Esto hecho, además de metilación del ADN y cambios encontrados en estructura de la cromatina, afectan los sistemas de señalización, incluyendo la regulación del metabolismo celular, proliferación, diferenciación y supervivencia. Es preciso seguir adelante con investigaciones sobre este tema para comprender la naturaleza y el significado de los defectos genéticos y epigenéticos en relación al CCR (Church 2016).

El gen supresor de tumores p53, localizado en el cromosoma 17p13.1 es conocido como el 'guardián del genoma'. Contiene 11 exones y transcribe un ARNm de 2.8 kb. Su forma activa, una fosfoproteína de 393 aminoácidos, regula el crecimiento celular y juega un papel fundamental en respuesta a diversas señales de estrés o daño celular, en la inducción de ciertos genes que son importantes en la detención del ciclo celular y la apoptosis que sigue al daño en el ADN (Figura 1); de esta forma frena la proliferación de células tumorales. Por tanto, una función normal de p53 es esencial para protegernos del desarrollo de tumores (Naccarati et al. 2012).

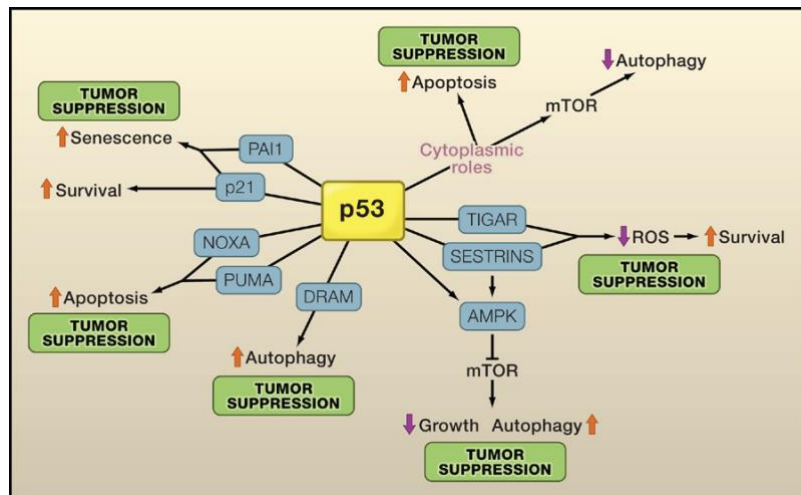


Figura 1. Funciones de p53 (Vousden and Prives 2009).

P53 es conocido por su papel como supresor de tumores y se encuentra mutado en la mayoría de las neoplasias en humanos. Las mutaciones más comunes son sustituciones de una sola base que alteran la función de la proteína. Existen mutaciones que aportan a p53 una ganancia de función. Mutaciones en la línea germinal ocurre en familias con síndrome de Li-Fraumeni, aumentado el riesgo de cáncer a edad temprana. Las mutaciones somáticas en residuos aminoácidos específicos se ha asociado a fenotipos clínicos específicos en diferentes tipos de cáncer (Brady and Attardi 2010; Naccarati et al. 2012).

La activación de p53 en respuesta a señales de estrés induce la reparación del ADN y regula el ciclo celular para prevenir mutaciones oncogénicas. Las alteraciones de la señalización de p53 en el CCR dan lugar a una pérdida de la muerte celular por apoptosis y de los puntos de control celular, además de alterar la integridad genética celular conduciendo finalmente a malignidad. La acumulación de mutaciones en los genes relacionados con el cáncer, como K-RAS, p53 y APC, estimulan la transición desde epitelio normal a tejido adenomatoso y finalmente CCR (Ashokkumar et al. 2018).

Un estudio llevado a cabo por Kezelmann y Attardi en 2010 confirmó el papel fundamental de p53 en la supresión de tumores utilizando ratones p53-null, en los que la incidencia de cáncer fue del 100% (Brož and Attardi 2010) (Figura 2).

p53 tiene la habilidad de responder a señales oncogénicas fomentando la apoptosis, para proteger contra la aparición de neoplasias. Ante señales de estrés, p53

dirige de manera irreversible a la apoptosis o senescencia, sacrificando aquellas muy dañadas o malignas. En condiciones de bajo nivel de estrés, p53 tiende a preservar la vida de la célula, bien deteniendo temporalmente el ciclo celular, reparando el daño del ADN o produciendo proteínas antioxidantes para mantener la integridad del genoma y la viabilidad en células. Todas estas respuestas, dependen de la habilidad de p53 como activador transcripcional de una gran variedad de genes, aunque las actividades independientes de la transactivación atribuidas a p53 pueden también contribuir a respuestas mediadas por p53 (Brady and Attardi 2010).

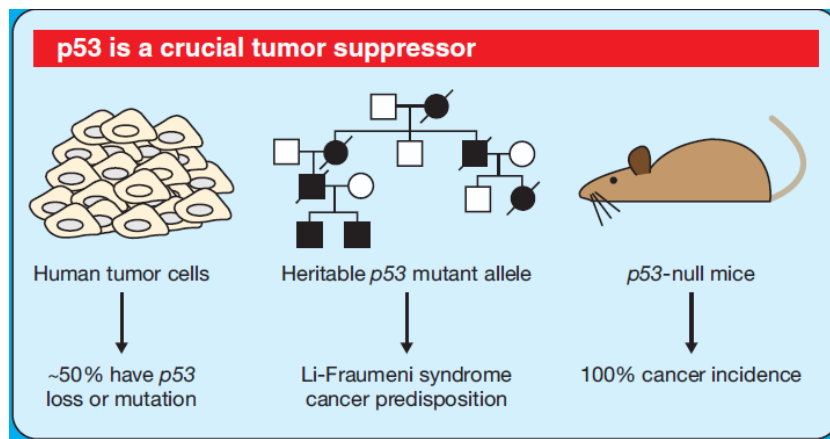


Figura 2. De izquierda a derecha. Un 50% de los cánceres en humanos presentan pérdida o mutación de p53. La herencia de un alelo mutado de p53 predispone al síndrome de Li-Fraumeni. En los ratones carentes de p53 se demostró una incidencia del 100% de cáncer (Brady and Attardi 2010).

2.2 ESTRUCTURA DE P53

La proteína activa de p53 existe en la célula como un tetrámero constituido por cuatro subunidades idénticas (monómeros). Cada monómero está formado por múltiples dominios bien definidos incluyendo el dominio de transactivación N-terminal (TAD), seguida de una región rica en prolina (PRD) y el dominio altamente preservado de unión del ADN (DBD). Dentro del dominio C-terminal están localizados el dominio de tetramerización seguido de un dominio básico desestructurado (CTD). (Laptenko and Prives 2006).

El dominio N-terminal comprende a su vez dos dominios que activan la transcripción (TAD 1 y TAD 2), que contienen los residuos aminoácidos 1-40 y 40-60 respectivamente. Estos dominios pueden aumentar la transcripción de los genes diana

de p53 de manera independiente reclutando enzimas modificadoras de histonas o complejos coactivadores como STAGA y Mediator. Entre los residuos de aminoácidos 60-95 se encuentra el dominio rico en prolina (PRD), el cual se pensó, originalmente que participaba en interacciones proteína-proteína. Sin embargo, parece que el papel principal de este dominio es estructural porque ratones knock-in que portaban mutaciones puntuales Prolina-Alanina en los lugares de interacción proteína-proteína de este dominio resultaban normales, mientras que la delección completa del dominio conllevaba a una pérdida de la función supresora de tumores de p53. El PRD es también necesario para la función de apoptosis y de supresión de crecimiento que lleva a cabo p53 (Vieler and Sanyal 2018). El dominio de unión al ADN, que comprende el tramo de aminoácidos 100-300, es el responsable de la unión de secuencias específicas de proteínas a los elementos respuesta a p53 en el ADN de sus genes diana. (Figura 3) (Brady and Attardi 2010).

Una capa más de complejidad se le añade a p53 por las numerosas modificaciones post-traslacionales que esta proteína puede sufrir, siendo las más importantes la fosforilación, la acetilación y la ubiquitinación (Laptenko and Prives 2006).

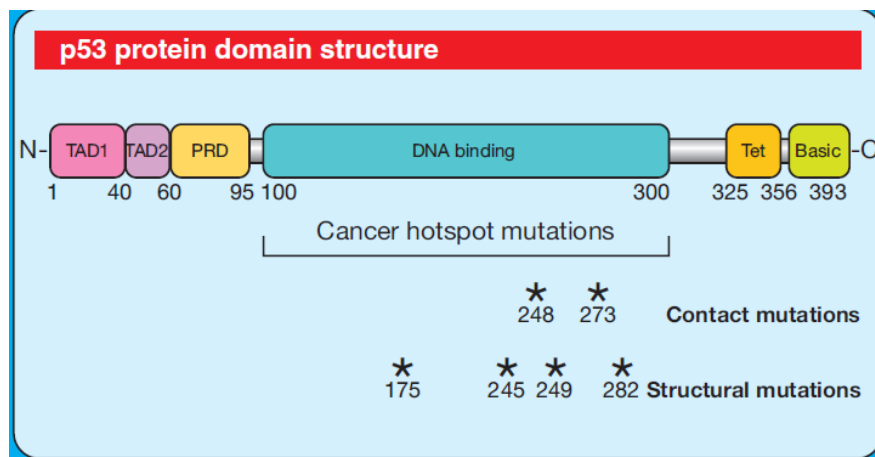


Figura 3. Estructura del monómero de p53 (Brady and Attardi 2010).

Existen muchas formas por las cuales p53 se puede inactivar. Las mutaciones en el dominio de unión del ADN son la mayor causa de su inactivación y pérdida de función. Esto conlleva a la síntesis de una proteína incapaz de unirse al ADN dando lugar a la pérdida de las funciones supresoras de tumores. Estas mutaciones están

ampliamente estudiadas y pueden relacionarse directamente con enfermedades. Aparte de las mutaciones puntuales que pueden aparecer, también se han encontrado formas truncadas de la proteína, comúnmente llamadas isoformas de p53, que también pueden ser responsables de su inactivación o incluso pueden tener funciones contrarias (Vieler and Sanyal 2018).

El gen p53 presenta mutaciones homocigotas en el 50-60% de los cánceres. Alrededor el 90% las mutaciones se tratan de *mutaciones missense* que abarcan alrededor de 190 diferentes codones localizados en el dominio de unión al ADN del gen y la proteína. Estas mutaciones producen una proteína con una capacidad reducida de unirse a una secuencia específica que regula la vía de transcripción de p53. El 10% restante da lugar a mutaciones con pérdida de función y no producen proteína (a través de varios mecanismos: mutaciones *nonsense*, mutaciones *frameshit* o deleciones) (Baugh et al. 2018).

Del mismo modo, se conoce la capacidad de la proteína p53 mutada de adquirir nuevas funciones oncogénicas y se ha asociado al aumento de la agresividad y metástasis tumorales (Brady and Attardi 2010). Otras muchas funciones oncogénicas se han caracterizado en modelos de cultivo, incluyendo la habilidad para promover invasión, migración y angiogénesis, expansión de células madre, supervivencia, proliferación y remodelación de tejido. También se han señalado otras funciones como un incremento de la quimiorresistencia, defectos mitogénicos e inestabilidad genómica. Este amplio rango de diferentes respuestas se refleja por la creciente evidencia de que p53 puede ganar función a través de múltiples vías (Muller and Vousden 2013).

2.3 FUNCIONES DE P53

El cáncer está asociado a numerosas alteraciones en oncogenes y genes supresores de tumores que ocurren en diferentes etapas, desde la carcinogénesis hasta el crecimiento tumoral, su progresión y posterior metástasis. Los proto-oncogenes normalmente controlan la división celular y el crecimiento. Las alteraciones moleculares, incluyendo mutaciones con ganancia de función, amplificación y sobreexpresión pueden desencadenar la activación de oncogenes conduciendo a una división descontrolada y causando finalmente la aparición de cáncer. Por otra parte,

los genes supresores de tumores habitualmente enlentecen la división y el crecimiento celular. Cuando ocurren mutaciones con pérdida de función o delección, estos genes supresores se inactivan. En consecuencia, la división y el crecimiento celular pierde el control resultando en cáncer. Por eso, el balance entre oncogenes y genes supresores de tumores suponen un punto de control crítico en el inicio y progresión del cáncer (Qin et al. 2018).

Desde su descubrimiento en 1979 se han publicado miles de artículos acerca de p53 (Lane and Crawford 1979). El gen p53 actúa como un factor de transcripción que protege a la célula de diferentes señales de estrés a través de la activación de mecanismos celulares como la detención del ciclo celular, apoptosis y senescencia, reparación del ADN, inhibición de angiogénesis y metástasis, actuando por tanto como un gen crucial en la supresión de tumores (Binayke et al. 2018). Además se le atribuye la habilidad de proteger a la célula contra un amplio rango de estímulos de estrés como son el estrés oxidativo, la privación de nutrientes, la hipoxia, el daño al ADN, el desgaste telomérico o la disfunción ribosomal, a través de mecanismos tanto dependientes como independientes de la transcripción (Nguyen et al. 2017).

Aunque p53 tiene funciones celulares indispensables, una activación descontrolada puede tener efectos deletéreos en tejidos normales o que se encuentren en desarrollo. Por lo tanto, en condiciones fisiológicas, p53 presenta una vida media relativamente corta y su expresión se mantiene a niveles bajos (Nguyen et al. 2017).

El principal regulador del gen p53 es la oncoproteína y ubiquitin-ligasas E3, principalmente MDM2, pero también otras como PIRH2, COP1 y ARF-BP1. MDM2 regulan negativamente los niveles de proteína p53, manteniendo los niveles bajos cuando no se requiere de su actividad, además también regula su actividad y estabilidad. El dominio N-terminal de MDM2 se une directamente al TAD del p53 y no solo regula la estabilidad de p53, sino que también inhibe su función de transactivación bloqueando la incorporación de componentes transcripcionales esenciales. Los niveles MDM2 aparecen aumentados en el 30-40% de los sarcomas y se sobreexpresa en células leucémicas. La oncoproteína MDM2 forma un complejo con p53 e inhibe la transregulación genética mediada por este último (S. N. Jones et al. 1995)

MDMX, también conocido como MDM4, es estructuralmente homólogo a MDM2 y puede, o bien unirse e inhibir p53 directamente o través de MDM2, estabilizándola y potenciando su capacidad de ubiquitinación (Brady and Attardi 2010). En respuesta a señales de estrés, p53 se moviliza por la inhibición de MDM2, a través de alguno de los muchos mecanismos que existen: modificaciones post-translacionales tanto en MDM2 como en p53 inducido por estrés, lo que rompe la interacción entre MDM2-p53 (Brady and Attardi 2010). Por ejemplo, el daño en el ADN desencadena la activación de quinasas como Chk1/Chk2) y ATM/ATR, las cuales fosforilan ciertos puntos en el extremo N-terminal de p53 disminuyendo su afinidad a MDM2/MDMX. Alternativamente, la activación de ciertas señales mitogénicas, como c-MYC y k-RAS, resultan en la acumulación de p14ARF (proteína supresora de tumores) en el nucleolo, la cual tiene la capacidad de unirse a MDM2 y liberar la a p53 de su unión inhibitoria a MDM2. Además, bajo condiciones de estrés nucleolar o ribosomal, la biogénesis ribosomal se restringe, fomentando la acumulación de formas libres de proteínas ribosomales. Algunas de estas proteínas, como RPL5 y RPL 11 tienen alta afinidad de unión por MDM2, de una forma similar a p14ARF, protegiendo a p53 de su degradación mediada por MDM2 (Nguyen et al. 2017).

p53 por sí mismo también controla la función de MDM2 activando la transcripción del gen MDM2, proporcionando un feedback negativo para atenuar la señalización de p53 en el momento oportuno. Preservar la integridad de este feedback regulador es esencial tanto para el crecimiento fisiológico como para el mantenimiento de la homeostasis (Brady and Attardi 2010; Nguyen et al. 2017)

Ya sabemos que, durante el desarrollo de un tumor, TP53 está mutado en un alto porcentaje de ellos, y esta mutación puede inactivar la proteína y de este modo conllevar a una pérdida de la función supresora de tumores. Sin embargo, hay un número considerable de tumores donde p53 no está mutado, no obstante, su función se ve comprometida por otra serie de mecanismos. Un ejemplo de estos mecanismos inhibitorios es la sobreexpresión de E3 ubiquitin ligasa MDM2, la cual debido a su unión a p53 causa la inhibición de su actividad transcripcional y promueve su degradación (Binayke et al. 2018)

2.4 P53 y CCR

Como ya hemos señalado, el CCR supone un problema de salud importante en países desarrollados, siendo la tercera causa de muerte (Ashokkumar et al. 2018). Fearon y Vogelstein propusieron un modelo de carcinogénesis en el CCR que correlacionaba diferentes eventos genéticos con la evolución de la morfología de los tejidos (Fearon and Vogelstein 1990), observando de forma características mutaciones en los genes TP53, APC, DCC y KRAS. La mutaciones se acumulan en la célula, dando lugar a la transformación maligna y acompañadas de cambios fenotípicos en la mucosa (Stoian, Stoica, and Radulian 2016). La mutación en el TP53 o su pérdida de función juega un papel fundamental en la secuencia adenoma-carcinoma y se ha observado un aumento en la frecuencia de mutaciones a medida que progresa la lesión (Xiao Lan Li et al. 2015; Worthley et al. 2007).

Las mutaciones de p53 en el CCR aparecen en un 34% de tumores proximales y en un 45% de tumores distales. La mayoría aparecen entre los exones 5 al 8 (dominio de unión al ADN), y principalmente en ciertos codones (175, 245, 248, 273 y 282), comprendiendo transiciones GC a AT y llevando a la sustitución de un aminoácido en la proteína p53 (Tabla 2). Es frecuente encontrar estas sustituciones en el dominio de unión al ADN causando la disrupción de la unión específica al ADN (Xiao Lan Li et al. 2015; Russo et al. 2005).

Las mutaciones de p53 tienen un rol fundamental en el comportamiento biológico del CCR, como la invasión en profundidad, el lugar de metástasis e incluso el pronóstico del paciente. Las mutaciones de p53 están asociadas con invasión linfática en el CCR proximal y muestran una correlación significativa tanto para la invasión linfática como vascular en el CCR distal. Los pacientes con CCR y mtp53 presentan más resistencia a terapias y peor pronóstico que aquellos con wtp53 (Barry Iacopetta 2003; Russo et al. 2005).

Tabla 2. Alteraciones de p53 más comunes y frecuentes en el CCR.

Extraída de Li 2015)

Exon	Codon	Codon change	Nucleotide change	Amino acid change
5	175	CGC→CAC	G→A	Arg→His
7	245	GGC→AGC	G→A	Gly→Ser
7	245	GGC→GAC	G→A	Gly→Asp
7	248	CGG→TGG	C→T	Arg→Trp
7	248	CGG→CAG	G→A	Arg→Gln
8	273	CGT→TGT	C→T	Arg→Cys
8	273	CGT→CAT	G→A	Arg→His
8	282	CGG→TGG	C→T	Arg→Trp

Las mutaciones en el codón 175 son más frecuentes en tumores localizados de colon y las mutaciones en el codón 288 (exón 8) son más comunes en los cánceres rectales. Las mutaciones en las regiones más conservadas de p53 son más frecuentes en los neoplasias distales que en proximales, sugiriendo que puede estar relacionado con las diferencias en la etiología (Naccarati et al. 2012). Las mutaciones en los adenomas colorrectales son raros (16%), en comparación con la frecuencia de alteraciones genéticas en el carcinoma (40-50%) (B. Iacopetta et al. 2006), siendo las mutaciones en los codones 175 y 273 las más frecuentemente encontradas en adenocarcinomas.

En el CCR, la alteración de la función normal de gen p53 representa un gran paso en la carcinogénesis, aunque las mutaciones se han identificado como eventos tardíos en este proceso. Debido al papel fundamental del p53, es esperable que sus variantes jueguen un papel en la susceptibilidad del CCR esporádico. A pesar de esto, no se dispone aún de resultados consistentes sobre la labor de las mutaciones en p53 y sus polimorfismos (Naccarati et al. 2012).

2.5 P53 y microARNs (miARNs).

Los miRNAs son una clase de nucleótidos pequeños endógenos de ARN (de unos 22 nucleótidos de longitud) no codificantes que tienen un papel esencial en la regulación post-transcripcional de la expresión de genes a través de la unión a la región 3'-UTR de ARN mensajeros (ARNm) codificantes de proteína. Un solo miARN puede regular múltiples diana de ARNm y se predice que los miARNs regulan aproximadamente el 60% de los genes (Cekaite et al. 2016). Hasta la fecha, 1527 precursores y 1921 miARN maduros se han identificados en humanos y la mayoría de los genes que codifican proteínas son diana de miARN. Cada miARN puede regular cientos de genes y cada gen puede ser regulado por múltiples miARN, resultando en complejas combinaciones en la regulación post-transcripcional de la expresión de genes (M. F. Jones and Lal 2012).

Los miARNs como resultado de la regulación de la expresión genética, modulan múltiples procesos celulares incluyendo la proliferación, la diferenciación y la apoptosis, por lo que la perturbación de la expresión de los miARN tiene consecuencias patológicas. En el cáncer, la pérdida de miARN supresores de tumores aumenta la expresión de oncogenes diana mientras que el aumento de expresión de miARN que se comportan como oncogenes (conocidos como oncomiRs) puede reprimir a genes supresores de tumores clave (Kasinski and Slack 2011). Existen múltiples datos científicos hasta la fecha que destacan el rol de los miARN en la iniciación progresión y desarrollo del CCR (Manzant Saplacan 2015).

La regulación negativa de la expresión de los miARN se observa frecuentemente en los cánceres, lo que sugiere que la mayoría de los miARNs funcionan como supresores de tumores. Sin embargo, otros miARNs, incluidas la familia miR-17-92, miR-21 y miR-155, tienen una regulación positiva en ciertos cánceres, lo que sugiere que presentan funciones oncogénicas.

Ejemplos de miARNs supresores de tumores incluye la familia let-7, el grupo miR-15-16, y el p53-target miR-34. La expresión de múltiples miembros de la familia let-7 está disminuida en múltiples cánceres incluyendo mama, ovario, pulmón y colon, habitualmente debido a la delección del loci let-7. Let-7 inhibe la proliferación y tumorigénesis reprimiendo a un grupo de oncogenes como RAS, MYC y HMGA2, y a su vez es regulado negativamente por MYC. El grupo miR-15-16 tiene potentes efectos

antiproliferativos y su localización en 13q14 está frecuentemente suprimida en la leucemia linfática crónica y en el cáncer de próstata (Xiao Ling Li et al. 2014).

Estudios recientes han demostrado que p53 puede alterar la transcripción de numerosos miARNs y, en algunos casos, también puede influenciar la maduración de los miARNs. Por el contrario, los miARNs pueden igualmente modular la cantidad y actividad de p53 a través de mecanismos directos e indirectos. Además, p53 mutado puede reprimir activamente la expresión de algunos miARNs que son activados por p53 no mutado o wild type. (M. F. Jones and Lal 2012).

Los miARNs regulados positivamente por p53 tienen habitualmente como diana genes con efectos proapoptóticos y antiproliferativos, reforzando así la función de p53. La familia miR-34 fue de las primeras relacionadas con p53. Esta familia de miARNs juega un papel fundamental ya que media los efectos antiproliferativos y proapoptóticos de p53, teniendo como objetivos genes del ciclo celular y proto-oncogenes. La expresión de miR34 se pierde frecuentemente en muchos tipos de cáncer, tanto como resultados de la mutación de p53 como por la delección de miR-34 en el locus 1p36. El eje p53-miR-34 regula la transición epitelio-mesénquima (EMT) (Figura 3). Este proceso tiene lugar durante el desarrollo humano y se puede reactivar en algunos cánceres, permitiendo a las células cancerígenas del epitelio adoptar un fenotipo mesenquimal más móvil y así propagarse a otros órganos (M. F. Jones and Lal 2012).

Como ya hemos señalado para miR-34, se ha demostrado que ciertos miARN son regulados por p53. En el caso de p53 mutado, no solo pierde su actividad como supresor de tumores, sino que también adquiere nuevas funciones oncogénicas, lo que se ha denominado ganancia de función. Se ha comprobado que los miARNs son los efectores últimos de los procesos biológicos regulados por p53 mutado. Por lo tanto, una perspectiva importante para el cáncer es la conexión entre las vías de regulación de los miARN con las vías de regulación de p53, ya sea mutado o wild type (Xiao Ling Li et al. 2014).

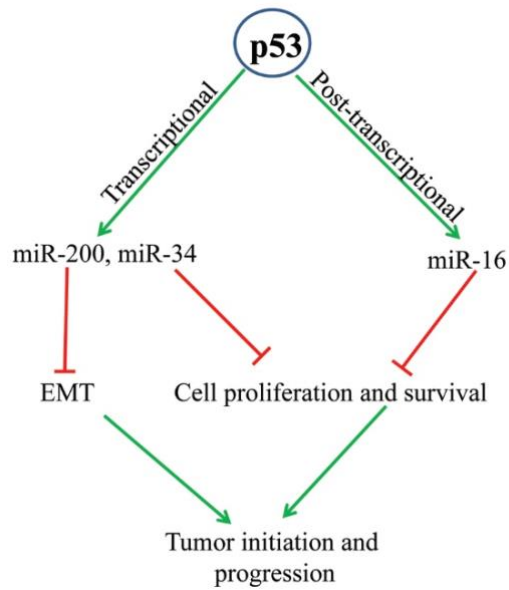


Figura 3. Regulación de la biogénesis de miARN por p53. P53 incrementa la expresión de miARN incluyendo miR-200, miR34 y miR-16. Si ocurre un daño en el ADN, p53 activa transcripcionalmente la familia miR-34 y postranscripcionalmente aumenta miR-16. Estos miARNs inhiben la expresión de numerosos genes involucrados en la proliferación celular y supervivencia. Los niveles basales de p53 también pueden regular otros miARN como la familia miR-200 para inhibir EMT. Induciendo miARNs, p53 puede ejecutar su función supresora de tumores para inhibir la iniciación y progresión tumoral (M. F. Jones and Lal 2012).

3. CÉLULAS MADRE (CM) y CÉLULAS MADRE CANCEROSAS (CMC)

3.1 GENERALIDADES

3.1.1 CÉLULAS MADRE (CM)

Las células madre (CM) son células presentes en todos los organismos multicelulares con capacidad de auto-renovación y que pueden diferenciarse en múltiples líneas celulares. Se clasifican acorde con su origen y su capacidad de diferenciación (Behr et al. 2010). Otra característica adicional de las CM es su habilidad para migrar. Por lo tanto, las CM son únicas, ya que una pueden mantener un equilibrio entre quiescencia, migración, proliferación y diferenciación en función de distintos factores (Florian and Geiger 2010).

La CM adulta es específica del tipo de tejido y órgano al que pertenece. Forman solo una pequeña fracción del total de células y pueden proliferar a lo largo de la vida del organismo. Estas células, relativamente indiferenciadas y con una división lenta son responsables de mantener la integridad del tejido y de aportar nuevas células (Stoian, Stoica, and Radulian 2016). Las CM normales de un tejido se localizan dentro o adyacentes a un microambiente conocido como “nicho”, el cual es beneficioso para mantener sus características de CM. Los nichos se componen de varios tipos de células, así como de matriz extracelular (ECM), citoquinas y factores de crecimiento secretados por las células del nicho. Por ejemplo, las células de Paneth localizadas en las criptas intestinales forman parte del nicho en el cual se encuentran las CM intestinales (Yoshida and Saya 2016).

Se piensa que las CM se dividen lentamente. El modelo de división de las CM es muy importante ya que determina el tipo de progeñe y la cantidad de población celular en un futuro. Para asegurar su auto-renovación, las CM pueden dividirse de forma simétrica o asimétrica (Figura 4). La división asimétrica supone que cada CM se divide para generar una célula hija con características CM y otra célula hija diferenciada. Se ha postulado que la nueva CM mantiene la hebra de ADN original para minimizar los errores de replicación. A esto se le ha llamado “hipótesis de la hebra

inmortal". Este modelo tiene la ventaja de mantener la población de CM constante. Sin embargo, una desventaja obvia es la incapacidad de reponer el pool de CM en caso de daño. En el caso de la división simétrica, las CM son capaces de dos tipos: una división de proliferación que resulta en la creación de dos SC idénticas que mantienen las características de CM, y una división de diferenciación resultando en la creación de dos células diferenciadas. La división simétrica se ha observado durante el desarrollo de organismos vertebrados e invertebrados y es también común durante el proceso de curación y regeneración. El equilibrio entre los dos modelos está controlado por señales intrínsecas y extrínsecas para producir un número apropiado de CM y células diferenciadas (Morrison and Kimble 2006; Shahriyari and Komarova 2013; Stoian, Stoica, and Radulian 2016).

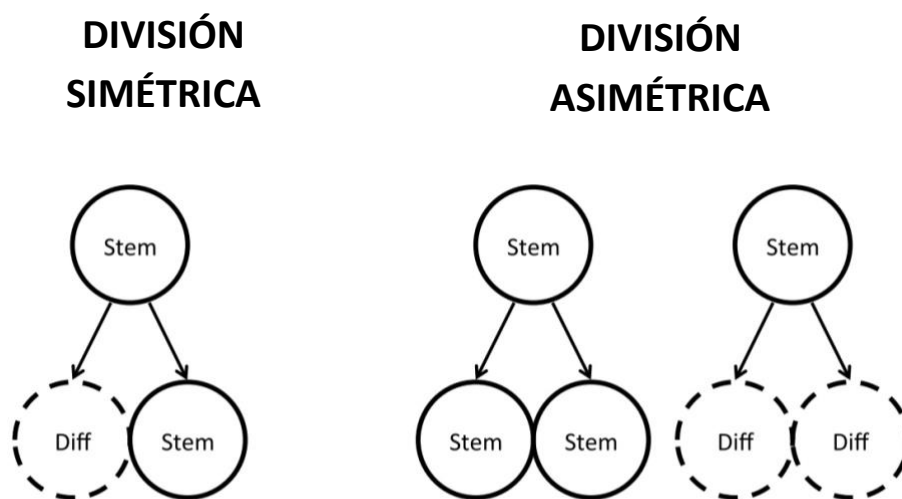


Figura 4. División simétrica y asimétrica de las CM. En el modelo de división asimétrica, la CM produce una célula diferenciada y una CM. En el modelo de división simétrica, la CM produce dos células diferenciadas o dos CM (Shahriyari and Komarova 2013).

La auto-renovación de las CM está regulada por distintas vías, muchas de las cuales también se han visto implicadas en la oncogénesis. Por ejemplo, la prevención de la apoptosis por la expresión forzada del oncogén BCL-2. Las vías de señalización Notch, Sonic hedgehog (SHH) y Wnt pueden regular la auto-renovación de las CM. Una vía de señalización particularmente interesante que ha demostrado regular tanto la vía de la auto-renovación de las CM como la oncogénesis en diferentes organismos es la

Wnt. Las proteínas Wnt son moléculas de señalización intracelular que regulan el desarrollo en numerosos organismos y contribuyen a la oncogénesis cuando se desregulan (Reya et al. 2001). Se ha demostrado que la vía Wnt aumenta la autorenovación de las células madre hematopoyéticas y se activa tanto en neoplasias mieloides como linfoides, indicando su implicación tanto en la hematopoyesis normal como en la maligna (Kirstetter et al. 2006).

Las CM pueden clasificarse dependiendo en su potencial de diferenciación en cinco grupos: totipotentes u omnipotentes, pluripotentes, multipotentes, oligopotentes y unipotentes. Y según su origen, las CM puede ser agrupadas en cinco categorías: embrionarias, fetales, perinatales, adultas e iP_s (células madre pluripotentes inducidas) (Ilic and Polak 2011). A continuación, definiremos la clasificación según su potencial de diferenciación.

Células madre Totipotentes

Las células totipotentes u omnipotentes puede diferenciarse en tejidos embrionarios de las tres capas germinales y en tejidos extraembrionarios. Son capaces de generar un organismo completo y viable. Un óvulo fecundado es un ejemplo de células totipotente (Ilic and Polak 2011).

Células madre pluripotentes

Aunque tienen menos potencial que las células totipotentes, las células pluripotentes son posiblemente más útiles para la medicina regenerativa. Pueden auto-renovarse y diferenciarse en casi cualquiera de las tres capas germinales, ectodermo, endodermo y mesodermo, desde donde se desarrollan todos los tejidos y órganos. Las CM embrionarias (CME) son actualmente las únicas células madre pluripotentes conocidas. CME derivan de la masa celular interna (MIC) del blastocito, y se caracterizan por ser pluripotentes y dar lugar a diferentes linajes y tipos celulares (Behr et al. 2010).

Recientemente se han creado las células madre pluripotentes inducidas (iP_s), y como su nombre indica también pertenecen a este grupo. Las iP_s son células específicas de tejido reprogramadas al nivel de CME. Se incluyen en un grupo a parte por ser obtenidas de forma artificial (Ilic and Polak 2011).

Células madre multipotentes

Las CM multipotentes puede auto-renovarse y diferenciarse en diferentes tipos celulares pertenecientes a una misma familia o linaje. Las células madre mesénquimas (CMM) son un ejemplo típico de células multipotentes. Las CMM son células mesodérmicas no especializadas que pueden generar tejido conectivo, hueso, cartílago y los sistemas circulatorio y linfático (Ilic and Polak 2011).

Células madre oligopotentes

Las CM oligopotentes pueden auto-renovarse y diferenciarse en unos pocos tipos celulares estrechamente relacionados. Las células madre hematopoyéticas que pueden diferenciarse tanto en los linajes mieloides y linfoides serían un ejemplo de células madre oligopotente (Ilic and Polak 2011).

Células madre unipotentes

Las CM unipotentes tienen capacidad de auto-renovación pero solo pueden diferenciarse en un tipo celular concreto. Las células madre musculares son ejemplo típico de este grupo (Ilic and Polak 2011).

Las CM adultas son específicas de tejido y órgano, forman una pequeña fracción de la población total de células y tienen la capacidad de dividirse lentamente manteniendo la integridad del tejido al que pertenecen. Su progenie es más diferenciada y puede dividirse a un ritmo más rápido. Las CM adultas tiene numerosas características que las distinguen. Estas incluyen (i) auto-renovación; (ii) plasticidad; (iii) potencial de diferenciación en múltiples tipos celulares y (iv) regeneración tisular. La plasticidad es un rasgo principal de las CM. Las CM adultas de un tejido (ej. Médula ósea) tienen la habilidad de formar injertos en diferentes tipos de tejidos (ej. Colon) (Stoian, Stoica, and Radulian 2016).

3.1.2 CÉLULAS MADRE CANCEROSAS (CMC)

La presencia de células madre cancerosas (CMC) se demostró por primera vez en cáncer hematopoyético hace aproximadamente 20 años. En 1994, Dick et al. (Lapidot et al. 1994) demostraron que solo las células leucémicas que expresaban los mismos marcadores que las CM adultas hematopoyéticas (CD34⁺CD38⁻) podían iniciar una neoplasia hematopoyética y se llamó a estas células, células madres leucémicas (CMLs), o células madres cancerosas (CMC) (X. Wang, Huang, and Chen 2017). Posteriormente se han ido identificando en distintos tipos de tumores sólidos incluyendo cerebro, pulmón, mama, colon, melanoma y ovario (M. Yang, Liu, and Huang 2016). Este pequeño subgrupo de células eran capaces de auto-renovación, iniciación de tumor y mantenimiento de la enfermedad (Stoian, Stoica, and Radulian 2016).

Las neoplasias están compuestas por diferentes tipos celulares que contribuyen a la heterogeneidad del tumor. De acuerdo con el concepto de carcinogénesis más reciente, hay evidencia que apoya una hipótesis que postula que los tumores contienen pequeñas subpoblaciones de CMC, las cuales presentan una serie de características que las distinguen: (1) capacidad de iniciación de tumor y progresión tumoral, (2) auto-renovación y diferenciación, (3) expresión de un característico repertorio de marcadores de superficie (Casado et al. 2017; Dalerba and Clarke 2007). Las CMC, además, controlan el desarrollo tumoral siendo responsable de las recidivas y metástasis y de la resistencia a quimio y radioterapia. Por tanto, las CMCs se consideran la fuente principal de enfermedad residual tras la administración de tratamiento (Kucia and Ratajczak 2006; Papaccio et al. 2017; M. Yang, Liu, and Huang 2016). Esta subpoblación de células tumorales con estas propiedades biológicas no es abundante en los distintos tejidos. En líneas celulares cultivadas a largo plazo, la fracción de estas células especiales están presentes en un rango de no más de 0.1-2% (M. Yang, Liu, and Huang 2016).

Se han propuesto dos teorías para explicar cómo surgen las CMC: (1) a partir mutaciones en CM normales o células precursoras, llevando a una proliferación sin control (Figura 6); o (2) des-diferenciación celular hasta un estado stem-like, lo que en una células cancerígena produciría una CMC (Munro et al. 2017).

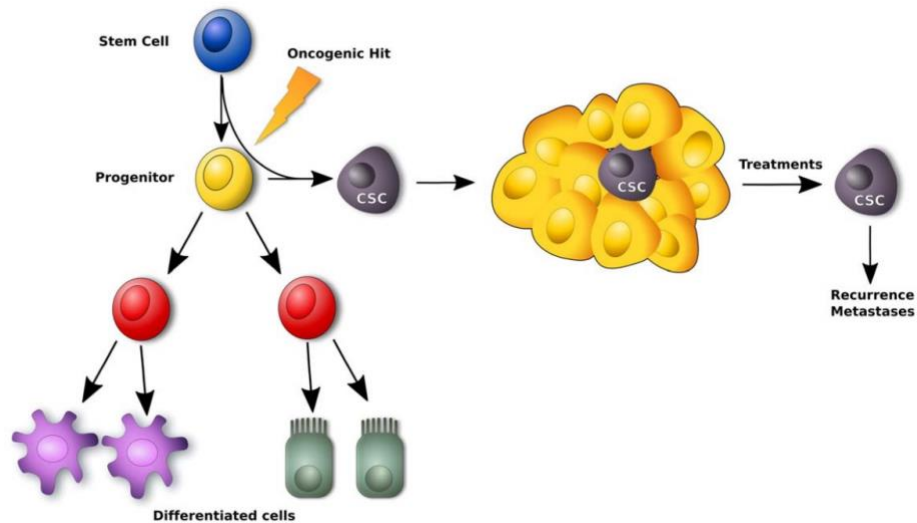


Figura 6. Modelo de la teoría de CMC: solo las CMC son capaces de iniciar y mantener el tumor, siendo además resistentes a terapias convencionales de tratamiento. Las CMC se generan a partir de CM normales o células precursoras/progenitores donde ocurren mutaciones epigenéticas (Papaccio et al. 2017).

Tal como las CM normales en los tejidos, las CMCs también han mostrado tener nichos cuyos componentes incluyen células endoteliales, osteoblastos y moléculas de la ECM compuestas por osteopontin y ácido hialurónico. Además, fibroblastos y macrófagos asociados a neoplasias, MSC indiferenciadas y células del sistema inmune en el estroma tumoral sirven como nicho de CMC proporcionando factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento transformante beta (TGF β), factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), así como citoquinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral α (TNF α) y varias interleuquinas incluyendo IL-1b y IL-6. La red de citoquinas no solo fomenta el desarrollo tumoral sino que también mantiene las características de CMC de las cuales depende la recurrencia de la enfermedad y las metástasis (Yoshida and Saya 2016). Existe suficiente evidencia que apoya la importancia que tiene el nicho en el mantenimiento del pool de CM.

Su habilidad para sobrevivir y resistir los tratamientos con quimioterapia y radioterapia convencionales se ha observado en varios tumores. Un estudio llevado a

cabo por Kang et al. mostró que sólo una pequeña proporción de células de glioblastoma sobrevivían y conseguían proliferar tras la exposición a dosis letales de 1-3-bis(2-chlorethyl)-1-nitrosoure (BCNU). Estas células residuales expresaban los marcadores de superficie CD133, CD177, CD90, CD71 y CD45 y podían iniciar el tumor cuando se trasplantaban de forma ortotópica en ratones inmunodeprimidos. Describieron estas células resistentes a BCNU como células cancerosas stem-like (Kang and Kang 2007).

Una de las propiedades más preocupantes de las CMC es su capacidad para metastatizar, movilizarse desde el tejido primario e implantar en un compartimento anatómico distinto donde mantiene el crecimiento de una lesión tumoral secundaria (Dalerba and Clarke 2007). Investigadores han mostrado que la habilidad metastásica del cáncer estaba estrechamente asociada al fenotipo de la CMC, especialmente al proceso conocido como transición epitelio-mesenquimal (Mani et al. 2008; M. Yang, Liu, and Huang 2016). Hermann et al. (Hermann et al. 2007) llevaron a cabo un estudio usando líneas celulares de cáncer pancreático humano. Mostró que la población CD133+ de esta línea celular podía ser subdividida en dos subgrupos basándose en la expresión de la molécula CXCR4 (CD133+/ CXCR4neg and CD133+/CXCR4+). Comparando la capacidad tumorigénica del volumen de células CD133+ (el cual contiene una mezcla de células CD133+/CXCR4neg y CD133+/CXCR4+) y de las células CD133+ que carecen de CXCR4+ (ej.: CD133+/CXCR4neg) mostró que las dos poblaciones eran igualmente capaces de mantener el crecimiento tumoral. Sin embargo, de forma curiosa, la depleción del subgrupo CXCR4+ del volumen CD133+ era capaz de anular la capacidad del tumor de formar metástasis espontáneas, al menos a corto/medio plazo.

3.2 IDENTIFICACIÓN Y AISLAMIENTO DE CMC

En los últimos años ha surgido la “hipótesis de las CMC” la cual postula que una población minoritaria de células dentro de un tumor son las ya mencionadas células madre tumorales. Este subgrupo celular es presuntamente el responsable de generar la masa tumoral la cual consiste en una variedad de células con distintos grados de diferenciación. En paralelo a la aparición de esta hipótesis, ha crecido el interés en su estudio y aislamiento (Elsaba et al. 2010).

Las CMCs se aíslan habitualmente por la expresión de marcadores moleculares específicos como CD133, CD34, CD24, CD44, CD166 y la molécula epitelial de adhesión celular (EpCAM), la cual se usan también para identificar células madre normales, CD66c, CD29, Musashi-1, aldehído-deshidrogenasa-1 y el receptor 5 acoplado a la proteína G que contiene repeticiones ricas en leucina (LGR-5) (Todaro et al. 2010; M. Yang, Liu, and Huang 2016). Existen estudios que sugieren que alteraciones genéticas o del microambiente pueden influenciar la aparición de células con genotipo CM-like (Casado et al. 2017). CD133 ha mostrado ser un marcador de gran importancia en la identificación de poblaciones celulares enriquecidas con CMC de cáncer de colon y carcinoma hepatocelular (Stoian, Stoica, and Radulian 2016; M. Yang, Liu, and Huang 2016). Un estudio realizado por Horst et al. demostró que la alta expresión de CD133+ en el CCR se correlacionaba de forma importante con la aparición de metástasis hepáticas (David Horst et al. 2009).

Las CMCs se pueden aislar usando citometría de flujo basado en los marcadores de superficie específicos y bolas magnéticas especiales recubiertas de anticuerpos específicos para los marcadores de superficie de dichas células. Mientras que la presencia de marcadores de superficie expresados por las CMCs se utiliza para aislar estas células, aún no se conoce un marcador o patrón de marcadores con el potencial de identificar estas células en muchos tumores. Otro método para identificar y aislar CMCs está basado en su habilidad para excluir el colorante fluorescente Hoechst 33342 vía transportadores de membrana dependientes de ATP (del inglés, "ATP-binding cassette, ABC). Estos transportadores pueden evacuar fuera de la célula varios compuestos endógenos y exógenos incluyendo xenobióticos y también el colorante fluorescente Hoechst 33342, consiguiendo así una baja retención de la señal fluorescente en estas células, por lo que aparecen en la esquina inferior izquierda en el análisis por citometría de flujo. Las CMCs tienen una sobre-expresión de los transportadores ABC, especialmente ABCG2, los cuales excluyen activamente el colorante fuera de la célula. A la fracción de células capaz de expulsar el colorante Hoechst 33342 se la conoce como "side population" (SP) y son consideradas CMCs. La existencia en distintos tumores de células SP con características estaminales se considera un factor clave en la resistencia a terapias y se considera uno de los mayores retos en el tratamiento del cáncer (P. Liu et al. 2014; C. Wu and Alman 2008; M. Yang,

Liu, and Huang 2016). Las CMCs también pueden ser identificadas basándose en la expresión de aldehído deshidrogenasa (ALDH). Ginester et al. mostraron que tanto las células de mama normales como las cancerígenas que presentaban un aumento de la actividad ALDH tenían propiedades de células madre. En el carcinoma de mama, la alta actividad de ALDH identifica a la fracción celular tumorigénicas capaz de auto-renovación y de generar tumores heterogéneos que recuerdan al tumor primario (Ginestier et al. 2007).

3.3 MECANISMOS DE RESISTENCIA A TERAPIAS

Las CMC poseen la propiedad de resistencia (del inglés "robustness"), la cual comprende varias características incluyendo un ciclo celular lento, la habilidad de expulsar agentes citotóxicos de la célula, resistencia al estrés oxidativo, habilidad de adaptación a un microambiente con pocos nutrientes y una rápida respuesta al daño del ADN. Todo ello contribuye al desarrollo de la resistencia a terapias (Figura 7 a y b) (Yoshida and Saya 2016).

La resistencia de las CMC a quimioterapia y radioterapia estándar puede llevar a la persistencia de la enfermedad, lo que conocemos como enfermedad mínima residual (EMR) y a la recurrencia tumoral y por tanto constituye un reto en el tratamiento clínico del cáncer (M. Yang, Liu, and Huang 2016). Si las CMCs persisten, incluso si la masa tumoral ha desaparecido gracias al tratamiento con quimioterapia (QT) y radioterapia (RT), el tumor recurrirá inevitablemente (Stoian, Stoica, and Radulian 2016).

Las CMCs son capaces de activar los mecanismo de control de daño de ADN en respuesta a un daño a este inducido tanto por radiación o por QT, por lo tanto aumenta su habilidad para reparar las hebras de ADN (M. Yang, Liu, and Huang 2016).

Otro mecanismo importante que contribuye a la resistencia al tratamiento es la alta expresión de transportadores ABC, las proteínas transmembrana dependiente de ATP capaces de exportar ciertas sustancias y drogas fuera de la célula llevando a una multiresistencia a tratamientos. Liu et al. han demostrado recientemente que la expresión de ABCG2 en las células SP era mayor que en las células no SP. Así mismo, Las CMCs presentan un nivel bajo de ROS debido en parte a la hasta expresión de

moléculas que eliminan radicales libres como el glutatión (GSH) (M. Yang, Liu, and Huang 2016).

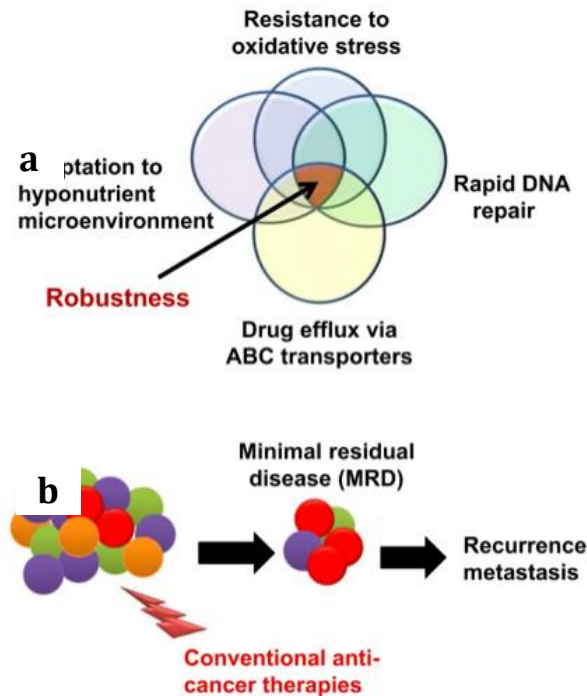


Figura 7. Características biológicas de las CMC. (a) CMC presentan propiedades de resistencia que se estable por la combinación de distintos fenotipos. (b) CMC son más resistentes a intervenciones terapéuticas, dando lugar a la generación de “enfermedad mínima residual” (EMR) que están principalmente compuesta por CMCs, siendo EMR la principal causa de recurrencia y metástasis (Yoshida and Saya 2016).

Otro factor que contribuye a la resistencia a la terapia convencional de las CMCs es su estado quiescente o inactivo. Ciertos agentes quimioterapéuticos tienen preferencia por células con crecimiento rápido, que presentan una replicación de ADN activa y por tanto altamente sensibles a agentes que dañan el ADN. Las CMCs que se encuentran en estado latente serían menos vulnerables a estos agentes (M. Yang, Liu, and Huang 2016).

3.4 CÉLULAS MADRE CANCEROSAS (CMC) Y CÁNCER COLORRECTAL (CCR)

La superficie luminal del colon consiste en una simple capa de células de epitelio columnar las cuales están plegadas formando protrusiones en forma de dedo hacia el lumen. Los espacios entre las protusiones se conocen como criptas de Lieberkühn y son la unidad funcional del intestino. El epitelio intestinal contiene cuatro linajes celulares distintos: enterocitos, células caliciformes, células endocrinas y células de Paneth (Figura 8). Las células columnares de la base de la cripta (CBCs) son pequeñas células indiferenciadas las cuales se piensan que son las verdaderas CM intestinales que dan lugar a todos los tipos celulares epiteliales. Estas CM tienen la habilidad de dividirse asimétricamente, generando una célula hija idéntica y a una célula que va proliferando y diferenciándose en enterocitos, células caliciformes y células endocrinas durante su desplazamiento hacia la parte más superior de la cripta. Las células de Paneth, que se localizan en la base de la cripta y están distribuidas principalmente desde el duodeno hasta el íleon, contribuyen en el mantenimiento del nicho produciendo barreras defensivas mucosas, modulando la microflora intestinal y produciendo factores de crecimiento y otras moléculas (Munro et al. 2017).

Existen dos hipótesis que intentan explicar el mecanismo celular de la formación espontánea de adenomas. Parece lógico pensar que todo comienza en las criptas del epitelio del colon de un modo ascendente, ya sea a través de mutaciones directas de las CBCs o de células progenitoras durante el proceso de diferenciación. En la hipótesis “ascendente” (del inglés “botton-up”), un clon de célula adenomatosa se produce por expansión estocástica de una CM en la base de la cripta, siendo el epitelio displásico el que coloniza toda la cripta formando un adenoma monoclonal en la cripta (Brittan and Wright 2004; Munro et al. 2017). Sin embargo, en adenomas más avanzados, la cinética de migración celular parece que ocurre de forma contraria y la proliferación se restringe a las células más cercanas al borde superior de la cripta. Esta redistribución de las células proliferativas aboga por una segunda teoría, la hipótesis “descendente” (del inglés “top-down”), donde una CM mutada localizada en una zona inter-cripta cercana a la superficie luminal prolifera y migra lateralmente hacia criptas adyacentes reemplazando el epitelio normal, y de forma similar a la hipótesis “ascendente”, genera una lesión monoclonal (Brittan and Wright 2004). En 1963, Cole and McKalen ya mostraron datos que apuntaba a una carcinogénesis según el modelo

descendente o top-down, demostrando que tanto tumores colorrectales pequeños y grandes, así como pólipos presentaban células en división en su periferia distribuidas en focos de forma aleatoria (Cole and McKalen 1963).

Las células diferenciadas de la mucosa del colon tienen una vida útil corta, de días, mientras que las CM intestinales normales tienen una vida más larga y por lo tanto presentan más oportunidades para acumular mutaciones. La secuencia adenoma-carcinoma de Vogelstein establece que las mutaciones se acumulan en la célula, conduciendo a la transformación maligna. Actualmente existen evidencias que sugieren que las CM del colon con vida media larga pueden acumular mutaciones por un periodo de tiempo prolongado antes de que su fenotipo cambie (Fearon and Vogelstein 1990; Stoian, Stoica, and Radulian 2016).

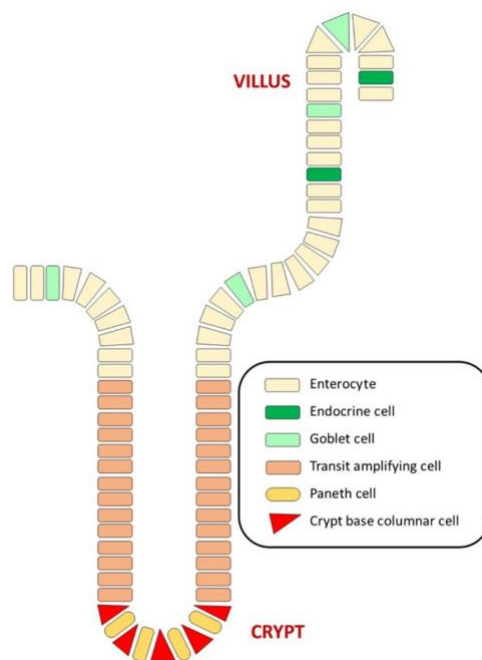


Figura 8. Organización celular del epitelio intestinal (Munro et al. 2017).

El nicho es el ambiente físico que mantiene a las CMs en los distintos tejidos, incluyendo el colon. En este tejido, se han descrito como estructura básicamente formadas por miofibroblastos intestinales subepiteliales (ISEMFs) localizados en la base de las criptas. Cada cripta está revestida por estos ISEMFs separados únicamente

por una lámina basal. Los ISEMFs se activan y proliferan en respuesta a varios factores de crecimiento, incluyendo miembros de la familia del factor de crecimiento derivado de plaquetas. Los ISEMFs dentro del intestino están involucrados en la organogénesis, protección de agentes dañinos y reparación tras el daño. Existe evidencia que sugiere que controlan la proliferación y diferenciación de las células epiteliales. Además, juegan un papel importante en la absorción de agua y electrolitos. En estados patológicos, ISEMFs contribuyen a la fibrosis, reacción desmoplástica y neoplasia. Se ha visto que los nichos también están regulados por señales extrínsecas e intrínsecas. Aparte de los ISEMFs, el mantenimiento de los nichos está regulado por la familia de receptores tirosin-kinasa Eph/ephrin. Las proteínas Wnt están presentes en el fondo de las criptas e interactúan con receptores en las células epiteliales, resultando en una proliferación nuclear inducida por beta-catenina. Además de Wnt, otras vías de señalización, incluyendo aquellas mediadas por la proteína morfogenética ósea, Notch y Sonic hedgehog (SHH), han sido identificadas como reguladores clave del nicho de CM. Se piensa que el microambiente ejerce su efecto a través de mecanismo epigenéticos que inhiben o realzan la expresión de varios genes sin alterar la secuencia de ADN (Stoian, Stoica, and Radulian 2016; Todaro et al. 2010).

El conocimiento del patrón de expresión de las CMCs en el CCR ha aumentado en los últimos años, revelando una población celular heterogénea dentro de las CMCs, desde pluripotentes hasta células diferenciadas, con solapamiento y a veces combinaciones únicas de marcadores.

CD133 ha mostrado ser un marcador de importancia para identificar CMCs en el cáncer colorrectal. CD133 fue primariamente identificado como marcador de superficie en un grupo de células madre hematopoyéticas, células progenitoras y progenitores endoteliales circulantes derivados de la médula ósea involucrados en la angiogénesis postnatal, inflamación y regeneración tisular. O'Brien et al., demostraron que era 200 veces más probable que las células CD133+ de CCR iniciaran crecimiento tumoral que aquellas que eran CD133-. Cuando se inoculan células CD133+ bajo la cápsula renal de ratones inmunodeficientes NOD/SCID, el tumor que resultante se asemejaba al tumor original (O'Brien et al. 2007). En un estudio similar Ricci-Vitiani et al. fue el subgrupo de células de cáncer colorrectal CD133+ las que resultaron tumorigénicas. Las células CD133+ daban lugar a tumores semejantes al tumor original

(Ricci-Vitiani et al. 2007). Contrariamente, un estudio reciente demuestra la población de células CD133+ es variable en distintas líneas celulares, con porcentajes que varían desde el 95% del total de las células tumorales hasta el 32% (Elsaba et al. 2010).

Múltiples estudios han hablado de su potencial diagnóstico y pronóstico así como interacción con vías de señalización intracelulares. Existen estudios que han investigado mediante inmunohistoquímica el papel pronóstico de la expresión de CD133, mostrando una relevancia pronóstica alta en la progresión del CCR y la formación de metástasis (Fanali et al. 2014). Chao et al. propusieron que las células de CCR CD133+ eran más tumorigénicas que aquellas CD133- debido a su interacción en el microambiente del tumoral con los fibroblastos asociados a carcinoma a través del eje de señalización paracrino CXCR4- SDF-1 (Chao et al. 2012).

CD44 ha resultado ser también un marcador importante para identificar CMC en el CCR. Es una glicoproteína de superficie que actúa en interacciones célula-célula, adhesión del citoesqueleto a la matriz extracelular y migración celular (Munro et al. 2017). Dalerba et al. fue el primero en identificar CD44 como un potencial marcador de células madre tumorales (Dalerba et al. 2007). La expresión de CD44 se activa al menos en parte por el complejo beta-catenina/Tcf-4 en las células del cáncer colorrectal; y su sobreexpresión es un evento temprano en la transformación de adenoma a carcinoma (Sanders 2011). En la mucosa del colon se usa como marcador de diferenciación inmadura. La desactivación de CD44 previene la tumorigénesis y la formación clonal. De hecho, la inoculación de tan solo 100 células CD44+ es suficiente para iniciar la formación tumoral en ratones desnudos, y una simple célula CD44+ forma esferas tumorales con características estaminales, pudiendo desarrollar tumores cuando se injertan en ratones desnudos (Du et al. 2008).

EpCAM es un marcador que se expresa únicamente por células epiteliales y en cánceres de origen epitelial. Se describió por primera vez en cáncer colorrectal, y posteriormente en otros cánceres (Munro et al. 2017). Múltiples estudios han aislado y caracterizado células EpCAM+/CD44+ de tumores colorrectales. Dalerba et al. (Dalerba et al. 2007) descubrió que tanto el colon normal como los tumores colorrectales contenían dos poblaciones celulares: EpCAM_{High}/CD44+ and EpCAM_{Low}/CD44-. Sólo el grupo EpCAM_{High}/CD44+ es capaz de formar tumor cuando se inoculan en ratones NOD/SCID (del inglés "nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency mice").

EpCAM es un marcador potencialmente diagnóstico en cánceres epiteliales, donde su alta expresión se correlaciona con una pobre supervivencia y estados avanzados de la enfermedad. Además, debido a su sobreexpresión en adenocarcinomas, metástasis y CMCs, se ha usado para detectar CMC circulantes o metastásicas (Munro et al. 2017).

CD166 o molécula de adhesión celular a leucocitos (del inglés activated leukocyte cell adhesion molecule, ALCAM) pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas de adhesión celular. CD166 se describió por primera vez como un potencial marcador de CMC en el CCR por Dalerba et al. en 2007 (Dalerba et al. 2007). Weichert et al. en 2004 observó un aumento heterogéneo en la expresión de CD166 en el cáncer colorrectal. Observó una correlación significativa entre la expresión de la proteína CD166 en adenocarcinomas de colon primario y una supervivencia menor (Sanders 2011; Weichert et al. 2004).

En los últimos años se han ido añadiendo nuevos marcadores en el estudio de las CM en el CCR, como son CD24, CD29, actividad ALDH, Lgr5 o CD66c (Fanali et al. 2014; Gemei et al. 2013a). ALDH es comúnmente considerado como un marcador tanto de CM normales como de CMCs. Un estudio llevado a cabo por Huang et al en 2009 mostraron que células tumorales de cáncer de colon con actividad enzimática ALDH aisladas mediante citometría de flujo tenían la capacidad de generar tumores en ratones NOD/SCID con tan solo la implantación de 25 células (E. H. Huang et al. 2009). La expresión de CD66c, medido por inmunohistoquímica, estaba aparentemente aumentado en neoplasias colorrectales, y una alta expresión de CD66c fue identificada como un factor pronóstico independiente en pacientes con CCR resecable. Un estudio llevado a cabo por Gemei et al. demuestra que la expresión de CD66c estaba asociada con las CMCs del CCR y que la inhibición de CD66c bloquea el crecimiento tumoral, de este modo abriendo una vía para un potencial tratamiento del CCR (Gemei et al. 2013a)..

3.5 CMC Y P53

El gen supresor de tumores p53 asegura la calidad y estabilidad genómica de las CM, por lo tanto, sirve de barrera para la formación de CMCs (Shetzer et al. 2014). Cuando se encuentra mutado, p53 no solamente pierde sus funciones de supresión de tumor, sino que gana funciones oncogénicas adicionales, un fenómeno denominado p53 mutado con ganancia de función (GOF, *del inglés, gain of function*). La amplia evidencia experimental existente sugiere que el p53 con ganancia de función media propiedades oncogénicas como la proliferación sostenida, la resistencia a la muerte celular, invasión y metástasis y la inflamación potenciada por el tumor (Brosh and Rotter 2009; Muller and Vousden 2014).

Mientras que wild type p53 sirve de barrera para la formación de CMCs (Shetzer et al. 2014), parece que p53 GOF promueve la adquisición de funciones en CMCs (Molchadsky and Rotter 2017). Resulta interesante comprobar que muchas de las ya aceptadas funciones de mtp53 GOF se comparten con las características de las CMCs (Muller and Vousden 2014). Por ejemplo, sabemos que las CMCs tienen un alto índice de actividad mitótica una capacidad de autorenovación descontrolada, y que generan heterogeneidad tumoral (Zhou et al. 2009). Estas características también se atribuyen a mtp53 GOF, como la extensa proliferación, la formación de metástasis y la resistencia a tratamiento (Muller and Vousden 2014), dando lugar a tumores indiferenciados (Aloni-Grinstein et al. 2014).

Los tumores que expresan mutaciones missense de p53 se asocian a mayor agresividad tumoral. Estos muestran una mayor expresión de marcadores de CMCs. Solomon et al. muestran en su estudio que el aumento de la expresión de ALDH1A1, CD44 y Lgr5 en las células mtp53 examinadas podría estar mediado por la unión de p53 mutado a sus promotores (Solomon et al. 2018), aunque mtp53 podría regular indirectamente la transcripción de genes a través de la unión y estabilización de otros factores de transcripción (Muller and Vousden 2014).

Zeilstra et al. muestran que la expresión de CD44 es independiente del estatus de p53 en CCR (Zeilstra et al. 2013). Las discrepancias entre estudios pueden deberse al hecho de que el análisis de Zeilstra et al. incluyó tumores con todo tipo de mutaciones de p53 en el mismo grupo, mientras que otros estudios han dividido las muestras de CCR en dos grupos: (a) tumores que expresan mutaciones de p53 tipo missense que

son conocidas por sus funciones oncogénicas y (b) tumores con wtp53 o p53 con mutaciones tipo delección/inserción que habitualmente ejerción una pérdida de función.

3.6 CMC Y miARN

Datos recientes sugieren que los miARNs tienen un rol muy significativo regulando la función de células normales y de CMCs a través de su interacción con varias vías de señalización. Las CMCs además de estar reguladas por Wnt, TGF- β , Ras y vías de señalización inflamatorias, también están reguladas por miARNs. Se ha observado que múltiples miARNs, como miR-470, miR-296 y miR-134 pueden inhibir los factores de auto-renovación Oct4, Sox2 y Nanog en el CCR (Guo, Bao, and Yang 2017). Xu et al han comunicado que la expresión de miR-328 estaba disminuida en las CMCs del CCR y se correlacionaba con una fracción de SP alta. Sin embargo, una expresión alta de miR-328 podía suprimir la capacidad de invasión de las células tumorales y las sensibilizada frente a la quimioterapia (X. T. Xu et al. 2012). Bitarte et al. han demostrado que la supresión de miR-451 suprimía la auto-renovación, la malignidad tumoral y la recurrencia de las CMC en el CCR (Bitarte et al. 2011).

4. MELATONINA

4.1 GENERALIDADES

Descrita por primera vez por McCord y Allen en 1917 (McCord and Allen 1917) y aislada por Lerner en 1958, la melatonina o N-acetil-5-metoxitriptamina es una hormona sintetizada principalmente en la glándula pineal a partir de la serotonina. (Lerner et al. 1958). Uno de los rasgos más únicos de la melatonina es su ritmo circadiano, con alta secreción por la noche y bajo niveles durante las horas de luz, siendo capaz de informar al organismo de alteraciones fotoperiódicas ambientales (Reiter 1991a). Dado que la melatonina presenta un pico de secreción en sangre coincidiendo siempre con la fase oscura del ciclo luz/oscuridad, se puede decir que la melatonina es la expresión química de la oscuridad. Se conoce que, como molécula de señalización, la producción de melatonina presenta también cambios estacionales, con picos nocturnos más largos durante el invierno y más cortos en verano (Brainard et al. 1982).

En vertebrados, el ritmo circadiano normal de la melatonina se genera únicamente por la melatonina secretada en la glándula pineal ya que se ha demostrado que la resección de la glándula pineal elimina el ritmo en sangre por completo o se reduce significativamente la amplitud. Las alteraciones en el ritmo circadiano de la melatonina conlleva a una “crono-disrupción” asociándose con enfermedades, incluyendo enfermedades neurodegenerativas, enfermedades cardíacas, hipertensión y cáncer (Tan et al. 2015).

Tras la identificación de la síntesis de melatonina en la glándula pineal, la presencia de las enzimas de síntesis fue descubierta en la retina y el cerebelo, y posteriormente en múltiples tejidos y órganos (cóclea, epitelio respiratorio, glándula de Harder, piel, tracto gastrointestinal, hígado, etc). Estas son la aralkilamin N-acetiltransferasa (AA-NAT) y la hidroxindol-O-metil transferasa (HIOMT), conocida actualmente como la acetilserotonina O-metiltransferasa (ASMT) (León et al. 2012).

Además de sus bien conocidas funciones en el ritmo circadiano, la melatonina y sus metabolitos poseen propiedades antioxidantes, como capturando exceso de radicales libres y aumentando la síntesis de enzimas antioxidantes tanto in vivo como in vitro. También se le atribuyen acciones antiinflamatorias y la habilidad para mantener la

estabilidad de membranas. Además, la melatonina presenta otras funciones como la modulación de la actividad mitocondrial o del sistema inmune, así como propiedades antiapoptóticas, antitumorales y antiisquémicas (S. Zhang et al. 2017)

La existencia de las enzimas de síntesis en multitud tejidos y la presencia en estos de los receptores de melatonina, así como el descubrimiento de sus efectos antioxidantes y antiinflamatorios han llevado a los científicos a calificar a esta hormona como una molécula con múltiples acciones (Acuña-Castroviejo et al. 2014).

4.2 SÍNTESIS Y METABOLISMO

La síntesis de melatonina ocurre en el pinealocito, con una oscilación diaria, dependiendo de las condiciones lumínicas, habiendo un incremento de su secreción durante la noche. Es considerada como un marcador endocrino nocturno (Reiter 1991b).

La síntesis de melatonina comienza con la absorción triptófano en el pinealocito. Seguidamente, se convierte el triptófano en 5- hidroxitriptófano (5HTP) a través de la triptofano-5- hidroxilasa. En el siguiente paso, el 5HTP es decarboxilado por la enzima 5HTP- decarboxilasa en 5-hidroxitriptamina (Serotonina o 5-HT). Posteriormente, ocurre la N-acetilación de la serotonina por la arilalkilamina N-acetiltransferasa (AA-NAT), dando lugar a N-acetilserotonina. Finalmente, la N-acetilserotonina se convierte en melatonina por la acetilserotonin-O-metiltransferasa (ASMT, también conocida como HIOMT) (Stehle et al. 2011) (Figura 9)

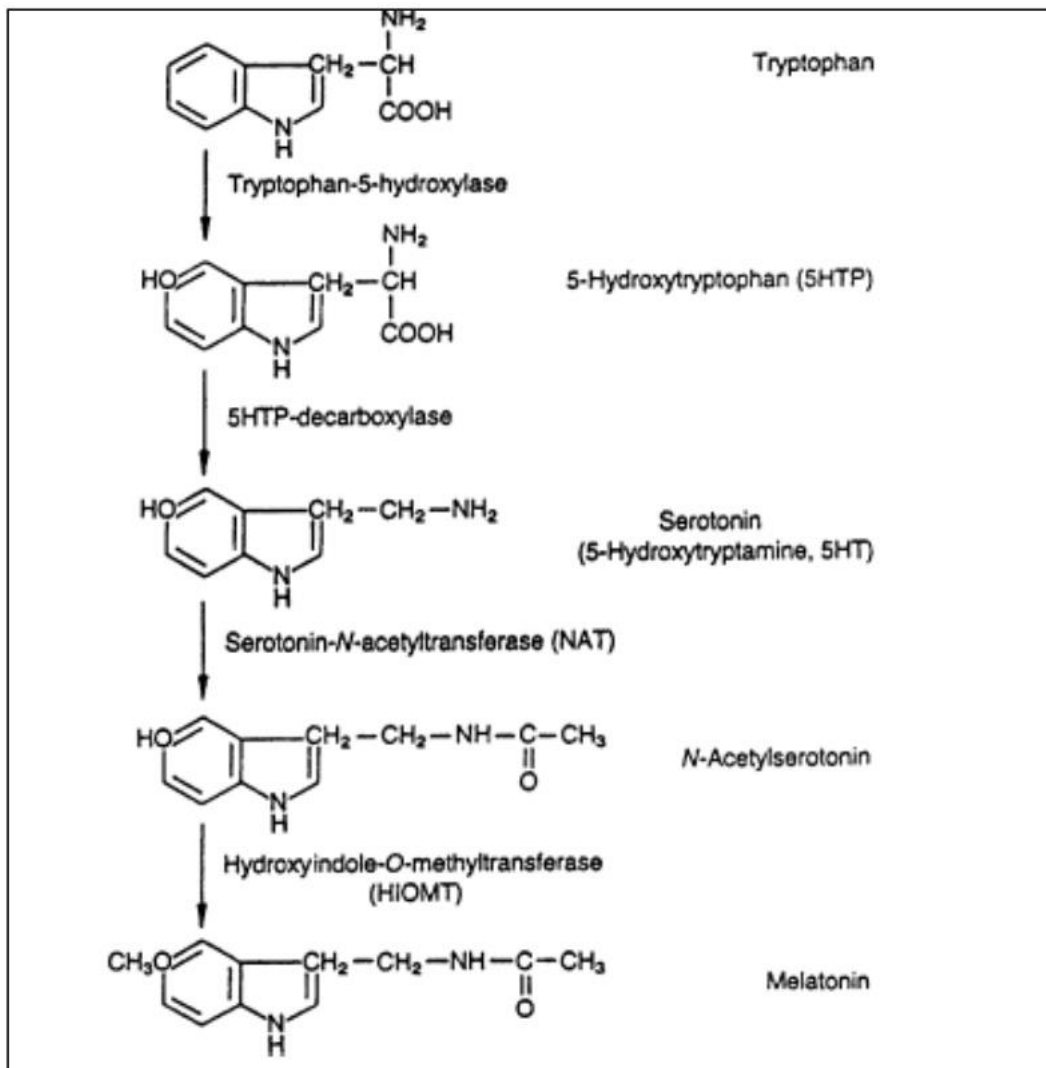


Figura 9. Biosíntesis de Melatonina a partir de triptófano (Venegas Maldonado 2012).

La N-acetilación de 5-HT por la arilalkilamina N-acetiltransferasa (AA-NAT) es considerada un paso limitante de velocidad en la síntesis, motivado por la elevada liberación nocturna del neurotransmisor norepinefrina (NE) desde el sistema simpático hacia la glándula pineal. Sin embargo, Liu y Borjigin demostraron en ratas que era la actividad enzimática ASMT la que determinaba los niveles de síntesis de melatonina en la glándula pineal durante la noche. De esta manera, ASMT, y no AA-NAT como se había descrito previamente debería ser considerada la enzima limitante de velocidad en la síntesis de melatonina (T. Liu and Borjigin 2005).

La producción pineal de melatonina está bajo control del núcleo paraventricular del hipotálamo, el cual proyecta, finalmente, a la columna intermedio lateral de los segmentos torácicos superiores de la espinal dorsal donde las neuronas simpáticas preganglionares están situadas. Los axones de estas neuronas salen de la espina por el tercio anterior del ganglio superior, el cual manda señales postganglionares simpáticas a través de los nervios coronarii hacia la glándula pineal. La norepinefrina se libera de estas terminaciones nerviosas donde interactúa con receptores postsinápticos β_1 y α_1 desencadenando múltiples mecanismos intracelulares que activan las síntesis de melatonina en los pinealocitos. La activación/desactivación de esta compleja vía neural que controla la síntesis de melatonina está bajo control del reloj circadiano, el núcleo supraquiasmático en el hipotálamo. A través de esta vía, la producción de melatonina expresa un ritmo circadiano que está íntimamente sincronizado con el ciclo luz/oscuridad (Cipolla-Neto et al. 2014).

Una vez sintetizada, sale fácilmente del pinealocito, dada su alta liposolubilidad, siendo liberada a la sangre, y llegando a todos los tejidos. Los niveles de melatonina circulantes provienen casi de forma exclusiva de la glándula pineal, a pesar de ser sintetizadas en otros órganos (Reiter 1991b). Una vez en el torrente circulatorio, la encontramos unida a albúmina y su vida media es de 10-40 minutos y con metabolismo principalmente hepático. Aproximadamente un 75% de la melatonina absorbida por los hepatocitos pasa a 6-hidroximelatonina por las enzimas microsomales. Este compuesto es posteriormente conjugado o bien con sulfato (70%), llamado 6-sulfatoxymelatonina, o unida a un grupo glucurónico (6%) (Reiter 1991b).

La producción de melatonina disminuye con la edad, su síntesis comienza al os tres o cuatro meses, con máximos entre los ocho y diez años. A partir de entonces, su síntesis va disminuyendo progresivamente, hasta que por encima de los setenta años los niveles en sangre son un 90% menores que los prepuberales (Guerrero et al. 2006; Mishima et al. 2001).

4.3 RECEPTORES DE MELATONINA

La melatonina tiene múltiples funciones como la re-sincronización del ritmo biológico, la inducción del sueño, vasoregulación o incluso inmunomodulación. Gran parte de sus acciones están mediadas por dos receptores de membrana pertenecientes a la familia de los receptores acoplados a proteína G (MT1 y MT2) y a por receptores nucleares pertenecientes a la familia de receptores retinoicos RZR/ROR. El receptor nuclear ROR α ha demostrado actuar como mediador en la señalización intranuclear de la melatonina (León et al. 2012). Además, como mencionamos anteriormente, la melatonina es una molécula liposoluble pudiendo interactuar directamente sobre proteínas citosólicas como la calmodulina, la proteína quinasa C o bien puede actuar sobre radicales libres (Guerrero, J. M.; Carrillo-Vico, A.; Lardone 2007).

De esta manera, la mayoría de los efectos de la melatonina se pueden dividir en dos, aquellos que son dependientes de su unión a receptores (de membrana o nuclear) y aquellos que son independientes de receptor (S. Zhang et al. 2017).

4.3.1 Receptores de membrana.

Hasta ahora se han identificado tres lugares de unión a la melatonina, denominados primariamente Mel1a, Mel1b y Mel1c y posteriormente renombrado como MT1, MT2 y MT3 (C. Q. Chen et al. 2011).

MT3 se ha identificado como una quinona reductasa 2 (QR2), relacionada en el metabolismo xenobiótico de la célula. Esta enzima, sin embargo no reúne todos los criterios para ser clasificado como receptor de melatonina (Acuña-Castroviejo et al. 2014; Nosjean et al. 2000). No obstante, parece que la activación de MT3/QR2 por la melatonina puede explicar el efecto protector de esta frente al estrés oxidativo en diferentes modelos animales, ya que MT3/QR2 tiene potentes propiedades antioxidantes (C. Q. Chen et al. 2011).

MT1 y MT2 son altamente parecidos a nivel aminoacídico, con una homología total del 55% y hasta un 70% de homología dentro de sus dominios transmembrana. También comparten ciertas secuencias de aminoácidos específicas, sugiriendo que representan una subfamilia específica. Sin embargo, los receptores MT1 y MT2 activan distintas vías de señalización. Los receptores MT1 están acoplados a proteínas G que

median la inhibición de la adenilatociclasa y la activación de la fosfolipasa C beta, mientras que los receptores MT2 se acoplan a numerosas vías de transducción de señales, incluyendo la producción de inositoltrifosfato, la inhibición de la adenilatociclasa y la inhibición de la vía soluble de la guanilatociclasa (C. Q. Chen et al. 2011).

La activación de los receptores MT1 da lugar a diferentes respuestas, la mayoría de ellas dependientes de la inhibición de AMPc, a través de las proteínas G y del incremento del calcio citosólico a través de Gq11. La unión de melatonina a receptores MT2 da lugar a la inhibición de AMPc y GMPc. Tanto MT1 como MT2 pueden acoplarse a las vías PLC-dependientes (Acuña-Castroviejo et al. 2014). MT1 se expresa en el cerebro y modula la respuesta neuronal, la vasoconstricción arterial, la proliferación celular en células cancerígenas y funciones metabólicas y reproductivas. La activación de los receptores MT2 de la melatonina cambian las fases de activación neuronales circadianas en el núcleo supraquiasmático, inhiben la liberación de dopamina a nivel de la retina, inducen vasodilatación y mejoran la respuesta inmune. La respuesta mediada por la melatonina tras la activación de MT1 y MT2 es dependiente del ritmo circadiano, duración y exposición a melatonina, tanto endógena como exógena y la sensibilidad funcional del receptor (Dubocovich and Markowska 2005).

Los tres receptores de melatonina (MT) se han encontrado en el tracto gastrointestinal (TGI) (Tabla 3). ARNm del receptor MT1 se ha detectado en intestino delgado y grueso de ratas. Mayor expresión de ARNm MT1 se encontró en el duodeno de rata, con menor expresión en yeyuno e íleon. No se evidenciaron cambios circadianos en la expresión de ARNm MT1 en tejido gastrointestinal (C. Q. Chen et al. 2011). Stebelová et al. Llevaron a cabo un estudio utilizando tejido de estómago, duodeno, páncreas y colon de ratas y analizaron la localización de MT2 y los cambios de densidad en este receptor en relación a las concentraciones de melatonina con los cambios circadianos. La mayor densidad de MT2 se encontró en el colon. En estómago, duodeno y colon, fueron la *muscularis mucosae* y la *muscularis externa* las que presentaron la inmunorreactividad más intensa para MT2 (Stebelová et al. 2010).

Tabla 3. Localización de receptores de membrana de melatonina en íleon y colon de roedores. MT: Receptor de Melatonina; i: Íleon; c: Colon (C. Q. Chen

	MT1	MT2	MT3
Ileum	+	+	+
Colon	+	+	+
Mucosa	+	No data	No data
Muscularis mucosae		+ (i); + (c)	
Submucosa		+ (i); + (c)	
Muscularis propria		+ (c)	

4.3.2 Receptores nucleares

Los receptores nucleares de melatonina pertenecen a la subfamilia receptores Z retinoides (RZR) o receptores retinoides “huérfanos” (ROR), incluyendo el productos de tres genes diferentes: ROR α (a su vez ROR α 1, ROR α 2, ROR α 3, RZR α) los cuales difieren en el dominio N-terminal, RZR β y ROR γ . Contienen 523, 556, 548, 468, 459, and 560 residuos aminoácidos respectivamente y tienen una organización de los dominios típica de los receptores nucleares (Smirnov 2001). Se ha sugerido una interacción entre los receptores de membrana y los nucleares ya que se ha observado que la expresión de mRNA ROR/RZR está disminuida en las células mononucleares sanguíneas con reducción de la expresión de MT1 (C. Q. Chen et al. 2011).

La expresión de los distintos miembros de la familia varía en diferentes tejidos. La expresión de RZR β es la más limitada. RZR β se detecta casi exclusivamente en tejido neuronal, neuroendocrino y sistémica límbico, pero no al asociado con la locomoción. ROR γ es el que se expresa más activamente en el Sistema músculo esquelético y en hígado, riñones y adipocitos. Isoformas RZR α /ROR α se expresan en un número significativamente alto de tejidos como la pituitaria, tálamo, bulbo olfatorio, cerebelo (especialmente células de Purkinje), tejido adiposo, hígado, piel, etc. La más estudiada y documentada es la participación de ROR/RZR en la regulación del sistema inmune, en la diferenciación del sistema nervioso central y posiblemente en la modulación del metabolismo lipídico. La participación de ROR α 1 y RZR α en la regulación del sistema inmune se basa en la inhibición de la 5- lipooxigenasa, una de las enzimas clave para la

biosíntesis de leucotrienos proinflamatorios en linfocitos B (Smirnov 2001). Hasta la fecha los únicos ligandos descritos para estos receptores son la melatonina y compuestos pertenecientes a la familia de las tiazolidindionas, que actúan como análogos de la melatonina. Así, el CGP 52608 ejerce como agonista de la melatonina, mientras que el CGP 55644 lo hace como antagonista (Guerrero, J. M.; Carrillo-Vico, A.; Lardone 2007).

4.3.3 Mecanismos independientes de receptor

La melatonina también interactúa distintas proteínas citosólicas como la calmodulina y la calreticulina, involucradas en la regulación del citoesqueleto y del control de receptores nucleares y PKC respectivamente (Benítez-King, Huerto-Delgado, and Antón-Tay 1993).

De forma directa, actúa como scavenger de radicales libres, generándose, debido a su interacción con especies reactivas de oxígeno (EROS) y especies reactivas del nitrógeno (ERN), una serie de intermediarios que actúan como neutralizadores de radicales libres. Así mismo, también puede actuar como scavenger de radicales libres de forma indirecta, dando lugar a un aumento de la expresión y actividad de enzimas antioxidantes endógenos. Este mecanismo, relacionado como efecto de la melatonina a través del receptor ROR α (Tomas-Zapico and Coto-Montes 2005), parece depender también de la activación de los receptores de membrana (Venegas et al. 2013).

Los efectos antioxidantes de la melatonina han sido bien estudiados y descritos, sin embargo, en algunos casos puede tener efecto prooxidante, ocurriendo principalmente en células que están muy dañadas o células cancerígenas. Sánchez-Sánchez et al. describen de efectos duales de melatonina sobre el estado redox en relación con su efectos antioxidantes/antiproliferativos o bien un prooxidante/citotóxicos (Sánchez-Sánchez et al. 2011). Este efecto pro-oxidante puede explicar las acciones oncostáticas atribuidas a la melatonina. Esta última función puede servir de control sobre el destino de ciertas células, promoviendo en última instancia respuestas proapoptóticas para eliminar células potencialmente malignas (Acuña-Castroviejo et al. 2014).

4.4 MELATONINA Y TRACTO GASTROINTESTINAL

En 1975, Raikhlin y Kvetnoy obtuvieron datos que demostraban que la melatonina no solo se sintetizaba en la glándula pineal sino también en las células enterocromafines (EC) del tracto gastrointestinal (TGI) (Raikhlin and Kvetnoy 1976). Tras esto múltiples estudios se condujeron que demostraban la producción de melatonina en el TGI (G. A. Bubenik 1980; G. A. Bubenik, Brown, and Grota 1977). Esto junto con el hallazgos de sus enzimas de síntesis (AA-NAT y ASMT) en las EC terminó de confirmar su producción a este nivel (George A. Bubenik 2002).

La concentración de melatonina en el TGI es entre 10-100 veces más alta que en el plasma y la cantidad total de melatonina en el TGI es alrededor de 400 veces mayor que la cantidad en la glándula pineal. Al igual que la que encontramos en la pineal, la melatonina del TGI es una molécula multifuncional con acciones generales y/o específicas dependiendo del órgano y la localización donde actúe. La distribución de la melatonina es comparable a la densidad de células EC en el intestino (C. Q. Chen et al. 2011).

La melatonina gastrointestinal proviene de diferentes fuentes incluyendo otros tejidos, bilis, flora intestinal o comida. La cantidad de la indolamina en el tubo digestivo no presenta fluctuaciones diarias, por lo que parece que el ritmo circadiano no tiene efectos en su regulación (Acuña-Castroviejo et al. 2014). Además, se ha llevado a cabo estudio en ratas pinealectomizadas mostrando que este procedimiento no influía en la cantidad de melatonina en el TGI y por lo tanto indicando que estos valores son independientes de la glándula pineal (Ozaki and Lynch 1976).

En el TGI, la melatonina presenta funciones endocrinas, paracrinas, autocrinas y luminales. En este contexto, las células EC secretan serotonina la cual estimula los plexos mioenteréricos promoviendo la secreción y la motilidad intestinal. La melatonina producida por estas células puede ser o bien liberada a la circulación o puede difundir, gracias a su alta lipofiliabilidad, a las capas externas de músculo liso actuando como antagonista de los efectos contráctiles de la serotonina y por tanto causando relajación (C. Q. Chen et al. 2011). El lugar de acción más probable en las células del músculo liso es en los receptores de membrana. La melatonina también puede regular el plexo mioentérico nervioso, el transporte transmembrana de electrolitos y iones, la cantidad de agua intestinal y la actividad mitótica (Acuña-

Castroviejo et al. 2014). A nivel de duodeno proximal, en respuesta a un estímulo neuronal, las células EC liberan melatonina, la cual se une a receptores MT2 causando la liberación de calcio y bicarbonato; esto ayuda a neutralizar el contenido ácido proveniente del estómago (Acuña-Castroviejo et al. 2014; G. A. Bubenik 2008).

Melatonina parece que presenta una variedad de funciones en los órganos anejos del TGI, incluyendo el hígado. Se han encontrado niveles de melatonina en hígado hasta 15 veces mayores que los encontrados en sangre (George A. Bubenik 2002). La melatonina intestinal se transporta vía portal hasta el hígado donde es metabolizada a 6-sulfatoxymelatonina (6-HMS) (Chojnacki et al. 2013). Los hepatocitos expresan ARNm de AA-NAT y ASMT. Claramente, la presencia de receptores de melatonina en el hígado presagia las funciones tan importantes que pueda tener en este órgano. Entre ellas, se ha documentado efectos inhibitorios en el hepatocarcinoma (Acuña-Castroviejo et al. 2014). Se ha sugerido que las altas concentraciones de melatonina encontradas en la bilis pueden prevenir el daño oxidativo a nivel del epitelio intestinal causado por los ácido biliares (George A. Bubenik 2002).

También se ha demostrado la protección del colon bajo diferentes condiciones fisiológicas, como por ejemplo su papel en la activación de mecanismo antioxidativos o la regulación del tono vascular y por tanto la modificación en la perfusión (Konturek et al. 1997). Como hemos comentado anteriormente, también se le han atribuido acciones en la regulación del transporte iónico. En el colon, la melatonina parece que juega un papel importante regulando la secreción de cloro (Cl⁻). Puede afectar la expresión de COX-2 y iNOS y modula la secreción a través de prostaglandina E2 y sodio nitroprusiato en el colon distal de rata (Chojnacki et al. 2013). Algunos de estos efectos parece que se localizan en el epitelio del colon implicando las vías cAMP, mientras que otros involucran el sistema entérico neuronal (C. Q. Chen et al. 2011).

La liberación de melatonina puede tener efectos directos en muchos tejidos GI pero también puede influir en el TGI de forma indirecta, a través del sistema nervioso central y los sistemas simpático y parasimpático. La melatonina puede prevenir la producción de úlceras en la mucosa GI a través de su acción antioxidante, reduce la secreción de ácido clorhídrico, estimula el sistema inmune, promueve la regeneración epitelial e incrementa la microcirculación. Gracias a estas propiedades únicas, puede ser considerada como tratamiento de prevención del cáncer colorrectal, la colitis

ulcerosa, las úlceras gástricas, el síndrome de intestino irritable y el cólico del niño (George A. Bubenik 2002).

4.5 MELATONINA Y CÁNCER

En las últimas décadas se ha recabado suficiente evidencia que subraya la relevancia de la melatonina en la fisiología y patología humana. Hoy en día está aceptado que la melatonina no es solo una hormona, sino que también como un protector celular, involucrado en la inmunomodulación, procesos antioxidativos y hematopoyesis (Y. Li et al. 2017)

Es reconocido que la melatonina tiene propiedades oncostáticas, a través de mecanismos dependientes de receptor e independientes de receptor (Reiter et al. 2017), en una gran variedad de tumores, especialmente en aquellos que son hormono-dependientes.

Esta indolamina posee una increíble variedad de funciones y efectos antineoplásicos muy prometedores. En particular, la melatonina inhibe varias acciones que caracterizan al cáncer debido a sus efectos antiproliferativos, citostáticos, antimetástasicos y efectos proapoptóticos contra células tumorales (Favero et al. 2018)

Los mecanismos que están involucrados en la habilidad de melatonina de de contrarrestar el crecimiento tumoral incluyen: a) efectos antioxidantes, b) regulación en la transactivación y expresión de los RE, c) control de las enzimas involucradas en la síntesis local de estrógenos, d) control del ciclo celular y la inducción de apoptosis, e) inhibición de metástasis, f) prevención de la alteración del ritmo circadiano, g) inhibición de la actividad telomerasa, h) estimulación de la diferenciación celular, i) activación del sistema inmune, j) antiangiogénesis, k) efectos epigenéticos (D. Mediavilla et al. 2010).

Los efectos de la melatonina se han estudiado en numerosos tipos de tumores, incluyendo próstata, sarcomas, cáncer colorrectal, hepatocarcinomas, melanoma, tumores neurales, carcinoma de laringe, cáncer de piel, cáncer de ovario, cáncer de mama y cáncer cervical (D. Mediavilla et al. 2010), pudiendo ser un excelente candidato en la prevención y tratamiento de estos tumores. La melatonina también ha mostrado potencial para ser utilizada como adyuvante en terapias anticáncer,

reforzando los efectos terapéuticos y reduciendo los efectos secundarios de la quimioterapia o la radiación (Y. Li et al. 2017).

Seely et al. publicó en un metaanálisis en 2012 un efecto significativamente positivo del uso de la melatonina oral, en monoterapia o en combinación con otros tratamientos, en pacientes con cáncer. Los beneficios se observaron en las tasas de supervivencia, de respuesta al tratamiento y en el perfil de toxicidad de una variedad de fármacos quimioterápicos. Se halló un incremento de la supervivencia en un año en pacientes con cáncer que además habían recibido tratamiento con melatonina. Hay que subrayar, que los resultados beneficiosos de la melatonina demostraban efectos similares en distintos tipos de cáncer. (Seely et al. 2012).

La melatonina no solo tiene la habilidad de mejorar la eficacia de muchas drogas usadas en quimioterapia, sino que también presenta efectos inhibitorios directos en células neoplásicas. Muchas publicaciones subrayan su capacidad para suprimir la proliferación de células cancerosas o para modular la expresión de los receptores de membrana de esas células, por lo tanto reduciendo la agresividad del tumor (Favero et al. 2018). Una revisión realizada por Reiter et al. sobre el papel de la melatonina como agente anticancerígeno revisa múltiples estudios los cuales utilizan melatonina como tratamiento anticancerígeno en una gran variedad de tumores con resultados prometedores (Reiter et al. 2017).

4.6 MELATONINA Y CCR

Los lugares de unión de la melatonina en el colon de humano se identificaron la mucosa/submucosa de pacientes afectados de cáncer de colon y recto (Poon, Mak, and Luk 1996). Tras esto se han realizado múltiples estudios que atribuyen a la melatonina un papel en el cáncer colorrectal. Se ha demostrado que en pacientes con cáncer colorrectal existe una disminución de los picos de secreción de melatonina como consecuencia de un descenso de la secreción nocturna (Kos-Kudla et al. 2002) Un estudio realizado en ratas pinealectomizadas observó un aumento en la proliferación de las células de la cripta en el colon, sugiriendo que las vías de la melatonina están involucradas en la carcinogénesis en el colon (Dalio et al. 2006).

Aunque no está del todo claro el mecanismo por el cual la melatonina participa el CCR, se han descrito algunos de ellos como la inhibición de la angiogénesis, la

modulación de los índices mitóticos y apoptóticos y el mantenimiento de los niveles intracelulares de glutatión. Otros mecanismos relacionados con el control de crecimiento tumoral son la modulación de los receptores de estrógenos, efectos directos en el ciclo celular, influencia en múltiples factores de crecimiento, aumento de las uniones gap y el aumento de los niveles de antioxidantes (C. Q. Chen et al. 2011). Tanto los receptores de membrana como nucleares de la melatonina se han asociado a efectos oncostáticos en el CCR, inhibiendo el crecimiento y su capacidad de invasión (León et al. 2012).

Estudios realizados *in vitro* con células HT-29 de cáncer de colon demostró que los efectos antioxidantes y antiinflamatorios de la melatonina, al cambiar el estado redox de la células y al reducir la producción de óxido nítrico, también podían verse involucrados de forma directa en las propiedades oncostáticas de la melatonina (García-Navarro et al. 2007).

Se ha demostrado que las diferencias en la agresividad del cáncer colorrectal en función del género pueden estar asociadas a una posible disminución de expresión de los receptores de melatonina. Esto parece estar relacionado con la pérdida de expresión de receptores de estrógenos (ER) α y ER β , y andrógenos (AR), muy ligados funcionalmente a la melatonina en sus efectos oncostáticos. Para ello analizaron la expresión receptores de melatonina de membrana y nucleares y receptores androgénicos (ER y AR). Se demostró un descenso en la expresión de MT1, MT2, AR, ER α y ER β en muestras tumorales versus no tumorales, lo que a su vez parece estar correlacionado con el estadio tumoral y el género (León et al. 2012).

Otro de los mecanismos que se han descrito para el efecto oncostático de la melatonina en el CCR, está relacionado con el péptido endotelina-1 (ET-1). La melatonina inhibe la expresión de ARNm del gen *end-1* y la liberación de ET-1 desde las células de CCR. La inhibición de la expresión de este gen es debido a la inactivación de los factores de transcripción FoxO1 y NF- κ β (León et al. 2014).

En un modelo *in vitro* de CCR se encontró que esta hormona era capaz de activar la apoptosis y la autofagia de las células tumorales, así como inducir la parada del ciclo celular en G1 (Y. Hong et al. 2014). Un estudio reciente demuestra que el tratamiento con melatonina, asociada a un agente quimioterápico (oxiloplatino), produce a

apoptosis en células cancerosas de cáncer colorrectal resistentes a esta droga (J. hee Lee et al. 2018).

4.7 MELATONINA Y CÉLULAS MADRE.

Ya conocemos que las CM son elementos indiferenciados dotados con propiedades de proliferación indefinida. Dependiendo de sus capacidades las CM se dividen en totipotentes, pluripotentes o multipotentes. Las CM multipotentes pueden diferenciarse en un número limitado de tejidos y suelen derivar de una monocapa germinal que está presente en casi todos los tejidos de organismos adultos y juega un rol importante en el proceso de regeneración, así como en mecanismo de homeostasis. Las CM mesenquimales (CMM) pertenecen a este último grupo, y bajo las condiciones adecuadas pueden diferenciarse en múltiples tipos celulares como osteoblastos, condrocitos o adipocitos (Luchetti et al. 2014).

Las CMM han surgido como un recurso muy prometedor para reparar tejidos y funciones de órganos. Sin embargo, también existen muchos riesgos potenciales a la hora de su aplicación clínica que incluye la escasez de células, senescencia, sensibilidad a ambientes tóxicos y su potencial tumorigénico. Los tratamientos basados en CMM son una herramienta poderosa con la cual se puede regenerar la función de un órgano a través de la secreción de citoquinas y otros mecanismos antiinflamatorios. Una vez que las CMM se han aislado del tejido u órgano original, pierden rápidamente su viabilidad bajo condiciones *ex vivo* inapropiadas. En condiciones fisiológicas, las CMM generarán, indudablemente, especies reactivas de oxígeno (ROS) para mantener la proliferación y diferenciación celular, a la vez que la oxidación de oxígeno incompleta resultará en una producción excesiva de ROS y un daño en el ADN que perjudica la función normal de las CMM a través de múltiples vías relacionadas con la apoptosis (C. Hu and Li 2019).

Entre las numerosas funciones de la melatonina, recientemente se ha propuesto el control de la supervivencia y la diferenciación de las CMM. La administración de melatonina mejora substancialmente la manipulación de CMM tanto *in vivo* como *in vitro*. Melatonina actúa como un componente de los agentes protectores de la célula y homeostáticos, los cuales protegen a las CMM de la oxidación, inflamación, apoptosis, isquemia, y envejecimiento para regular la diferenciación y protección de las CMM en

diferentes órganos y tejidos. Se han sugerido como vías reguladoras principales de estos procesos la Wnt/b-catenin, la MAPK y TGF- β (C. Hu and Li 2019; Luchetti et al. 2014; S. Zhang et al. 2017).

Las CMM son ampliamente utilizadas en el tratamiento de lesiones producidas por heridas y lesiones isquémicas de varios tejidos. La melatonina se ha aplicado para mejorar los efectos terapéuticos de las CMM a través de la anti inflamación y el estrés oxidativo.

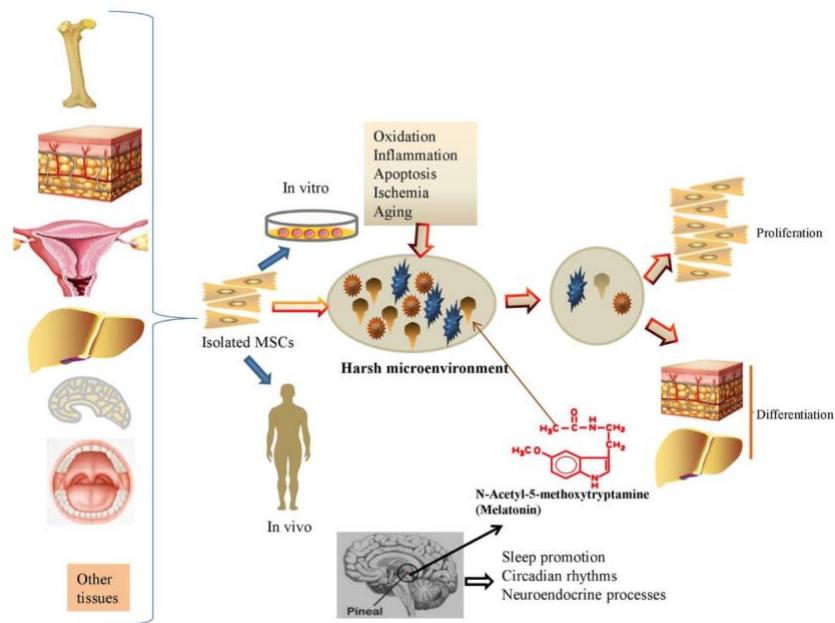


Figura 10. Melatonina emerge como un novedoso y potencial regulador de las CMM *en vivo* y *en vitro*

4.8 MELATONINA Y CMC

Hasta la fecha, pocos estudios han investigado los efectos de la melatonina y los mecanismos relacionados con las CMC. Se ha reportado que la melatonina inhibe la autorenovación y las vías de señalización de las CMC del glioma. Los efectos de la melatonina en la viabilidad, la capacidad de invasión y metástasis de las CMC del cáncer de mama, también han sido descritos a través de la regulación de la transición epitelio-mesenquimal (EMT). Un estudio reciente llevado a cabo en CMC de ovario ha demostrado que la melatonina es capaz de inhibir la proliferación y la migración de las CMC a través de la modulación de las vías de señalización PI3K y MAPK, de manera receptor-dependiente o independiente. Los resultados de este estudio sugieren que la

melatonina puede ser considerada como un importante modulador para suprimir la progresión tumoral utilizando como diana la proliferación, migración e invasión de la CMC, especialmente en pacientes con alta expresión de receptores de melatonina (Akbarzadeh et al. 2017).

En un estudio reciente, Lee et al. demuestra, que la melatonina inhibe las CMC de colon, regulando el axis PrP^c – Oct4. En especímenes de pacientes con CRC, la expresión de *cellular prion protein* (PrP^c) y Oct4 se correlacionaban significativamente con el estadio del tumor y la aparición de metástasis. El co-tratamiento con 5-Fluoracilo (5-FU) y melatonina inhibían los marcadores de CMC Oct4, Nanog, Sox2 y ALDH1A1 a través de la regulación negativa de PrP^c. De esta manera, se suprimía el crecimiento tumoral, la proliferación y la angiogénesis mediada por tumor. La disminución de la expresión de PrP^c estaba disminuída significativamente en respuesta al co-tratamiento con 5-FU/melatonina, comparado con aquellos del grupo control, tratamiento solo con 5-FU o tratamiento solo con melatonina (J. H. Lee et al. 2018).

4.9 MELATONINA Y P53

Ya conocemos que la melatonina presenta funciones oncostáticas y que una disminución de sus niveles podría llevara a la aparición de neoplasias. Por otra parte, las señales de estrés celular activan p53, desencadenando una serie de cambios celulares pudiendo llevar a las células desde un el paro transitorio del ciclo celular hasta su apoptosis.

Varias investigaciones han correlacionado a la melatonina con p53, siendo considerada mediadora de la activación de p53. Mediavilla et al. mostraron en 1999 que la melatonina incrementaba la expresión de p53 y p21^{WAF1}, *in vitro*, en células MCF-7 de cáncer de mama, inhibiendo la proliferación celular a través del paro del ciclo celular dependiente de un aumento de la expresión de p21^{WAF1}, mediado en la vía p53 (Mediavilla, Cos, and Sánchez-Barceló 1999). Años más tarde, Proietti et al. publican que la melatonina inhibe la expresión del gen MDM2, conocido por regular la actividad de p53, y aumenta los niveles de p300, el cual induce acetilación de p53. Por lo tanto, las células tratadas con melatonina presentaban un aumento tanto de p53 como de p53 acetilado así como de lo niveles de p21 (Proietti et al. 2014).

Santoro et al. en su investigación, mostraron que melatonina producía una acumulación de p53 y p21. Así mismo, observaron que inducía la fosforilación de p53 en el residuo Ser-15. En conclusión, melatonina era capaz de inducir la inhibición de la proliferación celular dependiente de p53. En el mismo estudio, se demostró que la melatonina prevenía la acumulación de daño en el DNA tanto en células normales como malignas, requiriendo de la expresión de p53, de la proteína PML (promyelocytic leukemia) y una fosforilación eficiente del p53 en el residuo Ser-15. PML está muy conectado a p53, actuando tanto como gen diana post-transcripcional de p53 y como una proteína de interacción con p53. El residuo Ser-15 se fosforila a través de la quinasa mutada de ataxia teleangiectasia (ATM) en respuesta a radiación γ , mientras que p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) conduce a la fosforilación de p53 en respuesta a la radiación UV. Cabe señalar que ATM no se requiere para la activación dependiente de melatonina de p53, sin embargo, la inhibición de la actividad de p38 MAPK afecta la capacidad de la melatonina para inducir la respuesta al ADN dañado dependiente de p53 y su habilidad para mantener la integridad del genoma. Esto lo demostraron inhibiendo la actividad de p38 MAPK, observando un deterioro muy importante en la fosforilación de p53 inducida por melatonina en el Ser-15 en células MCF-7 (R. Santoro et al. 2012).

La fosforilación en Ser-15 de p53 dependiente de melatonina a través de la cascada de p38 está a su vez mediada por los receptores de membrana acoplados a proteína G, MT1 y MT2. De hecho, tanto la inhibición química como el silenciamiento génico de estos receptores afecta a la habilidad de la melatonina para activar la fosforilación de p38 y su acumulación, y por tanto inhibiendo la fosforilación de p53. Como resultado, la ausencia de estos receptores afecta a la función de la melatonina de reducir la proliferación celular y el potencial clonogénico de las células tumorales (Raffaella Santoro et al. 2013).

HYPOTHESIS & OBJECTIVES

HYPOTHESIS AND OBJECTIVES

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer and the fourth most common cause of cancer-related death. Most cases of CRC are detected in Western countries and imposes a major health burden in developing countries (Ashokkumar et al. 2018; Mármol et al. 2017). More than 1.2 million patients are diagnosed with colorectal cancer every year, and more than 600 000 die from the disease.

The optimal approach to the diagnosis, management, and treatment of CRC involves multidisciplinary and integrated management practices. The cornerstones of therapy are surgery, neoadjuvant radiotherapy (for patients with rectal cancer), and adjuvant chemotherapy (for patients with stage III/IV and high-risk stage II colon cancer) (American Cancer Society n.d.).

CRC mortality rate have been decreasing since the 1980s. Decline in mortality can be attributed advances in surgery, patient's care, chemotherapy and screening (Brenner, Kloor, and Pox 2014; Vleugels, Van Lanschot, and Dekker 2016). In the last decade, there have been important advances in delineating the molecular basis of tumorigenesis and the genetic alterations responsible for the development of colorectal cancer (Patil et al. 2017). Advances in the understanding of the relationship between the immune system and cancer, has led to significant developments in tumor immunotherapy, including immune checkpoint inhibitors (ICIs) (Kalyan et al. 2018). ICIs reinvigorate antitumor immune responses by interrupting co-inhibitory signaling pathways and promote immune-mediated elimination of tumor cells (Darvin et al. 2018). However, despite the advances achieved in recent years, the results in patients with metastases remain insufficient and the available therapeutic options are limited.

Acquired drug resistance is one of the major reasons for failing cancer therapies. Heterogeneity of tumor tissue is highly associated with failure of conventional anticancer therapy, and it is generated by a combination of genetic and functional diversities. Tumors, as normal tissues, show cellular hierarchy, with a subpopulation of cancer cells having a tumorigenic potential much greater than that of other cancer cells. These cells comprise cancer stem cells (CSCs) and give rise to

progenitors and cells at various levels of differentiation along various lineages in a manner similar to that of normal tissue stem cells. (Yoshida and Saya 2016).

CSCs are thought to play pivotal role in tumor initiation, progression, metastasis, and its relapse (Yu et al. 2015). CSCs possess special biological properties including long-term self-renewal capacity, multi-lineage differentiation. CSCs often exhibit resistance to many conventional chemotherapeutic agents due to multiple mechanisms. As such, CSCs are considered as a major source of residual disease after therapy leading to disease occurrence (M. Yang, Liu, and Huang 2016).

Cancer stem cells in colorectal cancer are characterized by their expression of multiple markers. The increased expression of certain CSC markers in CRC has been associated with chemotherapy resistance, metastasis and worse survival (Tuy et al. 2016). Refining our understanding of the roles of these markers, such ABCG2 as an enabler of multidrug resistance and STAT3 in tumor initiation and inflammations, may lead to a better understanding of the biological pathways that currently allow for resistance to existing therapeutic agents (Munro et al. 2017).

In the last decades, a series of studies have demonstrated the oncostatic effect of melatonin, both in vivo and in vitro in different type of tumors and in human clinical trials (García-Navarro et al. 2007; Vriend and Reiter 2016).

In CRC, the mechanism by which melatonin interacts is not clear. A recent study has shown that melatonin induces p38-dependent phosphorylation of both p53 and histone H2AX (Raffaella Santoro et al. 2013). Data from our research team reveals a decreased expression of MT1, MT2, and AA-NAT in CRC in relation to gender and tumor stage (León et al. 2012, 2014).

To date, very few studies have investigated the effects of melatonin and underlying mechanisms on CSCs. The effects of melatonin on viability, invasiveness and metastasis in CSCs have also been postulated through regulation of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in breast cancer, melanoma, prostate cancer and gastrointestinal cancer (Do Nascimento Gonçalves et al. 2016).

A recent study found that melatonin inhibits colon CSCs by regulating the prion protein (PrP^C)- Oct4 axis. In specimens from patients with colorectal cancer, the expressions of PrP^C and Oct4 were significantly correlated with metastasis and tumor stages. Co- treatment with 5- fluorouracil (5- FU) and melatonin inhibited the stem cell

markers by downregulating PrP^C. The findings of this study suggest that co-treatment with anti-cancer drug and melatonin is a potential therapy for CRC (J. H. Lee et al. 2018).

MicroRNAs (miRNAs) are endogenous non-coding RNAs that complementarily bind to their target mRNA. These small RNA molecules have been well-known to negatively regulate gene expression at the post-transcriptional level. It is known that the aberrant expression of miRNAs could also involve in gene alterations, including gene mutation, methylation, and amplification. These molecules have been suggested to involve in cancer signaling pathways as tumor suppressors or oncogenes. Dysregulation of miRNAs has also been confirmed to engage in CRC development and progression. The altered expression of miRNAs has frequently been correlated with tumor staging, diagnosis, and prognosis (Moghadamnia et al. 2019). Recent findings suggest that miRNAs might be involved in the tumorigenicity and resistance to chemotherapy of CSCs. For instance, it has been suggested that overexpression of miR-215 and miR-140 could control the slow proliferation and the chemoresistance of colon cancer CSCs (Bitarte et al. 2011).

As stated above, *“The decrease expression of melatonin synthesis and signaling genes is related to the expression of CSCs in the CRC and depends on p53”*.

Therefore, the objectives of our study are:

1. To analyze the expression of CSCs markers and melatonin synthesis and signaling genes in tumor samples from CRC patients in Andalusia.
2. To investigate p53 gene mutations in CRC samples.
3. To correlate these results with other tumor and patient pathological parameters.
4. To search for additional information from public databases to find molecular connections between p53, stemness and melatonin in CRC, mainly through miRNAs.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MUESTRAS DE CCR HUMANO

Las muestras de CCR humano usadas las proporcionó la Red de Bancos de Tumores de Andalucía (RBTA). El Comité de Ética del Hospital Universitario San Cecilio (código de proyecto: PI-067/2013; fecha de aprobación: 21/01/2014) aprobó el estudio y todos los pacientes dieron su consentimiento por escrito para usar las muestras de tejido en investigaciones biomédicas. Todas las muestras fueron inmediatamente disecadas (muestras de tumor y muestras de tejido sano adyacente) y congeladas en Tissue-Tek (Optimal Cutting Temperature Compound, Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, The Netherlands) por métodos estándar. Los ARNm de AA-NAT, MT1, MT2, CD44, CD66c y Ubiquitina C (UBC) fueron evaluados en el tejido de tumor y en el tejido sano adyacente de 183 pacientes (edad media 71 ± 9 años), los cuales fueron operados de CCR esporádico (Tabla 1). En relación con el estadio del tumor (clasificados acordes con la nomenclatura TNM), las muestras se agruparon en estadios tempranos (estado I + estadio II) y avanzados (estadios III + estadios IV), ya que no se consiguieron resultados significativos al analizar cada grupo por separado. También se extrajo ADN para evaluar el estado de p53

Tabla 4. Características de los pacientes incluidos en el estudio

CARACTERÍSTICAS	N (%)
Género	
Mujeres	110 (60)
Hombres	73 (40)
Localización	
Colon	174 (95)
Recto	9 (5)
Tipo histológico	
Bien diferenciado	45 (24.4)
Moderadamente diferenciado	113 (61.6)
Pobremente diferenciado	25 (14.0)
Estado pTNM	
Estadio I	23 (12.4)
Estadio II	73 (39.9)
Estadio III	74 (40.4)
Estadio IV	13 (7.3)

2. AISLAMIENTO DE ARN Y SÍNTESIS DE ADNc

El ARN total de las muestras de tejido, se preparó usando el RNeasy Mini Kit (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del kit. Para ello, los tejidos se homogeneizaron en 500 μ l de tampón RLT. Posteriormente, al producto de lisis se le añadieron 500 μ l de etanol al 70%. Seguidamente, se transfirieron 700 μ l de la mezcla a una mini columna con un tubo recolector de 2 ml y se centrifugó durante 15 segundos a 10,000 rpm. Seguidamente, la columna se lavó con 700 μ l de tampón RW1 y mediante centrifugación durante 15 segundos a 10,000 rpm. Después, se realizó un segundo lavado con 500 μ l de tampón RPE (al 80% de etanol) y centrifugación durante 15 segundos a 10,000 rpm. Por último, el ARNm retenido en la columna se eluye con 30-50 μ l de agua ultra-pura mediante centrifugación durante 1 minuto a 10,000 rpm.

La cantidad de ARN total se determinó por espectrofometría UV en un nanodrop (IMPLEN).

El ADNc de cadena simple se preparó mediante transcripción inversa con cebadores o primers oligo-dT, utilizando 2 μ g del total de ARN en 50 μ l de volumen total y empleando un kit comercial (AccuScript™ High Fidelity 1st Strand cDNA Synthesis Kit, Stratagene, San Diego, CA, USA).

3. PCR EN TIEMPO REAL (RT-PCR)

Unos 5 μ l de ADNc se amplificaron durante 40 ciclos con primers específicos para AA-NAT, MT1, MT2, CD44, CD66c y UBC (Tabla 2). Las reacciones de PCR que contienen la molécula SYBR-green fueron amplificadas usando el Mx3000P QPCR System (Stratagene, Austin, TX, USA). El gen UBC se utilizó como housekeeping para normalizar los niveles de ARNm. Se generaron curvas estándar para cada uno de los genes de estudio mediante el trazado de los valores de Ct frente a diluciones de ADNc conocidas. Después de cada experimento se realizó electroforesis en gel de agarosa de cada muestra, para descartar los productos de PCR no específicos y los dímeros de los primers.

Tabla 5. Cebadores utilizados en el estudio

GEN	CEBADOR SENTIDO	CEBADOR ANTISENTIDO	TAMAÑO (PB)
MT1	ttgtcctttttgccatttctgggctctc	gtcatcagtgagacggttccatttaacc	289
MT2	gtgggttttgatctttgccatctgctgg	agcatctgcctggtgctgcacaccaatgat	321
ROR α	ttgtactgatgtcagcagatcgctcatggc	gctggctcaaattctgaagtgaacaactcc	277
AA-NAT	tccctgccagtgagtttcgctgctcac	tgtcccagagcgagccgatgatgaaggc	206
ASMT	catgactgggcagacggaaa	gtagttccaggtcacaagaaacagtt	300
UBC	tgggatgcaaatcttctggaagaccctgac	accaagtgcagagtgactctttctggatg	213

4. EXTRACCIÓN DE ADN

El ADN de las muestras se aisló utilizando el kit QIAamp ADN mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), según las instrucciones del fabricante. El ADN fue cuantificado en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Implen GmbH, Munich, Germany) y analizado por electroforesis en gel de agarosa. Las ratios 260/280 oscilaron del 1.7 al 2.0, indicando una calidad aceptable de las muestras.

5. DETERMINACIÓN DE LAS MUTACIONES DE P53

Se analizaron las muestras de tejido por PCR en busca de mutaciones de TP53 en los exones 2-10, usando primers específicos (Tabla 3). Se realizó secuenciación de ADN automática de los productos de PCR usando un analizador genético 3130XL y se evaluaron con Sequence Scanner v1.0 software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Este proceso lo podemos dividir en distintas etapas:

5.1 Extracción de ADN (descrito anteriormente).

5.2 Amplificación de ADN con primers que flanquean los exones en regiones intrónicas.

- Diseño de los primers para amplificación: El gen p53 tiene 26204 nucleótidos (11 regiones exónicas y 12 intrones que lo flanquean). El exón 1 (5001-5169) codifica la región UTR5' del ARNm y el intrón que lo separa del siguiente exón es de gran tamaño. El Exón 11 (22856-24144) incluye la UTR3', la cual es de

gran tamaño. Estas regiones no han sido secuenciadas. Los primers para la secuenciación del resto de exones se muestran en la tabla 3.

Tabla 6. Primers utilizados para la secuenciación de p53

Exons	Primers		Product Size (pb)
	Sense	Antisense	
2-4	agctgtctcagacactggcatggtgttg	cactgacaggaagccaaagggtgaagagg	840
5-6	gttgctttatctgttcacttgtgccctgac	tagggaggtcaatatagcagcaggagaaag	548
7-9	cagcctgggagcagagcgagattccatc	aaccaggagccattgtctttgaggcatcac	987
10	tacttgaagtgcagtttctactaaatgcatg	Aggaagactaaaaaatgtctgtgcagggc	393

Para cada exón amplificamos un segmento variable de los intrones que lo flanquean. Para cada caso hemos elegido la región intrónica que mejor cumple los criterios considerados adecuados por la comunidad científica (no formación de dímero ni estructuras secundarias, repeticiones y números de nucleótidos, alta temperatura de hibridación, etc) y que está próxima a los exones. Propuestas las parejas de exones, las evaluamos utilizando el programa primer 6 para asegurarnos que cumplen su función con la máxima eficacia y que son admisibles termodinámicamente.

- Condiciones de PCR: las PCRs se realizaron en un termociclador tipo 2720 Thermal de Applied Biosystems utilizando el kit de amplificación de Taq PCR ADN Polymerase, según instrucciones del proveedor. Para ellos, se añadieron 20 ng de ADN purificado y 5 μ l de primer, quedando a una concentración final de 0.1 μ M para un volumen final de 30 μ l. Al producto final de la PCR se midió la concentración de ADN mediante espectofotómetro y se analizaron 5 μ l en un gel de agarosa para comprobar la correcta amplificación y pureza del fragmento de PCR. Finalmente, se congeló a -20o hasta su procesamiento para la secuenciación.

5.3 Secuenciación de los exones

La secuenciación requiere un ADN muy puro, por ello, previo al procedimiento de secuenciación se purificaron los productos de PCR en microcolumnas de Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System. Tras la purificación, la secuenciación se realizó mediante el procedimiento de secuenciación cíclica con BigDyeTerminator v3.1 y electroforesis multicapilar 3130XL GeneticAnalyzer. Los datos fueron analizados con el programa Sequence scanner v1.0 y7 o Chronas lite.

Las mutaciones detectadas se confirmaron mediante dos amplificaciones y reacciones independientes. Se consultó la base de datos IARC p53 (<http://www.p53.iarc.fr/>), la cual describe la actividad de cada proteína de p53 codificada por la mutación puntual de un único nucleótido (Leroy et al. 2013).

Las mutaciones de p53 con una actividad transcripcional media >75% fueron clasificadas como wild-type para el cálculo. Una actividad transcripcional media <75% fue considerada como parcialmente funcional y por lo tanto clasificada como mutación para el cálculo (Pietrantonio et al. 2014).

6. WESTERN BLOTTING

Las células se despegaron mediante raspado mecánico y se lavaron con una disolución de PBS a 4°C. Posteriormente se resuspendieron en 50 µl de tampón de lisis por cada 500.000 células (tampón RIPA e inhibidores de fosfatasa y proteasas), durante 30 minutos a 4°C. Los restos membranosos y de ADN se eliminaron por centrifugación y en el sobrenadante se cuantificaron la concentración de proteínas mediante el método de Bradford. Una vez igualada la concentración a 50 µg para cada muestra, se añadió tampón de carga de proteínas (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 6M urea, 6% β-mercaptoetanol, 3DS, 0.003% azul de bromofenol) y las muestras se calentaron a 95°C durante 3-5 minutos. Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida para separar las proteínas, que después se transfirieron a una membrana de PVDF (Immobilon, Millipore) mediante la técnica de transferencia semiseca con el sistema Trans-Blot SD (Bio-Rad) a 100 mA durante 45 minutos. Para

disminuir la fijación inespecífica de anticuerpos, la membrana fue bloqueada con una solución de leche en polvo al 5% en tampón TBS al 0.1% de Tween-20 durante 30 minutos y posteriormente incubada durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo correspondiente para MT1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA), MT2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), AA-NAT (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), CD44 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), CD66c (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) y β -actin (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). La inmunorreactividad fue evaluada en un sistema de autoradiografía electroquimoluminiscente mejorada (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK).

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los niveles de ARNm en muestras de tejido tumorales fueron normalizados usando los niveles en muestras de mucosa normal del mismo paciente y se compararon utilizando el test de la t de Student para muestras pareadas. La correlación de Pearson fue usada para expresar los resultados de la correlación de análisis. El análisis bivalente se realizó utilizando el test de Chi², el test exacto de Fisher y el test de Mantel-Haenszel. El valor de detención entre niveles bajos y altos de expresión se definió como la mediana del nivel de expresión ARNm para cada uno de los genes analizados. Los valores de *p* menores de 0.05 fueron considerados significativos. Todos los cálculos estadísticos fueron realizados utilizando el software SPSS versión 15.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Los detalles del conjunto de datos TCGA se han publicado anteriormente (Muzny et al. 2012). Los datos fueron recuperados usando el cBioPortal (<https://www.cbioportal.org/>). Para el perfil genómico y transcripcional, el ADN y el ARN se aislaron de las muestras y se hibridaron con las plataformas Affymetrix SNP 6.0 e Illumina HT-12 v3 como se describió anteriormente. Para los datos de expresión de ARNm, se analizó la expresión relativa de un gen individual en pacientes con cáncer colorrectal y en una población de referencia. El valor devuelto indica el número de desviaciones estándar de la media de expresión en la población de referencia (Z score).

RESULTADOS

RESULTADOS

1. MUTACIONES DE P53 EN EL CCR

El análisis de secuenciación de p53 fue satisfactorio en las 183 muestras. Se detectaron mutaciones de p53 en 76 pacientes (42%). Las mutaciones están caracterizadas en la Tabla 7. La frecuencia de las mutaciones de p53 fue diferente entre los estadios tumorales (estadio I + estadio II, y estadio III y estadio IV; $p = 0.025$) siendo mayor en los estadios avanzados de la enfermedad (Tabla 8). Esta frecuencia fue casi significativa cuando se consideró el grado de diferenciación del tumor (diferenciado, moderadamente diferencia y pobremente diferenciado; $p = 0.095$) pero no se encontraron diferencias entre la localización anatómica del tumor (proximal, distal o rectal; $p = 0.437$).

Tabla 7. Mutaciones de p53

Tipo de mutación de p53	Números de paciente con la mutación	Exon
c.375G>A (p?)	1	4
c.404G>T (p.C135F)	2	5
c.422G>A (p.C141Y)	1	5
c.423C>G (p.C141W)	1	5
c.438G>A (p.W146X)	1	5
c.455C>T (p.P152L)	2	5
c.481G>T (p.A161S)	1	5
c.488A>G (p.Y163C)	4	5
c.510G> (p.T170X)	1	5
c.517G>T (p.V173L)	2	5
c.515T>G (p.V172G)	1	5
c.520A>T (p.R174W)	1	5
c.524G>A (p.R175H)	8	5
c.526_52del (p.C176X)	1	5
c.527G>T (p.C176F)	1	5
c.536A>G (p.H179R)	1	5
c.584T>C (p.I195T)	1	6
c.632C>T (p.T211I)	1	6
c.637C>T (p.R213X)	5	6
c.659A>G (p.Y220C)	1	6
c.672+2T (p ?)	1	Intron 6 ^b
c.713G>A (p.C238Y)	2	7
c.733G>A (p.G245S)	4	7
c.734G>A (p.G245D)	2	7
c.742C>T (p.R248W)	2	7
c.743G>A (p.R248Q)	4	7
c.745A>T p.R249W	1	7
c.757_75del (p.T253X)	1	7
c.775G>T (p.D259Y)	1	7
c.783-1G (p?)	1	Intron 7 ^b
c.797G>A (p.G266E)	1	8
c.811G>A (p.E271K)	2	8
c.814G>A (p.V272M)	2	8
c.817C>T (p.R273C)	4	8
c.818G>A (p.R273H)	5	8
c.818G>C (p.R273P)	1	8
c.844C>T (p.R282W)	2	8
c.853G>A (p.E285K)	1	8
c.919+1G (p?)	1	Intron 8 ^b
c.904G>T (p.G302W) ^a	1	8

Para documentar las mutaciones, hemos seguido las recomendaciones que proporciona la Human Gene Variation Society (HGVS).

^aMutación fue considerada y calculada como wild type debido a una actividad de transactivación >75%

^bTres mutaciones, aunque localizadas en intrones, se les precedía efecto en splicing y fueron clasificadas como mutaciones.

Table 8. Covariantes pronósticas

	TP53 wild-type % (n)	TP53 mutado % (n)	P-value
Género			
Hombre	62.0 (66)	63.2 (48)	0.893
Mujer	38.0 (41)	36.8 (28)	
Grado de diferenciación			
Bien diferenciado	16.8 (18)	35.5 (27)	0.095
Moderadamente diferenciado	69.1 (74)	51.3 (39)	
Pobrememente diferenciado	14 (15)	13.2 (10)	
Estadio			
Estado I+II (Temprano)	59.8 (64)	33.3 (32)	0.025
Estadio III+IV (Avanzado)	40.2 (43)	57.9 (44)	
Localización			
Proximal	47.7 (51)	38.2 (29)	0.437
Distal	47.7 (51)	56.6 (43)	
Rectal	4.6 (5)	5.2 (4)	

Las asociaciones significativas se han presentado en negrita ($p < 0.05$).

2. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA ARILALQUILAMINA-N-ACETILTRANSFERASA (AA-NAT), MT1, Y MT2 EN MUESTRAS DE CÁNCER COLORRECTAL (CCR) HUMANO CON DIFERENTES ESTADOS DE P53.

A continuación, evaluamos la expresión de AA-NAT, MT1 y MT2 en nuestra cohorte de pacientes. En todos los pacientes, la expresión en muestras de tumor versus muestras de mucosa normal fue menor de uno para AANAT, MT1 y MT2 (0.39 ± 0.06 , 0.31 ± 0.03 , and 0.36 ± 0.05 , respectivamente), lo cual indica que su expresión disminuye en muestras de tumor versus mucosa normal, como se ha publicado previamente en otros estudios (León et al. 2012, 2014; Nemeth et al. 2011). Considerando el estado de p53, la expresión de AA-NAT, MT1 y MT2 fue menor en pacientes con p53 mutado (mtp53) que en pacientes con p53 no mutado o wild type (wtp53) ($p < 0.05$, $p < 0.01$, and $p < 0.05$, respectivamente) (Figura 11A). La expresión proteica de AA-NAT, MT1 y MT2 fue mayor en de mucosa normal que en muestras de tumor con wtp53 y se detectó muy débilmente en tumores mtp53 (Figura 11B)

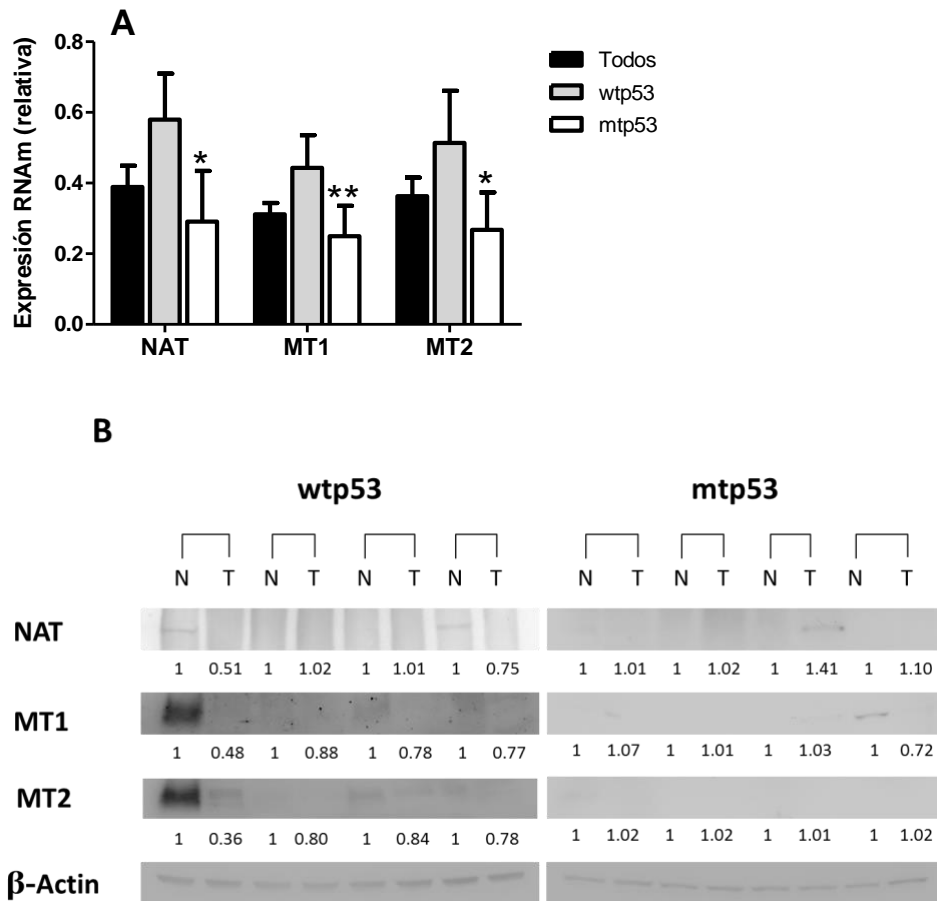


Figura 11. (A) Expresión del ARNm de arilalquilamina-N-acetiltransferasa (AA-NAT), MT1 y MT2 en todos los pacientes, pacientes con tumores wtp53 y pacientes con tumores mtp53. Los datos representan la media \pm S.E.M. * $p < 0.05$ versus wtp53; ** $p < 0.01$ versus wtp53; **(B)** La expresión proteica de AA-NAT, MT1 y MT2 en muestras de colon normales (N) y tumorales (T) en cuatro pacientes con wtp53 y cuatro pacientes con mtp53.

Cuando estratificamos por estadio tumoral y estado de p53, la expresión de AA-NAT disminuye significativamente ($p < 0.05$) en estadios avanzados versus estadios tempranos (Figura 12A), mientras que la expresión de MT1 y MT2 no cambió en todos los pacientes (Figura 12B, C). En tumores wtp53, se encontraron diferencias en los niveles de expresión de AA-NAT ($p < 0.05$) y MT2 ($p < 0.05$) entre tumores en estadios tempranos y avanzados (Figura 12A, B). Sin embargo, no se encontraron cambios significativos en la expresión de AA-NAT, MT1 y MT2 entre tumores en estadios tempranos y avanzados de muestras con mtp53 (Figura 12). Cuando comparamos la

expresión genética en el mismo estadio tumoral, encontramos que los niveles de expresión de AA-NAT, MT1 y MT2 disminuyen significativamente en estadios tempranos de tumores mtp53 versus estadios tempranos de tumores wtp53 ($p < 0.05$) (Figura 12A-C).

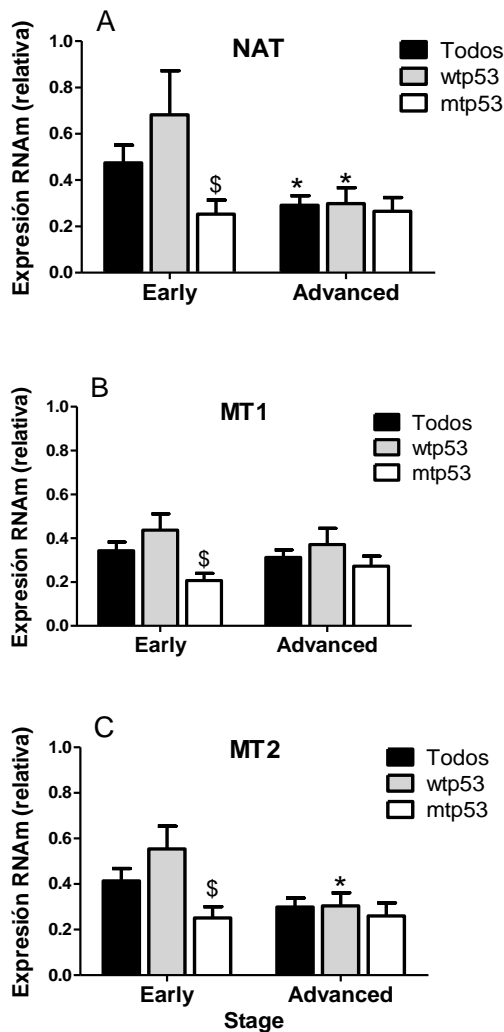


Figura 12. Expresión de (A) AA-NAT; (B) MT1 y (C) MT2 en estadios tempranos (estadio I + estadio II) versus avanzados (estadio III + estadio IV) de tumores colorrectales considerando el estatus de p53. Los datos representan la media \pm S.E.M. * $p < 0.05$ versus tempranos; \$ $p < 0.05$ versus wtp53.

3. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES DE CÉLULAS MADRES CANCEROSAS (CMC) EN MUESTRAS DE CCR HUMANO CON DIFERENTES ESTADOS DE P53.

Evaluamos la expresión de CD44 y CD66c como marcadores de células madres cancerosas (CMC). En el CCR, la expresión de CD44 y CD66c está aumentada (Gemei et

al. 2013a; Wielenga et al. 1993). Sin embargo, su regulación por p53 no está clara o no ha sido descrita (Gemei et al. 2013a; Zeilstra et al. 2013). En nuestro estudio, la expresión relativa de CD44 y CD66c fue 6.10 ± 0.07 y 2.42 ± 0.01 , respectivamente, lo cual indica una mayor expresión en muestras de tumor que en muestras de tejido normal. De manera interesante, la expresión de ambos marcadores era significativamente mayor ($p < 0.01$ en ambos casos) en muestras de tumor con wtp53 que con mtp53 (Figura 13A). La expresión proteica de CD44 y CD66c era mayor en muestras de tumor con wtp53 que en muestras de tejido normal, y esta expresión era débil en muestras de tumor mtp53 (Figura 13B).

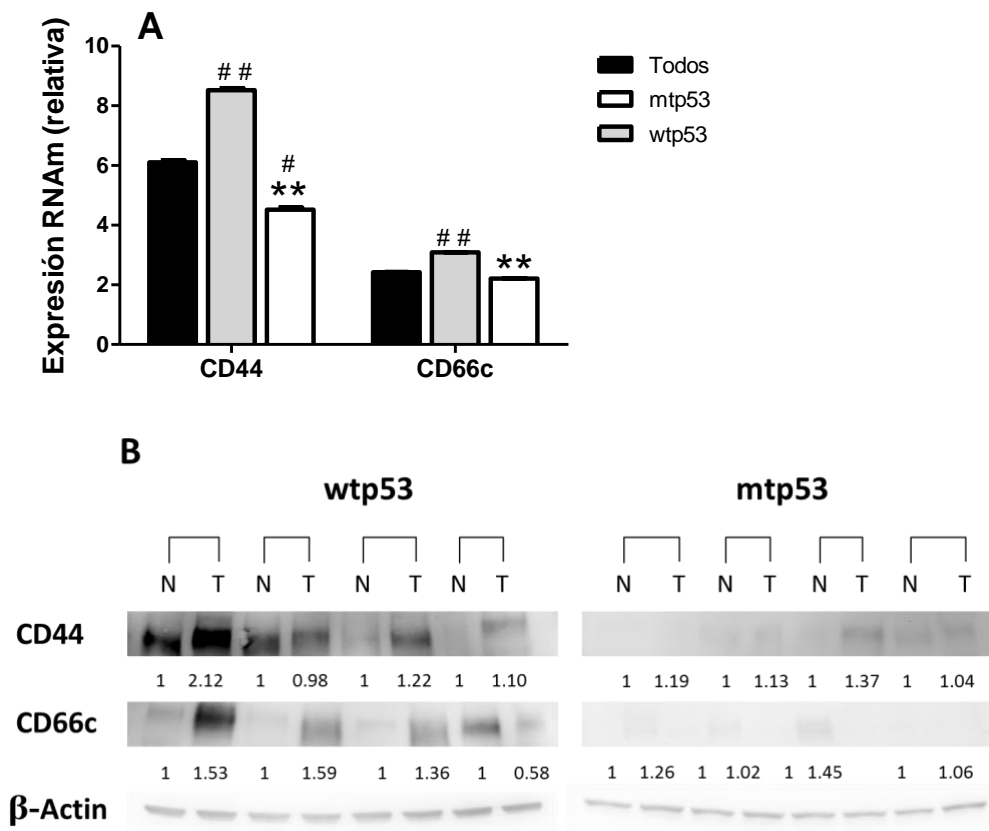


Figura 13. (A) expresión relativa de ARNm de CD44 y CD66c en todos los pacientes, pacientes con tumores wtp53 y pacientes con tumores mtp53. Los datos representan la media \pm S.E.M. ** $p < 0.01$ versus wild-type; # $p < 0.05$ versus todos los pacientes; ## $p < 0.01$ versus todos los pacientes; (B) Expresión proteica de CD44 y CD66c en muestras de colon normal (N) y cancerosa (T) en cuatro pacientes con tumores wtp53 y cuatro pacientes con tumores mtp53.

La expresión de CD44 estaba aumentada en tumores en estadios avanzados comparada con aquellos en estadio temprano e independientemente del estatus p53. Sin embargo, la expresión de CD66c fue similar en ambos estadios de la enfermedad, también independientemente del estatus de p53 (Figura 14). Cuando comparamos la expresión de CD44 y CD66c en el mismo estadio tumorales, se encontró que la expresión de CD44 disminuía en tumores mtp53 comparado con tumores wtp53 en estadio tempranos ($p < 0.05$) y que la expresión de CD66c disminuía en tumores mtp53 comparado con tumores wtp53 en estadios avanzados de la enfermedad ($p < 0.05$) (Figura 14A, B).

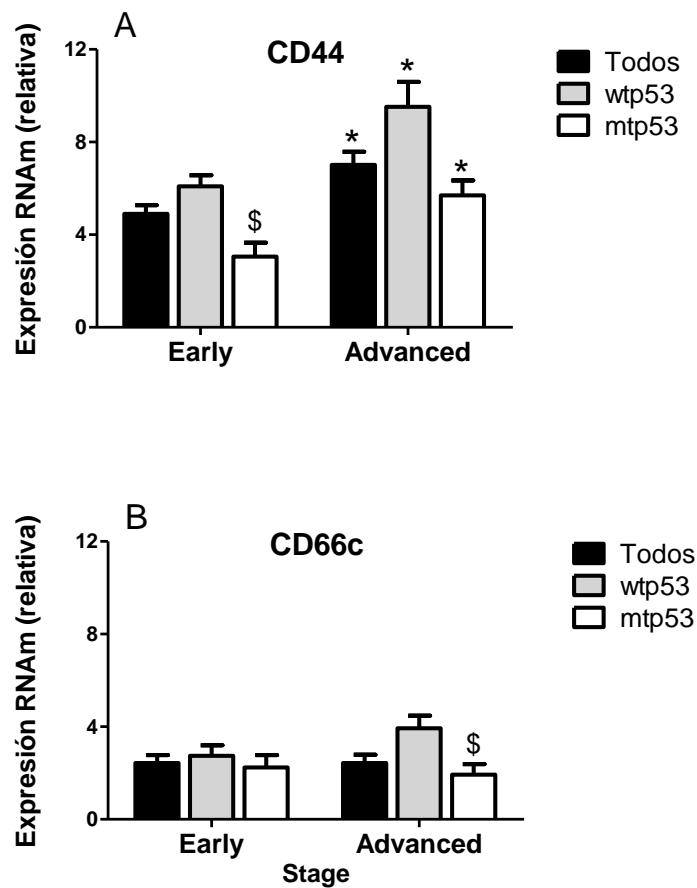


Figura 14. Expresión relativa de (A) CD44 y (B) CD66c en estadios tempranos de CRC (I + II) comparado con estadios avanzados (III + IV) considerando el estatus de p53. Los datos representan la media \pm S.E.M. * $p < 0.05$ versus tempranos; \$ $p < 0.05$ versus wtp53.

4. CORRELACIÓN ENTRE LOS MARCADORES DE CMC Y LOS GENES RELACIONADOS CON LA SÍNTESIS Y SEÑALIZACIÓN DE MELATONINA EN EL CÁNCER COLORRECTAL (CCR)

El análisis de la expresión del ARN m de AA-NAT, MT1, MT2, CD44, y CD66c de acuerdo al estadio tumoral y al estatus de p53 reveló una correlación significativamente negativa entre CD44 y AA-NAT en tumores en estadios avanzados independientemente del estado de p53, aunque se encontró una correlación mayor en tumores wtp53. La expresión de CD44 también se relacionó con MT2 solo en estadios avanzados y tumores wtp53 y con MT2 en estadios avanzados y tumores mtp53 (Figura 15). Se halló también una correlación negativa entre CD66c y AA-NAT tanto en tumores en estadios tempranos como avanzados, pero solo en tumores wtp53, y entre CD66c y MT2 en estadios avanzados, solo en tumores wtp53 (Figura 16).

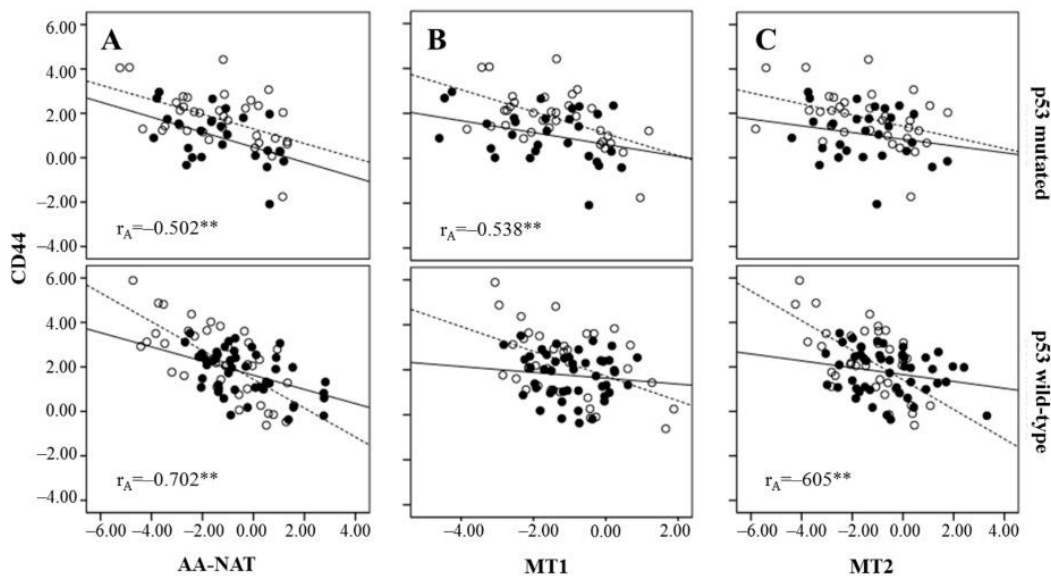


Figure 15. Correlación de la expresión de CD44 y la expresión de AA-NAT (A), MT1 (B), y MT2 (C), estratificación según estatus de p53 (wild-type o mutado) en tumores en estadio temprano (—) y tumores en estadio avanzados (. . . .). Coeficiente de correlación de Pearson: rE (tumores en estadio temprano) and rA (tumores avanzados). ** p < 0.01.

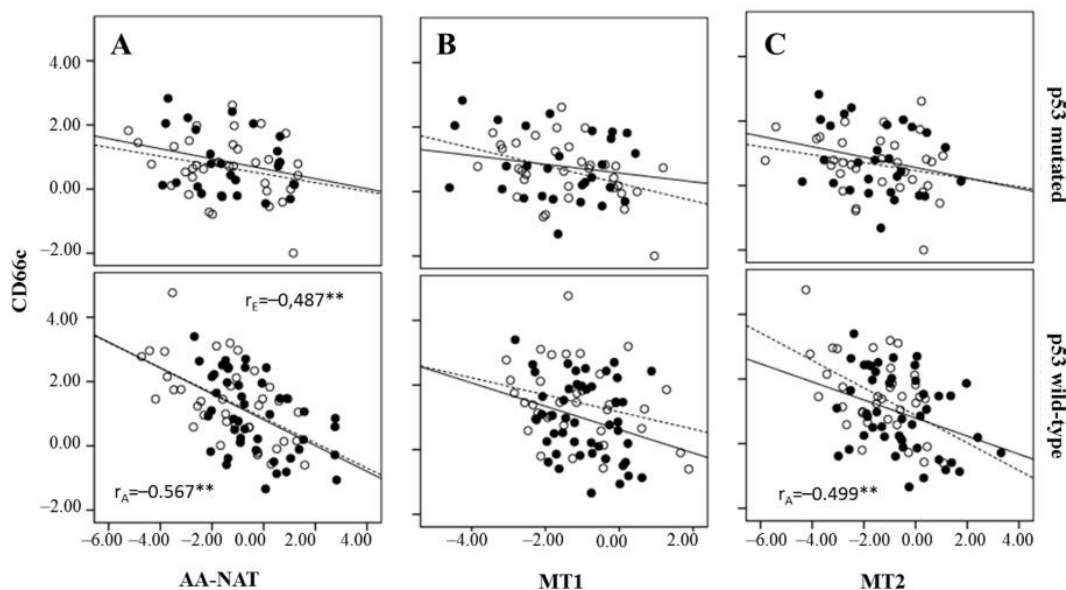


Figura 16. Correlación entre la expresión CD66c y la expresión de AA-NAT (A), MT1 (B) y MT2 (C), estratificación según estatus de p53 (wild-type o mutado) en tumores en estadio temprano (—) y tumores en estadio avanzados (. . .). Coeficiente de correlación de Pearson: rE (tumores en estadio temprano) and rA (tumores avanzados). ** p < 0.01.

En nuestra de cohorte de pacientes, el 32.2% (n = 59) de los tumores mostraron alta expresión de ambos marcadores CD44 y CD66c y fueron designados como CD44_{high}CD66c_{high}, mientras que el 21.9% de los tumores mostraron una expresión baja para ambos marcadores y fueron designados como CD44_{low}CD66c_{low}. Los tumores CD44_{high}CD66c_{high} se correlacionaron con una baja expresión de AA-NAT y MT2, en tumores wtp53 y estadios avanzados de la enfermedad (Mantel-Haenszel test, p < 0.01 en ambos casos) (Tabla 9).

Tabla 9. Relación entre los marcadores de CMC y los genes relacionados con la síntesis y señalización de melatonina, según el estado de p53 y la progresión de la enfermedad.

	P53 wild-type						
	Estadios Tempranos			P ^a	Estadios Avanzados		
	CD44 _{low} CD66c _{low} n (%)	CD44 _{high} CD66c _{high} n (%)	CD44 _{low} CD66c _{low} n (%)		CD44 _{high} CD66c _{high} n (%)	P ^a	
NAT^b							
<i>Low</i>	7 (63.6)	17 (89.5)	ns	4 (40.0)	16 (80.0)	0.045	
<i>High</i>	4 (36.4)	2 (10.5)		6 (60.0)	4 (20.0)		
MT1							
<i>Low</i>	11 (91.7)	19 (95.0)	ns	7 (77.8)	18 (90.0)	ns	
<i>High</i>	1 (8.3)	1 (5.0)		2 (22.2)	2 (10)		
MT2^c							
<i>Low</i>	8 (66.7)	17 (85.0)	ns	4 (44.4)	20 (100.0)	0.001	
<i>High</i>	4 (33.3)	3 (15.0)		5 (55.6)	0 (0.0)		
	P53 mutato						
	Estadios Tempranos			P ^a	Estadios Avanzados		
	CD44 _{low} CD66c _{low} n (%)	CD44 _{high} CD66c _{high} n (%)	CD44 _{low} CD66c _{low} n (%)		CD44 _{high} CD66c _{high} n (%)	P ^a	
NAT^b							
<i>Low</i>	6 (75.0)	4 (80.0)	ns	4 (40.0)	10 (83.3)	ns	
<i>High</i>	2 (25.0)	1 (20.0)		6 (60.0)	2 (16.7)		
MT1							
<i>Low</i>	9 (100.0)	5 (71.4)	ns	7 (77.8)	11 (100.0)	ns	
<i>High</i>	0 (0.0)	2 (28.6)		2 (22.2)	0 (0.0)		
MT2^c							
<i>Low</i>	7 (77.8)	6 (85.7)	ns	6 (66.7)	9 (81.8)	ns	
<i>High</i>	2 (22.2)	1 (14.3)		3 (33.3)	2 (18.2)		

^aAnálisis Bivariante: valor de P calculado por el test de χ^2 o test de Fisher's

^bMantel-Haenszel test: P \leq 0.005.

^cMantel-Haenszel test: P \leq 0.01.

5. RESULTADOS OBTENIDOS DE BASES DE DATOS PÚBLICAS

En primer lugar, se ha realizado una búsqueda bibliográfica para conocer miARNs relacionados con CCR y p53 (Tabla 10).

Tabla 10. miARNs analizados en bases de datos públicas

miARN	REFERENCIA
mir-195, mir-497	(Poel et al. 2019)
mir-34a, miR-143, miR-153, miR-27a, miR-218, miR-520	(J. Gao et al. 2015; Hahn et al. 2013; Hahn and Hermeking 2014; Hiyoshi et al. 2015; Jiang and Hermeking 2017; Kaller and Hermeking 2016; N. H. Kim et al. 2013; Krajewska, Fichna, and Mosińska 2018; M. Lai et al. 2015; W. Li et al. 2015; Moradi Marjaneh et al. 2019; Öner et al. 2018; Rokavec et al. 2014; Rokavec, Bouznad, and Hermeking 2019; Rudolf, John, and Cervinka 2012; Vogt et al. 2011; Lihua Wang et al. 2016; J. Wu et al. 2012; Xi et al. 2006)
miR-21, miR-31, miR-20a, miR-133b, and miR-145, miR-135b, let-7g	(X. Lai and Friedman 2017; Moghadamnia et al. 2019; Peng et al. 2014; Xi et al. 2006)
miR-1249	(Chen et al. 2019)
miR-128	(T. Zhou et al. 2018)
miR-944	(Kim et al. 2019)
miR-221	(Pu et al. 2010; Xi et al. 2006; Youssef et al. 2018)
miR-429	(Mo et al. 2018)
miR-663a	(Tian et al. 2018)
miR-552	(Kwak et al. 2018)
miR-150-5p, miR-196b-5p	(Slattery et al. 2019)
miR-18a-5p, miR-135b-5p, miR-21-5p, miR-375, miR-133b	(Falzone et al. 2018)
miR-211	(Cai et al. 2012; Chang et al. 2018; K. Liu et al. 2013)
miR-1246	(Cooks et al. 2018)
miR-495	(Bai et al. 2018)
miR-215-5p	(Karaayvaz et al. 2011; Vychytilova-Faltejskova et al. 2017)
miR-196b, miR-466, miR-296, miR-592, miR-1247, miR-1275, miR-3131, miR-10b, miR-146a, miR-155, miR-615, miR-625, and miR-1293	(W. Hu et al. 2018; Xi et al. 2006)
miR-6883-5p, miR-149*, miR-6785-5p, and miR-4728-5p	(Lulla et al. 2017)
miR-214	(Chandrasekaran et al. 2017)
miR-124	(K. Liu et al. 2013, 2017)
miR-338-3p	(Han et al. 2017)
miR-200c	(Chen et al. 2014; Xi et al. 2006; Ye et al. 2017)
miR-141	(Long et al. 2017)
miR-30e	(Laudato et al. 2017)
miR-140-3p	(Song et al. 2009; Tang et al. 2017)
miR-600	(Zhang et al. 2017)
miR-503-5p	(Xu et al. 2017)
miR-29c-3p	(Chen et al. 2017)
miR-34b/c	(Hiyoshi et al. 2015; Jiang and Hermeking 2017; N. H. Kim et al. 2013; Xiao Lan Li et al. 2015; Toyota et al. 2008; Vogt et al. 2011; S. Yang et al. 2015)
miR-374b	(Gong et al. 2017)
miR-129, mir-145, let-7c	(Lee et al. 2013; Yan et al. 2016)
miR-23a, miR-92a, miR-1246	(Lai and Friedman 2017)
miR-300	(Lin Wang and Yu 2016)
miR-145	(Kamatani et al. 2013; Pagliuca et al. 2013; P. Yang

	et al. 2017)
miR-143	(Arora et al. 2016; Kamatani et al. 2013; Pagliuca et al. 2013)
miR-27a	(Maqbool, Lone, and Hussain 2016; Xi et al. 2006)
miR-370	(Zeng et al. 2016)
miR-139-5p	(Cao et al. 2016)
miR-1827	(Zhang et al. 2016)
miR-126	(Ebrahimi et al. 2015)
miR-203	(Funamizu et al. 2015)
miRNA-146a, miRNA-147b, and miRNA-1288	(Shen et al. 2015)
miR-520g	(Zhang et al. 2015)
miR-96	(F. Gao and Wang 2015; S. A. Kim et al. 2015)
miR-135b	(Aslam et al. 2015)
miR-339-5p	(Zhang et al. 2014)
miR-1915	(Nakazawa, Dashzeveg, and Yoshida 2014)
miR-148b	(G. Wang et al. 2015)
miR-103	(Benderska and Schneider-Stock 2014; Z. Hong et al. 2014)
miR-15a, miR-16-1	(Shi et al. 2014)
Let-7a	(N. H. Kim et al. 2013; Luu et al. 2013; Xi et al. 2006)
miR-16	(Cui et al. 2013; Ma et al. 2013)
miR-7	(Xi et al. 2006; N. Zhang et al. 2013)
miR-186, miR-216b, miR-337-3p, and miR-760	(S. Y. Kim, Lee, and Bae 2012)
miR-128a and miR-449a	(Rudolf, John, and Cervinka 2012)
miR-502	(Zhai et al. 2013)
miR-194	(Sundaram et al. 2011)
miR-22	(Jian Li et al. 2011; Tsuchiya et al. 2011; Xi et al. 2006)
miR-125b	(Nishida et al. 2011)
miR-192/miR-215	(Boni et al. 2010; Braun et al. 2008; Rokavec, Bouznad, and Hermeking 2019)
miR-23b, miR-183, miR-19b, miR-181a/b, miR-151, miR-26a, miR-132, miR-339, miR-92, miR-423, miR-422b, miR-372, miR-328, miR-331, miR-30a-3p, miR-320, miR-30d, miR-30c, miR-30b, miR-99b, miR-103, miR-100, miR-107, miR-125b, miR-10a, miR-326	(Xi et al. 2006)

Utilizando la base de datos The Cancer Genome Atlas (TCGA) (Muzny et al. 2012), se han extraído datos de pacientes que cumplan los mismos criterios de inclusión mencionados anteriormente en la base creada por nosotros. En estas condiciones, se han analizado los datos provenientes de 275 pacientes.

Se han buscado correlaciones significativas entre los miARN de la tabla anterior con los genes de nuestro estudio. Aunque se han analizado los miRNAs descritos en la

bibliografía, en la tabla 11 solo se han incluido aquellos que han dado algún tipo de resultado significativo en la correlación en al menos dos genes al mismo tiempo.

Tabla 11. Correlaciones significativas entre los genes de nuestro estudio y miARNs, según el estado mutado o salvaje de p53

miARN	P53 wild-type					P53 mutado				
	MT1	MT2	AANAT	CD44	CD66c	MT1	MT2	AANAT	CD44	CD66c
<i>miR-195</i>								0.423 0.011		0.471 0.004
<i>miR-27a</i>			0.252 0.026		0.270 0.017					
<i>Mir-552</i>	-0.396 0.006				0.447 0.003					
<i>miR-150</i>			0.231 0.042	0.409 <0.001				0.341 0.045	0.384 0.023	
<i>MiR-375</i>	0.288 0.011				-0.340 0.002					
<i>MiR-146a</i>						0.377 0.001			0.314 0.005	
<i>MIR-155</i>	0.325 0.034		0.360 0.018	0.343 0.014				0.384 0.001	0.352 0.002	
<i>MIR-140-3P</i>			0.376 0.013	0.359 0.018						
<i>MIR-15A</i>			0.313 0.005		0.244 0.031					
<i>MIR-23B</i>								0.360 0.033		0.514 0.002

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Actualmente, la terapia basada en CMC representa un desafío importante para el desarrollo de una nueva generación de medicamentos y tratamientos para el CCR y otros tipos de cáncer. Sin embargo, los mecanismos que regulan la renovación de las CMC y la carcinogénesis no están del todo claros (Zeuner et al. 2014)

Estudios recientes han sugerido que los efectos oncostáticos de la melatonina podrían estar relacionados con su toxicidad inducida en las CMC cerebrales (V. Martín et al. 2013; V. Martín et al. 2014), glioblastoma (Xueran Chen et al. 2016), y tumores de mama (Gonçalves Ndo et al. 2016). En el CCR, la melatonina reduce el pool de CMC y las lesiones displásicas inducidas por la exposición constante a la luz y los tratamientos cancerígenos en modelos con ratas (Kannen et al. 2011). De acuerdo con esto, hemos hallado que AA-NAT, MT1 y MT2 se correlacionan negativamente con CD44 y CD66c en el CCR. De hecho, la melatonina regula vías clave implicadas en la diferenciación mesenquimatosas y de CMC, tales como la vía Wnt/ β -catenina, BMPs o la vía Notch (Ashley 2013; Krausova and Korinek 2014; Luchetti et al. 2014; Margheri et al. 2012; Park et al. 2011).

Múltiples estudios han señalado los efectos que producen la pérdida o mutación de p53 en el pool de CMC (Aloni-Grinstein et al. 2014). La pérdida de función de wtp53 enriquece las CMC de colon, mientras que la restauración de wtp53 en células de cultivo HCT116 con p53-null elimina la subpoblación de CMC (Allen et al. 2009). La combinación de 5-fluoracilo con la restauración de la vía p53 se ha asociado con la depleción de CMC de colon con p53 mutado o defectuoso (C. Huang et al. 2009). Otros estudios han mostrado que el silenciamiento de HMGA1 reestablece las características de CM normales en CMC de colon aumentando los niveles de p53 (Puca et al. 2014). Recientemente, se ha demostrado que p53 reprime transcripcionalmente la expresión proteica de CD44 tanto en células normales como en células tumorales pulmonares y del epitelio mamario (Godar et al. 2008).

Sin embargo, la pérdida de función de p53 no se ha asociado con una elevada expresión de CD44 en el CCR (Zeilstra et al. 2013). De acuerdo con esto, nuestros resultados muestran una expresión de CD44 mayor en tumores con wtp53 que en

tumores con mtp53. La expresión de CD66c también disminuye en tumores mtp53 comparando con tumores wtp53.

Se ha demostrado que la melatonina regula la expresión tanto de p53 como de p21 (Mediavilla, Cos, and Sánchez-Barceló 1999) y que además aumenta la fosforilación de p53 mediada por p38 en células cancerosas y la respuesta al daño el ADN dependiente de p53 (C. H. Kim and Yoo 2010; R. Santoro et al. 2012) a través de MT1 y MT2 (Raffaella Santoro et al. 2013). En nuestro estudio hemos encontrado una disminución de la expresión de AA-NAT, MT1 y MT2 en tumores colorrectales con p53 mutado. Nuestros resultados se apoyan en datos publicados previamente por nuestro grupo de investigación (León et al. 2012, 2014), con baja expresión de AA-NAT y MT2 en tumores avanzados comparado con tumores en estadios tempranos de la enfermedad. Sin embargo, esto se demostró en tumores wtp53, no en mtp53. Estos resultados indican que la pérdida de p53 podría llevar a la disminución de la expresión de AA-NAT y MT2 en el CCR, y que p53 podría regular su expresión o viceversa. De hecho, melatonina es una molécula con importantes propiedades antioxidantes (Manchester et al. 2015; Tan et al. 2015) y la disminución en su síntesis y señalización podría llevar a un incremento del estrés oxidativo en el tejido colónico (G. A. Bubenik 2008), que a su vez podría producir mutaciones de p53 (Hussain, Hofseth, and Harris 2003). Nuestros resultados son a su vez concuerdan con resultados publicados por Nemeth et al., quienes mostraron una disminución de la expresión de MT1 en adenocarcinomas colorrectales humanos (Nemeth et al. 2011). Recientemente, Ziolko et al. han estudiado el perfil del gen del receptor MT1 en el CCR, y han mostrado un aumento significativo de sus niveles de expresión en tejido canceroso comparado con tejido no canceroso (Ziółko et al. 2015). Estas discrepancias podrían ser debidas al pequeño número de pacientes incluidos en estos dos estudios (24 y 39 respectivamente), mientras que nuestra cohorte incluye 184 pacientes.

Aún no hay consenso sobre el origen de las CMC en el CCR. Aunque según la hipótesis de las CMC, el origen del tumor no es necesariamente una célula madre, esto podría ser el caso en el intestino, un tejido donde las células diferenciadas se renuevan cada 2-7 días y cuya unidad funcional, las criptas de Lieberkühn, yacen bajo células madres mesenquimales (CMM). Independientemente de su origen, las CMC tienen considerable importancia clínica, ya que han mostrado ser más resistentes a

tratamientos de quimio y radioterapia que otras células. Esta es una característica que comparten con las CM normales, las cuales presentan varias formas de resistencia a la quimioterapia, incluyendo la quiescencia celular y la expresión de proteínas capaces de eliminar drogas del citoplasma, como las proteínas multirresistentes a drogas (MDR) y los transportadores dependientes de ATP (ABC) (Dalerba et al. 2011). Se piensa que durante el proceso de transformación a CMC, podría ocurrir la disminución de la expresión de los genes relación con las vías de síntesis y señalización de la melatonina. El hecho de que hayamos encontrado una correlación negativa entre AA-NAT, MT1 y MT2 con CD44 y CD66c en estadios avanzados del CCR en nuestra cohorte de pacientes, refuerza esta hipótesis, aunque aún se necesitan más estudios para confirmarlo. Además, encontramos que estas correlaciones son mayores en tumores wtp53 lo que indica se necesita una proteína p53 funcionando para que la interrelación entre los genes relacionados con la melatonina y los marcadores de CMC tenga lugar.

La medicina personalizada implica el uso de información genética de un paciente para seleccionar u optimizar el tratamiento que va a recibir. A pesar del éxito de los nuevos tratamientos, en muchos pacientes, la enfermedad avanzada debido a la presencia de heterogeneidad intra e intertumoral la cual confiere resistencia. Distintos factores contribuyen a esta heterogeneidad, incluyendo la presencia de subpoblaciones de CMC, entre otros (Punt, Koopman, and Vermeulen 2017). P53 es un factor de gran importancia involucrado en el desarrollo del CCR (Allen et al. 2009; Aloni-Grinstein et al. 2014; C. Huang et al. 2009; Puca et al. 2014). La presencia de mutaciones en el p53 induce resistencia en células de cultivo de CCR y es indicativo de menor supervivencia en pacientes tras tratamiento con 5-fluoracilo (Bunz et al. 1999; Pilat et al. 2015), el tratamiento quimioterápico *gold-standard* en el CCR, el cual, dependiendo del estadio tumoral se utilizado combinado con otras drogas (Cunningham et al. 2010). Melatonina es capaz de aumentar la citotoxicidad del 5-fluoracilo en células de cultivo y en pacientes con CCR avanzado (metastásico) (Cerea et al. 2003; Y. Gao et al. 2017). Aquí mostramos el posible mecanismo de este efecto de la melatonina y la posibilidad de usarlo en combinación con 5-fluoracilo en pacientes con mtp53 resistentes a tratamiento con 5-fluoracilo solo. La glicoproteína transmembrana CD133 fue uno de los primeros marcadores de CMC identificados en el CCR (Ricci-Vitiani et al. 2007) y su uso como marcador de CMC ha sido polémico desde

entonces (Kemper, Grandela, and Medema 2010). La selección de células de cáncer de colon basado en la positividad de AC133, un epítipo de la proteína CD133, permite la identificación de poblaciones celulares tumorigénicas y clonogénicas (Kemper et al. 2010). Por otro lado, tanto las células de cáncer de colon CD133⁺ como las CD133⁻ han mostrado ser capaz de formar nuevo tumor y su expresión no parece estar restringida al compartimento de células madre, lo que indica que el uso de CD133 como marcador de CMC es cuestionable (D. Horst et al. 2008; Kojima et al. 2008; Shmelkov et al. 2008). Dado que las células de cáncer de colon clasificadas por CD44^{high} o CD66^{high} mostraron una alta tumorigenicidad (Gemei et al. 2013b; Todaro et al. 2010), hemos usado estos marcadores de CMC en nuestro estudio. Los tumores CD44^{high}CD66^{high} se correlacionaron con una baja expresión de AA-NAT y MT2 en tumores wtp53 en estadios avanzados de la enfermedad, lo cual indica el rol tan importante que tiene la melatonina y su señalización a través de MT2 en el CCR.

Los miARN son ARN no codificantes muy importantes para el desarrollo de CM (Ng and Surani 2011) que también pueden contribuir al desarrollo de cáncer (Dong et al. 2011). Debido a esto se ha estudiado su papel regulador en los procesos de autorenovación, proliferación y quimioresistencia de CMCs (Zimmerman and Wu 2011).

Una de las funciones fisiológicas de los miARN es la regulación del crecimiento y diferenciación de CM embrionarias (Ng and Surani 2011). Recientemente, se ha demostrado la implicación de los miARN en la regulación de las CMC en varios tipos de tumores. En CCR, sin embargo, este papel de los miARN es menos conocido. La sobreexpresión de miR-140 y miR-125 conduce a quimiorresistencia e inhibe el crecimiento en células HCT-116 (wt-p53) CD133^{high}CD44^{high} (Song et al. 2009). Un descenso en la expresión de miR-451 en colonosferas obtenidas mediante el cultivo de CMC procedentes de varias líneas celulares, se ha correlacionado con un aumento en la capacidad tumorigénica y un descenso en la respuesta a irinotecan. Probablemente, esto es debido a un aumento de la expresión de COX-2 y activación de la vía Wnt, así como a un aumento de la expresión de ABCB1, respectivamente. Esto estaría de acuerdo con el descenso de expresión de miR-451 que se observa en pacientes resistentes a irinotecan (Bitarte et al. 2011). LIN28B es un homólogo de LIN28 que

induce pluripotencia cuando se co-expresa con OCT4, SOX2 y KLF4 en fibroblastos somáticos e inhibe la biogénesis de let-7, un grupo de miARNs que actúan como supresores de tumores en CCR (Vaiopoulos et al. 2012). Esto podría implicar que la inducción de diferenciación por miRNAs podría considerarse como estrategia terapéutica en el futuro (Vaiopoulos et al. 2012).

En nuestro análisis de bases de datos públicas, hemos encontrado varios miRNAs (miR-195, miR-27a, miR-552, miR-150, miR-375, miR-146a, miR-155, miR-140, miR-15a, miR-23b) cuya expresión que se correlaciona al mismo tiempo con marcadores de CMC y algún gen relacionado con la síntesis o señalización de melatonina. Entre ellos, miR-27a, miR-150, miR-146a, miR-140 y miR-23b se han relacionado con la regulación de CMCs en CCR (François et al. 2019; Hwang et al. 2014; Jahid et al. 2012; Jiazhi Li et al. 2018; Viswanathan et al. 2017). Por otro lado, miR-155 actúa además como intermediario en el proceso de inhibición del crecimiento celular e invasión en glioma (Gu et al. 2017) y en la polarización fenotípica de macrófagos de M2 a M1 por la melatonina (Xia et al. 2019).

Hay que destacar que, al menos en la base de datos estudiada, no hemos encontrado ningún miARN relacionado con MT2. Aunque es necesario realizar un análisis más profundo en este sentido, es posible que la relación entre este gen y p53 sea más directa.

En conclusión, en vistas de los resultados de este estudio, la melatonina podría ser considerada como un abordaje terapéutico en pacientes con CCR avanzado y con tumores wtp53, disminuyendo, al menos en parte, la resistencia a las terapias que se utilizan habitualmente (V. Martín et al. 2013). En un futuro cercano, la comunidad oncológica deberá validar esta posibilidad y asegurarse que los pacientes que son candidatos para la terapia con melatonina se someten a los test y tratamiento adecuados.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. In our cohort of patients, p53 mutations correlated with advanced stages of the disease.
2. The presence of p53 mutations leads to a decrease of the expression levels of melatonin synthesis and signaling genes (AA-NAT, MT1 and MT2) in early stages of the disease.
3. In wtp53 tumors, the progression of colorectal cancer leads to a significant decrease of the expression of melatonin synthesis and signaling genes.
4. Colorectal tumors bearing p53 mutations showed a decrease in the expression of CSCs markers. CD66c expression was independently of the stage of the disease, whilst expression of CD44 increased in advanced tumors.
5. The progression of the disease results in an increase of the expression of CD44, a CSCs marker, independently of the status (wild type or mutated) of p53.
6. Tumors with high expression of CD44 and CD66c correlated with low expression of AA-NAT and MT2, though only in tumors with wtp53. Therefore, this could be used as a therapeutic approach.
7. The analysis of public databases demonstrates common molecular pathways of CSCs markers and melatonin synthesis and signaling genes through miRNAs. Although, this would require further in vitro and in vivo analysis to be able to demonstrate. This, likewise, would open a new field of study in relation to the regulation of the subpopulation of CSCs in the CRC.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Acuña-Castroviejo, Darío et al. 2014. "Extrapineal Melatonin: Sources, Regulation, and Potential Functions." *Cellular and Molecular Life Sciences* 71(16): 2997–3025.
- Adelstein, Barbara-Ann et al. 2011. "Most Bowel Cancer Symptoms Do Not Indicate Colorectal Cancer and Polyps: A Systematic Review." *BMC gastroenterology* 11(1): 65.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3120795&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
- AJCC. 2009. "Colon and Rectum Cancer Staging, 7th Ed." : 4.
- Akbarzadeh, Maryam et al. 2017. "The Potential Therapeutic Effect of Melatonin on Human Ovarian Cancer by Inhibition of Invasion and Migration of Cancer Stem Cells." *Scientific Reports* 7(1): 1–11.
- Allen, Joshua E. et al. 2009. "Visualization and Enrichment of Live Putative Cancer Stem Cell Populations Following P53 Inactivation or Bax Deletion Using Non-Toxic Fluorescent Dyes." *Cancer Biology and Therapy* 8(22): 2193–2204.
- Aloni-Grinstein, Ronit, Yoav Shetzer, Tom Kaufman, and Varda Rotter. 2014. "P53: The Barrier to Cancer Stem Cell Formation." *FEBS Letters* 588(16): 2580–89.
- Althumairi, Azah A., Mark G. Lazarev, and Susan L. Gearhart. 2016. "Inflammatory Bowel Disease Associated Neoplasia: A Surgeon's Perspective." *World Journal of Gastroenterology* 22(3): 961–73. <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v22/i3/961.htm>.
- American Cancer Society. "Colorectal Cancer Facts & Figures 2017-2019." *Colorectal Cancer Facts & Figures 2017-2019*.
<https://www.mendeley.com/viewer/?fileId=446a0f98-7242-86a5-07ff-be4c6c8cd11c&documentId=3b9629ab-fc85-3cb8-9607-7468ed4f76a7>.
- Arora, Himanshu et al. 2016. "Study of Apoptosis-Related Interactions in Colorectal Cancer." *Tumor Biology* 37(11): 14415–25. <http://dx.doi.org/10.1007/s13277-016-5363-9>.
- Ashley, Neil. 2013. "Regulation of Intestinal Cancer Stem Cells." *Cancer Letters* 338(1): 120–26. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2012.04.016>.
- Ashokkumar, Pandurangan et al. 2018. "Colorectal Carcinogenesis: Insights into the Cell Death and Signal Transduction Pathways: A Review." *World Journal of Gastrointestinal Oncology* 10(9): 244–59. <http://www.wjgnet.com/1948-5204/full/v10/i9/244.htm>.

- Aslam, Muhammad Imran et al. 2015. "MicroRNAs Associated with Initiation and Progression of Colonic Polyp: A Feasibility Study." *International Journal of Surgery* 13: 272–79. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijso.2014.12.009>.
- Aune, Dagfinn et al. 2011. "Dietary Fibre, Whole Grains, and Risk of Colorectal Cancer: Systematic Review and Dose-Response Meta-Analysis of Prospective Studies." *BMJ (Online)* 343(7833): 1082. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3213242&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
- Bai, Zhigang et al. 2018. "The MiR-495/Annexin A3/P53 Axis Inhibits the Invasion and EMT of Colorectal Cancer Cells." *Cellular Physiology and Biochemistry* 44(5): 1882–95.
- Baugh, Evan H. et al. 2018. "Why Are There Hotspot Mutations in the TP53 Gene in Human Cancers?" *Cell Death and Differentiation* 25(1): 154–60. <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2017.180>.
- Behr, B et al. 2010. "Stem Cells." *Plastic and Reconstructive Surgery* 126: 1163–71.
- Benderska, Natalya, and Regine Schneider-Stock. 2014. "Transcription Control of DAPK." *Apoptosis*.
- Benítez-King, G., L. Huerto-Delgadillo, and F. Antón-Tay. 1993. "Binding Of3H-Melatonin to Calmodulin." *Life Sciences*.
- Binayke, Akshay et al. 2018. "Awakening the 'Guardian of Genome': Reactivation of Mutant P53." *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 0(0): 0. <http://link.springer.com/10.1007/s00280-018-3701-x>.
- Bitarte, Nerea et al. 2011. "MicroRNA-451 Is Involved in the Self-Renewal, Tumorigenicity, and Chemoresistance of Colorectal Cancer Stem Cells." *Stem Cells* 29: 1661–71.
- Boni, Valentina et al. 2010. "MiR-192/MiR-215 Influence 5-Fluorouracil Resistance through Cell Cycle-Mediated Mechanisms Complementary to Its Post-Transcriptional Thymidilate Synthase Regulation." *Molecular Cancer Therapeutics* 9(8): 2265–75.
- Brady, Colleen A, and Laura D. Attardi. 2010. "P53 at a Glance." *Journal of Cell Science* (123): 2527–32. <http://jcs.biologists.org/lookup/doi/10.1242/jcs.217364>.
- Brainard, G.C., L.J. Petterborg, B.A. Richardson, and R.J Reiter. 1982. "Pineal Melatonin in Syrian Hamsters: Circadian and Seasonal Rhythms in Animals Maintained under Laboratory and Natural Conditions." *Neuroendocrinology* 35: 342–48.

- Braun, Christian J. et al. 2008. "P53-Responsive MicroRNAs 192 and 215 Are Capable of Inducing Cell Cycle Arrest." *Cancer Research*.
- Brenner, Hermann, Matthias Kloor, and Christian Peter Pox. 2014. "Colorectal Cancer." *The Lancet* 383(9927): 1490–1502.
- Brittan, M, and N. A. Wright. 2004. "The Gastrointestinal Stem Cell." *Cell Prolif.* 37: 35–53.
- Brosh, Ran, and Varda Rotter. 2009. "When Mutants Gain New Powers: News from the Mutant P53 Field." *Nature Reviews Cancer* 9(10): 701–13.
<http://dx.doi.org/10.1038/nrc2693>.
- Brož, Daniela Kenzelmann, and Laura D. Attardi. 2010. "In Vivo Analysis of P53 Tumor Suppressor Function Using Genetically Engineered Mouse Models." *Carcinogenesis* 31(8): 1311–18.
- Bubenik, G. A. 1980. "Localization of Melatonin in the Digestive Tract of the Rat. Effect of Maturation, Diurnal Variation, Melatonin Treatment and Pinealectomy." *Hormone Research*.
- . 2008. "Thirty Four Years since the Discovery of Gastrointestinal Melatonin." In *Journal of Physiology and Pharmacology*,.
- Bubenik, G. A., G. M. Brown, and L. J. Grotta. 1977. "Immunohistological Localization of Melatonin in the Rat Digestive System." *Experientia*.
- Bubenik, George A. 2002. "Gastrointestinal Melatonin: Localization, Function, and Clinical Relevance." *Digestive Diseases and Sciences*.
- Bunz, Fred et al. 1999. "Disruption of P53 in Human Cancer Cells Alters the Responses to Therapeutic Agents." *Journal of Clinical Investigation*.
- Cai, Chunxiao et al. 2012. "MicroRNA-211 Expression Promotes Colorectal Cancer Cell Growth in Vitro and in Vivo by Targeting Tumor Suppressor CHD5." *PLoS ONE*.
- Cao, Bo et al. 2016. "Inactivation of Oncogenic CAMP-Specific Phosphodiesterase 4D by MiR-139-5p in Response to P53 Activation." *eLife*.
- Casado, Jorge et al. 2017. "AA-NAT, MT1 and MT2 Correlates with Cancer Stem-like Cell Markers in Colorectal Cancer: Study of the Influence of Stage and P53 Status of Tumors." *International Journal of Molecular Sciences* 18(6).
- Cekaite, Lina et al. 2016. "MicroRNAs as Growth Regulators, Their Function and Biomarker Status in Colorectal Cancer." *Oncotarget* 7(6): 6476–6505.
<http://www.oncotarget.com/fulltext/6390>.

- Cerea, G. et al. 2003. "Biomodulation of Cancer Chemotherapy for Metastatic Colorectal Cancer: A Randomized Study of Weekly Low-Dose Irinotecan Alone Versus Irinotecan plus the Oncostatic Pineal Hormone Melatonin in Metastatic Colorectal Cancer Patients Progressing on 5-Fluorour." *Anticancer Research*.
- Chandrasekaran, Karthik Subramanian, Anusha Sathyanarayanan, and Devarajan Karunakaran. 2017. "MiR-214 Activates TP53 but Suppresses the Expression of RELA, CTNNB1, and STAT3 in Human Cervical and Colorectal Cancer Cells." *Cell Biochemistry and Function*.
- Chang, Chiu Chun et al. 2018. "MiR-211 Regulates the Expression of RRM2 in Tumoral Metastasis and Recurrence in Colorectal Cancer Patients with a k-Ras Gene Mutation." *Oncology Letters*.
- Chao, Celia et al. 2012. "CD133+ Colon Cancer Cells Are More Interactive with the Tumor Microenvironment than CD133-Cells." *Laboratory Investigation* 92(3): 420–36. <http://dx.doi.org/10.1038/labinvest.2011.185>.
- Chen, Chun Qiu et al. 2011. "Distribution, Function and Physiological Role of Melatonin in the Lower Gut." *World Journal of Gastroenterology* 17(34): 3888–98.
- Chen, Geng et al. 2017. "P53 Target MiR-29c-3p Suppresses Colon Cancer Cell Invasion and Migration through Inhibition of PHLDB2." *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
- Chen, Jianmei et al. 2014. "The Roles of MiR-200c in Colon Cancer and Associated Molecular Mechanisms." *Tumor Biology*.
- Chen, Xiaoxiang et al. 2019. "P53-Induced MiR-1249 Inhibits Tumor Growth, Metastasis, and Angiogenesis by Targeting VEGFA and HMGA2." *Cell Death and Disease*.
- Chen, Xueran et al. 2016. "Melatonin Inhibits Tumorigenicity of Glioblastoma Stem-like Cells via the AKT–EZH2–STAT3 Signaling Axis." *Journal of Pineal Research* (April): 208–17.
- Chojnacki, Cezary et al. 2013. "Evaluation of Enterochromaffin Cells and Melatonin Secretion Exponents in Ulcerative Colitis." *World Journal of Gastroenterology* 19(23): 3602–7.
- Church, James. 2016. "Molecular Genetics of Colorectal Cancer." *Seminars in Colon and Rectal Surgery* 27(4): 172–75.
- Cipolla-Neto, J. et al. 2014. "Melatonin, Energy Metabolism, and Obesity: A Review." *Journal of Pineal Research* 56(4): 371–81.

- Cole, Jack W, and Anne McKalen. 1963. "Studies on the Morphogenesis of Adenomatous Polyps in the Human Colon." *Cancer* 16(8): 998–1002.
- Cooks, Tomer et al. 2018. "Mutant P53 Cancers Reprogram Macrophages to Tumor Supporting Macrophages via Exosomal MiR-1246." *Nature Communications*.
- Coyle, Christopher, Fay Helen Cafferty, and Ruth Elizabeth Langley. 2016. "Aspirin and Colorectal Cancer Prevention and Treatment: Is It for Everyone?" *Current Colorectal Cancer Reports* 12(1): 27–34.
- Cui, Xiangli et al. 2013. "The Induction of MicroRNA-16 in Colon Cancer Cells by Protein Arginine Deiminase Inhibition Causes a P53-Dependent Cell Cycle Arrest." *PLoS ONE*.
- Cunningham, David et al. 2010. "Colorectal Cancer." *The Lancet* 375(9719): 1030–47.
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673610603534>.
- Van Cutsem, E., A. Cervantes, B. Nordlinger, and D. Arnold. 2014. "Metastatic Colorectal Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up." *Annals of Oncology* 25(suppl 3): iii1–9.
<https://academic.oup.com/annonc/article-lookup/doi/10.1093/annonc/mdu260>.
- D. Mediavilla, M. et al. 2010. "Basic Mechanisms Involved in the Anti-Cancer Effects of Melatonin." *Current Medicinal Chemistry* 17(36): 4462–81.
<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-78650672113&partnerID=tZOtx3y1>.
- Dalerba, Piero et al. 2007. "Phenotypic Characterization of Human Colorectal Cancer Stem Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(24): 10158–63.
<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0703478104>.
- . 2011. "Single-Cell Dissection of Transcriptional Heterogeneity in Human Colon Tumors." *Nature Biotechnology*.
- Dalerba, Piero, and Michael F. Clarke. 2007. "Cancer Stem Cells and Tumor Metastasis: First Steps into Uncharted Territory." *Cell Stem Cell* 1(3): 241–42.
- Dalio, Marcelo Belini et al. 2006. "A Study of the Effects of Pinealectomy on Intestinal Cell Proliferation in Infant Newborn Rats." *Acta cirúrgica brasileira / Sociedade Brasileira para Desenvolvimento Pesquisa em Cirurgia* 21(1): 16–20.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16491217>.
- Darvin, Pramod, Salman M. Toor, Varun Sasidharan Nair, and Eyad Elkord. 2018. "Immune Checkpoint Inhibitors: Recent Progress and Potential Biomarkers." *Experimental and Molecular Medicine* 50(12): 1–11.
<http://dx.doi.org/10.1038/s12276-018-0191-1>.

- Dekker, Evelien et al. 2019. "Colorectal Cancer." *The Lancet* 394(10207): 1467–80. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32319-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32319-0).
- Dong, Peixin et al. 2011. "MicroRNA-194 Inhibits Epithelial to Mesenchymal Transition of Endometrial Cancer Cells by Targeting Oncogene BMI-1." *Molecular Cancer* 10(1): 99. <http://www.molecular-cancer.com/content/10/1/99>.
- Du, Lei et al. 2008. "CD44 Is of Functional Importance for Colorectal Cancer Stem Cells." *Clinical Cancer Research* 14(21): 6751–60.
- Dubocovich, Margarita L, and Magdalena Markowska. 2005. "Functional MT₁ and MT₂ Melatonin Receptors in Mammals." *Endocrine* 27(2): 101–10. <http://link.springer.com/10.1385/ENDO:27:2:101>.
- Ebrahimi, Faeza et al. 2015. "Deregulation of MiR-126 Expression in Colorectal Cancer Pathogenesis and Its Clinical Significance." *Experimental Cell Research*.
- Elsaba, Tarek M A et al. 2010. "The Stem Cell Marker CD133 Associates with Enhanced Colony Formation and Cell Motility in Colorectal Cancer." 5(5).
- Falzone, Luca et al. 2018. "Integrated Analysis of Colorectal Cancer MicroRNA Datasets: Identification of MicroRNAs Associated with Tumor Development." *Aging*.
- Fanali, Caterina et al. 2014. "Cancer Stem Cells in Colorectal Cancer from Pathogenesis to Therapy: Controversies and Perspectives." *World Journal of Gastroenterology* 20(4): 923–42.
- Favero, Gaia et al. 2018. "Promising Antineoplastic Actions of Melatonin." *Frontiers in Pharmacology* 9(October): 1086. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2018.01086/full>.
- Fearon, Eric R., and Bert Vogelstein. 1990. "A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis." *Cell* 61(5): 759–67.
- Florian, Maria Carolina, and Hartmut Geiger. 2010. "Concise Review: Polarity in Stem Cells, Disease, and Aging." *Stem Cells* 28(9): 1623–29.
- François, Sabine et al. 2019. "Mesenchymal Stem Cell Administration Attenuates Colon Cancer Progression by Modulating the Immune Component within the Colorectal Tumor Microenvironment." *Stem Cells Translational Medicine* 8(3): 285–300.
- Funamizu, Naotake et al. 2015. "MicroRNA-203 Induces Apoptosis by Upregulating Puma Expression in Colon and Lung Cancer Cells." *International Journal of Oncology*.

- Gao, Feng, and Wenhui Wang. 2015. "MicroRNA-96 Promotes the Proliferation of Colorectal Cancer Cells and Targets Tumor Protein P53 Inducible Nuclear Protein 1, Forkhead Box Protein O1 (FOXO1) and FOXO3a." *Molecular Medicine Reports*.
- Gao, J. et al. 2015. "MiR-34a-5p Suppresses Colorectal Cancer Metastasis and Predicts Recurrence in Patients with Stage II/III Colorectal Cancer." *Oncogene* 34(31): 4142–52.
- Gao, Yue et al. 2017. "Melatonin Synergizes the Chemotherapeutic Effect of 5-Fluorouracil in Colon Cancer by Suppressing PI3K/AKT and NF-KB/INOS Signaling Pathways." *Journal of Pineal Research*.
- García-Navarro, Ana et al. 2007. "Cellular Mechanisms Involved in the Melatonin Inhibition of HT-29 Human Colon Cancer Cell Proliferation in Culture." *Journal of Pineal Research* 43(2): 195–205.
- Gemej, Marica et al. 2013a. "CD66c Is a Novel Marker for Colorectal Cancer Stem Cell Isolation, and Its Silencing Halts Tumor Growth in Vivo." *Cancer* 119(4): 729–38.
- . 2013b. "CD66c Is a Novel Marker for Colorectal Cancer Stem Cell Isolation, and Its Silencing Halts Tumor Growth in Vivo." *Cancer*.
- Ginestier, Christophe et al. 2007. "ALDH1 Is a Marker of Normal and Malignant Human Mammary Stem Cells and a Predictor of Poor Clinical Outcome." *Cell Stem Cell* 1: 555–67.
- Godar, Samuel et al. 2008. "Growth-Inhibitory and Tumor-Suppressive Functions of P53 Depend on Its Repression of CD44 Expression." *Cell* 134(1): 62–73.
- Gong, Hangjun et al. 2017. "P53/MicroRNA-374b/AKT1 Regulates Colorectal Cancer Cell Apoptosis in Response to DNA Damage." *International Journal of Oncology*.
- Gu, Junyi et al. 2017. "Melatonin Inhibits Proliferation and Invasion via Repression of MiRNA-155 in Glioma Cells." *Biomedicine and Pharmacotherapy* 93: 969–75.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.010>.
- Guerrero, J. M.; Carrillo-Vico, A.; Lardone, P. J. 2007. "La Melatonina." *Investigación y Ciencia*: 30–38.
http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1020-49891997000300012&lng=es&nrm=iso&tlng=es.
- Guerrero, J. M. et al. 2006. "Impairment of the Melatonin Rhythm in Children with Sanfilippo Syndrome." *Journal of Pineal Research* 40(2): 192–93.
- Guo, Yongchen, Yonghua Bao, and Wancai Yang. 2017. "Regulatory MiRNAs in Colorectal Carcinogenesis and Metastasis." *International Journal of Molecular Sciences* 18(4).

- Hahn, Stefanie et al. 2013. "SNAIL and MiR-34a Feed-Forward Regulation of ZNF281/ZBP99 Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition." *EMBO Journal* 32(23): 3079–95.
- Hahn, Stefanie, and Heiko Hermeking. 2014. "ZNF281/ZBP-99: A New Player in Epithelial-Mesenchymal Transition, Stemness, and Cancer." *Journal of Molecular Medicine* 92(6): 571–81.
- Halligan, Steve et al. 2013. "Computed Tomographic Colonography versus Barium Enema for Diagnosis of Colorectal Cancer or Large Polyps in Symptomatic Patients (SIGGAR): A Multicentre Randomised Trial." *The Lancet* 381(9873): 1185–93.
- Han, Jia et al. 2017. "MiR-338-3p Confers 5-Fluorouracil Resistance in P53 Mutant Colon Cancer Cells by Targeting the Mammalian Target of Rapamycin." *Experimental Cell Research*.
- Hermann, Patrick C et al. 2007. "Article Distinct Populations of Cancer Stem Cells Determine Tumor Growth and Metastatic Activity in Human Pancreatic Cancer." *Cell Stem Cell* (September): 313–23.
- Hiyoshi, Yukiharu et al. 2015. "Increased MicroRNA-34b and -34c Predominantly Expressed in Stromal Tissues Is Associated with Poor Prognosis in Human Colon Cancer." *PLoS ONE* 10(4): 1–14.
- Hong, Yunkyung et al. 2014. "Melatonin Treatment Induces Interplay of Apoptosis, Autophagy, and Senescence in Human Colorectal Cancer Cells." *Journal of Pineal Research* 56(3): 264–74.
- Hong, Zhang, Zhang Feng, Zhang Sai, and Su Tao. 2014. "PER3, a Novel Target of MiR-103, Plays a Suppressive Role in Colorectal Cancer In Vitro." *BMB Reports*.
- Horst, D. et al. 2008. "CD133 Expression Is an Independent Prognostic Marker for Low Survival in Colorectal Cancer." *British Journal of Cancer*.
- Horst, David et al. 2009. "The Cancer Stem Cell Marker CD133 Has High Prognostic Impact but Unknown Functional Relevance for the Metastasis of Human Colon Cancer." (June): 427–34.
- Hu, Chenxia, and Lanjuan Li. 2019. "Melatonin Plays Critical Role in Mesenchymal Stem Cell-Based Regenerative Medicine in Vitro and in Vivo." *Stem Cell Research and Therapy* 10(1): 1–11.
- Hu, Wangxiong et al. 2018. "Multi-Omics Approach Reveals Distinct Differences in Left- and Right-Sided Colon Cancer." *Molecular Cancer Research*.

- Huang, Catherine et al. 2009. "The Combination of 5-Fluorouracil plus P53 Pathway Restoration Is Associated with Depletion of P53-Deficient or Mutant P53-Expressing Putative Colon Cancer Stem Cells." *Cancer Biology and Therapy* 8(22): 2185–92.
- Huang, Emina H et al. 2009. "Aldehyde Dehydrogenase 1 Is a Marker for Normal and Malignant Human Colonic Stem Cells (SC) and Tracks SC Overpopulation during Colon Tumorigenesis." *Cancer* 69(8): 3382–89.
- Hussain, S. Perwez, Lorne J. Hofseth, and Curtis C. Harris. 2003. "Radical Causes of Cancer." *Nature Reviews Cancer*.
- Hwang, Wei Lun et al. 2014. "MicroRNA-146a Directs the Symmetric Division of Snail-Dominant Colorectal Cancer Stem Cells." *Nature Cell Biology* 16(3): 268–80.
- Iacopetta, B. et al. 2006. "Functional Categories of TP53 Mutation in Colorectal Cancer: Results of an International Collaborative Study." *Annals of Oncology* 17(5): 842–47.
- Iacopetta, Barry. 2003. "TP53 Mutation in Colorectal Cancer." *Human Mutation* 21(3): 271–76.
- Ilic, Dusko, and Julia M. Polak. 2011. "Stem Cells in Regenerative Medicine: Introduction." *British Medical Bulletin* 98(1): 117–26.
- Jahid, Sohail et al. 2012. "MiR-23a Promotes the Transition from Indolent to Invasive Colorectal Cancer." *Cancer Discovery* 2(6): 540–53.
- Jemal, Ahmedin, Robert A Smith, and Elizabeth Ward. 2009. "Worldwide Variations in Colorectal Cancer."
- Jiang, Longchang, and Heiko Hermeking. 2017. 77 *Cancer Research* *MiR-34a and MiR-34b/c Suppress Intestinal Tumorigenesis*.
- Jones, Matthew Fletcher, and Ashish Lal. 2012. "MicroRNAs, Wild-Type and Mutant P53: More Questions than Answers." *RNA Biology* 9(6): 781–91.
- Jones, Stephen N., Amy E. Roe, Lawrence A. Donehower, and Allan Bradley. 1995. "Rescue of Embryonic Lethality in Mdm2-Deficient Mice by Absence of P53." *Nature* 378(6553): 206–8.
- Kaller, Markus, and Heiko Hermeking. 2016. "Interplay between Transcription Factors and MicroRNAs Regulating Epithelial-Mesenchymal Transitions in Colorectal Cancer." *Advances in Experimental Medicine and Biology*.
- Kalyan, Aparna et al. 2018. "Updates on Immunotherapy for Colorectal Cancer." *Journal of Gastrointestinal Oncology* 9(1): 160–69.

- Kamatani, Akemi et al. 2013. "Downregulation of Anti-Oncomirs MiR-143/145 Cluster Occurs before APC Gene Aberration in the Development of Colorectal Tumors." *Medical Molecular Morphology* 46(3): 166–71.
- Kang, Mi-Kyung, and Soo-Kyung Kang. 2007. "Tumorigenesis of Chemotherapeutic Drug-Resistant Cancer Stem-Like Cells in Brain Glioma." *Stem Cells and Development* 16(5): 837–48.
<http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/scd.2007.0006>.
- Kannen, Vinicius et al. 2011. "The Melatonin Action on Stromal Stem Cells within Pericryptal Area in Colon Cancer Model under Constant Light." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 405(4): 593–98.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.01.074>.
- Karaayvaz, Mihriban et al. 2011. "Prognostic Significance of MiR-215 in Colon Cancer." *Clinical Colorectal Cancer*.
- Kasinski, Andrea L., and Frank J. Slack. 2011. "MicroRNAs En Route to the Clinic: Progress in Validating and Targeting MicroRNAs for Cancer Therapy." *Nature Reviews Cancer* 11(12): 849–64. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3166>.
- Kemper, Kristel et al. 2010. "The AC133 Epitope, but Not the CD133 Protein, Is Lost upon Cancer Stem Cell Differentiation." *Cancer Research*.
- Kemper, Kristel, Catarina Grandela, and Jan Paul Medema. 2010. "Molecular Identification and Targeting of Colorectal Cancer Stem Cells." *Oncotarget*.
- Kim, Chi Hyun, and Yeong Min Yoo. 2010. "Melatonin Induces Apoptotic Cell Death via P53 in LNCaP Cells." *Korean Journal of Physiology and Pharmacology* 14(6): 365–69.
- Kim, Nam Hee et al. 2013. "P53 Regulates Nuclear GSK-3 Levels through MiR-34-Mediated Axin2 Suppression in Colorectal Cancer Cells." *Cell Cycle*.
- Kim, Soo Young, Young Hoon Lee, and Young Seuk Bae. 2012. "MiR-186, MiR-216b, MiR-337-3p, and MiR-760 Cooperatively Induce Cellular Senescence by Targeting α Subunit of Protein Kinase CKII in Human Colorectal Cancer Cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
- Kim, Sun Ah et al. 2015. "Indirect Modulation of Sensitivity to 5-Fluorouracil by MicroRNA-96 in Human Colorectal Cancer Cells." *Archives of Pharmacal Research*.
- Kim, Yoon Jin et al. 2019. "Primate-Specific MiR-944 Activates P53-Dependent Tumor Suppression in Human Colorectal Cancers." *Cancer Letters*.

- Kirstetter, Peggy et al. 2006. "Activation of the Canonical Wnt Pathway Leads to Loss of Hematopoietic Stem Cell Repopulation and Multilineage Differentiation Block." *Nature Immunology* 7(10): 1048–56.
- Kojima, Motohiro et al. 2008. "Immunohistochemical Detection of CD133 Expression in Colorectal Cancer: A Clinicopathological Study." *Cancer Science*.
- Konturek, P. Ch et al. 1997. "Gastroprotective Activity of Melatonin and Its Precursor, L-Tryptophan, against Stress-Induced and Ischaemia-Induced Lesions Is Mediated by Scavenge of Oxygen Radicals." *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 32(5): 433–38.
- Kos-Kudla, Beata et al. 2002. "Circadian Rhythm of Melatonin in Patients with Colorectal Carcinoma." *Neuroendocrinology Letters*.
- Krajewska, Julia B., Jakub Fichna, and Paula Mosińska. 2018. "One Step Ahead: MiRNA-34 in Colon Cancer-Future Diagnostic and Therapeutic Tool?" *Critical Reviews in Oncology/Hematology*.
- Krausova, Michaela, and Vladimir Korinek. 2014. "Wnt Signaling in Adult Intestinal Stem Cells and Cancer." *Cellular Signalling* 26(3): 570–79. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.11.032>.
- Kucia, M, and M.Z. Ratajczak. 2006. "Stem Cells as a Two Edged Sword - From Regeneration to Tumor Formation." *Journal of Physiology and Pharmacology* (56): 5–16.
- Kwak, Bomi et al. 2018. "MicroRNA-552 Links Wnt Signaling to P53 Tumor Suppressor in Colorectal Cancer." *International Journal of Oncology*.
- Lai, Mingguang et al. 2015. "MiR-34a Inhibits Migration and Invasion by Regulating the SIRT1/P53 Pathway in Human SW480 Cells." *Molecular Medicine Reports* 11(5): 3301–7.
- Lai, Xiulan, and Avner Friedman. 2017. "Exosomal MicroRNA Concentrations in Colorectal Cancer: A Mathematical Model." *Journal of Theoretical Biology* 415(April 2016): 70–83. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtbi.2016.12.006>.
- Lane, D. P., and L. V. Crawford. 1979. "T Antigen Is Bound to a Host Protein in SY40-Transformed Cells [19]." *Nature* 278(5701): 261–63.
- Lapidot, Tsvee et al. 1994. "A Cell Initiating Human Acute Myeloid Leukaemia after Transplantation into SCID Mice." *Nature* 367: 645–48.
- Laptenko, O., and C. Prives. 2006. "Transcriptional Regulation by P53: One Protein, Many Possibilities." *Cell Death and Differentiation* 13(6): 951–61.

- Laudato, Sara et al. 2017. "P53-Induced MiR-30e-5p Inhibits Colorectal Cancer Invasion and Metastasis by Targeting ITGA6 and ITGB1." *International Journal of Cancer*.
- Lee, Ji Young et al. 2013. "Tumor Suppressor P53 Plays a Key Role in Induction of Both Tristetraprolin and Let-7 in Human Cancer Cells." *Nucleic Acids Research*.
- Lee, Jun hee et al. 2018. "Melatonin Promotes Apoptosis of Oxaliplatin-Resistant Colorectal Cancer Cells Through Inhibition of Cellular Prion Protein." *Anticancer Research* 38(4): 1993–2000.
<http://ar.iiarjournals.org/content/38/4/1993.abstract>.
- Lee, Jun Hee et al. 2018. "Melatonin and 5- f Luorouracil Co- - Suppress Colon Cancer Stem Cells by Regulating Cellular Prion Protein- - Oct4 Axis." *Pineal Research* (July): 1–16.
- León, Josefa et al. 2012. "Gender-Related Invasion Differences Associated with MRNA Expression Levels of Melatonin Membrane Receptors in Colorectal Cancer." *Molecular Carcinogenesis* 51(8): 608–18.
- . 2014. "Melatonin Reduces Endothelin-1 Expression and Secretion in Colon Cancer Cells through the Inactivation of FoxO-1 and NF-K β ." *Journal of Pineal Research* 56(4): 415–26.
- Lerner, A. B. et al. 1958. "Isolation of Melatonin, the Pineal Gland Factor That Lightens Melanocytes." *Journal of the American Chemical Society* 80(10): 2587.
- Leroy, Bernard et al. 2013. "The TP53 Website : An Integrative Resource Centre for the TP53 Mutation Database and TP53 Mutant Analysis." *Nucleic Acids Research* 41(November 2012): 962–69.
- Li, Jian et al. 2011. "Overexpression of MiR-22 Reverses Paclitaxel-Induced Chemoresistance through Activation of PTEN Signaling in P53-Mutated Colon Cancer Cells." *Molecular and Cellular Biochemistry*.
- Li, Jiazhi et al. 2018. "MicroRNA-140 Inhibits the Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis in Colorectal Cancer." *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 10(9): 426–37. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.12.022>.
- Li, Weiwei et al. 2015. "P53-Dependent MiRNAs Mediate Nitric Oxide-Induced Apoptosis in Colonic Carcinogenesis." *Free Radical Biology and Medicine*.
- Li, Xiao Lan, Jianbiao Zhou, Zhi Rong Chen, and Wee Joo Chng. 2015. "P53 Mutations in Colorectal Cancer- Molecular Pathogenesis and Pharmacological Reactivation." *World Journal of Gastroenterology* 21(1): 84–93. <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v21/i1/84.htm>.

- Li, Xiao Ling, Matthew F. Jones, Murugan Subramanian, and Ashish Lal. 2014. "Mutant P53 Exerts Oncogenic Effects through MicroRNAs and Their Target Gene Networks." *FEBS Letters* 588(16): 2610–15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2014.03.054>.
- Li, Ya et al. 2017. "Melatonin for the Prevention and Treatment of Cancer." *Oncotarget* 8(24): 39896–921.
- Liu, Kuijie et al. 2013. "MicroRNA-124 Regulates the Proliferation of Colorectal Cancer Cells by Targeting IASPP." *BioMed Research International*.
 ———. 2017. "Wild-Type & Mutant P53 Differentially Modulate MIR-124/IASPP Feedback Following Photodynamic Therapy in Human Colon Cancer Cell Line." *Cell Death and Disease* 8(10). <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2017.477>.
- Liu, P-p et al. 2014. "Metabolic Regulation of Cancer Cell Side Population by Glucose through Activation of the Akt Pathway." : 124–35.
- Liu, Tiecheng, and Jimo Borjigin. 2005. "N-Acetyltransferase Is Not the Rate-Limiting Enzyme of Melatonin Synthesis at Night." *Journal of Pineal Research* 39(1): 91–96.
- Long, Zhi H. et al. 2017. "MiR-141 Inhibits Proliferation and Migration of Colorectal Cancer Sw480 Cells." *Anticancer Research* 37(8): 4345–52.
- Luchetti, Francesca et al. 2014. "Melatonin Regulates Mesenchymal Stem Cell Differentiation: A Review." *Journal of Pineal Research* 56(4): 382–97.
- Lulla, Amriti R. et al. 2017. "MiR-6883 Family MiRNAs Target CDK4/6 to Induce G1 Phase Cell-Cycle Arrest in Colon Cancer Cells." *Cancer Research* 77(24): 6902–13.
- Luu, Carrie et al. 2013. "TP53 and Let-7a Micro-RNA Regulate K-Ras Activity in HCT116 Colorectal Cancer Cells." *PLoS ONE*.
- Ma, Qunying et al. 2013. "MicroRNA-16 Represses Colorectal Cancer Cell Growth in Vitro by Regulating the P53/Survivin Signaling Pathway." *Oncology Reports* 29(4): 1652–58.
- Maćkowiak, Kalina, Natalia Torlińska-Walkowiak, and Barbara Torlińska. 2016. "Dietary Fibre as an Important Constituent of the Diet." *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej* 70: 104–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26943307>.
- Manchester, Lucien C. et al. 2015. "Melatonin: An Ancient Molecule That Makes Oxygen Metabolically Tolerable." *Journal of Pineal Research* 59(4): 403–19.
- Mani, Sendurai A et al. 2008. "The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells." *Cell* 133(4): 704–15.

- Maqbool, Raihana, Saife Niaz Lone, and Mahboob Ul Hussain. 2016. "Post-Transcriptional Regulation of the Tumor Suppressor P53 by a Novel MiR-27a, with Implications during Hypoxia and Tumorigenesis." *Biochemical Journal* 473(20): 3597–3610.
- Margheri, Martina et al. 2012. "Combined Effects of Melatonin and All-Trans Retinoic Acid and Somatostatin on Breast Cancer Cell Proliferation and Death: Molecular Basis for the Anticancer Effect of These Molecules." *European Journal of Pharmacology* 681(1–3): 34–43. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.02.011>.
- Mármol, Inés et al. 2017. "Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer." *International Journal of Molecular Sciences* 18(1).
- Martín, V. et al. 2013. "Melatonin-Induced Methylation of the ABCG2/BCRP Promoter as a Novel Mechanism to Overcome Multidrug Resistance in Brain Tumour Stem Cells." *British Journal of Cancer* 108(10): 2005–12.
- Martín, Vanesa et al. 2014. "Involvement of Autophagy in Melatonin-Induced Cytotoxicity in Glioma-Initiating Cells." *Journal of Pineal Research* 57(3): 308–16.
- McCord, Carey Pratt, and Floyd P. Allen. 1917. "Evidences Associating Pineal Gland Function with Alterations in Pigmentation." *Journal of Experimental Zoology*.
- Mediavilla, M. D., S. Cos, and E. J. Sánchez-Barceló. 1999. "Melatonin Increases P53 and P21WAF1 Expression in MCF-7 Human Breast Cancer Cells in Vitro." *Life Sciences*.
- Mishima, K., M. Okawa, T. Shimizu, and Y. Hishikawa. 2001. "Diminished Melatonin Secretion in the Elderly Caused by Insufficient Environmental Illumination." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86(1): 129–34.
- Mo, Ji Su, Seol Hee Han, Ki Jung Yun, and Soo Cheon Chae. 2018. "MicroRNA 429 Regulates the Expression of CHMP5 in the Inflammatory Colitis and Colorectal Cancer Cells." *Inflammation Research* 67(11–12): 985–96.
- Moghadamnia, Farahnaz et al. 2019. "MicroRNA Expression and Correlation with mRNA Levels of Colorectal Cancer-Related Genes." *Journal of Gastrointestinal Cancer*. <http://link.springer.com/10.1007/s12029-019-00249-2>.
- Mojarad, Ehsan Nazemalhosseini, Peter J.K. Kuppen, Hamid Asadzadeh Aghdaei, and Mohammad Reza Zali. 2013. "The CpG Island Methylator Phenotype (CIMP) in Colorectal Cancer." *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench* 6(3): 120–28.
- Molchadsky, Alina, and Varda Rotter. 2017. "P53 and Its Mutants on the Slippery Road From Stemness To Carcinogenesis." *Carcinogenesis* 38(4): 347–58.

- Moradi Marjaneh, Reyhaneh et al. 2019. "MicroRNAs as Potential Therapeutic Targets to Predict Responses to Oxaliplatin in Colorectal Cancer: From Basic Evidence to Therapeutic Implication." *IUBMB Life* 71(10): 1428–41.
- Morrison, Sean J., and Judith Kimble. 2006. "Asymmetric and Symmetric Stem-Cell Divisions in Development and Cancer." *Nature* 441(7097): 1068–74.
- Moskal, Aurélie, Teresa Norat, Pietro Ferrari, and Elio Riboli. 2007. "Alcohol Intake and Colorectal Cancer Risk: A Dose-Response Meta-Analysis of Published Cohort Studies." *International Journal of Cancer* 120(3): 664–71.
- Muller, Patricia A.J., and Karen H. Vousden. 2013. "P53 Mutations in Cancer." *Nature Cell Biology* 15(1): 2–8. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2641>.
- . 2014. "Mutant P53 in Cancer: New Functions and Therapeutic Opportunities." *Cancer Cell* 25(3): 304–17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2014.01.021>.
- Munro, Matthew J. et al. 2017. "Cancer Stem Cells in Colorectal Cancer: A Review." *Journal of Clinical Pathology* 71(2): 110–16.
- Murphy, Gwen et al. 2011. "Sex Disparities in Colorectal Cancer Incidence by Anatomic Subsite, Race and Age." *International Journal of Cancer* 128(7): 1668–75.
- Muzny, Donna M. et al. 2012. "Comprehensive Molecular Characterization of Human Colon and Rectal Cancer." *Nature*.
- Naccarati, A. et al. 2012. "Mutations and Polymorphisms in TP53 Gene - An Overview on the Role in Colorectal Cancer." *Mutagenesis* 27(2): 211–18.
- Nakazawa, Kazuya, Nurmaa Dashzeveg, and Kiyotsugu Yoshida. 2014. "Tumor Suppressor P53 Induces MiR-1915 Processing to Inhibit Bcl-2 in the Apoptotic Response to DNA Damage." *FEBS Journal* 281(13): 2937–44.
- Do Nascimento Gonçalves, Naiane et al. 2016. "Effect of Melatonin in Epithelial Mesenchymal Transition Markers and Invasive Properties of Breast Cancer Stem Cells of Canine and Human Cell Lines." *PLoS ONE* 11(3): 1–16.
- Nemeth, C. et al. 2011. "Decreased Expression of the Melatonin Receptor 1 in Human Colorectal Adenocarcinomas." *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*.
- Ng, Huck Hui, and M. Azim Surani. 2011. "The Transcriptional and Signalling Networks of Pluripotency." *Nature Cell Biology* 13(5): 490–96. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb0511-490>.

- Nguyen, Daniel, Wenjuan Liao, Shelya X. Zeng, and Hua Lu. 2017. "Reviving the Guardian of the Genome: Small Molecule Activators of P53." *Pharmacology and Therapeutics* 178: 92–108. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.03.013>.
- Nishida, Naohiro et al. 2011. "MicroRNA MiR-125b Is a Prognostic Marker in Human Colorectal Cancer." *International Journal of Oncology* 38(5): 1437–43.
- Nosjean, Olivier et al. 2000. "Identification of the Melatonin-Binding Site MT3 as the Quinone Reductase 2." *Journal of Biological Chemistry* 275(40): 31311–17.
- O'Brien, Catherine A, Aaron Pollett, Steven Gallinger, and John E Dick. 2007. "A Human Colon Cancer Cell Capable of Initiating Tumour Growth in Immunodeficient Mice." *Nature* 445(4): 106–10.
- Obrocea, FI, Maria Sajin, Elena Cristina Marinescu, and D. Stoica. 2011. "Colorectal Cancer and the 7th Revision of the TNM Staging System: Review of Changes and Suggestions for Uniform Pathologic Reporting." *Romanian Journal of Morphology and Embryology* 52(2): 537–44.
- Öner, Meryem Gülfem et al. 2018. "Combined Inactivation of TP53 and MIR34A Promotes Colorectal Cancer Development and Progression in Mice Via Increasing Levels of IL6R and PAI1." *Gastroenterology*.
- Ozaki, Yoshisuke, and Harry J Lynch. 1976. "Presence of Melatonin in Plasma and Urine of Pinealectomized Rats." *Endocrinology* 99(2): 641–44.
- Pagliuca, A. et al. 2013. "Analysis of the Combined Action of MiR-143 and MiR-145 on Oncogenic Pathways in Colorectal Cancer Cells Reveals a Coordinate Program of Gene Repression." *Oncogene*.
- Papaccio, Federica et al. 2017. "Concise Review: Cancer Cells, Cancer Stem Cells, and Mesenchymal Stem Cells: Influence in Cancer Development." *Stem Cells Translational Medicine* 6(12): 2115–25.
- Park, Ki Ho et al. 2011. "Melatonin Promotes Osteoblastic Differentiation through the BMP/ERK/Wnt Signaling Pathways." *Journal of Pineal Research* 51(2): 187–94.
- Patil, Harshali et al. 2017. "Chasing the Personalized Medicine Dream through Biomarker Validation in Colorectal Cancer." *Drug Discovery Today*.
- Peng, Wei et al. 2014. "Overexpression of MiR-145 Increases the Sensitivity of Vemurafenib in Drug-Resistant Colo205 Cell Line." *Tumor Biology*.
- Pietrantonio, Filippo et al. 2014. "TP53 Mutations in Advanced Colorectal Cancer : The Dark Side of the Moon." *Oncology* (86): 289–94.

- Pilat, N. et al. 2015. "Assessing the TP53 Marker Type in Patients Treated with or without Neoadjuvant Chemotherapy for Resectable Colorectal Liver Metastases: A P53 Research Group Study." *European Journal of Surgical Oncology*.
- Poel et al. 2019. "Proteomic Analysis of MiR-195 and MiR-497 Replacement Reveals Potential Candidates That Increase Sensitivity to Oxaliplatin in MSI/P53wt Colorectal Cancer Cells." *Cells* 8(9): 1111. <https://www.mdpi.com/2073-4409/8/9/1111>.
- Poon, A. M S, A. S Y Mak, and H. T. Luk. 1996. "Melatonin and 2[125I]Iodomelatonin Binding Sites in the Human Colon." *Endocrine Research* 22(1): 77–94. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0029670379&partnerID=tZOtx3y1>.
- Proietti, Sara et al. 2014. "Melatonin Down-Regulates MDM2 Gene Expression and Enhances P53 Acetylation in MCF-7 Cells." *Journal of Pineal Research* 57(1): 120–29.
- Pu, Xing Xiang et al. 2010. "Circulating MiR-221 Directly Amplified from Plasma Is a Potential Diagnostic and Prognostic Marker of Colorectal Cancer and Is Correlated with P53 Expression." *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*.
- Puca, Francesca et al. 2014. "HMGA1 Silencing Restores Normal Stem Cell Characteristics in Colon Cancer Stem Cells by Increasing P53 Levels." *Oncotarget*.
- Punt, Cornelis J.A., Miriam Koopman, and Louis Vermeulen. 2017. "From Tumour Heterogeneity to Advances in Precision Treatment of Colorectal Cancer." *Nature Reviews Clinical Oncology*.
- Qin, Jiang Jiang et al. 2018. "Natural Products Targeting the P53-MDM2 Pathway and Mutant P53: Recent Advances and Implications in Cancer Medicine." *Genes and Diseases* 5(3): 204–19. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2018.07.002>.
- Raikhlin, Nathan T., and Igor M. Kvetnoy. 1976. "Melatonin and Enterochromaffin Cells." *Acta Histochemica* 55(1): 19–24. [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-1281\(76\)80092-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-1281(76)80092-X).
- Raskov, Hans, Hans Christian Pommergaard, Jakob Burcharth, and Jacob Rosenberg. 2014. "Colorectal Carcinogenesis-Update and Perspectives." *World Journal of Gastroenterology* 20(48): 18151–64.
- Reiter, Russel J. 1991a. "Melatonin: The Chemical Expression of Darkness." *Molecular and Cellular Endocrinology* 79(1–3).
- . 1991b. "Pineal Melatonin: Cell Biology of Its Synthesis and of Its Physiological Interactions." *Endocrine Reviews* 12(2): 151–80.
- . 2017. 18 International Journal of Molecular Sciences *Melatonin, a Full Service Anti-Cancer Agent: Inhibition of Initiation, Progression and Metastasis*.

- Reya, Tannishtha, Sean J Morrison, Michael F Clarke, and Irving L Weissman. 2001. "Stem Cells, Cancer, and Cancer Stem Cells." *Nature* 414: 105–11.
- Ricci-Vitiani, Lucia et al. 2007. "Identification and Expansion of Human." *Nature* 445(4): 111–15.
- Risio, M. 2012. "The Natural History of Colorectal Adenomas and Early Cancer." *Der Pathologe* 33 Suppl 2: 206–10.
- Rokavec, Matjaz et al. 2014. "IL-6R/STAT3/MiR-34a Feedback Loop Promotes EMT-Mediated Colorectal Cancer Invasion and Metastasis." *Journal of Clinical Investigation*.
- Rokavec, Matjaz, Nassim Bouznad, and Heiko Hermeking. 2019. "Paracrine Induction of Epithelial-Mesenchymal Transition Between Colorectal Cancer Cells and Its Suppression by a P53/MiR-192/215/NID1 Axis." *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 7(4): 783–802.
<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1440-1746.2010.06417.x>.
- Rudolf, Emil, Stanislav John, and Miroslav Cervinka. 2012. "Irinotecan Induces Senescence and Apoptosis in Colonic Cells in Vitro." *Toxicology Letters*.
- Russo, Antonio et al. 2005. "The TP53 Colorectal Cancer International Collaborative Study on the Prognostic and Predictive Significance of P53 Mutation: Influence of Tumor Site, Type of Mutation, and Adjuvant Treatment." *Journal of Clinical Oncology* 23(30): 7518–28.
- Rustgi, Anil K. 2007. "The Genetics of Hereditary Colon Cancer." *Genes and Development* 21(20): 2525–38.
- Saidi, H. S., D. Karuri, and E. O. Nyaim. 2008. "Correlation of Clinical Data, Anatomical Site and Disease Stage in Colorectal Cancer." *East African Medical Journal* 85(6): 259–62.
- Sánchez-Sánchez, Ana M. et al. 2011. "Intracellular Redox State as Determinant for Melatonin Antiproliferative vs Cytotoxic Effects in Cancer Cells." *Free Radical Research* 45(11–12): 1333–41.
- Sanders, Matthew A. 2011. "Colon Cancer Stem Cells: Implications in Carcinogenesis." *Frontiers in Bioscience* 16(1): 1651.
- Santoro, R. et al. 2012. "Melatonin Triggers P53 Serphosphorylation and Prevents DNA Damage Accumulation." *Oncogene* 31(24): 2931–42.
<http://dx.doi.org/10.1038/onc.2011.469>.
- Santoro, Raffaella et al. 2013. "Blockage of Melatonin Receptors Impairs P53-Mediated Prevention of DNA Damage Accumulation." *Carcinogenesis* 34(5): 1051–61.

- Seely, Dugald et al. 2012. "Melatonin as Adjuvant Cancer Care with and without Chemotherapy: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Trials." *Integrative Cancer Therapies* 11(4): 293–303.
- Shahriyari, Leili, and Natalia L. Komarova. 2013. "Symmetric vs. Asymmetric Stem Cell Divisions: An Adaptation against Cancer?" *PloS one* 8(10).
- Shen, Hong et al. 2015. "Different Treatment Strategies and Molecular Features between Right-Sided and Left-Sided Colon Cancers." *World Journal of Gastroenterology*.
- Shetzer, Yoav et al. 2014. "The Paradigm of Mutant P53-Expressing Cancer Stem Cells and Drug Resistance." *Carcinogenesis*.
- Shi, Lei et al. 2014. "P53-Induced MiR-15a/16-1 and AP4 Form a Double-Negative Feedback Loop to Regulate Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis in Colorectal Cancer." *Cancer Research* 74(2): 532–42.
- Shmelkov, Sergey V. et al. 2008. "CD133 Expression Is Not Restricted to Stem Cells, and Both CD133 + and CD133- Metastatic Colon Cancer Cells Initiate Tumors." *Journal of Clinical Investigation*.
- Slattery, Martha L. et al. 2019. "The P53-Signaling Pathway and Colorectal Cancer: Interactions between Downstream P53 Target Genes and MiRNAs." *Genomics*.
- Smirnov, A.N. 2001. "Nuclear Melatonin Receptors." *Biochemistry (Moscow)* 66(1): 28–36. http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/contents/v66/pdf/bcm_0019.pdf.
- Solomon, Hilla et al. 2018. "Mutant P53 Gain of Function Underlies High Expression Levels of Colorectal Cancer Stem Cells Markers." *Oncogene* 37(12): 1669–84.
- Song, B. et al. 2009. "Mechanism of Chemoresistance Mediated by MiR-140 in Human Osteosarcoma and Colon Cancer Cells." *Oncogene*.
- Spada, Cristiano et al. 2014. "Clinical Indications for Computed Tomographic Colonography : European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) and European Society of Gastrointestinal and Abdominal Radiology (ESGAR) Guideline." : 897–908.
- Stebelová, Katarína et al. 2010. "Immunohistochemical Definition of MT2receptors and Melatonin in the Gastrointestinal Tissues of Rat." *Acta Histochemica* 112(1): 26–33.
- Stehle, Jörg H. et al. 2011. "A Survey of Molecular Details in the Human Pineal Gland in the Light of Phylogeny, Structure, Function and Chronobiological Diseases." *Journal of Pineal Research* 51(1): 17–43.

- Stoian, M, V Stoica, and G Radulian. 2016. "Stem Cells and Colorectal Carcinogenesis." *Journal of medicine and life* 9(1): 6–11.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27713769>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5052488>.
- Sundaram, Prema et al. 2011. "P53-Responsive MiR-194 Inhibits Thrombospondin-1 and Promotes Angiogenesis in Colon Cancers." *Cancer Research*.
- Tan, Dun Xian et al. 2015. "Melatonin as a Potent and Inducible Endogenous Antioxidant: Synthesis and Metabolism." *Molecules* 20(10): 18886–906.
- Tang, Yongjun et al. 2017. "LncRNA XIST Interacts with MiR-140 to Modulate Lung Cancer Growth by Targeting IASPP." *Oncology Reports* 38(2): 941–48.
- Tariq, Kanwal, Kulsoom Ghias, Kanwal Tariq, and Kulsoom Ghias. 2016. "Colorectal Cancer Carcinogenesis: A Review of Mechanisms." *Cancer Biology & Medicine* 13(1): 120–35. <http://www.cancerbiomed.org/index.php/cocr/article/view/913>.
- Tian, Wei et al. 2018. "MALAT1–MiR663a Negative Feedback Loop in Colon Cancer Cell Functions through Direct MiRNA–LncRNA Binding." *Cell Death and Disease* 9(9).
<http://dx.doi.org/10.1038/s41419-018-0925-y>.
- Todaro, Matilde, Maria Giovanna Francipane, Jan Paul Medema, and Giorgio Stassi. 2010. "Colon Cancer Stem Cells: Promise of Targeted Therapy." *Gastroenterology* 138(6): 2151–62. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2009.12.063>.
- Tomas-Zapico, Cristina, and Ana Coto-Montes. 2005. "A Proposed Mechanism to Explain the Stimulatory Effect of Melatonin on Antioxidative Enzymes." *Journal of Pineal Research* 39(2): 99–104.
- Torre, Lindsey A. et al. 2015. "Interpretation of Model in Modelling Ecological Niche.Pdf." *CA: a cancer journal of clinicians*. 65(2): 87–108.
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21262/abstract>.
- Toyota, Minoru et al. 2008. "Epigenetic Silencing of MicroRNA-34b/c and B-Cell Translocation Gene 4 Is Associated with CpG Island Methylation in Colorectal Cancer." *Cancer Research* 68(11): 4123–32.
- Tsuchiya, Naoto et al. 2011. "Tumor Suppressor MiR-22 Determines P53-Dependent Cellular Fate through Post-Transcriptional Regulation of P21." *Cancer Research* 71(13): 4628–39.
- Tuy, Hoang Dinh et al. 2016. "ABCG2 Expression in Colorectal Adenocarcinomas May Predict Resistance to Irinotecan." *Oncology Letters*.

- Vaiopoulos, Aristides G., Ioannis D. Kostakis, Michael Koutsilieris, and Athanasios G. Papavassiliou. 2012. "Concise Review: Colorectal Cancer Stem Cells." *Stem Cells* 30(3): 363–71.
- Vega, Pablo, Fátima Valentín, and Joaquín Cubiella. 2015. "Colorectal Cancer Diagnosis: Pitfalls and Opportunities." *World Journal of Gastrointestinal Oncology* 7(12): 422. <http://www.wjgnet.com/1948-5204/full/v7/i12/422.htm>.
- Venegas, Carmen et al. 2013. "Analysis of the Daily Changes of Melatonin Receptors in the Rat Liver." *Journal of Pineal Research* 54(3): 313–21.
- Venegas Maldonado, Carmen Jesica. 2012. *Estudio de Los Mecanismos de Regulación de La Síntesis , Distribución y Efectos de La Melatonina Extrapineal*.
- Vieler, Maximilian, and Suparna Sanyal. 2018. "P53 Isoforms and Their Implications in Cancer." *Cancers* 10(9): 288.
- Viswanathan, Vignesh et al. 2017. *77 Cancer Research An MiRNA Expression Signature for the Human Colonic Stem Cell Niche Distinguishes Malignant from Normal Epithelia*.
- Vleugels, Jasper L.A., Meta C.J. Van Lanschot, and Evelien Dekker. 2016. "Colorectal Cancer Screening by Colonoscopy: Putting It into Perspective." *Digestive Endoscopy* 28(3): 250–59.
- Vogt, Markus et al. 2011. "Frequent Concomitant Inactivation of MiR-34a and MiR-34b/c by CpG Methylation in Colorectal, Pancreatic, Mammary, Ovarian, Urothelial, and Renal Cell Carcinomas and Soft Tissue Sarcomas." *Virchows Archiv* 458(3): 313–22.
- Vousden, Karen H., and Carol Prives. 2009. "Blinded by the Light: The Growing Complexity of P53." *Cell* 137(3): 413–31.
- Vriend, Jerry, and Russel J. Reiter. 2016. "Melatonin, Bone Regulation and the Ubiquitin-Proteasome Connection: A Review." *Life Sciences* 145: 152–60. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2015.12.031>.
- Vychytilova-Faltejskova, Petra et al. 2017. "MiR-215-5p Is a Tumor Suppressor in Colorectal Cancer Targeting EGFR Ligand Epiregulin and Its Transcriptional Inducer HOXB9." *Oncogenesis* 6(11). <http://dx.doi.org/10.1038/s41389-017-0006-6>.
- Wang, G. et al. 2015. "Altered P53 Regulation of MIR-148b and P55PIK Contributes to Tumor Progression in Colorectal Cancer." *Oncogene* 34(7): 912–21.
- Wang, Lihua et al. 2016. "A Long Non-Coding RNA Targets MicroRNA MiR-34a to Regulate Colon Cancer Stem Cell Asymmetric Division." *eLife* 5(APRIL2016): 1–16.

- Wang, Lin, and Peiwu Yu. 2016. "MiR-300 Promotes Proliferation and EMT-Mediated Colorectal Cancer Migration and Invasion by Targeting P53." *Oncology Reports* 36(6): 3225–32.
- Wang, Xuefei, Shile Huang, and Ji-long Chen. 2017. "Understanding of Leukemic Stem Cells and Their Clinical Implications." *Molecular Cancer*: 1–10.
<http://dx.doi.org/10.1186/s12943-016-0574-7>.
- Weichert, W. et al. 2004. "ALCAM/CD166 Is Overexpressed in Colorectal Carcinoma and Correlates with Shortened Patient Survival." *Journal of Clinical Pathology* 57(11): 1160–64.
- Wielenga, Vera J.M. et al. 1993. "Expression of CD44 Variant Proteins in Human Colorectal Cancer Is Related to Tumor Progression." *Cancer Research*.
- Worthley, Daniel L., Vicki L. Whitehall, Kevin J. Spring, and Barbara A. Leggett. 2007. "Colorectal Carcinogenesis: Road Maps to Cancer." *World Journal of Gastroenterology* 13(28): 3784–91.
- Wu, Colleen, and Benjamin A Alman. 2008. "Side Population Cells in Human Cancers." 268: 1–9.
- Wu, Jianmin et al. 2012. "MicroRNA-34a Inhibits Migration and Invasion of Colon Cancer Cells via Targeting to Fra-1." *Carcinogenesis* 33(3): 519–28.
- Xi, Yaguang et al. 2006. "Differentially Regulated Micro-RNAs and Actively Translated Messenger RNA Transcripts by Tumor Suppressor P53 in Colon Cancer." *Clinical Cancer Research* 12(7 I): 2014–24.
- Xia, Yaoyao et al. 2019. "Melatonin in Macrophage Biology: Current Understanding and Future Perspectives." *Journal of Pineal Research* 66(2): 1–21.
- Xu, Ke et al. 2017. "MiR-503-5p Confers Drug Resistance by Targeting PUMA in Colorectal Carcinoma." *Oncotarget* 8(13): 21719–32.
- Xu, X. T. et al. 2012. "MicroRNA Expression Profiling Identifies MiR-328 Regulates Cancer Stem Cell-like SP Cells in Colorectal Cancer." *British Journal of Cancer* 106(7): 1320–30.
- Yan, Ming et al. 2016. "Identification of Potential Therapeutic Targets for Colorectal Cancer by Bioinformatics Analysis." *Oncology Letters* 12(6): 5092–98.
- Yang, Mengqi, Panpan Liu, and Peng Huang. 2016. "Cancer Stem Cells, Metabolism, and Therapeutic Significance." *Tumor Biology* 37(5): 5735–42.
<http://dx.doi.org/10.1007/s13277-016-4945-x>.

- Yang, Pengxiang et al. 2017. 32 *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)* *The Long Noncoding RNA-ROR Promotes the Resistance of Radiotherapy for Human Colorectal Cancer Cells by Targeting the P53/MiR-145 Pathway.*
- Yang, Shu et al. 2015. "Resveratrol Elicits Anti-Colorectal Cancer Effect by Activating MiR-34c-KITLG in Vitro and in Vivo." *BMC Cancer* 15(1): 1–11.
- Ye, J. et al. 2017. "Core 3 Mucin-Type O-Glycan Restoration in Colorectal Cancer Cells Promotes MUC1/P53/MiR-200c-Dependent Epithelial Identity." *Oncogene* 36(46): 6391–6407.
- Yoshida, Go J, and Hideyuki Saya. 2016. "Therapeutic Strategies Targeting Cancer Stem Cells." *Cancer Science* 107(1).
- Youssef, Omar et al. 2018. "Expression of Plasma MiRNA-221 in Colorectal Carcinoma Patients and Its Diagnostic Significance in Comparison with P53 Expression." *Clinical Laboratory.*
- Yu, Yingjie et al. 2015. "MiR-21 and MiR-145 Cooperation in Regulation of Colon Cancer Stem Cells." *Molecular Cancer* 14(1).
- Zeilstra, Jurrit et al. 2013. "CD44 Expression in Intestinal Epithelium and Colorectal Cancer Is Independent of P53 Status." *PLoS ONE.*
- Zeng, Yang et al. 2016. "Upregulation of MicroRNA-370 Promotes Cell Apoptosis and Inhibits Proliferation by Targeting PTEN in Human Gastric Cancer." *International Journal of Oncology.*
- Zeuner, Ann, Matilde Todaro, Giorgio Stassi, and Ruggero De Maria. 2014. "Colorectal Cancer Stem Cells: From the Crypt to the Clinic." *Cell Stem Cell* 15(6): 692–705. <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2014.11.012>.
- Zhai, H. et al. 2013. "Inhibition of Autophagy and Tumor Growth in Colon Cancer by MiR-502." *Oncogene.*
- Zhang, Cen et al. 2014. "MicroRNA-339-5p Inhibits Colorectal Tumorigenesis through Regulation of the MDM2/P53 Signaling." *Oncotarget* 5(19): 9106–17.
- . 2016. "MicroRNA-1827 Represses MDM2 to Positively Regulate Tumor Suppressor P53 and Suppress Tumorigenesis." *Oncotarget.*
- Zhang, N. et al. 2013. "MicroRNA-7 Is a Novel Inhibitor of YY1 Contributing to Colorectal Tumorigenesis." *Oncogene.*
- Zhang, Peili et al. 2017. "MiR-600 Inhibits Cell Proliferation, Migration and Invasion by Targeting P53 in Mutant P53-Expressing Human Colorectal Cancer Cell Lines." *Oncology Letters.*

- Zhang, Shuo, Simon Chen, Yuan Li, and Yu Liu. 2017. 117 *Pharmacological Research Melatonin as a Promising Agent of Regulating Stem Cell Biology and Its Application in Disease Therapy*. Elsevier Ltd.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2016.12.035>.
- Zhang, Yang, Liying Geng, Geoffrey Talmon, and Jing Wang. 2015. "MicroRNA-520g Confers Drug Resistance by Regulating P21 Expression in Colorectal Cancer." *Journal of Biological Chemistry*.
- Zhou, Bin Bing S. et al. 2009. "Tumour-Initiating Cells: Challenges and Opportunities for Anticancer Drug Discovery." *Nature Reviews Drug Discovery* 8(10): 806–23.
<http://dx.doi.org/10.1038/nrd2137>.
- Zhou, Taicheng et al. 2018. "MicroRNA-128 Targeting RPN2 Inhibits Cell Proliferation and Migration through the AKT-P53-Cyclin Pathway in Colorectal Cancer Cells." *Oncology Letters*.
- Zimmerman, Amy L., and Shiyong Wu. 2011. "MicroRNAs, Cancer and Cancer Stem Cells." *Cancer Letters* 300(1): 10–19.
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383510004647>.
- Ziółko, E. et al. 2015. "The Profile of Melatonin Receptors Gene Expression and Genes Associated with Their Activity in Colorectal Cancer: A Preliminary Report." *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*.

ANEXO

FORMULARIO DE INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO INFORMADO ESCRITO.

Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía

NODO: Biobanco del Hospital Universitario San Cecilio

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

Este documento sirve para que usted otorgue su consentimiento para donar sus muestras biológicas, o las del sujeto al que representa, al Biobanco indicado, establecimiento público, sin ánimo de lucro, dependiente de la Consejería de Salud/del Servicio Andaluz de Salud, que acoge colecciones de muestras biológicas concebidas con fines diagnósticos o de investigación biomédica y organizadas como una unidad técnica con criterios de calidad, orden y destino, donde serán conservadas hasta que se agoten por su uso, salvo que usted solicitara su eliminación. Las muestras biológicas son un excelente elemento para la investigación de enfermedades. A través de dichas investigaciones se podrán obtener datos que permitirán mejorar el conocimiento sobre la aparición, desarrollo y tratamiento de multitud de enfermedades. Esta hoja de información puede contener palabras que usted no entienda. Por favor, pídale al profesional sanitario que le explique la información que no comprenda. Tómese el tiempo necesario para decidir si quiere o no donar su muestra biológica y consulte a personas de su confianza si lo desea. Para consultas que desee plantear posteriormente, podrá dirigirse al Biobanco o a la dirección de correo electrónico: ines.aroca.exts@juntadeandalucia.es / benilde.ayala.exts@juntadeandalucia.es

Las muestras biológicas donadas y sus datos clínicos asociados se utilizarán de conformidad con lo establecido en la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica (en adelante Ley de Investigación biomédica).

Es posible que la información obtenida de las investigaciones en las que se utilicen sus muestras no le genere un beneficio directo, pero habrá contribuido al avance de la medicina y del conocimiento de diversas enfermedades, lo que supondrá, sin duda, un beneficio para la sociedad.

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

En el apartado dedicado al consentimiento (2.3), podrá decidir si quiere que sus muestras se conserven de forma codificada (en cuyo caso se identifican con un código que protege su identidad) o anonimizada (eliminandose de forma irreversible toda vinculación con su identidad).

Sus muestras y los datos asociados a las mismas sólo se cederán a terceros que las utilicen en investigación biomédica de manera anónima o disociada. Si, por la naturaleza del proyecto de investigación en el que se utilizara su muestra se

necesitaran datos clínicos adicionales, el Biobanco coordinaría la obtención de los mismos, siempre que la muestra no hubiera sido anonimizada.

1. LO QUE USTED DEBE SABER:

1.1. Obtención de las muestras

Las muestras serán obtenidas durante el procedimiento médico-quirúrgico al que va a someterse o se ha sometido durante su proceso asistencial, o a través de un procedimiento expreso para obtenerla, según lo indicado en el apartado sobre consentimiento (2.3). En el caso de que usted done las muestras obtenidas durante un procedimiento médico-quirúrgico asistencial, no existe ningún inconveniente adicional derivado de la donación de las mismas. Si, por el contrario, las muestras fueran extraídas expresamente para la donación para investigación biomédica podrían existir inconvenientes vinculados con la obtención de las mismas, de las que será convenientemente informado en la hoja de información del procedimiento correspondiente.

1.2. Utilización de las muestras

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

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

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

1.3. Información relacionada con las muestras

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

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

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

1.4. Posibilidad de ponerse nuevamente en contacto

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

1.5. Protección de datos y confidencialidad de la información

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

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

Sus datos de carácter personal serán incorporados a un fichero automatizado, debidamente inscrito en la Agencia Española de Protección de Datos, cuya titularidad corresponde al Servicio Andaluz de Salud. Sólo los responsables del Biobanco podrán identificar a quién corresponde cada muestra o dato, si no está anonimizada.

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

1.6. Derecho de revocación del consentimiento

Salvo que sus muestras se encuentren anonimizadas, podrá revocar o retirar, en cualquier momento, el consentimiento prestado.

Para ello, deberá dirigirse al Biobanco, pudiendo solicitar la eliminación o la anonimización de las muestras.

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

1.7. Información relativa a análisis genéticos

Salvo que usted manifieste lo contrario en el apartado dedicado al consentimiento, se podrán realizar análisis genéticos. Excepto si sus muestras son anonimadas, tiene derecho a conocer los datos genéticos que se obtengan a partir del análisis de las muestras donadas, así como de la información relativa a su salud derivada de dichos análisis, según los términos en que exprese su voluntad en el apartado 2.3.

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

1.8. Otras consideraciones

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

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA DONACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS AL BIOBANCO. Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía. Nodo del Hospital Universitario San Cecilio.

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

Apellidos y nombre del/de la Donante:

.....

DNI / NIE: NUHSA:

Apellidos y nombre del/de la representante legal:

.....

DNI / NIE:

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

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

Apellidos y nombre Fecha Firma

.....

CONSENTIMIENTO:

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

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

Dichas muestras son:

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

-Tomadas mediante el procedimiento
expreso.....

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

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

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

– Anonimizada (no se podrán asociar las muestras conmigo, por haberse eliminado
de forma irreversible la vinculación entre las mismas y mi identidad). Deseo
establecer restricciones respecto al uso de la muestra, para que no sea utilizada
en.....

.....

Autorizo que se pueda contactar conmigo posteriormente: – SI – NO

En caso afirmativo, por favor, indique el medio de hacerlo:.....

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

Marque lo que proceda: – SI – NO

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

En....., ade..... de.....

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

Fdo.: Fdo.:

REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO PARA USO DE MUESTRAS DONADAS:

Yo,D./Dña.....revoco el
consentimiento informado otorgado en el
documento.....

...(especificar fecha aproximada y/o procedimiento).

Solicito:

- La eliminación de las muestras donadas
- La anonimización de las mismas

Otras

consideraciones:.....
.....

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

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

Fdo.: Fdo.: