

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA CLÍNICA Y SALUD PÚBLICA**



**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**TESIS DOCTORAL**

**Interacción de los sistemas endotelina-1**

**y hemo oxigenasa-1 en el cáncer colorrectal y su relación con la progresión  
de la enfermedad**

**Memoria presentada por Dña. Agata Szuba para optar a la mención de  
Doctor por la Universidad de Granada**

**Granada, 2021**

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Agata Szuba  
ISBN: 978-84-1117-059-8  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/71093>

La doctoranda **Agata Szuba** y los directores de la tesis **Josefa León López, Cristina González Puga y Javier Salmerón Escobar** garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por la doctoranda bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

En Granada, a 7 de Junio de 2021

**Directores de la tesis doctoral:**

Josefa León López

Cristina González Puga

Javier Salmerón Escobar

**Doctorando:**

Agata Szuba

A mis padres,  
por estar siempre a mi lado  
y cuidarme en tiempos difíciles.

Al Profesor Jerzy Szuba,  
mi abuelo, científico, héroe,  
por su amor, bondad y ética.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su colaboración han hecho posible la realización de este proyecto, mencionando especialmente a los directores de esta tesis Dr. Javier Salmerón Escobar, Dra. Josefa León López y Dra. Cristina González Puga.

Al Dr. Javier Salmerón, por brindarme la oportunidad de participar en su proyecto de investigación del que nace esta tesis doctoral.

A la Dra. Josefa León, mi admiración y gratitud por su incondicional y constante apoyo, por su paciencia, sabiduría y dedicación a la elaboración de este proyecto y seguimiento de esta tesis.

A la Dra. Cristina González, por invitarme a formar parte de este gran equipo, por guiarme durante varios años en el ámbito profesional y por ser un ejemplo a seguir como persona y cirujano.

A mis amigas, Ángela Argote Camacho y Esther Brea Gómez por creer en mí, por su ayuda y sus consejos.

Por último, quiero mostrar mi agradecimiento a todos los miembros del grupo de investigación MP-15, en especial a Sandra, Sara, José David, María y Julia, sin cuyo increíble trabajo diario esta tesis no hubiese sido posible.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	9
<b>SUMMARY</b> .....	10
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	11
<b>1. ADENOCARCINOMA COLORRECTAL</b> .....	11
1.1. INCIDENCIA Y EPIDEMIOLOGÍA .....	11
1.1. Edad y sexo .....	11
1.1.2. Factores ambientales .....	13
1.1.3. Factores genéticos .....	14
1.2. GENERALIDADES .....	14
1.2.1. Localización y clínica .....	14
1.2.2. Diagnóstico .....	15
1.3. ETIOPATOLOGÍA .....	16
1.3.1. Secuencia adenoma – carcinoma .....	16
1.3.2. Biología molecular .....	16
1.4. CCR Y ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL.....	17
1.5. FACTORES FAMILIARES .....	18
1.5.1. Síndromes asociados con CCR hereditario .....	18
1.5.1.1. Poliposis adenomatosa Familiar (PAF) .....	18
1.5.1.2. CCR hereditario no polipósico (CCHNP) .....	19
1.5.1.3. Síndromes de poliposis hamartomatosa .....	19
1.6. PREVENCIÓN DEL CCR .....	19
1.7. PRONÓSTICO DEL CCR .....	21
1.8. ESTADIFICACIÓN DEL CCR .....	23

1.9. TRATAMIENTO .....	25
1.9.1. Generalidades .....	25
1.9.2. Quimioterapia en CCR .....	26
1.9.3. Tratamiento adyuvante en cáncer de recto .....	27
2. ENDOTELINA .....	27
2.1. ESTRUCTURA DE LAS ETS .....	28
2.2. SÍNTESIS DE LAS ETS .....	30
2.2.1 Regulación de la síntesis de endotelina-1 .....	30
2.3. MECANISMO DE ACCIÓN .....	30
2.4. FUNCIONES BIOLÓGICAS EN TEJIDO SANO Y ÓRGANOS .....	32
2.4.1. Efecto de la ET-1 sobre los vasos sanguíneos sistémicos .....	32
2.4.2. Efecto de la ET-1 sobre la presión arterial .....	32
2.4.3. Efecto de la ET-1 sobre el corazón .....	32
2.4.4. Efecto de la ET-1 sobre los vasos sanguíneos pulmonares .....	33
2.4.5. Efecto de la ET-1 sobre riñón .....	33
2.5. ETS Y CÁNCER .....	33
2.5.1.1. Efecto de la ET-1 sobre los tejidos tumorales .....	33
2.5.1.2. ET-1 y proliferación celular .....	35
2.5.1.3. ET-1 y la supervivencia de las células tumorales .....	35
2.5.1.4. Impacto de la ET-1 sobre la migración celular y la invasión .....	36
2.5.1.5. ETs y metástasis .....	36
2.5.1.6. ET-1 y osteogénesis .....	37
2.5.1.7. ET-1 y dolor .....	38
2.5.1.8. ET-1 y angiogénesis y linfogénesis .....	38
2.5.1.9. ET-1 y respuesta inflamatoria .....	38
2.5.2. Relación de la ET-1 en diferentes tipos de cáncer .....	39
2.5.2.1. ET-1 y cáncer de ovario .....	39

2.5.2.2. ET-1 y cáncer de próstata .....	40
2.5.2.3. ET-1 y cáncer de útero .....	40
2.5.2.4. ET-1 y cáncer de pulmón .....	40
2.5.2.5. ET-1 y cáncer de mama .....	40
2.5.2.6. ET-1 y otros tipos de cáncer .....	40
2.6. OPORTUNIDADES TERAPÉUTICAS .....	41
2.7. ETS Y CCR .....	42
3. HEMOOXIGENASA .....	43
3.1. GENERALIDADES .....	44
3.2. ESTRUCTURA Y LOCALIZACIÓN DE LA HEMOOXIGENASA-1 .....	45
3.3. REGULACIÓN DE LA HEMOOXIGENASA .....	45
3.3.1. Genes .....	45
3.3.2. Factores de regulación de la hemooxigenasa .....	45
3.4. MECANISMO DE ACCIÓN .....	46
3.5. FUNCIONES FISIOLÓGICAS DE LA HEMOOXIGENASA SOBRE TEJIDOS, ÓRGANOS Y SISTEMAS .....	48
3.5.1. HO-1 y los procesos inflamatorios .....	48
3.5.2. Función antioxidante de la HO-1 .....	49
3.5.3. Función antiapoptótica de la HO-1 .....	49
3.5.4. HO-1 y proliferación celular .....	50
3.5.5. HO-1 y el sistema gastrointestinal .....	50
3.6 HO-1 Y CÁNCER .....	52
3.6.1. Impacto de la HO-1 en los tejidos tumorales mediante la modulación de la apoptosis .....	52
3.6.2. Impacto de la HO-1 en los tejidos tumorales mediante la modulación de la ferroptosis .....	54
4. CÁNCER STEM CELLS .....	55
4.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS CÉLULAS MADRE .....	56

4.2. CMCs Y CÁNCER COLORRECTAL .....	60
4.3. CÉLULAS MADRE CANCEROSAS Y PROGRESIÓN DEL CCR .....	63
4.3.1 Métastasis .....	63
4.3.2. CCR-CMCs y resistencia a la quimio y radioterapia .....	65
4.4. CÉLULAS STEM Y HEMOOXIGENASA .....	65
4.5. CÉLULCAS MADRE CANCEROSAS DEL CCR Y LA ENDOTELINA-1 .....	67
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>68</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>69</b>
1. Cultivo celular y reactivos .....	69
2. Pacientes .....	69
3. Transfección transitoria de la HO-1 .....	70
4. Western blot .....	70
5. ELISA y ET-1 .....	70
6. Aislamiento del ARN y síntesis del ADNc .....	70
7. PCR en tiempo real .....	71
8. Extracción del ADN y análisis de mutaciones del gen p53 .....	71
9. Ensayo ALDEFLUOR .....	71
10. Aislamiento y caracterización de las CMCs .....	72
11. Ensayo de formación de las esferas .....	72
12. Ensayo MTT .....	72
13. Análisis estadístico .....	73
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>74</b>
1. La sobreexpresión de la HO-1 induce un aumento de la subpoblación de CMCs en el CCR in vitro independientemente del estado de p53 .....	74
2. La sobreexpresión de la HO-1 induce la expresión de ECE-1 y la producción de la ET-1 por las células CCR .....	76
3. La sobreexpresión de la HO-1 induce las propiedades stem en las líneas celulares del CCR a través de ECE-1/ET-1 solo en células p53 salvaje .....	82

4. La sobreexpresión de la HO-1 induce resistencia al tratamiento con 5-FU en CCR	
in vitro .....	84
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>85</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>88</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>89</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>94</b>

## RESUMEN

La hemo oxigenasa-1 (HO-1) es una proteína antioxidante implicada en la progresión de tumores, las metástasis y la resistencia a la terapia. La expresión elevada de HO-1 se asocia con el fenotipo stem en varios tipos de cáncer, aunque este aspecto aún no se ha estudiado en el cáncer colorrectal (CCR). Utilizando un modelo in vitro, demostramos que la sobreexpresión de HO-1 regula el fenotipo stem y la resistencia al tratamiento con 5-FU, independientemente del p53.

En muestras de los pacientes con CCR, la expresión de HO-1 y ECE-1 se correlaciona significativamente, y p53 no influyó en este resultado. El CO activó la vía ECE-1 / ET-1, que podría explicar los efectos protumorales de HO-1 en las células de p53 salvaje, como se demostró después del tratamiento con bosentan (un antagonista de los receptores de endotelina-1 ETAR y ETBR).

Sorprendentemente, en células con p53 inactivo o p53 mutado con ganancia de función, la ET-1 producida por ECE-1 actuó como una molécula protectora, ya que el tratamiento con bosentan condujo a una mayor eficiencia para la formación de esferas y el porcentaje de CSC. marcadores. En estas células, HO-1 podría activar o desactivar ciertas rutas desconocidas que podrían inducir estas respuestas contrarias al bosentan, aunque se necesitan más investigaciones para confirmar estos resultados. Los pacientes que presentan tumores con alta expresión de HO-1 y ECE-1 y un p53 de tipo no salvaje deben considerarse para terapias basadas en HO-1 en lugar de terapias basadas en antagonistas de ET-1.

## SUMMARY

Heme oxygenase-1 (HO-1) is an antioxidant protein implicated in tumor progression, metastasis, and resistance to therapy. Elevated HO-1 expression is associated with stemness in several types of cancer, although this aspect has not been yet studied in colorectal cancer (CCR). Using an in vitro model, we demonstrated that HO-1 overexpression regulates stemness and resistance to 5-FU treatment, regardless p53.

In samples from CRC patients, HO-1 and ECE-1 expression correlates significantly, and p53 had no influence on this result. CO activated the ECE-1/ET-1 pathway, which could account for the protumoral effects of HO-1 in p53 wild-type cells, as demonstrated after treatment with bosentan (an antagonist of both ETRA and ETRB endothelin-1 receptors).

Surprisingly, in cells with a non-active p53 or a mutated p53 with gain-of-function, ECE-1-produced ET-1 acted as a protective molecule, since treatment with bosentan led to increased efficiency for spheres formation and percentage of CSCs markers. In these cells, HO-1 could activate or inactivate certain unknown routes that could induce these contraries responses to bosentan, although more research is warranted to confirm these results. Patients carrying out tumors with high expression of both HO-1 and ECE-1 and a non-wild-type p53 should be considered for HO-1 based-therapies instead to ET-1 antagonists-based ones.

# INTRODUCCIÓN

## 1. ADENOCARCINOMA COLORRECTAL

El cáncer colorrectal (CCR) es la tercera neoplasia más común y constituye la cuarta causa de muerte por cáncer en los países desarrollados. Su incidencia, el pronóstico y la necesidad de estrategias terapéuticas individualizadas conducen a que las investigaciones sobre él son una de las áreas de oncología con el desarrollo más dinámico (Parilla y cols., 2009; Ferlay y cols., 2014; Weiser y Saltz, 2015; Porru y cols., 2018).

La etiopatogenia del CCR es multifactorial y se considera que es el resultado de una combinación de factores genéticos y ambientales.

Los factores asociados a un riesgo elevado de cáncer colorrectal son la historia familiar o personal de pólipos adenomatosos o de cáncer CCR (15-20% de los casos), la enfermedad inflamatoria intestinal, los síndromes de CCR hereditario (enfermedad de Lynch 5%, PAF 1%) y la edad mayor de 50 años. No obstante, la mayoría de los cánceres colorrectales (casi las dos terceras partes, aproximadamente 75-80% de todos los casos) aparecen en personas sin ningún factor identificado que claramente favorezca su desarrollo. Estos tumores en pacientes sin la predisposición conocida se llaman tumores esporádicos (Parilla y cols., 2009; Morán y cols., 2010; Weiser y Saltz, 2015)).

### 1.1. INCIDENCIA Y EPIDEMIOLOGÍA

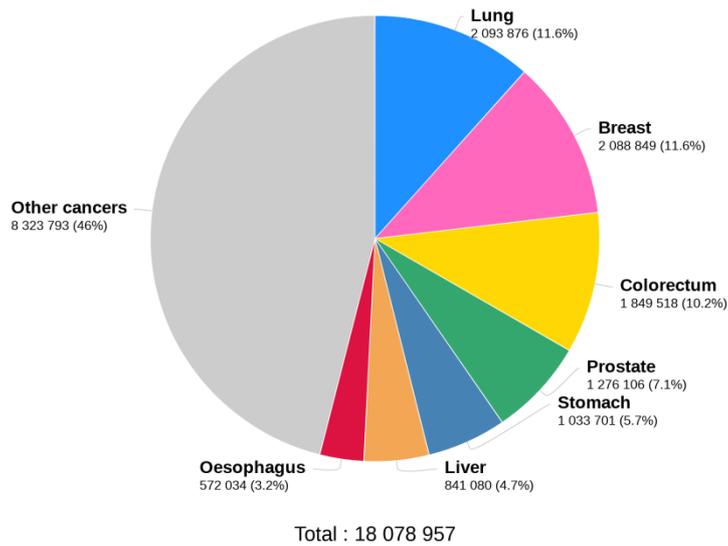
#### 1.1.1. Edad y sexo

El CCR es la tercera neoplasia más común en los hombres (por detrás del cáncer de pulmón y el de próstata), la segunda de las mujeres (después del de mama) (Parilla y cols., 2009; Weiser y Saltz, 2015; Sancho-Muriel y cols., 2017). Se calcula que es el cuarto cáncer más mortal después del cáncer de pulmón, hígado y estómago en los países desarrollados y la segunda a nivel mundial (Ferlay y cols., 2014; Porru y cols., 2018; GLOBOCAN 2018).

El riesgo de CCR incrementa con la edad, la edad media de aparición es de setenta años y a partir de esta edad se diagnostican la mayoría de los casos.

Es el tipo más frecuente de neoplasia entre las personas de más de setenta y cinco años de edad, y en todos los países es más frecuente en los hombres que en las mujeres (Sandler, 1996; Parilla y cols., 2009; Weiser y Saltz, 2015).

Estimated number of new cases in 2018, worldwide, all cancers, both sexes, all ages

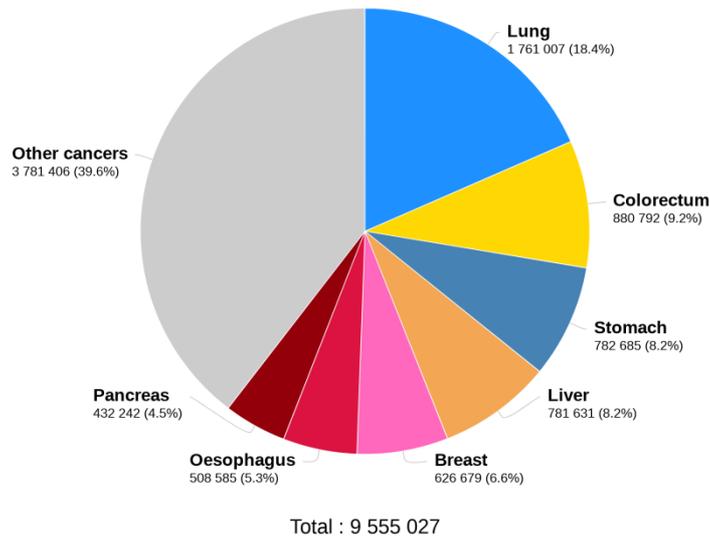


Data source: Globocan 2018  
Graph production: Global Cancer Observatory (<http://gco.iarc.fr>)

International Agency for Research on Cancer  
World Health Organization

**Figura 1.** Incidencia mundial del CCR según la Organización Mundial de la Salud.  
\* Extraído de GLOBOCAN 2018 (<http://gco.iarc.fr>).

Estimated number of deaths in 2018, worldwide, all cancers, both sexes, all ages



Data source: Globocan 2018  
Graph production: Global Cancer Observatory (<http://gco.iarc.fr>)

International Agency for Research on Cancer  
World Health Organization

**Figura 2.** Mortalidad mundial por CCR según la Organización Mundial de la Salud.  
\* Extraído de GLOBOCAN 2018 (<http://gco.iarc.fr>).

Se estima que la incidencia mundial del CCR es de aproximadamente un millón cuatrocientos mil personas al año lo que conlleva más de 694.000 muertes anuales (Weiser y Saltz, 2015, Parkin y cols., 2005; Porru y cols., 2018). Estas cifras son incluso más altas según el registro GLOBOCAN de la Organización Mundial de la Salud. En España se diagnostican 37.000 nuevos casos anuales y es la segunda causa de muerte (aproximadamente 17.000 casos al año), detrás del cáncer de pulmón. Se estima que el riesgo general en la población española de padecer CCR a lo largo de su vida es del 3,5% (Ferlay y cols., 2007 y 2014; Parilla y cols., 2009; Weiser y Saltz, 2015; Porru y cols., 2018; GLOBOCAN 2018).

### **1.1.2. Factores ambientales**

La incidencia del CCR difiere entre países. Las tasas más elevadas se observan en los países desarrollados y más bajas en Europa de Este, Asia, África y Sudamérica. En Europa, el número de nuevos casos se estima en aproximadamente 400.000 al año con al menos 200.000 muertes por esta causa. En EE.UU. el número de casos y la mortalidad es más elevada entre las personas de raza negra, seguidos de los de raza blanca, luego de origen latino y de los orientales. Estas diferencias asociadas a las distintas circunstancias culturales, sociales y económicas, junto a la modificación de la incidencia de la enfermedad en los inmigrantes, la relación con una dieta rica en grasa, la ingesta de alcohol, el tabaquismo y la vida sedentaria hacen probable un impacto de los factores ambientales (Kolonel y cols., 1982; Akerley y cols., 1993; Jessup y cols., 1996; Ferlay y cols., 2007; Parilla y cols., 2009; Weiser y Saltz, 2015; Na y Lee, 2017).

Una baja actividad física y un aumento de la masa corporal, tanto en las mujeres como en los hombres se asocian con mayor riesgo de padecer CCR (Le Marchand, 1997; Yiu y cols., 2004; Weiser y Saltz, 2015).

El colon es un órgano expuesto de forma constante a las sustancias ingeridas y producidas por la digestión. Es difícil determinar con certeza cuáles son los componentes de la dieta que disminuyen o aumentan el riesgo de CCR. Aunque los estudios necesarios para confirmar el papel de la dieta son difíciles de llevar a cabo y están limitados por ser solamente observacionales, se supone que las personas sin factores de riesgo de CCR que consuman una dieta alta en fibra, frutas y vegetales y baja en grasa de origen animal y carnes rojas, tendrán un riesgo menor (Parilla y cols., 2009; Helmus y cols., 2013; Alexander y cols., 2015; Weiser y Saltz, 2015; Turner y Lloyd, 2017; Ma y cols., 2018).

Por otro lado, en estudios experimentales y epidemiológicos, se ha demostrado el papel que ocupa el calcio en la prevención de CCR. El calcio es un agente quelante de las sales biliares y tiene influencia directa en la proliferación de la mucosa. Hay suficiente evidencia de que la suplementación crónica de calcio en la dieta disminuye el riesgo de recidiva tras la resección endoscópica de pólipos de colon y un descenso en el riesgo de CCR en la población con una ingesta mayor de calcio, lo que se demostró en un estudio realizado sobre una población de 500.000 personas (Baron y cols., 1999; Parilla y cols., 2009; Weiser y Saltz, 2015; Irving y cols., 2018).

El siguiente factor posiblemente implicado es el ácido fólico. Es imprescindible para la metilación normal del ADN y la deficiencia se asocia a una alteración de la síntesis del mismo y un

aumento del cáncer. Los estudios demostraron que alta ingesta de esta vitamina supone una reducción del 20% de riesgo de CCR (Compton y cols., 2000; Parilla y cols., 2009; Chau y cols., 2016).

### **1.1.3. Factores genéticos**

El aumento de la incidencia del CCR en los familiares de los pacientes diagnosticados de este tipo de neoplasia sugiere la importancia de los factores hereditarios, aunque tras realizar estudios de riesgo para esta enfermedad en gemelos mono- y heterocigóticos se ha observado que los factores ambientales contribuyen en mayor proporción que los factores genéticos hereditarios (Parilla y cols., 2009).

Las células neoplásicas son células anormales con crecimiento no controlado y son capaces de evitar la muerte y el envejecimiento; aparecen como resultado de la inestabilidad cromosómica del genoma (CIN, vía supresora, responsable del 80% de los tumores) o de la inestabilidad de microsatélites (MSI, *microsatellite instability*, deficiencia del sistema reparador del ADN, vía mutadora) (Ribic y cols., 2003; Morán y cols., 2010; Sargent y cols., 2010; Weiser y Saltz, 2015; Porru y cols., 2018).

Generalmente el CCR se asocia con tres tipos de alteraciones genéticas: alteraciones de los oncogenes (KRAS, NRAS, BRAF), de los genes supresores de tumores (APC, DCC, p53, MCC, SMAD2, SMAD4) - ambas vías pertenecen al CIN - y de los genes relacionados con la reparación del ADN (MLH1, MLH2, MSH2, MSH3, MSH6, PMS1, PMS2) (Fearon y Vogelstein, 1988 y 1990; Parilla y cols., 2009; Morán y cols., 2010; Weiser y Saltz, 2015; Porru y cols., 2018).

## **1.2. GENERALIDADES**

### **1.2.1. Localización y clínica**

La mayoría de los cánceres colorrectales se localiza en el colon ascendente y ciego, en el colon sigmoide y en el recto. Se estima que el CCR es tres veces más frecuente que el localizado en el recto y según los estudios epidemiológicos recientes está aumentando el número de los casos de cáncer del colon derecho más que en otras localizaciones (Jessup y cols., 1996; Parilla y cols., 2009; Weiser y Saltz, 2015).

Inicialmente el crecimiento es asintomático y posteriormente la sintomatología depende de la localización del tumor. Los cánceres del colon ascendente se caracterizan por con una historia de hemorragia oculta y crónica secundaria a la ulceración del tumor que se manifiesta en forma de anemia y melenas, asociada a una pérdida de peso y astenia. En el 40% de los casos se observa la triada de dolor abdominal, diarrea y anemia. En fases avanzadas aparece una masa en el hemiabdomen derecho.

Los tumores localizados en el colon descendente provocan la disminución del calibre de la luz intestinal lo que conduce a cambios en el hábito defecatorio (estreñimiento, diarrea), asociados a dolor abdominal y rectorragias.

El cáncer de recto asocia rectorragia, alteración del ritmo deposicional y tenesmo. El dolor no es un síntoma frecuente ni temprano, sugiere infiltración del aparato esfinteriano o suelo pélvico. En el 15% de los casos de cáncer de recto debuta en forma de una complicación.

La sintomatología suele durar de promedio 6 meses hasta que el paciente consulte por ella y en el 25% de los casos obliga a acudir a Urgencias por presentar formas avanzadas de la enfermedad y sus complicaciones como perforación u obstrucción intestinal y excepcionalmente como hemorragia digestiva baja abundante.

Entre el 8 y 30% de todos los casos el CCR se presenta con oclusión intestinal como el síntoma inicial. Se estima que la ubicación más frecuente de la obstrucción está en el ángulo esplénico (49%), luego en el colon izquierdo (23%) y en el colon derecho (22%).

Solamente entre el 3 y el 9% de los cánceres colorrectales debuta en forma de perforación intestinal. En estos casos puede ser una perforación cubierta y manifestarse en forma de plastrón inflamatorio palpable, una perforación a la cavidad abdominal con peritonitis fecaolidea, una perforación al retroperitoneo que se presenta en forma de abscesos a este nivel o una perforación a los órganos vecinos, creando fístulas entre colon y vagina (salida de material fecaloideo por la vagina) o vejiga (fecaluria, neumaturia, salida de la orina por el ano) (Parilla y cols., 2009).

### **1.2.2. Diagnóstico**

En el momento de diagnóstico del CCR debemos definir la localización del tumor, la presencia de otras lesiones sincrónicas en el colon, la presencia de metástasis a distancia o invasión de los órganos vecinos.

Debido a que el síntoma principal es el sangrado digestivo, el diagnóstico se realiza mediante la determinación de sangre oculta en heces, estudio de anemia y colonoscopia (sensibilidad del 90-95% para los tumores malignos con tasa de complicaciones de 0,1%). Ante la confirmación de la sospecha con biopsia de la lesión encontrada en la colonoscopia, se realiza TAC toracoabdominal para descartar la presencia de metástasis pulmonares, hepáticas, retroperitoneas, en la pared abdominal y la invasión de órganos adyacentes al tumor. En el caso de cáncer de recto además del TAC se realiza resonancia pélvica para estadiaje preoperatorio (Parilla y cols., 2009; Weiser y Saltz, 2015; Roselló y Cervantes, 2016).

Es importante determinar los niveles de los marcadores tumorales antes de realizar la intervención, ya que sirven como factor pronóstico preoperatorio y para diagnosticar precozmente la recurrencia. Los más frecuentemente utilizados son el antígeno carcinoembrionario (CEA) y el antígeno carbohidratado (CA 19-9). La elevación del CEA en los casos en que se presentaban valores normales en el momento del diagnóstico - o normalización de los niveles del mismo después de la cirugía si estaba previamente elevado - sugiere la recurrencia. Si persiste elevado indica peor pronóstico. El CA 19-9 es un anticuerpo monoclonal que se eleva en diversos tumores intestinales y sugiere recidiva locorregional de la enfermedad (Parilla y cols., 2009; Weiser y Saltz, 2015).

### 1.3. ETIOPATOLOGÍA

#### 1.3.1. Secuencia adenoma - carcinoma

El cancer colorrectal puede originarse en un pólipo o en cualquier lugar a lo largo de todo el intestino grueso (Weiser y Saltz, 2015). En el colon podemos encontrar diferentes tipos de pólipos. Son unas protuberancias del epitelio de intestino y pertenecen al grupo de tumores benignos. Los más frecuentes son los pólipos adenomatosos y los pólipos hiperplásicos, menos frecuentes son los hamartomas y los pólipos inflamatorios.

La mayoría de los cánceres colorrectales se desarrollan a partir de los pólipos adenomatosos preexistentes (los adenomas). Se dividen en tres grupos según la arquitectura histológica: tubulares, vellosos y mixtos. El CCR es más frecuente en pacientes con pólipos adenomatosos, especialmente con pólipos mayores de 1-1,5 cm de diámetro y su incidencia se reduce con la extirpación endoscópica de los adenomas. Se considera que uno de cada 400 pólipos adenomatosos se transformará en cáncer y el periodo de esta transformación es de al menos diez años. Los cánceres metacrónicos también parecen evolucionar desde adenomas.

Según los estudios realizados se ha demostrado que el riesgo de la transformación maligna depende tanto del tamaño del pólipo como la proporción de componente veloso y la presencia de displasia (Atkin y cols., 1992; Winawer S.J. y cols., 1993; Parilla y cols., 2009; Weiser y Saltz, 2015).

Se estima que en los pacientes ya diagnosticados y tratados por CCR el 40% presentará pólipos metacrónicos y, aproximadamente, el 6% cáncer metacrónico durante el seguimiento (Markowitz, 1990; Heald, 1990; Parilla y cols., 2009; Weiser y Saltz, 2015).

Los polipos hiperplásicos y hamartomatosos no son precancerosos excepto en caso de poliposis colónica. Los pólipos inflamatorios carecen de la posibilidad de malignización.

Encontrando un pólipo en la luz de colon durante la endoscopia resulta imposible identificar el tipo histológico del pólipo, por lo cual se deben extirpar todos los pólipos (Winawer S.J. y cols., 1993; Parilla y cols., 2009; Weiser y Saltz, 2015).

#### 1.3.2. Biología molecular

En la mayor parte de los cánceres colorrectales esporádicos y en los que se desarrollan en pacientes con poliposis adenomatosa familiar (PAF) - aproximadamente el 80% de todos los tumores malignos de colon - la progresión desde un pequeño adenoma al cáncer se inicia con una alteración genética que consiste en la inactivación del gen APC (*Adenomatous polyposis coli*) y otros genes oncosupresores como DCC (*Deleted in Colorectal Carcinoma*) o de la proteína p53 y la acumulación de las mutaciones en oncogenes (KRAS). La inactivación del APC es el resultado de una mutación somática en los tumores esporádicos y germinal en los pacientes con la PAF y da lugar a la síntesis de una proteína truncada (Leslie y cols., 2002; Smakman y cols., 2005; Jones y cols., 2008; Haigis y cols., 2008; Parilla y cols., 2009; Weiser y Saltz, 2015).

Otros genes implicados en la transformación cancerosa son el MSH2, MSH3, MSH6, MLH1, MLH3, PMS1 y PMS2. Son unos genes que codifican las enzimas encargadas de corregir las mutaciones que se producen durante la replicación del ADN. La inactivación de estos genes se ha observado en los tumores que se desarrollan en pacientes con el síndrome de CCR hereditario no polipósico (CCHNP) y en el aproximadamente 15-20% de los cánceres esporádicos; conduce a la acumulación de las mutaciones en los oncogenes y los genes supresores como TGF- $\beta$ RII, Bax, Smad4 y BRAF que regulan la proliferación y la muerte celular (Samowitz y cols., 2001; Ward y cols., 2001; Pawlik y cols., 2004; Imai y Yamamoto, 2008; Morán y cols., 2010; Sargent y cols., 2010; Weiser y Saltz, 2015; Porru y cols., 2018).

Los tumores originados según este modelo generalmente tienen mejor pronóstico que los mencionados anteriormente, pero parecen ser menos sensibles a la quimioterapia con 5-fluorouracilo (5FU). Generalmente están ubicados en el colon derecho y son más frecuentes en las mujeres. En los estudios histopatológicos parecen ser más profundos (más avanzados localmente) pero suelen ser menos invasivos por menor tendencia de afectación de los ganglios linfáticos y las metástasis a distancia (Greenson y cols., 2003; Gryfe y cols., 2000; Samowitz y cols., 2001; Ward y cols., 2001; Watanabe y cols., 2001; Benatti y cols., 2005; Jeong y cols., 2003; Ribic y cols., 2003; Raut y cols., 2004; Morán y cols., 2010; Sargent y cols., 2010; Parilla y cols., 2009; Weiser y Saltz, 2015).

Se ha estudiado el papel de otros oncogenes supresores tumorales y el vínculo con el pronóstico de la enfermedad, como por ejemplo el p53 (el oncogen inactivado con mayor frecuencia en tumores sólidos en humanos). Su inactivación está relacionada con la recurrencia del cáncer, disminución de la supervivencia y resistencia a la radio- y quimioterapia con 5FU. Las mutaciones del gen 18q (gen SMAD4) y del p27 parecen corresponder a disminución de la supervivencia (Fearhead y cols., 2002; Parilla y cols., 2009; Weiser y Saltz, 2015).

#### **1.4. CCR Y ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL**

Los pacientes con colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn tienen un riesgo de CCR más elevado que la población general. No obstante, la enfermedad inflamatoria intestinal contribuye en 1% al aumento de la incidencia del CCR. El riesgo es más alto en personas con afectación difusa del colon, diagnosticados a una edad temprana, con larga duración de la enfermedad (a partir de los diez años del diagnóstico el riesgo acumulado del CCR aumenta un 1% al año) y con colangitis esclerosante asociada a la colitis ulcerosa (Lavery y cols., 1982; Ransohoff y cols., 1985; Sachar, 1994; Solomon y Schnitzler, 1998; Parilla y cols., 2009; Weiser y Saltz, 2015).

Estos pacientes precisan vigilancia muy estrecha y controles sistemáticos. La colonoscopia debe realizarse cada 1-2 años y siempre se precisan biopsias de la mucosa de colon independiente si tiene aspecto macroscópico sospechoso o no. Por lo general se toman muestras cada 10-12 cm. La cirugía preventiva está indicada solamente en caso de diagnóstico de displasia de bajo o alto grado o con colitis de difícil control o en los pacientes que no acuden a las revisiones de forma sistemática. (Weiser y Saltz, 2015).

## 1.5. FACTORES FAMILIARES

El riesgo de CCR entre los familiares de primer grado (padres e hijos) y algunos de segundo grado (hermanos) de un paciente diagnosticado de CCR es 2,4 veces mayor que en la población general y se considera más elevado aún cuanto más joven es el familiar afectado en el momento de diagnóstico. Por otro lado, en algunos estudios se ha demostrado que el riesgo aumenta con el número de familiares afectados hasta ser de 4,2 veces más alto para las personas que tienen dos o más familiares de primer grado perjudicado por la enfermedad.

Las personas con familiares de segundo grado (tíos, abuelos, primos) que padecen de CCR igualmente tienen el riesgo más elevado, en torno a 1,5 veces mayor que la población general (Fuchs y cols., 1994; Parilla y cols., 2009; Weiser y Saltz, 2015).

### 1.5.1. Síndromes asociados con CCR hereditario

El 15-20% de los CCR exhibe una relación familiar y el 5% se asocia a CCR. Los síndromes hereditarios de CCR más frecuentes son: poliposis adenomatosa familiar (PAF), poliposis adenomatosa familiar atenuada (PAFA), poliposis asociada al gen MYH (MAP) y CCR hereditario no polipoideo (CCHNP, llamado también el síndrome de Lynch) (Lynch y cols., 2003; Parilla y cols. 2009).

#### 1.5.1.1. Poliposis adenomatosa Familiar (PAF)

La PAF es un síndrome autosómico dominante caracterizado por la presencia de más de cien pólipos adenomatosos a lo largo del colon y recto. Está causada por mutaciones en las células germinales del gen APC. El patrón de la herencia es autosómico dominante con penetrancia del 100%, aunque en el 25% de los casos se presentan como resultado de una mutación de *novo*, sin antecedentes familiares. Las personas diagnosticadas de la PAF tienen un riesgo de CCR de aproximadamente 100%; sin embargo, este síndrome es responsable solamente del 1% de todos los casos del CCR (1 caso por cada 8.000-10.000 personas). La media de edad en el momento del diagnóstico de los pólipos es de 16 años y si no se operan desorrollan el cáncer en la cuarta o quinta década de vida (la media es de 39 años). Se ha observado que un adenoma necesita aproximadamente unos 17 años para formar un tumor maligno y a partir de este momento solamente 2 años para poder provocar las metástasis (Mulvihill, 1983; Lipkin y cols., 1984; Powell y cols., 1993; Jones y cols., 2008; Parilla y cols., 2009; Weiser y Saltz, 2015).

Existe una variante de la PAF denominada la poliposis asociada al gen MYH que se caracteriza por unos hallazgos anatomopatológicos similares, pero con un número menor de pólipos (la media es de 50) y mayor predominio en el colon derecho. Es un síndrome autosómico recesivo y aproximadamente el 48% de los pacientes esta afectado con CCR en el momento del diagnóstico.

Otras variantes fenotípicas de la PAF con una mutación germinal del gen APC con patrón de herencia autosómica dominante son: el síndrome de Gardner (asociado a osteomas, tumores de tejidos blandos, dientes supranumerarios), el síndrome de Turcot (asociado a tumores cerebrales) y la PAF atenuada que se caracteriza por menos pólipos, generalmente localizados en el colon derecho y

en los pacientes de edad más avanzada (Brensinger y cols., 1998; Parilla y cols., 2009; Weiser y Saltz, 2015).

El riesgo de cáncer se estima basándose en el número y tamaño de los adenomas, lo que permite decidir el momento de la intervención quirúrgica. En la mayoría de los casos se debe realizar el procedimiento entre la pubertad y los dieciocho años por el bajo riesgo de malignización a esta edad. En caso de gran número de pólipos o sintomatología asociada los pacientes se deben operar en el momento del diagnóstico. Existen diferentes variedades de la cirugía, no obstante, siempre se requiere exéresis amplia del colon (Parilla y cols., 2009; Weiser y Saltz, 2015). Aproximadamente el 40-75% de los pacientes requieren exéresis del recto más adelante (Rodríguez-Bigas y Petrelli, 2002; Weiser y Saltz, 2015).

### **1.5.1.2. CCR hereditario no polipósico (CCHNP)**

El CCHNP, también denominado síndrome de Lynch, es la forma más frecuente de CCR hereditario. Es responsable del 5% de todos los casos del CCR. Las características principales son la aparición del cáncer en los pacientes jóvenes, la localización en el colon derecho y un número elevado de tumores sincrónicos y metacrónicos (Vasen y cols., 1991; Lynch y cols., 1993; Marra y cols., 1995; Parilla y cols., 2009; Weiser y Saltz, 2015).

Existen dos subtipos de este síndrome: (1) Lynch I, en el que el CCR es la única manifestación de la enfermedad; (2) Lynch II, en el que existe también una predisposición para otros tipos de tumores malignos (Aarnio y cols., 1999; Parilla y cols., 2009; Weiser y Saltz, 2015). La mayoría de estos pacientes (50-80%) presentan mutaciones en los genes MLH1, MSH2, MSH6 y menos frecuentemente en el PMS1 y PMS2. La enfermedad se transmite con carácter autosómico dominante, con una penetración cercana al 80% (Markowitz 1990; Jemal y cols. 2004; Parilla y cols., 2009; Weiser y Saltz, 2015).

### **1.5.1.3. Síndromes de poliposis hamartomatosa**

Es un grupo heterogéneo de síndromes hereditarios que se transmiten de manera autosómica dominante y se caracterizan por el desarrollo de los pólipos hamartomatosos y un riesgo elevado de CCR, pero representan menos de 1% de todos los cánceres colorrectales.

Los pólipos hamartomatosos son unas protuberancias de la mucosa gastrointestinal. Presentan un epitelio normal que cubre la capa de músculo liso, que tiene aspecto de pseudoinvasión de la submucosa con sus ramificaciones, aunque este proceso no es maligno y no presenta atipia celular. Generalmente estos pólipos conllevan menos riesgos de transformación maligna que los pólipos adenomatosos (Parilla y cols., 2009; Weiser y Saltz, 2015). Los síndromes que pertenecen a este grupo son el síndrome de Peutz-Jeghers, la poliposis juvenil (Jass y cols., 1988; Church, 1995; Giardello y cols., 1987; Weiser y Saltz, 2015), el síndrome de Cowden y de Ruvalcaba-Myhre-Smith (Parilla y cols., 2009).

## **1.6. PREVENCIÓN DEL CCR**

Se están llevando a cabo diferentes estudios sobre la prevención, pero hasta el momento actual no se ha confirmado el efecto protector de la ingesta de los suplementos de calcio sobre la inhibición del desarrollo de pólipos. Tampoco se ha confirmado el mismo efecto del incremento del

consumo de frutas, vegetales y vitaminas antioxidantes en los estudios prospectivos. Por otro lado, varios estudios epidemiológicos han establecido una relación entre la ingesta de la aspirina y un menor riesgo de CCR y de pólipos adenomatosos, también en pacientes ya intervenidos de CCR, aunque la evidencia es demasiado baja para apoyar su uso habitual como forma de prevención primaria. Otros estudios han demostrado que los inhibidores de la ciclooxigenasa reducen el número y tamaño de los adenomas en pacientes con poliposis adenomatosa familiar (Parilla y cols., 2009).

**Tabla 1.** Despistaje y vigilancia del CCR según el riesgo individual

DESPISTAJE Y VIGILANCIA DEL CÁNCER COLORRECTAL				
	Categoría del riesgo	Recomendación	Edad de inicio	Intervalo
<b>Riesgo medio</b> Riesgo de por vida 5%	Todos, a la edad de 50 o más, sin otros factores de riesgo	Sangre oculta en heces más sigmoidoscopia flexible o colonoscopia	50 años	Sangre oculta en heces anual Sigmoidoscopia flexible cada 5 años Colonoscopia cada 10 años o enema opaco con doble contraste, más sigmoidoscopia flexible cada 5-10 años
	<b>Riesgo moderado</b> Un pariente en primer grado con CCR o pólipos diagnosticados > 60 años	Monitorización de riesgo medio Colonoscopia	Monitorización: 40 años Colonoscopia: 50 años	Igual que arriba, hasta la primera colonoscopia Colonoscopias de seguimiento cada 5 años
Riesgo de por vida 10-30%	Un pariente en primer grado con CCR o pólipos diagnosticados < 60 años o dos parientes en primer grado de cualquier edad	Colonoscopia	40 años o 10 años antes del primer caso en la familia	Cada 5 años con examen negativo
	Pólipo neoplásico previo (> 1 cm, proximal o múltiple)	Colonoscopia	3 años después de la polipectomía inicial	3 años si se encontraron más pólipos 5 años para examen normal
	Pólipo pequeño simple (< 1 cm)	Colonoscopia	5 años después de la polipectomía	3 años si se encontraron más pólipos 5 años para examen normal
	Historia de resección de CCR con intento curativo	Colonoscopia	Al momento de la resección se deberá examinar en su totalidad el colon	1 y 3 años después de la resección; después, cada 5 años con examen normal
	Enfermedad intestinal inflamatoria	Colonoscopia con toma de biopsias para vigilancia en displasias	8 años después de inicio de pancolitis 12-15 años después de colitis izquierda	Cada 1-2 años Se recomienda colectomía para cualquier displasia
<b>Riesgo elevado</b> Riesgo de por vida 50%	Poliposis familiar adenomatosa: hijos o hermanos del paciente afectado	Sigmoidoscopia Referir a especialistas Examen genético	12 años si el paciente está en riesgo o es portador Panendoscopia cada 1-2 años después del diagnóstico	Anualmente hasta la colectomía (efectuada si aparecen pólipos)
	CCHNP: pacientes en riesgo, cuyas familias encajan en los criterios de Ámsterdam, o test genético positivo	Colonoscopia Ofrecer examen genético Monitorización ginecológica a mujeres	21	Cada 2 años hasta los 40, después anualmente

\* Extraído de Parilla Patricio P. et cols., 2009.

Las sociedades médicas y las autoridades sanitarias han establecido recomendaciones para la detección precoz del CCR que se adaptan a las necesidades de cada país. Se basan en estadificar a los pacientes en grupos de riesgo con diferentes programas de cribado. Los pacientes con síntomas o signos sugerentes de CCR no son candidatos a estos programas.

El despistaje de los tumores colorrectales en personas asintomáticas consiste en la detección y exéresis de pólipos premalignos y descurbimiento precoz del cáncer. La edad de comienzo del programa y el intervalo entre las pruebas diagnósticas dependen del riesgo individual del paciente

que se calcula basándose en la historia clínica, antecedentes personales y familiares (Parilla y cols., 2009; Weiser y Saltz, 2015).

Las pruebas más frecuentemente utilizadas son la prueba de sangre oculta en heces (SOH), la sigmoidoscopia (para los pacientes de riesgo medio) y/o colonoscopia con extirpación y estudio anatomopatológico de todos los pólipos encontrados en el colon (pacientes con riesgo alto o con riesgo bajo y resultado positivo de las pruebas mencionadas anteriormente). Según el riesgo individual de cada paciente las pruebas se repiten anualmente o cada 3-5 años (Winawer y cols., 1993; Zauber y cols., 1997; Parilla y cols., 2009; Weiser y Saltz, 2015).

Los pacientes ya diagnosticados y tratados de CCR precisan una vigilancia más estrecha para la detección precoz de enfermedad metacrónica. Se recomienda realización de nueva colonoscopia al año. Se debe realizar o antes de que pase un año después de la cirugía si no se pudo realizar la colonoscopia en el estudio preoperatorio o fue incompleta por mala preparación del colon o por la oclusión de la luz intestinal (lo que impide el paso del colonoscopio). Si estas pruebas resultan negativas la siguiente prueba se puede realizar a los 3 años después de la intervención.

Las nuevas tecnologías como la colonoscopia virtual o la detección de mutaciones específicas del CCR en el ADN en las heces de los pacientes se están estudiando para su utilización en el despistaje del CCR (Imperiale y cols., 2004; Parilla y cols., 2009; Weiser y Saltz, 2015).

La colonoscopia virtual consiste en realización de la tomografía computarizada de alta resolución de abdomen para valoración virtual de la luz colónica. Su problema principal es la sensibilidad y especificidad según el tamaño de la lesión, dificultad para valoración de lesiones pequeñas e imposibilidad de tomar biopsias (Pickhardt y cols., 2003; Cotton y cols., 2004; Weiser y Saltz, 2015).

## **1.7. PRONÓSTICO DEL CCR**

El CCR presenta una elevada tasa de curación (hasta 60%) cuando se localiza solamente en el intestino. Desgraciadamente en un 20-25% de los casos existe enfermedad diseminada en el momento de diagnóstico. En un 2-11% de los casos se observa dos o más tumores en el colon, llamados tumores sincrónicos, aunque aparentemente esta situación no asocia el peor pronóstico que un tumor solitario. Igualmente, aproximadamente el 10% de los tumores están adheridos a los órganos vecinos, unos 40-45% de estas adherencias son de origen inflamatorio y el resto es la invasión de las estructuras adyacentes lo que aumenta 2,6 veces el riesgo relativo de muerte por este motivo (Arenas y cols., 1997; Chen y cols., 2000; Parilla y cols., 2009; Weiser y Saltz, 2015).

Aproximadamente el 13% de los pacientes presentan carcinomatosis peritoneal en el momento de diagnóstico lo que significa empeoramiento del pronóstico y una corta supervivencia (Rosen y cols., 2000; Jayne y cols., 2002; Elias y cols., 2003; Parilla y cols., 2009; Weiser y Saltz, 2015).

Cerca del 30% de las intervenciones por CCR se realiza de urgencias lo que implica mayor morbimortalidad por las condiciones del paciente y el estado avanzado del tumor (mortalidad del 35% en casos de perforación y 15% de oclusión), además de peor pronóstico con una tasa elevada de las

metástasis (Parilla y cols., 2009; Kube y cols., 2009; Bakker y cols., 2014). Está establecida la relación de la resección de todo el mesenterio cólico y rectal como el índice de una correcta excisión oncológica de la enfermedad con el aumento de la supervivencia, incluso en los estadios III alcanzando el 27% (Goldstein, 2002; Comton y cols., 2004; Parilla y cols., 2009; Weiser y Saltz, 2015).

Las metástasis del CCR se asientan con frecuencia en el ovario (entre el 2 y el 8% de las metástasis son sincrónicas) y afectan el peritoneo. En el 10-20% de los pacientes sufrirá la recidiva en forma de carcinomatosis peritoneal con un pronóstico de vida de menos de 6 meses aumentando la supervivencia hasta 10 meses con la quimioterapia (Parilla y cols., 2009).

Se ha demostrado que en los pacientes sometidos a cirugía curativa existe alto riesgo de recidiva tumoral, estimada en el 25-50% de los casos, de los cuales aproximadamente 90% aparecerá durante los dos (según otros autores tres) primeros años después de la intervención. La forma de presentación incluye recidiva local y metástasis a distancia. La recurrencia local se manifiesta como una nueva masa tumoral a nivel del lecho quirúrgico, en la anastomosis intestinal, los ganglios linfáticos retroperitoneales y mesentéricos, los trayectos de antiguos drenajes y en la pared abdominal siempre cuando la cirugía inicial fue realizada con intención curativa. La vigilancia postoperatoria consiste en identificación temprana de la enfermedad recurrente susceptible de realización de nueva exéresis con intención curativa. Como la enfermedad recurrente potencialmente curable se consideran las metástasis aisladas en el pulmón, hígado, ovario o recidiva local en la anastomosis. El descubrimiento temprano de la enfermedad avanzada sin posibilidades de resección curativa es una indicación para administración de la quimioterapia, aunque con resultados poco prometedores. El seguimiento se realiza mediante exploración física y determinación frecuente del antígeno carcinoembrionario (CEA) cada tres meses durante los dos primeros años y luego cada seis meses durante los siguientes tres años después de la intervención. El TAC abdominopélvico se realizará anualmente durante los tres primeros años de seguimiento y la colonoscopia al año, luego a los tres años y posteriormente cada 5 años después de la exéresis del tumor primario (Nava y Pagana, 1982; Parilla y cols., 2009; Litvak y cols., 2014; Weiser y Saltz, 2015).

La recurrencia locorregional del cáncer del recto sometido al tratamiento quirúrgico con intención curativa es de 2,6 hasta 10% y normalmente ocurre en los 2 primeros años después de la cirugía. Sin tratamiento la supervivencia global alcanza 5% a los 5 años. Las cifras de supervivencia ascienden al 40-50% en caso de poder realizar nueva intervención con intención curativa. Entre el 15 y el 20% de los pacientes presenta metástasis en el momento del diagnóstico y un 30% desarrollará metástasis a distancia tras cirugía radical (Hartley y cols., 2003; Heriot y cols., 2006 y 2008; Palmer y cols., 2007, Bakx y cols., 2008; Biondo y cols., 2010; Kusters y cols., 2010; Rahbari y cols., 2011; González Castillo y cols., 2016).

Gracias a los programas de prevención primaria, los avances en el tratamiento adyuvante y al descubrimiento de nuevos agentes citotóxicos la supervivencia global de los pacientes con CCR se ha duplicado en las últimas dos décadas (especialmente en los pacientes con metástasis) y se estima que es de aproximadamente 30 meses (Van Cutsem y cols., 2016; Porru y cols., 2018).

## 1.8. ESTADIFICACIÓN DEL CCR

La estadificación del CCR se realiza basándose en las características anatomoclínicas de la enfermedad para establecer el pronóstico, seleccionar tratamiento adecuado y desarrollar criterios uniformes para evaluar y comparar los resultados de los diferentes tratamientos aplicados (Parilla y cols., 2009). La valoración clínica en los casos de CCR consiste en la realización de pruebas complementarias necesarias para confirmar la sospecha diagnóstica (colonoscopia y biopsia positiva para la neoplasia) y estudio de extensión que se efectúa mediante tomografía con contraste de tórax, abdomen y pelvis. En los pacientes con cáncer de recto, a las pruebas mencionadas anteriormente se añade resonancia magnética de pelvis para una mejor evaluación de la invasión local del tumor, lo que puede modificar las indicaciones terapéuticas (Delbeke y cols., 2004; Weiser y Saltz, 2015).

**Tabla 2.** Estadificación del CCR

<p><b>Tumor primario (T)</b> Tx tumor primario que no se puede valorar T0 no hay evidencia de tumor primario Tis carcinoma in situ; intraepitelial o invasión de la lamina propia T1 tumor que invade submucosa T2 tumor que invade muscularis propia T3 tumor que invade serosa, grasa T4a tumor que perfora el peritoneo visceral T4b tumor que invade directamente otros órganos o estructuras</p> <p><b>Nódulos linfáticos regionales (N)</b> Nx no se pueden valorar N0 sin afección ganglionar N1a 1 ganglio linfático regional afectado N1b 2-3 ganglios linfáticos regionales afectados N1c depósitos de tumor en la subserosa, el mesenterio o en los tejidos pericólicos o perirectales sin mtx en los ganglios regionales N2 4 o más ganglios linfáticos regionales afectados N2a 4-6 ganglios linfáticos regionales afectados N2b 7 o más ganglios linfáticos regionales afectados</p> <p><b>Metástasis a distancia (M)</b> Mx no se pueden estimar M0 sin evidencia de metástasis a distancia (no se asigna por el anatomopatólogo) M1 metástasis en uno o más órganos a distancia o en el peritoneo. M1a metástasis en un órgano o sitio (ej. hígado, pulmón, ovario, ganglio no regional; sin peritoneo) M1b metástasis en más de un órgano o sitio (sin peritoneo) M1c metástasis en el peritoneo con o sin metástasis en otros órganos o sitios</p> <p><b>Estadios</b> 0 Tis N0M0 I T1-2 N0M0 IIA T3 N0M0 IIB T4a N0M0 IIC T4b N0M0 IIIA T1-2 N1M0/ T1N2a IIIB T3-4a N1M0/ T2-T3 N2a/ T1-T2 N2b IIIC T4a N2aM0/T3-T4a N2b/ T4b N1-2 IVA TN M1a IVB TN M1b IVC TN M1c</p>
---

\* AJCC Cancer Staging Manual, 8<sup>th</sup> Edition, 2016.

Actualmente se utiliza la clasificación TNM de la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC) y el American Joint Committee on Cancer que valora independientemente la penetración del tumor en la pared del intestino (T), la afectación de los ganglios linfáticos regionales (N) y la presencia de

metástasis a distancia (M) (Edge y cols., AJCC Cancer Staging Manual, 7<sup>th</sup> edition 2010; Amin y cols., AJCC Cancer Staging Manual, 8<sup>th</sup> edition 2016).

En el análisis anatomopatológico uno de los factores con valor pronóstico independiente es el grado de la diferenciación o de la similitud de la arquitectura tumoral con respecto a la del epitelio colónico normal. Se distinguen cuatro grados de la diferenciación.

**Tabla 3.** Grado de diferenciación histopatológica del CCR de la UICC

Gx el grado no puede ser valorado
G1 bien diferenciado
G2 moderadamente diferenciado
G3 pobremente diferenciado
G4 indiferenciado

\* Extraído de Parilla Patricio P. et cols., 2009.

**Tabla 4.** Supervivencia global a 5 años según los estadios

ESTADIO	SUPERVIVENCIA (%)
I	93,2
II A	84,7
II B	83,4
III A	72,2
III B	61,4
III C	44,3
IV	8,1

\* Extraído de O'Connell JB, Maggard MA, Ko Cy. Colon cancer survival rates with the new AJCC sixth edition staging. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:1420-5.

Otras variables clinicopatológicas indicadoras de pronóstico desfavorable son la invasión de órganos vecinos, la oclusión intestinal, la perforación tumoral, el número de los ganglios extirpados o analizados inferior a 12, las metástasis discontinuas (localizaciones atípicas que no siguen las reglas de la diseminación), el margen de la resección circunferencial, los valores preoperatorios del CEA elevados, la invasión de vasos sanguíneos y linfáticos, la invasión perineural, la morfología del borde invasor, la fibrosis del estroma tumoral, la respuesta inmunológica al tumor, la aneuploidía, la mutación KRAS, NRAS y BRAF, la deficiencia del sistema MMR, la inestabilidad de los microsatelites, la pérdida alélica del cromosoma 18q y las alteraciones moleculares (Herter y Slanetz, 1980; Minsky y cols., 1988; Minsky y cols., 1989; O'Connell y cols., 2004; Parilla y cols., 2009; Weiser y Saltz, 2015). Estudios realizados en los últimos años han demostrado que a diferencia de otros cánceres el tamaño del tumor primario no condiciona el pronóstico (Edge y cols., AJCC Cancer Staging Manual, 7<sup>th</sup> edition 2010; Weiser y Saltz, 2015; Amin y cols., AJCC Cancer Staging Manual, 8<sup>th</sup> edition 2016).

## 1.9. TRATAMIENTO

### 1.9.1. Generalidades

El tratamiento de CCR se basa en el tratamiento quirúrgico siempre cuando sea posible, asociando la quimio- y radioterapia en algunos casos. Existen diferentes modalidades del tratamiento quirúrgico dependiendo de la ubicación del tumor y grado de la invasión de los órganos vecinos. Generalmente durante la cirugía se realiza resección en bloque del tumor con márgenes de seguridad (libres de enfermedad) y la extirpación del territorio ganglionar correspondiente por su localización y ligadura de los vasos en su origen. Una intervención urgente sigue las mismas reglas oncológicas que una cirugía electiva (Quirke y cols., 1986; Moore y cols., 2003; Ruiz López y cols., 2003; Rullier y cols., 2005; Temple y cols., 2005; Parilla y cols., 2009, Weiser y cols., 2009; Weiser y Saltz, 2015; Sancho-Muriel y cols., 2017).

El uso de la quimioterapia depende del estadio del tumor, la presencia de los factores de riesgo y las enfermedades de base del paciente. Se administra a partir del estadio III y en el estadio II si existe alguno de los factores de mal pronóstico existiendo diferentes protocolos de tratamiento. Se administra para reducir el riesgo de la recidiva.

La radioterapia y quimioterapia preoperatoria (neoadyuvante) se indica en el cáncer de recto y tiene buenos resultados cuando se asocia a una cirugía realizada con la intención curativa. En el día de hoy hay suficiente experiencia que demuestra que esta forma de tratamiento neoadyuvante llamada la modalidad combinada (CMT) reduce a la mitad las tasas de recidiva local y a distancia, mejora la resecabilidad del tumor primario y aumenta la probabilidad de preservación del esfínter. (Parilla y cols., 2009). Además de los beneficios mencionados anteriormente se ha demostrado que la quimiorradioterapia preoperatoria tiene menos toxicidad que la administrada después de la cirugía (Sauer y cols., 2004; Weiser y Saltz, 2015, Roselló y Cervantes, 2016; Zhang y cols., 2016; Gao y cols., 2018).

Se están llevando a cabo múltiples investigaciones sobre los mecanismos de la carcinogénesis para poder aplicar una terapia antitumoral personalizada, pero hasta el momento no hay suficiente evidencia para aplicar un marcador molecular para la selección de fármacos de quimioterapia adyuvante individualizada para diferentes tipos de pacientes y tumores (Kerr y cols., 2009; Weiser y Saltz, 2015; Russo y cols., 2016; Porru y cols., 2018).

Existen varias posibilidades de tratamiento paliativo. En caso de tumores que producen obstrucción intestinal y además se encuentran en fase avanzada o en pacientes mayores y pluripatológicos se puede colocar una prótesis autoexpandible para restablecer el tránsito intestinal, aunque la técnica no está exenta de complicaciones. Otra opción es realización de un estoma derivativo.

Sin embargo, en los pacientes sintomáticos, aunque no exista la posibilidad de cirugía curativa (por ejemplo, por la presencia de las metástasis incurables), se recomienda la exéresis del tumor siempre que sea posible, lo que resulta en la mejoría de la calidad de vida (desaparición de los síntomas) y se evitan las complicaciones del mismo (la obstrucción, la perforación y la hemorragia). En

caso de un tumor pequeño y asintomático y una enfermedad metastásica avanzada se puede evitar intervención quirúrgica porque el paciente fallecerá por las metástasis antes de que el tumor sea sintomático.

La quimioterapia paliativa estaría indicada en los pacientes con tumores asintomáticos o mínimamente sintomáticos y enfermedad a distancia avanzada (Temple y cols., 2004; Parilla y cols., 2009; Poultsides y cols., 2009; Weiser y Saltz, 2015).

### **1.9.2. Quimioterapia en CCR**

Existen diferentes esquemas de tratamiento que combinan los agentes quimioterapéuticos para aumentar la eficacia de tratamiento adyuvante.

El estadio II tiene alta tasa de curación quirúrgica, aunque esta se reduce en casos de asociar los factores de alto riesgo como presentación de la lesión primaria como T4, obstrucción o perforación intestinal en el momento de diagnóstico, poca diferenciación histológica del tumor o insuficiente número de ganglios linfáticos extirpados. En estos pacientes reciben la quimioterapia adyuvante con fluoropirimidinas (5 fluorouracil o capecitabina). El uso de oxiplatino no aporta ningún beneficio por no prolongar la supervivencia global en estos casos (Tournigand y cols., 2012; Weiser y Saltz, 2015).

Varios estudios apoyan la hipótesis de que los pacientes con el estadio II precisan evaluación de las proteínas del sistema MMR y los que presentan deficiencia no deben recibir quimioterapia adyuvante por no observar prolongación de la supervivencia libre de enfermedad e incluso la posibilidad de disminución de supervivencia global. Los resultados no se extrapolan a los pacientes en el estadio III (Kim y cols., 2007; Sargent y cols., 2010; Sinicrope y cols., 2011; Weiser y Saltz, 2015).

El esquema antiguo con efecto beneficioso en el estadio III utilizado desde los años 90 contiene 5-fluorouracil (5-FU) y leucovorina (LV). Otros fármacos con la actividad antitumoral demostrada son oxaliplatino, capecitabina y tegafur-uracilo (UFT) (Laurie y cols., 1989; Haller y cols., 2005; Twellves y cols., 2005; van der Pas y cols., 2013; Weiser y Saltz, 2015).

Actualmente el esquema estándar es el FOLFOX (oxaliplatino, 5-FU/LV) que aumenta la supervivencia libre de enfermedad, la supervivencia global y tasa de curación. Se realizaron estudios destinados a comparar este tratamiento con con administración de solamente 5-FU y leucovorina y se confirmó que el FOLFOX mejoró el pronóstico, aunque asocia cierto grado de neurotoxicidad a largo plazo y diarreas (Andre y cols., 2004 y 2009; Weiser y Saltz, 2015).

Otro esquema aceptable para el estadio III es el CapeOx (capecitabina oral y oxaliplatino intravenoso) con la supervivencia global a los 5 años y la supervivencia libre de enfermedad es comparable con el esquema 5-FU con LV y con el FOLFOX (Cassidy y cols., 2008; Haller y cols., 2011; Weiser y Saltz, 2015).

En los estudios sobre el efecto beneficioso de los inmunomoduladores en el estadio IV han demostrado la actividad antitumoral de los siguientes fármacos: irinotecán, el bevacizumab y el cetuximab. Hay suficiente evidencia científica para demostrar que el cetuximab es activo sólo en los pacientes con tumores sin mutaciones en el gen KRAS. En los estudios realizados sobre estos fármacos

se observó que presentan dudoso o ninguno beneficio clínico en los pacientes con tumores en estadios, II o III e incluso aumentan la toxicidad de tratamiento adyuvante y se asocian con tasas más altas de morbimortalidad. El cetuximab puede reducir la supervivencia libre de enfermedad en pacientes mayores de 70 años (Saltz y cols., 2007; Van Cutsem y cols., 2009; Ychou y cols., 2009; Alberts y cols., 2012; Allegra y cols., 2013; Weiser y Saltz, 2015).

### **1.9.3. Tratamiento adyuvante en cáncer de recto**

En los casos de cáncer de recto se utiliza diferentes esquemas que en el CCR. Si el tumor es T1 o T2 generalmente no precisa recibir tratamiento neoadyuvante y se indica cirugía con intención curativa. Si se trata de una neoplasia más avanzada (T3, T4 o confirmación de la presencia de ganglios linfáticos afectados por la enfermedad) se aplica tratamiento con quimiorradioterapia preoperatoria y quimioterapia postoperatoria, la cual se administra siempre, independiente de la estadificación del tumor tras su resección (Maas y cols., 2010 y 2011; Dalton y cols., 2012; Habr-Gama y cols., 2014; Apelt y cols., 2015; Weiser y Saltz, 2015, Renehan y cols., 2016; Roselló y Cervantes 2016).

Los fármacos indicados en esta modalidad de tratamiento son 5-FU intravenoso o capecitabina oral (monoterapia) junto con la radioterapia pélvica en la fase preoperatoria y el esquema FOLFOX en la fase postoperatoria, con inicio de 4 a 6 semanas después de la intervención quirúrgica y duración de cuatro meses. (Sauer y cols., 2004; Aschele y cols., 2009; Gerard y cols., 2010; Roh y cols., 2011; Weiser y Saltz, 2015, Roselló y Cervantes 2016).

Alrededor del 12-16% de los pacientes que reciben quimiorradioterapia neoadyuvante presenta una remisión completa en el momento de la cirugía, la cual se confirma posteriormente en los estudios anatomopatológicos (ausencia del tumor en la pared del recto y en los ganglios linfáticos locales). Estos pacientes tienen un pronóstico excelente con una supervivencia libre de enfermedad del aproximadamente 90% a los 10 años. Precisan vigilancia estrecha en los próximos años con un riesgo de recaída local entre el 5 y 50% según la serie estudiada. Gracias al diagnóstico precoz son candidatos a nueva resección quirúrgica curativa temprana. Se están llevando a cabo múltiples estudios para valorar si ante la respuesta clínica completa es necesario operar a estos pacientes o someterlos a una vigilancia estrecha y actitud expectante (Maas y cols., 2010 y 2011; Dalton y cols., 2012; Habr-Gama y cols., 2014; Apelt y cols., 2015; Weiser y Saltz, 2015, García Cabezas y cols., 2016; Renehan y cols., 2016; Roselló y Cervantes 2016).

## **2. ENDOTELINA**

Las endotelinas (ETs) son un grupo de tres péptidos endógenos: endotelina-1 (ET-1), endotelina-2 (ET-2) y endotelina-3 (ET-3), siendo la ET-1 la mejor caracterizada de las tres isoformas por su mecanismo de acción.

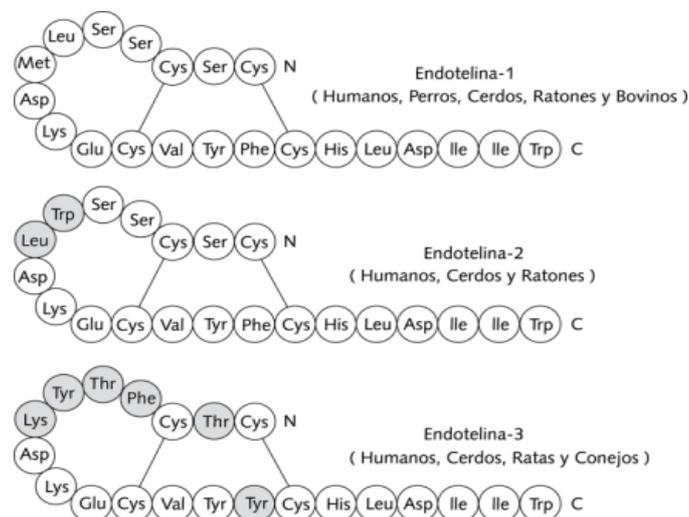
Las Ets junto con sus receptores (ETAR y ETBR) forman el eje de la endotelina (eje ET). A nivel fisiológico participan en los fenómenos de la diferenciación y desarrollo del tejido (por ejemplo, angiogénesis y osteogénesis), modulación del tono vasomotor (Nelson y cols., 2003), proliferación

celular, producción de hormonas, modulación del sistema inmune y en la apoptosis (Rubanyi y cols., 1994; Nelson et cols., 2003; Bagnato y cols., 2011; Rosano y cols., 2013). Los receptores ETAR están localizados principalmente en el músculo liso vascular y son responsables de la proliferación celular y la vasoconstricción. Los receptores ETBR están presentes en las células endoteliales y son mediadores de la relajación vascular por activación de la producción de óxido nítrico y prostaciclina, además, intervienen en la depuración de la ET-1 (Baltazares y cols., 2005).

Se ha demostrado que las ETs están involucradas con el desarrollo de diferentes enfermedades como la hipertensión arterial sistémica, hipertensión pulmonar, aterosclerosis, reestenosis coronaria, fallo cardíaco, cardiomiopatías e insuficiencia renal (Baltazares y cols., 2005). Las ETs ocupan un papel esencial actuando sobre el crecimiento y la progresión de diversos tumores, incluyendo cáncer de próstata, vejiga, riñón, pulmón, cérvix, ovario, mama, colon, cerebro, melanoma y sacroma de Kaposi (Bagnato y cols., 2005; Bagnato y cols., 2011; Nelson y cols., 2013).

Se están realizando varios estudios clínicos basados en la hipótesis que el eje de la endotelina representa una nueva diana del tratamiento de estos tumores (Bagnato y cols., 2005; Nelson y cols., 2013).

## 2.1. ESTRUCTURA DE LAS ETS



**Figura 3.** Estructura y homología de las ETs, cadenas de 21 aminoácidos ET-1, ET-2 y ET-3.

\* Extraído de Baltazares Lipp M, Rodríguez Crespo H, Ortega Martínez J, Sotres-Vega A, Baltazares Lipp ME. Sistema Endotelina. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex.* 2005;18(4):308-320.

Las tres isoformas de endotelina (ET-1, ET-2, ET-3) son péptidos constituidos por 21 aminoácidos con cuatro residuos de cisteína, estableciéndose dos puentes intramoleculares de disulfuro en la única  $\alpha$ -hélice, formando una estructura semicónica inusual (Figura 1) (Bagnato y cols., 2005; Baltazares y cols. 2005; Rosano y cols., 2013). Los puentes de disulfuro y el dominio carboxi terminal son cruciales,

tanto para la unión de las ETs con su receptor específico como para conservar su actividad biológica (Inoue y cols., 1989, Baltazares 2005) y se encuentran en la posición Cys3-Cys11 y Cys1-Cys15 (Bagnato y cols., 2005; Rosano y cols., 2013).

Todas las isoformas tienen una estructura peptídica similar. La ET-3 se diferencia de las otras dos isoformas en el aminoácido en posición 6 de la cadena peptídica (Bagnato y Rosano, 2008).

## **2.2. SÍNTESIS DE LAS ETs**

Las ETs están codificadas por distintos genes (EDN 1, EDN 2, EDN 3) que se encuentran en un cromosoma determinado 6, 1 y 20 respectivamente. El gen EDN 1 codifica la endotelina 1, abarca 6,8 kb de ADN genómico y contiene cinco exones. Está regulado principalmente a nivel de la transcripción (Bagnato y cols., 2005; Baltazares y cols., 2005; Rosano y cols., 2013).

La ET-1 se sintetiza predominantemente por células del endotelio, aunque también por células de músculo liso vascular (Lerman y cols., 1991; Nelson y cols., 2003; Bagnato y cols., 2005), células epiteliales, mesangiales, células de la glia, hepáticas (Emori y cols., 1991; Russell y cols., 1999; Nelson y cols., 2003), macrófagos, leucocitos, fibroblastos, cardiomiocitos y podocitos (Nuñez y cols., 1990; Resink y cols., 1990; Firth y cols., 1992; Kohan, 1997; Bagnato y cols., 2011).

La ET-2 se produce principalmente en el riñón y en el intestino por células aún no identificadas, asimismo, es producida por la placenta, útero y miocardio.

La ET-3 se produce en el cerebro, tracto digestivo y en menor proporción en los pulmones, glándulas suprarrenales y riñón (Nelson y cols., 2003; Baltazares y cols., 2005; Bagnato y cols., 2011).

Las tres ETs se sintetizan como prehormonas y son procesadas a péptidos activos en un proceso similar para las tres ET. La vía metabólica de la síntesis de la ET-1 es la más caracterizada y conocida. El ARN mensajero (ARNm) de la ET-1 humana codifica a la pre-proendotelina-1 de 212 aminoácidos que, mediante una endopeptidasa con acción proteolítica, se transforma en big-endotelina-1 de 39 aminoácidos (Big-ET-1). Este fragmento es posteriormente procesado por la enzima convertidora de endotelina-1 (ECE-1), que es una metaloendoproteasa (tiene diferentes formas intracelulares y otras unidas a la membrana celular), que rompe la unión en la posición triptófano 21 - valina 22 (Trp21-Val22) transformando la Big-ET-1 en ET-1, de 21 aminoácidos (Baltazares y cols., 2005).

La ET-1 no se almacena en las células, pero ante un estímulo determinado el ARNm induce la síntesis de la ET-1 en minutos y es secretada. El 75% de la ET-1 se libera hacia las células adyacentes al endotelio, donde se une a receptores específicos actuando primariamente como una sustancia paracrina y autocrina y no como una hormona circulante. No obstante, es posible detectar niveles de ET-1 en plasma, donde se correlacionan con la severidad de algunos procesos patológicos, tales como la insuficiencia cardíaca congestiva, la hipertensión arterial pulmonar o el cáncer (Baltazares y cols., 2005).

La vida media de la ET-1 en la circulación es de 4-7 minutos. Pueden distinguirse al menos cuatro vías de degradación de la ET-1: (1) a través del sistema lisosomal con la captación regulada por

el receptor ETBR; (2) el catabolismo mediado por la endopeptidasa extracelular neutral (NEP, neprilisina); (3) regulación a través de la ECE-1; (4) recaptación de la endotelina circulante (aproximadamente 80-90%) por el pulmón, riñón, y, en menor proporción, por el hígado (Abassi y cols., 1992; Rubin y cols., 1994; Xu y cols., 1994; Bremnes y cols., 2000; Bagnato y cols., 2005; Baltazares y cols., 2005; Bagnato y cols., 2011).

### **2.2.1. Regulación de la síntesis de endotelina-1**

La síntesis de la ET-1 puede ser inducida por más de 20 estímulos diferentes, por ejemplo la tensión pulsátil, lesión endotelial, cambios en el pH, factores fisicoquímicos como los ésteres de forbol, la trombina, angiotensina II, la insulina, la proteína quinasa C, el TGF  $\beta$ , el factor inducible por la hipoxia (HIF 1) a nivel del promotor proximal y los mineralocorticoides, la glucosa, el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), el interferón- $\gamma$ , y la interleuquina 1- $\beta$  (IL 1- $\beta$ ) a nivel del promotor distal (Bagnato y cols., 2005; Baltazares y cols., 2005; Rosano y cols., 2013).

La biosíntesis de la ET-1 también puede ser estimulada por el ejercicio miocárdico y algunos factores de riesgo cardiovascular, como un elevado nivel de colesterol, lipoproteínas de baja densidad y glucosa, deficiencia de estrógenos, obesidad, mediadores procoagulantes semejantes a trombina (Baltazares y cols., 2005).

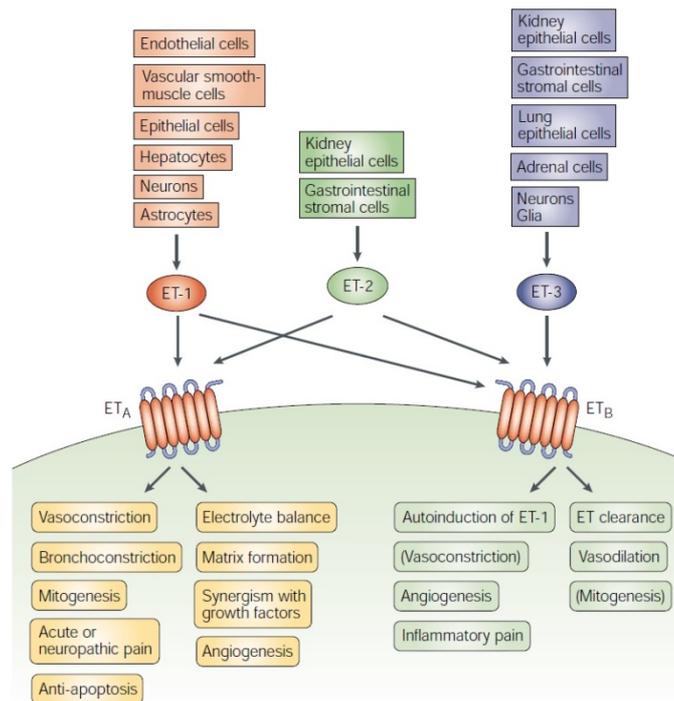
La inhibición de la síntesis (de la producción y la secreción) está regulada por los vasodilatadores como óxido nítrico, prostaglandinas PGI<sub>2</sub> y PGE<sub>2</sub>, y el péptido natriurético auricular (Rubin y cols., 1994; Bagnato y cols., 2005; Baltazares y cols., 2005).

## **2.3. MECANISMO DE ACCIÓN**

Las ETs ejercen sus efectos mediante su unión con los receptores de la superficie celular (Nelson y cols., 2003). Los ETAR y ETBR pertenecen al grupo de receptores acoplados a las proteínas G (GPCRs, G protein – coupled receptors) (Nelson y cols., 2003; Bagnato y cols., 2005; Baltazares y cols., 2005; Bagnato y cols., 2011).

El sistema endotelina se puede bloquear a través de dos vías: (1) la inhibición de la enzima convertidora de endotelina (ECE); (2) el uso de los antagonistas de ET-1 que bloquean a los receptores. Esta última es la vía más eficiente (Baltazares y cols., 2005).

El ETBR tiene afinidades iguales para las tres ETs, mientras que el ETAR exhibe una mayor afinidad por las ET-1 y ET-2 dos veces superior a que tiene por la ET-3. Ambos receptores activan una cascada de señalización similar, causando una gama de respuestas pleiotrópicas (Davenport, 2002; Bagnato y cols., 2011; Rosano y cols., 2013). La cadena c-terminal intracitoplasmática de ambos receptores difiere, lo que da lugar a efectos intracelulares contrapuestos (Nussendorfer y cols., 1999; Bagnato y cols., 2011).



**Figura 4.** Las ETs, sus células de origen, sus receptores y funciones fisiológicas.

\* Extraído de Nelson J., Bagnato A., Battistini B., Nisen P. *The Endothelin Axis: Emerging Role In Cancer.* Nature Reviews Cancer 2003;3:110–116.

Los ETAR y ETBR se expresan en una variedad de tejidos normales incluyendo sistema cardiovascular (músculo liso vascular, corazón, cardiomiocitos, fibroblastos), sistema nervioso central (nervio trigémino, cerebro, neuronas sensoriales de pequeño diámetro), de epitelio renal y células endoteliales, de próstata, de mama y tejido del sistema reproductivo femenino (Molenaar y cols., 1993; Karet y Davenport, 1996; Kuc y Davenport, 2004; Baltazares y cols., 2005; Schinelli, 2006; Smollich y Wülfing, 2008; Khodorova et al, 2009; Chichorro et al., 2010; Bagnato y cols., 2011). Esta expresión diferencial de los subtipos de los receptores de la ET en los tejidos es dinámica y contribuye a las diferentes acciones de las tres ETs (Levin, 1995; Nelson 1996).

En condiciones normales los dos tipos de receptores están distribuidos en distintas partes en un mismo tejido. Por ejemplo, a nivel vascular, los receptores ETAR están presentes generalmente en el músculo liso vascular y son responsables de inducir proliferación celular y vasoconstricción. Los receptores ETBR son mediadores de la relajación vascular por activación de la síntesis de óxido nítrico y prostaciclina, aunque la estimulación de los mismos también puede causar vasoconstricción. Además, intervienen en la depuración de la ET-1. Se encuentran principalmente en las células endoteliales y en menor proporción en las células de músculo liso. Se han encontrado ampliamente distribuidos en el riñón, hígado, útero y en menor cantidad, en el cerebro y sobre los astrocitos (Baltazares y cols., 2005).

El efecto de las ETs depende del receptor estimulado, por ejemplo, estimulando ETAR, las ETs causan vasoconstricción, brococonstricción, mitogenesis, dolor agudo o neuropático, frenan la apoptosis, influyen sobre el balance electrolítico, la formación de la matriz y la angiogenesis. La estimulación del ETBR provoca vasodilatación, angiogenesis, dolor y en menor medida vasoconstricción y mitogenesis (Nelson y cols., 2003; Bagnato y cols., 2005; Bagnato y cols., 2011).

El descubrimiento del papel del eje ET y el efecto del uso de los antagonistas de los receptores de la ET ha permitido pensar que el bloqueo del eje mediante los antagonistas, puede ser una nueva diana terapéutica para diferentes enfermedades, incluyendo cáncer. Existen varios tipos de moléculas capaces de bloquear los receptores de forma selectiva o de forma mixta (ETAR y ETBR) (Nelson y cols., 2003).

## **2.4. FUNCIONES BIOLÓGICAS EN TEJIDO SANO Y ÓRGANOS**

La función del eje ET en la vasoconstricción se está investigando en modelos de hipertensión arterial, insuficiencia cardíaca, insuficiencia renal, arteriosclerosis, reestenosis coronaria, hipertensión pulmonar y cardiomiopatías. El antagonista mixto de ambos receptores (bosentan) ya está aprobado para tratamiento de la hipertensión pulmonar y se están realizando ensayos clínicos para averiguar su efectividad para tratar insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedad coronaria y vasoespasmo cerebral (Nelson y cols., 2003; Baltazares y cols., 2005; Bagnato y cols., 2011).

Por otro lado, la ET-1 es un mitógeno directo de células de músculo liso que activa ambos receptores y estimula la producción de citoquinas y factores de crecimiento (Luscher y cols., 2000; Galie y cols., 2004). La ET-1 también posee una potente acción proinflamatoria: induce agregación plaquetaria y estimula la producción de aldosterona (Belloni y cols., 1996; Galie y cols., 2004).

### **2.4.1. Efecto de la ET-1 sobre los vasos sanguíneos sistémicos**

La ET-1 produce una marcada vasoconstricción, superando las propiedades vasoconstrictoras de la angiotensina-II (Ang II) y de las catecolaminas. Junto con el monóxido de nitrógeno (NO) induce vasodilatación tras su unión a los ETBR localizados en el endotelio vascular; en cambio los receptores ETAR y ETBR localizados en la capa de músculo liso vascular contribuyen en la vasoconstricción en la circulación mesentérica y cerebral, reduciendo el flujo sanguíneo. En los vasos pulmonares, sin embargo, produce un incremento en dicho flujo (Joško y cols., 2001; Baltazares y cols., 2005).

### **2.4.2. Efecto de la ET-1 sobre la presión arterial**

Se ha observado que la ET-1 y el receptor ETAR contribuyen en el mantenimiento basal del tono vasomotor y de la presión sanguínea en los humanos (Haynes y cols., 1995). Inicialmente al administrar la ET-1 en la sangre existe una disminución de la presión arterial, probablemente debido a la producción de NO y del péptido natriurético; posteriormente se produce un incremento dosis-dependiente en la presión sanguínea secundario a la vasoconstricción, y un incremento en la resistencia vascular (Joško y cols., 2001; Baltazares y cols., 2005).

### **2.4.3. Efecto de la ET-1 sobre el corazón**

Su administración sistémica aumenta la resistencia vascular coronaria produciendo una respuesta vasoconstrictora y participa en la etiología del vasoespasmo coronario. Igualmente tiene efectos sobre la agregación plaquetaria y la formación de trombos, lo cual agrava patologías como la

ateroesclerosis y la isquemia coronaria. Por otra parte, se ha observado, en modelos animales, que el incremento súbito en la producción de la ET-1 vascular está asociada con la remodelación e hipertrofia en el corazón de rata probablemente debido al efecto que tiene sobre los miocitos cardíacos (Ishikawa y cols., 1988; Baltazares y cols., 2005).

#### **2.4.4. Efecto de la ET-1 sobre los vasos sanguíneos pulmonares**

En los pulmones los receptores de la ET-1 tienen una distribución variable en los vasos, bronquios y alvéolos. Los receptores ETAR están localizados a lo largo de la arteria pulmonar, y los receptores ETBR predominan en el músculo liso de la vía aérea, en los capilares y en el tejido de la pared alveolar.

La ET-1 induce broncoconstricción *in vivo* mediante de dos mecanismos: (1) estimula la biosíntesis de tromboxanos y la activación de sus receptores situados en las células de músculo liso bronquial (Rubanyi y cols., 1994); (2) en el sistema autocrino siendo la ET-1 secretada por las células del epitelio bronquial y en este modo se puede unirse nuevamente a células de músculo liso.

Se han descrito múltiples mecanismos en los cuales la ET-1 contribuye en la aparición de la hipertensión pulmonar que incluyen la disfunción endotelial en la circulación pulmonar, vasoconstricción pulmonar, remodelación vascular y los fenómenos que participan en el incremento de las resistencias vasculares pulmonares. Las células endoteliales modifican la actividad de las células de músculo liso aumentando la síntesis de los vasodilatadores, como prostaciclina y NO, y vasoconstrictores y mitógenos, como tromboxano A<sub>2</sub> y ET-1 (Baltazares y cols., 2005).

#### **2.4.5. Efecto de la ET-1 sobre riñón**

Los riñones humanos tienen alta capacidad de producir la ET-1 y además contienen una importante concentración de los receptores de la ET-1. La administración sistémica de altas dosis de ET-1 causa incremento en la resistencia vascular renal, disminución en el flujo sanguíneo renal y en el grado de filtración glomerular, lo que provoca un descenso significativo de la perfusión y filtración renal y por lo tanto disminución de la diuresis (Baltazares y cols., 2005).

### **2.5. ETS Y CÁNCER**

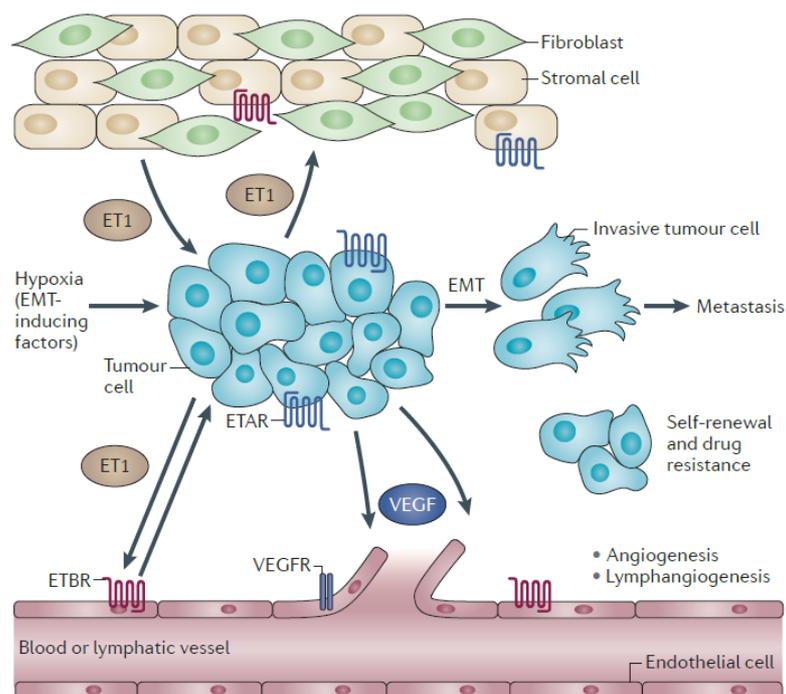
Se ha demostrado la implicación de la ET-1 en diversos tipos de tumores, como las neoplasias de ovario, de mama y de cérvix, de próstata, de riñón y de vejiga, de pulmón y, además en melanoma y CCR.

#### **2.5.1.1. Efecto de la ET-1 sobre los tejidos tumorales**

La expresión aberrante de la ET-1, o la sobreexpresión de los receptores de endotelina o de sus circuitos de la señalización puede contribuir a la iniciación del tumor y la progresión a través de mecanismos autocrinos y paracrinos. El mecanismo subyacente a la progresión de los tumores consiste

en la activación aberrante de los receptores de la ET-1 debido a la sobreexpresión de los mismos, la pérdida de un regulador negativo o por la expresión desregulada de los receptores de la ET-1 (Rosano y cols., 2013). Estos mecanismos de alteración pueden surgir a partir de cambios genéticos y epigenéticos.

Se ha demostrado que la ET-1 contribuye directamente al crecimiento del tumor y modula las interacciones tipo tumor-huésped en diversos tipos de cáncer. Actúa no solamente sobre las células tumorales, sino también sobre los tejidos adyacentes y la red capilar (Bagnato y cols., 2005), contribuyendo a la neovascularización, linfangiogenesis (crecimiento de las células de la red linfática), migración de los fibroblastos y algunas otras células de la respuesta inflamatoria. De este modo participa en el desarrollo del tejido tumoral (Rosano y cols., 2013). ETAR media múltiples actividades pro-cancerosas como la proliferación celular, el escape de la apoptosis, promueve la invasión y la diseminación metastásica, modula la respuesta inmune al proceso tumoral, altera los estímulos nociceptivos y como ya mencionamos anteriormente, la angiogénesis (Bagnato y cols., 2005; Bagnato y cols., 2011; Rosano y cols., 2013).



**Figura 5.** Interacciones microambientales reguladas por la ET1 sobre la progresión y crecimiento tumoral.

\* Extraído de Rosano L., Spinella F., Bagnato A. Endothelin 1 in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Cancer* 2013;13:637–651.

Los receptores de la ET-1 se pueden activar en las células tumorales a través de la producción autocrina de ligando o en un circuito paracrino mediante la producción de ligando desde las células del estroma, que lo producen fisiológicamente o en respuesta a las células (Rosano y cols., 2013).

La señalización de la ET-1 desencadena la activación de vías de señalización (MAPK, PI3K-AKT, NF- $\kappa$ B,  $\beta$ -catenina, HIF1 $\alpha$ , RHO, fosfolipasas, PKA y vía PKC1) descritas en la fisiopatología del cáncer. Mediante el mismo mecanismo, la ET-1 activa el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factor de crecimiento endotelial vascular del receptor 3 (VEGFR3) (Bagnato y cols., 2005; Rosano y cols., 2013).

La activación transcripcional de EDN1 por  $\beta$ -catenina se ha observado en las líneas celulares de cáncer de colon, próstata y ovarios donde se crea una autoamplificación positiva en forma de un bucle de retroalimentación que forma un circuito autocrino de la ET1 (Rosano y cols., 2013).

Muchos procesos activados por esta vía son los que están implicados en el funcionamiento normal de las células y además en el desarrollo y la progresión del cáncer, incluyendo la proliferación celular, apoptosis, invasión, la angiogénesis y osteogénesis y la nocicepción (Smollich y Wülfing, 2007; Bagnato y Rosano, 2008; Nelson y cols., 2009). La desregulación de la activación del ETAR puede, como se ha mencionado anteriormente, promover el desarrollo y progresión tumoral. Las alteraciones en las proporciones relativas del ETAR a ETBR pueden incitar la progresión de células de un fenotipo normal a un fenotipo maligno (Nelson et al., 1996; Kohan y cols., 1997; Bagnato et al., 1999; Godara et al., 2005; Bagnato 2011). Muchos tipos de células cancerosas, por ejemplo, de próstata, ovario, riñón, pulmón, cérvix, mama, vejiga, el melanoma y CCR, secretan ET-1 y el eje ET está implicado en su desarrollo, lo que sugiere que podría ser un objetivo muy atractivo para la terapia de estos tipos de cáncer (Asham y cols., 2001; Nelson y cols., 2003; Bagnato y cols., 2005; Bagnato y Rosano, 2008).

#### **2.5.1.2. ET-1 y proliferación celular**

Ambos efectos de la ET-1 sobre la proliferación y supervivencia celular están mediadas por los receptores ETAR en fibroblastos, células epiteliales y del músculo liso vascular y por ETBR en las células endoteliales (Nelson y cols., 2003).

Aunque los diferentes tipos de células del cáncer varían en sus respuestas a la estimulación de crecimiento por la ET-1, es evidente que la señalización autocrina de la ET-1 tiene un papel significativo en la proliferación celular. Los estudios sobre las células del cáncer de la próstata, cuello uterino y ovario revelaron que el crecimiento espontáneo fue inhibido por los antagonistas ETAR, como atrasentan (ABT-627 que disminuye los niveles de las proteínas antiapoptóticas como Bcl-2, Bcl -XL y survivina) y zibotentan (ZD4054), lo que demuestra que la ET-1 endógena actúa como un modulador autocrino de la proliferación celular a través del ETAR. La actividad mitogénica de la ET-1 puede ser amplificada por interacciones sinérgicas con otros factores de crecimiento, incluyendo EGF, factor de crecimiento de fibroblastos básico, insulina, TGF e IL-6 (Rosano y cols., 2013).

#### **2.5.1.3. ET-1 y la supervivencia de las células tumorales**

La ET-1 es un factor antiapoptótico en diferentes tipos de células y actúa modulando las vías de supervivencia celular (Nelson y cols., 2003; Rosano y cols., 2013). El bloqueo del ETAR resulta en un descenso en la actividad antitumoral a través de la inhibición del crecimiento y mediante la inducción de la apoptosis (Rosano y cols., 2013). Por ejemplo, el bloqueo del ETAR por atrasentan en células de cáncer de próstata induce la disminución de los niveles de las proteínas antiapoptóticas como Bcl-2,

Bcl-XL y survivina, lo que conduce a la muerte celular. Un efecto parecido se observa en el cáncer de ovario por el antagonista específico ETAR BQ-123 (Rosano y cols., 2013).

Resumiendo, el bloqueo del ETAR contribuye a la actividad antitumoral mediante la inhibición del crecimiento y mediante la inducción de apoptosis. Combinando el uso de los antagonistas selectivos de ETAR o los antagonistas de ambos receptores (macitentan) con la quimioterapia convencional *in vivo* e *in vitro* se ha demostrado más eficaz en la inducción de apoptosis en el cáncer de ovario, CCR, cuello uterino y próstata (Rosano y cols., 2013).

#### **2.5.1.4. Impacto de la ET-1 sobre la migración celular y la invasión**

La capacidad de ET-1 para interrumpir las comunicaciones intercelulares combinada con los efectos sobre la matriz extracelular acentúa la importancia de los receptores ET-1 en la regulación de las interacciones célula-célula o célula-matriz durante la progresión maligna. Durante esta progresión del cáncer, las células tumorales están estimuladas para liberar proteasas para perder la polaridad de las uniones celulares y adquieren un fenotipo mesenquimal, para poder desestructurar e invadir la matriz extracelular (ECM) y migrar a sitios distantes (Nelson y cols., 2003; Bagnato y cols., 2005; Rosano y cols., 2013). Estos cambios se caracterizan por el desmontaje de las uniones intercelulares (GJICs) y la reorganización de los complejos de adhesión del sustrato celular, y una remodelación sustancial del citoesqueleto. Se supone que el papel de la ET-1 (investigado en las líneas de cáncer de mama) es mediar estos cambios, lo que confirma que la sobreexpresión y la secreción aberrante de la ET-1 (junto a lactoferrina en estos casos) promueven la migración celular e invasión. Similares resultados se han obtenido en las líneas de melanoma (Rosano y cols., 2013).

La ET-1 regula dos familias de proteasas relacionadas con las metástasis: (1) las metaloproteinasas (las MMPs, tales como MMP2, MMP3, MMP7, MMP9, MMP13); y (2) el activador del plasminógeno tipo uroquinasa. Ambas familias participan en la degradación de la matriz extracelular. La ET-1 no solamente activa estas enzimas, pero a la vez disminuye la secreción del inhibidor tisular de la MMP1 (TIMP1) y de la MMP2 (TIMP2) (Salani y cols., 2000; Bagnato y cols., 2005; Rosano y cols. 2013).

Otra vía de la contribución de la ET-1 en la progresión tumoral se basa en el aumento de la motilidad de las células tumorales a través de la activación del sistema p125 FAK (quinasa de adhesión focal), paxilina, la familia de las proteínas RHO y de las integrinas.

#### **2.5.1.5. ETs y metástasis**

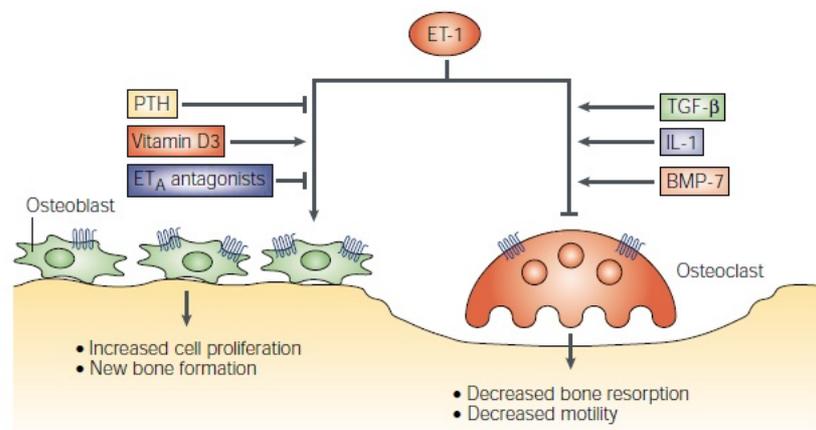
En varios estudios se ha descrito una amplia gama de posibles efectos de la ET-1 sobre la invasión metastásica. En un modelo de ratón se observó que un antagonista de los receptores de la ET-1 (macitentan) en combinación con paclitaxel impidió la progresión del cáncer de ovario mediante la inhibición de las vías de supervivencia tanto en las células tumorales, que expresan ETAR, y en las células endoteliales asociadas al tumor que expresan ETBR.

La sobreexpresión del ETBR aumenta la incidencia de metástasis cerebrales en un modelo preclínico de las metástasis de melanomas en el sistema nervioso central (SNC) y el crecimiento del melanoma intracraneal se inhibe por el antagonista ETBR A192621. Todo ello conduce a la conclusión

que la identificación del papel del ETBR en los casos de melanoma metastásico al SNC puede proporcionar tanto un objetivo para la intervención terapéutica como un marcador pronóstico potencial para identificar a los pacientes con melanoma que tienen un mayor riesgo de metástasis cerebral.

Algunos estudios recientes demostraron que los niveles de la ET-1 son más altos en los pacientes con cáncer de la vejiga invasivo, que son propensos a las metástasis y que se correlacionan con la reducción de la supervivencia del paciente, lo que indica la ET-1 como un biomarcador para metástasis pulmón en estos casos. El tratamiento con el Zibotentan redujo significativamente el crecimiento de células de cáncer de vejiga, pero sólo cuando el fármaco se administró antes de la inoculación celular. Es de destacar que el tratamiento con Zibotentan reduce dramáticamente el desarrollo de metástasis pulmonares lo que se asocia con una disminución significativa en el número de los macrófagos asociados al tumor (TAM). Esto indica que el eje ET-1 - ETAR desencadena la infiltración por los macrófagos y la producción de citoquinas inflamatorias en el pulmón antes del desarrollo de las metástasis. Estos resultados, que demuestran que Zibotentan reduce la respuesta inflamatoria temprana y el desarrollo posterior de las metástasis sugieren que los inhibidores del ETAR podrían ser más eficaces como agentes terapéuticos adyuvantes antes de que las metástasis se vuelvan clínicamente aparentes (Rosano y cols., 2013).

#### 2.5.1.6. ET-1 y osteogénesis



**Figura 6.** La endotelina-1 y remodelación ósea.

La endotelina participa en formación de nuevos huesos estimulando la proliferación de los osteoblastos y bajando la actividad de los osteoclastos.

\* Extraído de Nelson J., Bagnato A., Battistini B., Nisen P. *The Endothelin Axis: Emerging Role In Cancer.* Nature Reviews Cancer 2003;3:110-116.

En algunos estudios se ha descubierto que la ET-1 influye en la formación de lesiones osteoblásticas, que se observan con frecuencia en los pacientes con cáncer de próstata y, en menor medida, con cáncer de mama metastásico (las metástasis en estos casos suelen ser osteolíticas). En el microambiente de la médula, la ET-1 induce la formación de hueso nuevo mediante la estimulación de la mitogénesis en osteoblastos, que expresan tanto ETAR y ETBR, por la disminución de actividad de los osteoclastos y la motilidad de estas células (Nelson y cols., 2003).

Las metástasis óseas en los modelos experimentales se inhiben por los antagonistas ETAR (atrasentan y zibotentan), así como por los antagonistas de ambos, ETAR y ETBR (bosentan) (Nelson y cols.; 2003; Rosano y cols., 2013).

#### **2.5.1.7. ET-1 y dolor**

La evidencia sugiere que la ET-1 contribuye al dolor que está asociado a la enfermedad metastásica. Esto ocurre por la excitación de los nociceptores a través del ETAR, aunque simultáneamente se produce también el efecto analgésico mediante la liberación de  $\beta$ -endorfina y activación del receptor opioide mediado por el ETBR. Por lo tanto, el bloqueo ETAR podría representar una opción terapéutica para reducir la metástasis ósea y el dolor asociado.

#### **2.5.1.8. ET-1 y angiogénesis y linfogénesis**

Ambos procesos están bajo control celular y reguladores del medio ambiente incluyendo la hipoxia local. La ET-1 parece tener efecto sobre las células de endotelio linfático y vascular (Nelson y cols. 2003), células musculares lisas vasculares y los fibroblastos lo que conlleva formación de nuevos vasos sanguíneos y linfáticos (Bagnato y cols., 2005; Rosano y cols. 2013). La ET-1 modula diversas etapas de la neovascularización, incluyendo la proliferación de células endoteliales, la migración, la invasión, la producción de la proteasa y la formación del tubo vascular y estimula la neovascularización *in vivo* (Spinella y cols., 2002; Nelson y cols. 2003; Bagnato y cols., 2005).

A través del ETBR, estimula las células de epitelio a migrar, proliferar e invadir los tejidos circundantes formando capilares. En estos procesos contribuyen – activados por la ET-1 – el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), HIF1 $\alpha$ , ciclooxigenasas 1 y 2 (COX1, COX2) y prostaglandina E2 (Bagnato y cols., 2005; Rosano y cols., 2013). La activación del ETAR estimula principalmente las células del músculo liso vascular y la mitogénesis de los pericitos (células contráctiles que envuelven las células endoteliales de los capilares).

La activación del ETAR por la ET-1 estimula la producción de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que induce la proliferación de células endoteliales y la permeabilidad vascular mediante el aumento de los niveles del factor inducible por hipoxia-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), un regulador del crecimiento de los tumores y angiogénesis (Forsythe y cols., 1996; Salani y cols., 2000; Spinella y cols., 2002; Nelson y cols. 2003; Bagnato y cols., 2005).

En los tumores cerebrales, tales como glioma y astrocitoma, la presencia de la ET-1 se correlaciona con la vascularización del tumor (Nelson y cols., 2003).

#### **2.5.1.9. ET-1 y respuesta inflamatoria**

La ET-1 modula la diferenciación y activación de las células TAM (tumour-infiltrating immune cells - células inmunes que infiltran el tumor) que se caracterizan por producción de la ET-1 y expresión de los receptores de la endotelina. Desencadena la producción de los mediadores inflamatorios por macrófagos como IL-6, quimioquinas, COX2 y MMPs, que permiten la difusión celular e invasión de

otros órganos (por ejemplo, metástasis al pulmón en cáncer de vejiga que se pueden controlar parcialmente disminuyendo el nivel de macrófagos con zibotentan).

Por otra parte, la ET-1 secretada por las células tumorales actúa sobre sus receptores localizados en los fibroblastos aislados de los tejidos normales adyacentes a los tejidos de CCR, ovario y mama en el mecanismo que conduce a crecimiento de la matriz extracelular y aumento de tamaño tumoral.

## 2.5.2. Relación de la ET-1 en diferentes tipos de cáncer

**Tabla 5.** La expresión de los receptores de las ETs en tumores malignos y el impacto clínico

LOCALIZACIÓN/TIPO DE TUMOR	TIPO DE RECEPTOR	FENOTIPO ASOCIADO
Vejiga	ETAR, ETBR	Supervivencia ↓
Glioblastoma	ETAR, ETBR	Sin datos
Mama	ETAR	Supervivencia ↓, mtx óseas ↑
Cérvix	ETAR	Sin datos
Colorrectal	ETAR	Grado de tumor ↑, supervivencia ↓
Hígado	Pérdida de ETBR	Sin datos
Estómago	ETAR y pérdida de ETBR	Sin datos
Cabeza y cuello	ETAR	Supervivencia ↓
Pulmón	ETAR y ETBR	Supervivencia ↓
Melanoma	ETBR	Fenotipos agresivos, mtx ganglionares
Ovario	ETAR	Grado de tumor ↑, quimioresistencia, mtx ↑
Próstata	ETAR	Grado de tumor ↑, mtx óseas ↑
Riñón	ETAR ETBR	ETAR asociado con grado de tumor ETBR asociado con la supervivencia
Genital	ETBR	Supervivencia ↓

\* Extraído de Rosano L., Spinella F., Bagnato A. *Endothelin 1 in cancer: biological implications and therapeutic opportunities.* *Nature Reviews Cancer* 2013;13:637–651.

### 2.5.2.1. ET-1 y cáncer de ovario

La demostración de la ET-1 como un importante mediador de la progresión tumoral (a través de la desregulación de la señalización autocrina y proliferación de las células tumorales) en el cáncer de ovario permitió identificar claramente el ETAR como una potencial diana terapéutica. Esto ha provocado los estudios sobre varios antagonistas de los receptores ETAR. Estas pequeñas moléculas han contribuido a la comprensión de la relevancia fisiopatológica del eje ET-1 y el comienzo de la traducción de esta información en los ensayos clínicos (Nelson y cols., 2003; Bagnato y cols., 2005) descubriendo que el antagonista selectivo del ETAR (BQ123) inhibe el crecimiento del tumor (Bagnato y cols., 1995; Salani y cols., 2000; Del Bufalo y cols., 2002; Denkert y cols., 2002; Ferrandina y cols., 2002; Gupta y cols., 2003; Nelson y cols. 2003; Erkinheimo y cols., 2004; Bagnato y cols., 2005; Bagnato y cols., 2011).

### **2.5.2.2. ET-1 y cáncer de próstata**

El aumento de la expresión del ETAR se observa en el tumor de próstata localmente avanzado y en los pacientes con cáncer metastásico (Nelson y cols., 2003; Bagnato y Rosano, 2008; Bagnato y cols., 2011).

Por otra parte, se ha demostrado que los antagonistas selectivos del ETAR (atrasentan) bloquean los efectos proliferativos de la ET-1 sobre los factores de crecimiento en las células de cáncer de próstata y sobre los osteoblastos que están involucrados en metástasis óseas del cáncer de próstata (Nelson y cols., 2003; Bagnato y cols., 2011).

### **2.5.2.3. ET-1 y cáncer de útero**

En las líneas celulares del de cáncer de cuello uterino con VPH positivo (virus del papiloma humano) se ha observado mayor expresión de la ET-1 y el ETAR. El BQ123 y atrasentan igualmente que en otros tipos de cáncer inhiben la proliferación inducida por la ET-1, el efecto que no se observa en caso de tumor no asociado al VHP (Nelson y cols., 2003; Bagnato y cols., 2011).

### **2.5.2.4. ET-1 y cáncer de pulmón**

En el cáncer de pulmón de células pequeñas los niveles plasmáticos elevados de la ET-1 han sido reportados en pacientes con la enfermedad metastásica (Nelson y cols., 1995; Nelson y cols., 2003). Existen datos que sugieren una implicación de la desregulación epigenética del ETBR en el desarrollo y progresión del cáncer de pulmón y identifican este gen como un prometedor biomarcador para la respuesta a los regímenes que modulan el eje de ET (Knight y cols., 2009; Bagnato y cols., 2011).

### **2.5.2.5. ET-1 y cáncer de mama**

Igualmente, en el carcinoma de mama los niveles de la ET-1 y de ARNm fueron mayores en muestras del carcinoma ductal in situ de mama en comparación con el tejido mamario normal y el aumento de los niveles de la ET-1 en plasma se correlacionan con la gravedad de la enfermedad (Alanen y cols., 2000; Bagnato y cols., 2011).

### **2.5.2.6. ET-1 y otros tipos de cáncer**

El ETBR se sobreexpresa en melanomas (Lahav, 2005) y oligodendrogliomas (Anguelova y cols., 2005). Además, los análisis de los perfiles de expresión génica e inmunohistoquímica en líneas celulares y biopsias del melanoma humano indentificaron el ETBR como un marcador de la progresión tumoral asociado con un fenotipo agresivo (Bittner y cols., 2000; Demunter y cols., 2001). La activación del ETBR por la ET-1 o la ET-3 desencadena vías implicadas en la progresión del melanoma cutáneo y el bloqueo del ETBR inhibe el crecimiento de xenoinjerto de melanoma humano (Bagnato y cols., 2004). Igualmente se ha demostrado que la inhibición del ETBR bloquea la proliferación celular e induce la apoptosis de los gliomas (Takai y cols., 1992; Rai y cols., 2006; Setling y cols., 2008; Paolillo y cols., 2010; Bagnato y cols., 2011).

Similares resultados se han obtenido en casos de sarcoma de Kaposi, meningioma (tumor benigno del sistema nervioso central), glioblastoma multiforme (tumor maligno del SNC), cáncer de pulmón y de mama (Nelson y cols., 2003; Bangato y cols., 2011).

## 2.6. OPORTUNIDADES TERAPÉUTICAS

La variedad de los antagonistas de los receptores de la ET, las indicaciones para su utilización en diferentes enfermedades y las fases de los estudios actuales muestra la siguiente tabla:

**Tabla 6.**

NOMBRE	MARCA	TIPO	INDICACIONES	FASE	VÍA DE ADMINISTRACIÓN
Atrasentan	Abbott	ETAR (selectivo)	Próstata con metástasis Próstata sin metástasis)	III III	Oral Oral
YM 598	Yamanaouchi	ETAR (selectivo)	Próstata con metástasis Próstata sin metástasis)	II II	Oral Oral
AZD 4054	AstraZeneca	ETAR	Próstata	II	Oral
Bosentan	Actelion	ETAR/ETBR	Hipertensión pulmonar Melanoma con metástasis	Aprobado II	Oral Oral
Tezosentan	Actelion/Genetech	ETAR/ETBR	Hipertensión arterial	II	Oral/iv
J104132	Banyu/Merck	ETAR/ETBR	Insuficiencia cardíaca congestiva Hipertensión arterial	II	Oral
Sitaxsentan	ICOS-Texas Biotech	ETAR	Insuficiencia cardíaca congestiva	II	Oral/iv
Ambrisentan	Myogen	ETAR	Enfermedades cardiovasculares y renales	II	Oral
SPP 301	Speedel Development	ETAR	Enfermedades cardiovasculares	II	Oral
Endotentan	Bristol-Myers Squibb	ETAR	Insuficiencia cardíaca congestiva	II	Oral
S0139	Shionogi	ETAR	Insuficiencia cardíaca congestiva	II	Oral
Zibotentan	AstraZeneca	ETAR (específico)	Próstata con metástasis Próstata sin metástasis) Carcinoma no microcítico de pulmón	III III II	Oral Oral Oral
Macitentan	Actelion	ETAR/ETBR	Glioblastoma	I	Oral

\* Basado en Nelson J., Bagnato A., Battistini B., Nisen P. *The Endothelin Axis: Emerging Role In Cancer. Nature Reviews Cancer* 3: 110 – 116 (2003) y Rosano L., Spinella F., Bagnato A. *Endothelin 1 in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. Nature Reviews Cancer* 2013;13:637–651.

La inhibición del eje ET usando antagonistas de los receptores de la ET específicos, selectivos o de ambos receptores representa un atractivo enfoque específico para el tratamiento de cáncer. Se están evaluando actualmente más de 15 antagonistas del ETAR y o antagonistas del ETBR para una variedad de indicaciones, incluyendo la enfermedad cardiovascular y el cáncer. Los antagonistas selectivos de ETAR y ETBR, BQ123 y BQ788 han sido valiosas herramientas para la evaluación de antagonismo del receptor de la ET y se han utilizado en modelos preclínicos. Sin embargo, como estos

agentes ambos son péptidos su utilidad en el ámbito clínico ha sido limitado. Aunque no hay datos publicados con el BQ788 en los humanos, se han realizado una serie de estudios usando el BQ123 en un entorno en el que el acceso a la pequeña molécula de los agentes no peptídicos no ha sido posible (Spratt y cols., 2001).

Se ha demostrado que el ETAR es el receptor principal implicado en los procesos neoplásicos, por lo cual los enfoques terapéuticos se están centrando en los antagonistas del ETAR. Hasta la fecha, los antagonistas de ambos receptores ETAR/ETBR (bosentan, macitentan), los antagonistas selectivos del ETAR (atrasentan e YM-598) y el antagonista específico (zibotentan) son los únicos antagonistas del receptor de la ET que han sido evaluados tanto en los estudios preclínicos y en la oncología clínica (Bagnato y cols., 2011; Rosano y cols., 2013).

Hay menos evidencia sobre el efecto terapéutico de los antagonistas selectivos del ETBR (por ejemplo, IRL-1620) que aumenta la perfusión de los tejidos cancerosos incrementando las posibilidades de quimio- y radioterapia (Rosano y cols., 2013).

## **2.7. ETS Y CCR**

Se ha observado un aumento de la expresión del ARNm de pre-pro Et-1 y ECE-1 en los adenomas y adenocarcinomas colorrectales en comparación con el colon normal (Egidy y cols., 2000; Rosano y cols., 2008; Leon y cols. 2014).

Igualmente, en el 80% de los principales cánceres de colon humano, el gen EDN1 se encuentra sobreexpresado. Este gen se sobreexpresa, *in vivo* e *in vitro*, por acción de la  $\beta$ -catenina, que es la responsable del inicio de la mayoría de los cánceres de colon. Existe una zona específica de unión en la región promotora del gen de la ET-1, denominada TCF-4, y la inhibición en la señalización para la unión de la  $\beta$ -catenina produce una disminución en la expresión de ET-1 (Kim y cols., 2005; Leon y cols., 2014).

La ET-1 es secretada por las líneas celulares del carcinoma de colon humano y de rata (adenomas y adenocarcinomas). En estos casos la ET-1 y el receptor ETAR tienden a tener una mayor expresión en comparación con las células de colon normal. La ET-1 parece proteger las células cancerosas de la apoptosis inducida por FASL. Este receptor pertenece al grupo de la familia de los factores de necrosis tumoral, se une con el FASL (FAS ligand) e induce la muerte celular activando las caspasas (enzimas del grupo de los mediadores esenciales de la apoptosis). El mismo efecto sobre la muerte celular tiene Paclitaxel, un medicamento utilizado para tratamiento de algunos tumores malignos. Se ha observado que en las líneas de cáncer colorrectal la ET-1, actuando sobre el receptor ETAR, funciona como factor de supervivencia inhibiendo la apoptosis mediada por el FASL (Nelson y cols., 2003, Leon y cols., 2014).

En células de colon normal, el receptor ETAR está situado a nivel de las células endoteliales. En las células tumorales la expresión de este receptor está elevada a través de mecanismos dependientes de proteínas quinasas que inducen la producción de VEGF y contribuye a la angiogénesis vascular (Hoosein y cols., 2007).

Como se ha mencionado anteriormente los niveles plasmáticos de la ET-1 están incrementados en los pacientes con CCR, así como en un modelo de CCR singénico en ratas. Está demostrado que la inhibición del receptor ETAR con un antagonista selectivo (BQ123) reduce significativamente el tamaño de las metástasis en el hígado (Asham y cols., 2001; Bagnato y cols., 2011).

El número de los receptores ETBR se encuentra disminuido en las células tumorales de CCR en comparación con células normales (Pao y cols., 2001), lo que puede contribuir en el aumento de los niveles de la ET-1, teniendo en cuenta la fusión de los receptores ETBR en la degradación de la ET-1 (Hoosein y cols., 2007).

En un artículo recientemente publicado se presentaron los resultados de un estudio donde se observó el impacto que tiene la melatonina sobre las células de CCR. La melatonina es una hormona que se encuentra en forma natural en el cuerpo, sintetizada en varios órganos como la glándula pineal o el tracto gastrointestinal. En el estudio descrito se menciona que la melatonina inhibe el crecimiento del CCR tanto *in vitro* como *in vivo* y además aumenta la eficacia de los agentes quimioterapéuticos, aunque el mecanismo era incierto. Igualmente se ha observado en otros estudios no relacionados con cáncer, que la melatonina inhibe la síntesis de la ET-1. Los autores plantean la hipótesis y posteriormente demuestran que la melatonina efectúa sobre las células cancerosas comprometiendo el eje ET: inhibe la expresión de EDN1 - ARNm y de la ECE-1, disminuye la secreción de la ET-1 de las células tumorales *in vitro*. El impacto sobre el EDN1 - ARNm se realiza mediante inhibición de FoxO1 (fosforilación) y NF- $\kappa$ B, ambos son factores de transcripción del EDN1 implicados en la progresión tumoral (Leon y cols., 2014).

Varios estudios han revelado que la inactivación epigenética de EDN2 y EDN3 se produce con frecuencia en colon y puede ser un paso necesario que conduce al cáncer. Ante estas observaciones, es posible plantear la hipótesis de que el EDN2 y EDN3 pueden estar silenciados inicialmente en el desarrollo del cáncer para eludir la competencia con la ET-1 para sus receptores. Estos hallazgos podrían sugerir que las ET-2 y ET-3 presentan un papel importante en el CCR y pueden abrir nuevas posibilidades terapéuticas con el uso de los antagonistas no selectivos de los ETAR y ETBR (Wang y cols., 2013).

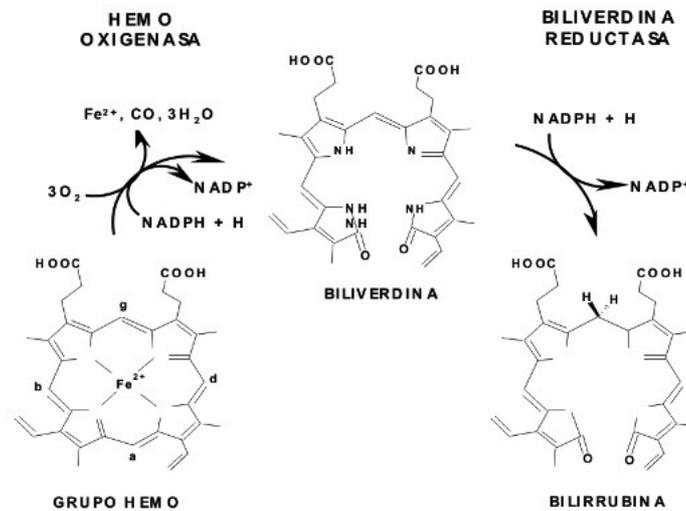
### **3. HEMOOXIGENASA**

La hemooxigenasa (HO) es una enzima que participa en el catabolismo intracelular del grupo hemo.

El grupo hemo es un grupo que forma parte de diferentes proteínas llamadas hemoproteínas, de las cuales destacan la hemoglobina, la mioglobina, los citocromos, catalasa, peroxidasa, oxigenasa, las ciclooxigenasas (COX 1 y 2) y la óxido nítrico sintasa endotelial (iNOS). El grupo está constituido por el ion Fe<sup>2+</sup> y un anillo de porfirina.

En el proceso de la degradación del hemo, la hemooxigenasa conduce a la liberación de tres productos fundamentales: la biliverdina (un antioxidante, posteriormente convertida a la bilirrubina

mediante la reducción por la biliverdina reductasa), el hierro libre ( $\text{Fe}^{2+}$ ) y el monóxido de carbono (CO).



**Figura 7.** Degradación del hemo por la HO-1

\* Extraído de Orozco Ibarra M, Pedraza Chaverri J. Hemo oxigenasa: aspectos básicos y su importancia en el sistema nervioso central. Arch Neurocién 2010;15(1):47-55.

Existe una isoforma de la hemooxigenasa denominada la hemooxigenasa-1 (HO-1), que no solamente está implicada en la degradación del grupo hemo sino también en la modulación de los procesos inflamatorios, antioxidantes y en el bloqueo de la apoptosis (Maines, 1997; Sánchez y cols., 2005; Orozco y Pedraza, 2010).

En condiciones fisiológicas la HO-1 está presente en todos los tejidos en bajas concentraciones, pero su expresión aumenta considerablemente en caso de daño celular. Además, se ha demostrado que el crecimiento de la mayoría de los cánceres está relacionado con la HO-1 (Fang y cols., 2004). La respuesta adaptativa de la HO-1 a diversos estímulos y la participación en los procesos neoplásicos sugieren que los enfoques farmacológicos dirigidos a sus inhibidores y/o estimuladores pueden dar lugar a nuevas estrategias para la terapia antitumoral y además la protección contra los procesos inflamatorios y lesiones oxidativas de los tejidos (Fang y cols., 2004; Zhu y cols., 2011).

### 3.1. GENERALIDADES

La hemooxigenasa es una proteína descubierta en los años sesenta por Wise y Drabkin como la enzima responsable del catabolismo oxidativo del grupo hemo a la biliverdina (BV). Posteriormente Tenhuen confirmó estas observaciones y empezó los estudios para una mejor caracterización de la sustancia. En los años ochenta se descubrió su isoforma inducible llamada la HO-1 o *heat shock protein-32* (HSP-32) (Wise y Drabkin, 1964; Tenhuen y cols., 1968 y 1969; Hill-Kapturczak y cols., 2002; Morse y Choi, 2002; Fang y cols., 2004; Sánchez y cols., 2005).

Existen otras dos isoformas de la hemooxigenasa: la hemooxigenasa-2 y la hemomoxigenasa-3. Estas isoformas están expresadas de forma constitutiva en los tejidos, en condiciones fisiológicas sin

necesidad de ningún tipo de inducción. Las dos isoformas catalizan la misma reacción de la degradación del hemo que la HO-1, pero tienen diferentes características bioquímicas, estructuras moleculares, mecanismos de regulación y distribución tisular por lo cual se supone que pueden tener distintas funciones celulares (Willis y cols., 1996; Maines, 1997; Wagener y cols., 1999; Guo y cols., 2001; Hill-Kapturczak y cols., 2002; Sikorski y cols., 2004; Orozco y Pedraza, 2010).

Hay multitud de evidencias que demuestran las funciones antiinflamatorias, antioxidantes y antiapoptóticas de la HO-1, tanto por su actividad propia y como por la actividad de los productos que genera su inducción. Participa en la fisiopatología de numerosas enfermedades del sistema cardiovascular, respiratorio, inmune, digestivo, endocrino, nervioso y renal y también en los mecanismos implicados en los trasplantes. Se estima que es la enzima más inducida por diferentes estímulos en el cuerpo humano. (Ryter y Tyrrell, 2000; Alcaraz y cols., 2003; Fang y cols., 2004; Sánchez y cols., 2005).

La sobreexpresión de la HO-1 por diversos inductores químicos conduce a la activación de su propiedad citoprotectora, lo que se ha demostrado experimentalmente tanto *in vitro* como *in vivo* (Fang y cols., 2004).

### **3.2. ESTRUCTURA Y LOCALIZACIÓN DE LA HEMOOXIGENASA-1**

La HO-1 es una proteína de 32kDa. En condiciones fisiológicas se encuentra con mayor actividad en el bazo, donde los eritrocitos senescentes son secuestrados y destruidos y en el hígado, donde en los microsomas hepáticos catalizan la degradación del hemo. En el caso de que se produzca su inducción, aunque presente en todos los órganos y tejidos, se expresa más en el endotelio y músculo liso del sistema vascular (Siow y cols., 1999; Otterbein y Choi, 2000; Wunder y Potter, 2003; Fang y cols., 2004; Orozco y Pedraza, 2010).

### **3.3. REGULACIÓN DE LA HEMOOXIGENASA**

#### **3.3.1. Genes**

La inducción de la HO-1 por los diversos estímulos extracelulares se debe a la síntesis del ARNm del gen de la HO-1 mediante múltiples factores de transcripción sensibles al estrés: AP-1, AP-2, NF- $\kappa$ B y Nrf2 (Alam y Cook, 2007; Orozco y Pedraza, 2010).

En los humanos existe polimorfismo satélite en el promotor del gen de la HO-1 que probablemente es el responsable de la respuesta transcripcional. Los sujetos con un menor número de repeticiones (GT) $_n$  presentan mayor expresión de la HO-1 y clínicamente presentan mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares, renales y neoplasias (Exner y cols., 2004; Orozco y Pedraza, 2010; Zhu y cols., 2010).

#### **3.3.2. Factores de regulación de la hemooxigenasa**

De las 3 isoformas de la hemooxigenasa de mamífero, la HO-1 es la más sensible al estrés y es conocida por modular las funciones celulares tales como la producción de citoquinas, la

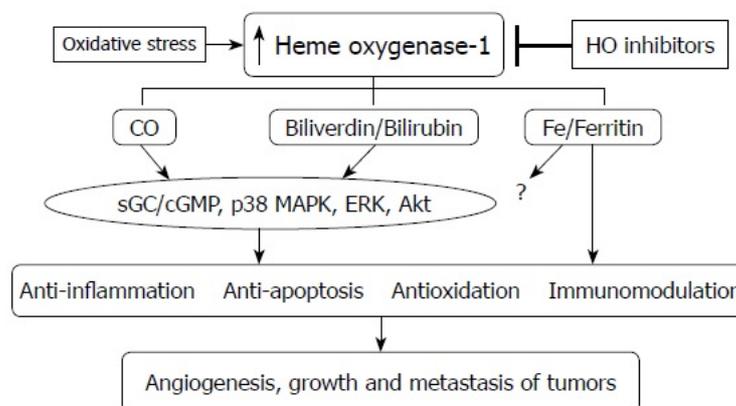
proliferación celular y la apoptosis, contribuyendo en la adaptación y a la protección de los órganos y tejidos de lesiones agudas (Choi y cols., 2003).

Su expresión aumenta en presencia de numerosos estímulos inductores del estrés celular como la hipoxia, la hiperoxia, el choque térmico, hemorrágico e isquemia, el déficit de hierro, las endotoxinas bacterianas (lipopolisacárido), las radiaciones ionizantes, las citoquinas y otros mediadores inflamatorios, lipoproteínas oxidadas de baja densidad, especies reactivas de oxígeno (ROS, por ejemplo el peróxido de hidrógeno H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), metales pesados (Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Ni, Pd, Pt, Sn, Zn), algunos medicamentos y los factores de crecimiento. No obstante, el estímulo más importante para su expresión es el grupo hemo, potencialmente nocivo por sus propiedades prooxidantes (Rosenberg y Kappas, 1991; Alam y cols., 1994; Willis y cols., 1996; Maines 1988 y 1997; Siow y cols., 1999; Morse y Choi 2002; Fang y cols., 2004; Collins y cols., 2005; Sánchez y cols., 2005, Orozco y Pedraza, 2010; Zhu y cols., 2010).

Existen inhibidores específicos de la HO-1 como la protoporfirina del zinc (ZnPP) o la protoporfirina de estaño (SnPP). Su aplicación en los estudios experimentales dio como resultado un empeoramiento de las enfermedades en las que está involucrada la inducción de la HO-1, tales como el rechazo del injerto, lesión por isquemia-reperusión, nefrotoxicidad de cisplatino o shock séptico inducido por la endotoxina (Agarwal y cols., 1995; Sato y cols., 2001; Lee y Chau, 2002; Choi y cols., 2003; Wagner y cols., 2003; Fang y cols., 2004; Morioka y cols., 2006).

Por otro lado, existen inductores exógenos de la HO-1 como el hemo arginato, la protoporfirina de cobalto (CoPP), la hemina (molécula de protoporfirina IX con un átomo de Fe<sup>3+</sup>) y el ácido trinitrobenceno sulfónico. La inducción de la HO-1 a través de estas sustancias se ha demostrado en los cultivos celulares y en modelos animales de enfermedades de cerebro, corazón, riñones, pulmones e hígado (Agarwal y cols., 1995; Hangaishi y cols., 2000; Yet y cols., 2001; Coito y cols., 2002; Tullius y cols., 2002; Wagner y cols., 2003; Fang y cols., 2004).

### 3.4. MECANISMO DE ACCIÓN



**Figura 8.** Funciones de la HO-1 con implicación en procesos tumorales

\* Extraído de Zhu X, Fan WG, Li DP, Lin MC, Kung H. Heme oxygenase-1 system and gastrointestinal tumors. *World J Gastroenterol* 2010;16: 2633-7.

Las características citoprotectoras de la HO-1 parecen depender principalmente de sus efectos antiapoptóticos y antioxidantes. Actúa mediante varios mecanismos como la disminución de los niveles de los oxidantes intracelulares, el aumento de los niveles de la bilirrubina y la producción del CO. (Fang y cols., 2004; Sánchez y cols., 2005).

Se ha postulado que existe un gran paralelismo entre las funciones biológicas de la HO-1 y los sistemas generadores del CO y NO, lo que conduce a las conclusiones sobre la relación en la regulación de estos sistemas por la HO-1 (Maines, 1997).

Existen numerosas evidencias que los mecanismos de la actuación de la HO-1 están íntimamente ligados a las funciones biológicas de los productos que genera su actividad. Por ejemplo, el ion  $Fe^{2+}$  es un agente prooxidante y se confirmó su relación con la muerte celular en diferentes órganos y tejidos. El efecto dañino del  $Fe^{2+}$  se compensa por el aumento de la síntesis de la ferritina paralelo a la inducción de la HO-1. De este modo disminuyen los niveles del hierro libre quedando el último unido con la ferritina.

Por otra parte, la bilirrubina se considera uno de los antioxidantes endógenos más potentes por su capacidad de secuestrar las Especies Reactivas de Oxígeno (EOR o ROS - reactive oxygen species), según varias hipótesis - los potenciales mediadores de la apoptosis. Además, la liberación de los pigmentos biliares protege las células vasculares del estrés oxidativo y reduce la infiltración de la pared vascular por los leucocitos sosteniendo de este modo la homeostasis vascular.

La HO-1 genera la mayoría, si no la totalidad del monóxido de carbono (CO) producido de forma endógena. Las funciones fisiológicas del CO incluyen el efecto citoprotector en varios tejidos como en el sistema vascular y respiratorio. A través de la activación del sistema GC/GMPc (guanilato ciclasa soluble/guanosina monofosfato cíclico) modula el tono vasomotor, inhibe la proliferación de las células musculares lisas y la agregación de las plaquetas regulando de este modo el flujo sanguíneo. Además, se ha confirmado que puede reducir los niveles de las citoquinas proinflamatorias manteniendo la integridad de la pared vascular, participa en la neurotransmisión y la prevención de la apoptosis en las células endoteliales y los fibroblastos. Varias hipótesis sugieren el efecto antiapoptótico del CO mediante diferentes mecanismos, por ejemplo, mediante la proteína activada por mitógeno p38 quinasa (MAPK), a través de la cual el CO puede mediar las acciones anti-inflamatorias en gran medida (Ferris y cols., 1999; Otterbein y Choi, 2000; Durante, 2002; Alcaraz y cols., 2003; Fang y cols., 2004; Sánchez y cols., 2005; Ryter y cols., 2006; Zhu y cols., 2010).

Sorprendentemente, la administración de CO a bajas concentraciones puede sustituir a HO-1 con respecto a los efectos antiinflamatorios y antiapoptóticos, sugiriendo que el CO desempeña un papel importante como mediador clave de la función HO-1. No obstante la exposición exógena crónica a bajo nivel de CO en el tabaquismo se ha demostrado como nocivo en la fisiopatología de las enfermedades pulmonares (Slebos y cols., 2003).

### 3.5. FUNCIONES FISIOLÓGICAS DE LA HEMOOXIGENASA SOBRE TEJIDOS, ÓRGANOS Y SISTEMAS

#### 3.5.1. HO-1 y los procesos inflamatorios

Varias observaciones experimentales confirman que la HO-1 posee una potente acción antiinflamatoria. La elevación de los niveles de la HO-1 implica supresión del proceso inflamatorio mientras que su inhibición conduce a potenciar la respuesta inflamatoria del organismo (Willis y cols., 1996; Otterbein, Soares y cols., 2003).

Diferentes estudios han demostrado que la inducción de la HO-1 está asociada con una respuesta protectora que consiste en la disminución de la biodisponibilidad del grupo hemo que resulta ser tóxico al inducir la generación de diversas ROS intracelulares (por ejemplo los radicales peróxido lipídicos). Estudios recientes indicaron que la expresión de la enzima en respuesta a diferentes mediadores inflamatorios puede contribuir en la resolución de los procesos inflamatorios y tener efectos protectores sobre el cerebro, hígado, pulmón y riñón (Akaike y cols., 1992; Sawa y cols., 1998; Kanazawa y cols., 2000; Guo y cols., 2001; Fang y cols., 2004).

Su inducción frena la liberación y la síntesis de los mediadores inflamatorios (por ejemplo los radicales libres y agentes quimiotácticos) lo que conduce a la inhibición de la migración y adhesión de los leucocitos y prevención de daño oxidativo celular, principalmente en las células del endotelio. En varios órganos como el hígado, pulmón, riñón e intestino reduce la expresión de las E- y P-selectinas estimuladas por el lipopolisacárido bacteriano (LPS) y la expresión de la molécula de adhesión intracelular endotelial (ICAM-1). (Wagener y cols., 1999; Cavicchi y cols., 2000; Otterbein y cols., 2000; Willis y cols., 2000; Chapman y cols., 2001; Alcaraz y cols., 2003; Sánchez y cols., 2005).

A la vez, la inducción de la HO-1 disminuye la expresión de hemoproteínas como la ciclooxigenasa (COX) y la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), reduciendo la disponibilidad del grupo hemo en las células endoteliales. La inhibición de la COX conlleva la disminución de la producción de las prostaglandinas (PGs) I<sub>2</sub> y E<sub>2</sub> lo que se ha demostrado en las células endoteliales y en los macrófagos peritoneales (Polyak y cols., 1994; Alcaraz y cols., 2003; Sánchez y cols., 2005).

La iNOS está implicada en la fisiopatología de las enfermedades inflamatorias intestinales, renales y hepáticas. Se ha postulado que el grupo hemo y los donantes de NO, a través de la HO-1, actúan a nivel transcripcional inhibiendo la expresión de ARNm de iNOS. La inhibición de la iNOS mediante la inducción de la HO-1 ha sido comprobada en las células epiteliales de intestino (Datta y cols., 1999; Cavicchi y cols., 2000; Levine y Flocchi, 2000; Guo y cols., 2001; Datta y cols., 2002; Wei y cols., 2003; Sánchez y cols., 2005).

La HO-1 regula también la producción de las citoquinas en los mecanismos dependientes de CO. Bajos niveles de monóxido de carbono provocan la inducción de la HO-1 que participa en la inhibición del factor de transcripción nuclear-κB (NF-κB) disminuyendo los niveles del factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (Alcaraz y cols., 2003). Existen numerosas evidencias que bajas concentraciones del CO disminuyen los niveles de citoquinas proinflamatorias en

los modelos del choque séptico estimulado por el LPS; entre ellas destaca el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y la interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). En los mismos modelos se vio que la interleucina-10 (IL-10) que posee las propiedades antiinflamatorias y la capacidad de inducir la HO-1 bajando de este modo los niveles del factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y el factor estimulante de colonias de granulocitos (Otterbein y cols., 2000; Champan y cols., 2001; Lee y Chau, 2002; Alcaraz y cols., 2003; Song y cols., 2003; Sánchez y cols., 2005).

### **3.5.2. Función antioxidante de la HO-1**

Varios autores destacan que el grupo hemo en su forma libre a altas concentraciones es potencialmente nocivo por sus propiedades prooxidantes. Cuando se produce la inducción de la HO-1 en la respuesta al estrés oxidativo se observa la degradación del exceso del hemo libre intracelular.

Los productos de la degradación del hemo - biliverdina y bilirrubina - como consecuencia de la acción de la HO-1 son conocidos por su efecto antioxidante, ya que, por ejemplo previenen la oxigenación de los ácidos poli-insaturados. La bilirrubina también parece ser uno de los antioxidantes endógenos más abundantes en mamíferos. La bilirrubina mostró una potente actividad de barrido contra diversas ROS como superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) (Minetti y cols., 1998; Dore, Takahashi y cols., 1999; Ryter y Tyrrell, 2000; Alcaraz y cols., 2003; Fang y cols., 2004; Stocker, 2004; Mancuso y cols., 2006).

### **3.5.3. Función antiapoptótica de la HO-1**

Se cree que el efecto antiapoptótico está mediado por diferentes vías de la actuación de la HO-1. Por un lado, este efecto está relacionado con los productos de la degradación del grupo hemo. Se ha mencionado anteriormente que el ion Fe participa en las reacciones oxidativas y apoptosis. La HO-1 incrementa los niveles de este ion, pero a la vez se produce un aumento de la síntesis de la ferritina que secuestra el hierro liberado (Vile y Tyrrell, 1993; Ferris y cols., 1999; Fang y cols., 2004; Harder y cols., 2008).

Varios autores refieren que la HO-1 está implicada en los mecanismos de la inhibición de la muerte celular mediante el aumento de los niveles de la biliverdina y la bilirrubina que son unos de los principales antioxidantes endógenos y secuestradores del sistema ROS (EOR) (Fang y cols., 2004; Kapitulnik, 2004; Sánchez y cols., 2005).

El efecto antiapoptótico que depende de la producción del monóxido de carbono es debido a la inhibición de la expresión de la p53 y la liberación del citocromo c mitocondrial. Existen varias hipótesis que relacionan también el CO con el sistema GM/GMPc, la vía MAPK (proteína quinasa activada por mitógenos), caspasas, canales de potasio, la modulación de las proteínas BCL-2 e inhibición de la expresión de CD95/CD95 ligando. Igualmente, el CO disminuye la liberación de las citoquinas y disminuye la apoptosis en los fibroblastos, células endoteliales y células musculares lisas en el sistema vascular (Brouard y cols., 2000; Inguaggiato y cols., 2001; Durante, 2002; Liu, Chapman y Peyton, 2002; Alcaraz y cols., 2003; Fang y cols., 2004; Sánchez y cols., 2005).

La mayoría de los autores destacan la función antiapoptótica de la HO-1 pero existe evidencia de que la HO-1 en algunas condiciones puede estimular la apoptosis. Este efecto se ha observado tanto *in vivo* como *in vitro* y probablemente depende de los niveles de la hemooxigenasa (se relaciona con alta expresión) y del tipo de tejido (confirmado en las células del músculo liso) (Tulis y cols., 2001; Liu, Chapman, Peyton y cols., 2002; Liu, Chapman, Wang y cols., 2002; Fang y cols., 2004).

#### **3.5.4. HO-1 y proliferación celular**

Aparentemente la HO-1 no solamente atenúa la apoptosis, pero es capaz de estimular la proliferación celular. A través de los donantes del NO la expresión de la HO-1 provoca el crecimiento de los queratinocitos (Clark y cols., 1997; Fang y cols., 2004) y las células del endotelium vascular por ejemplo en las arterias coronarias donde se observó fenómenos de angiogenesis (Deramaudt y cols., 1998; Li Volti y cols., 2002; Fang y cols., 2004).

Además, la inducción de la HO-1 se evidencia en múltiples tejidos tumorales por ejemplo en el adenocarcinoma, hepatocarcinoma, sarcoma, glioblastoma, melanoma y carcinoma de piel de células escamosas (Doi y cols., 1999; Goodman y cols., 1997; Tsuji y cols., 1999; Deininger y cols., 2000; Torisu y cols., 2000) con niveles de la expresión parecidos a los encontrados en el hígado y bazo en las condiciones fisiológicas de inducción (Doi y cols., 1999; Fang y cols., 2003; Fang y cols., 2004).

#### **3.5.5. HO-1 y el sistema gastrointestinal**

El epitelio del sistema gastrointestinal presenta un estado permanente de inflamación y ciclos celulares rápidos con apoptosis por una renovación constante. Ante la ingesta de alimentos y el paso de secreciones digestivas las células del epitelio reciben perpetuamente múltiples estímulos y sufren el estrés oxidativo por sus funciones (Guo y cols., 2001; Yun y cols., 2005; Oates y cols., 2006; Vijayan y cols., 2010; Zhu y cols., 2010).

En el tracto intestinal se ha demostrado la inducción de la HO-1 en la respuesta a estrés oxidativo o tóxico y su función citoprotectora en la fisiopatología de la inflamación aguda. Estudios recientes sobre los modelos de daño intestinal secundario a la isquemia, indometacina, LPS y sepsis, ácido trinitronenceno y sulfato de dextrano sódico sugieren que la estimulación de la HO-1 puede reducir la inflamación y lesión tisular. El papel de la HO-1 en las enfermedades inflamatorias agudas no está aún de todo claro y ante la advertencia sobre el vínculo de estas afecciones con un mayor riesgo de desarrollo del cáncer precisa completar estudios para poder establecer las terapias de estos trastornos (Guo y cols., 2001; Naito y cols., 2004; Naito y cols., 2011; Zhu y cols., 2010 y 2011).

La HO-1 bajo condiciones fisiológicas se puede encontrar en la mucosa gástrica, intestinal y de colon (Coeffier y cols., 2002; Barton y cols., 2003) y se sobreexpresa en caso de lesiones gastrointestinales como úlceras gástricas, colitis, enteritis de radiación, enfermedad inflamatoria intestinal y algunos tumores tanto en los modelos animales como en los pacientes (Wang y cols., 2001; Guo y cols., 2002; Paul y cols., 2005; Yun y cols., 2005; Abbasoğlu y cols., 2006; Giris y cols., 2006; Yu y cols., 2006).

Barton y cols., en el 2003 realizaron un estudio donde se observa la presencia de la HO-1 en la mucosa gástrica y la mucosa del colon humano donde se expresan constitutivamente en condiciones fisiológicas. Además confirman un aumento de la expresión de la misma en mucosas de los pacientes con gastritis (con o sin implicación del *Helicobacter pylori* en esta patología) y enfermedad inflamatoria intestinal activa tipo colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn. El aumento de la generación de la HO-1 parece ser un mecanismo adaptativo a la lesión oxidativa en la mucosa y presencia de las ROS.

En modelos experimentales de colitis se observó que cuando se estimula la HO-1 con el hemo, CoPP o hemo se reduce el proceso inflamatorio y por lo contrario los inhibidores de la HO-1 (ZnPP y SnPP) lo empeoran (Wang y cols., 2001; Berberat y cols., 2005; Varga y cols., 2007; Zhong y cols., 2010). Varias hipótesis sugieren que algunos de los medicamentos actúan a través de la inducción de la HO-1, por ejemplo, el ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) utilizado en la terapia de enfermedades inflamatorias intestinales, octreotido (análogo de somatostatina), lansoprazol o ketamina (Helmer y cols., 2006; Horvath y cols., 2008; Takagi y cols., 2009; Takagi, Ishii y cols., 2009; Schulz-Geske y cols., 2009).

La actividad de HO-1 está más alta en las células epiteliales intestinales indiferenciadas Caco-2. Esto sugiere que HO-1 y la proliferación y la apoptosis celular pueden estar vinculadas. Inhibiendo la actividad HO-1 se reduce la proliferación celular y aumento de la muerte celular. La inducción de actividad HO-1 en un modelo humano de la línea celular intestinal HT-29 reduce la expresión del gen pro-apoptótico caspasa-3 e inhibe la apoptosis. Es posible que la HO-1 media estos efectos indirectamente en la transcripción de genes a través de la actividad de la biliverdina (Ferris y cols., 1999; Brouard y cols., 2000; Uc y cols., 2003; Paul y cols., 2005).

El CO en bajas concentraciones mejora la inflamación intestinal crónica en los modelos experimentales en ratón a través de la IL-10 y la vía p38 MAPK (proteína quinasa activada por mitógenos) y protege contra el desarrollo del íleo postoperatorio e isquemia intestinal (Otterbein y cols., 2000; Lee y cols., 2002; Moore y cols., 2003; Hegazi y cols., 2005; Moore y cols., 2005; De Backer y cols., 2009; Scout y cols., 2009). El CO se ha demostrado que relaja el músculo liso vascular al unirse al grupo hemo de guanil ciclasa soluble (sGC). La activación de sGC aumenta el flujo sanguíneo en el sitio de la lesión intestinal inhibe la agregación plaquetaria, reduce la acumulación de fibrina microvascular y estringe la leucostasis en las vénulas poscapilares (Brüne y cols., 1987; Kubes y cols., 1991; Morita y cols., 1995; Durante y cols., 1997; Neurath y cols., 1998; Wagener y cols., 1999; Cavicchi y cols., 2000; Vachharajani y cols., 2000; Fujita y cols., 2001; Soares y cols., 2004).

El hemo endoluminal en el colon proviene de la sangre a través de extravasación y de la descamación celular. Estudios previos han demostrado que el grupo hemo irrita el epitelio del colon y aumenta la proliferación de la mucosa colónica. En adición, en las dietas ricas en grupo hemo (por ejemplo no vegetarianas) incrementa la incidencia de focos atípicos aberrantes (ATF) y los focos agotados de mucina (MDF) lo que sugiere que el hemo es cancerígeno (Hallberg y cols., 1993; Sesink y cols., 1999, 2000 y 2001; Pierre y cols., 2003 y 2004; Vogel y cols., 2005; van der Meer-van Kraaij y cols., 2005; Gleib y cols., 2006).

### **3.6 HO-1 Y CÁNCER**

La HO-1 es conocida como la molécula de la supervivencia celular involucrada en la progresión del cáncer y su inhibición se consideró beneficiosa para tratamiento oncológico. Existe una creciente evidencia que la HO-1 participa en los fenómenos del crecimiento celular. Sin embargo, el impacto de la HO-1 sobre los tejidos tumorales es un propósito de múltiples ensayos y cada vez se describen más evidencias que juega un doble papel sobre estos tejidos, que puede ser tanto favorable como perjudicial. Además, se ha observado que el efecto que ejerce sobre las células neoplásicas puede ser resultado del impacto sobre al menos dos fenómenos de la muerte celular - la apoptosis y la ferroptosis (Tulis y cols., 2001; Liu, Champan, Peyton y cols., 2002; Liu, Champan, Wang y cols., 2002; Fang y cols., 2004, Chiang y cols., 2018).

La Ho-1 ejerce un papel importante en la progresión del cáncer, está involucrada en la proliferación celular, metástasis, angiogénesis y además la resistencia a la quimioterapia, radioterapia y la terapia fotodinámica (Laboda y cols., 2015; Chiang y cols., 2018). Se han demostrado altos niveles de expresión de HO-1 en diferentes tipos de cáncer que además se asociaba con una menor tasa de supervivencia y malos resultados en los ensayos clínicos. En casos clínicos, los pacientes con mayor HO-1 expresión mostró la menor tasa de supervivencia y malos resultados (Nuhn y cols., 2009; Hjortso y Andersen, 2014; Na y Surj, 2014; Chiang y cols., 2018).

#### **3.6.1. Impacto de la HO-1 en los tejidos tumorales mediante la modulación de la apoptosis**

Los fenómenos de la progresión de enfermedad oncológica dependiente de la HO-1 son el resultado del equilibrio entre la proliferación y la apoptosis y aparentemente la HO-1 esta involucrada en ambos procesos. La mayoría de los autores destacan su función antiapoptótica, pero existe evidencia de que la HO-1 puede incluso promover la apoptosis (Tulis y cols., 2001; Liu, Champan, Peyton y cols., 2002; Liu, Champan, Wang y cols., 2002; Fang y cols., 2004).

Múltiples estudios realizados sobre la HO-1 permiten identificar su función en la inhibición de crecimiento tumoral *in vitro*, por lo cual se promovieron los estudios y se confirmaron las hipótesis de que el crecimiento de muchos tumores depende de la HO-1. Por este motivo se postuló que estos resultados podrían aplicarse para el tratamiento de neoplasias. Existen resultados de los estudios experimentales en los ratones que demuestran la sobreexpresión de la HO-1 o la administración exógena del CO aumentan tanto la supervivencia como disminuyen el tamaño tumoral en modelos de adenocarcinoma y mesotelioma. También se ha relacionado la expresión de la HO-1 en los carcinomas de la cavidad oral planteando la hipótesis que los pacientes sin enfermedad metastásica tienen los niveles más altos de la HO-1 que los pacientes con metástasis a distancia, lo que sugiere su efecto protector (Lee y cols., 1996; Otterbein y Choi, 2001; Fang y cols., 2004).

Sin embargo, existen otros resultados no tan prometedores que insinúan que la HO-1 estimula la angiogenesis protegiendo el tejido tumoral del estrés oxidativo, la hipoxia y la apoptosis (Slebos y cols., 2003; Sanchez y cols., 2005).

La inducción y el aumento de la expresión de la HO-1 se evidencia en múltiples tejidos tumorales por ejemplo en el adenocarcinoma, hepatocarcinoma, sarcoma, glioblastoma, melanoma,

cáncer de páncreas y carcinoma de piel de células escamosas (Goodman y cols., 1997; Doi y cols., 1999; Tsyi y cols., 1999; Deininger y cols., 2000; Torisu y Hakura, 2000; Nuhn y cols., 2009).

La HO-1 con su efecto antiapoptótico y citoprotector es capaz de promover el crecimiento tumoral por ejemplo en células del hepatocarcinoma (*in vitro*) y de sarcoma de rata (*in vivo*). También se ha demostrado que la inhibición de la HO-1 por ZnPP en estos modelos suprime el crecimiento tumoral, incrementando la apoptosis, lo que confirma la implicación de la HO-1 en el desarrollo de tejidos neoplásicos. El efecto se mantiene después de terminar el tratamiento, y los resultados son comparables a los obtenidos con los agentes quimioterapéuticos convencionales (doxorubicina). Estudios recientes demostraron que el ZnPP puede amplificar la respuesta al tratamiento si se combina con la quimioterapia tradicional (Mastushita y cols., 1985; Doi y cols., 1999; Tanaka y cols., 2003; Fang y cols., 2004; Fang y cols., 2004).

El impacto del efecto antiapoptótico y antioxidante de la HO-1 en los tejidos tumorales se ha verificado tanto *in vitro* como *in vivo*. Las células SW480 de CCR humano que recibieron tratamiento con PEG-ZnPP (derivado polimérico de la ZnPP) mostraron un aumento del estrés oxidativo intracelular lo que finalmente dio lugar a cambios apoptóticos de una manera dependiente de la dosis. También se observó la apoptosis en las células transfectadas con ARN interferente pequeño (siRNA) para bajar la expresión de la HO-1 (Fang y cols., 2004).

Según los resultados de los ensayos realizados por Fang el efecto antiapoptótico de la HO-1 en los tejidos tumorales dependen en la mayor parte de la bilirrubina (y también en menor medida del CO) (Dore, Takahashi y cols., 1999; Dore, Sampei y cols., 1999; Dore y cols., 2000; Tanaka y cols., 2003; Fang y cols., 2004).

Los fenómenos de supresión del crecimiento tumoral con los antagonistas de la HO-1 se basan probablemente en el aumento de la toxicidad de las ROS generados por el sistema inmunológico del paciente (por ejemplo, macrófagos) e inducción de la apoptosis en ausencia de la defensa antioxidativa (Sato y cols., 1992; Doi y cols., 1999; Hasegawa y cols., 2002; Fang y cols., 2004).

Los estudios realizados por Beckey y Park confirman la presencia y la sobreexpresión de la HO-1 en células de CCR y adenoma de colon (Zhu y cols., 2010; Becker y cols., 2007; Park y cols., 2010). En líneas celulares de CCR se ha demostrado que la sobreexpresión de HO-1 induce resistencia a la apoptosis mediante mecanismo independiente de p38, pero mediado por Akt (Busserolles y cols., 2006; Park y cols., 2010). En el estudio realizado por Busserolles se utilizó el fenómeno de apoptosis inducida por privación de suero lo que condujo a la reducción de la fosforilación de la Akt y p38 y aumentó los niveles del p21<sup>Cip/WAF1</sup> (proteínas que participan en la diferenciación, proliferación celular y apoptosis). La inducción de la HO-1 a través de CoPP resulta en un aumento de la resistencia celular a la apoptosis. La apoptosis también fue inhibida por la bilirrubina y la biliverdina, pero no se observó el mismo efecto con los donantes de CO. Estos resultados confirman el doble efecto pro- y anti-apoptótico de la HO-1 y sus metabolitos y señalan que la sobreexpresión de la HO-1 puede promover la resistencia tumoral al estrés en condiciones del suministro limitado de nutrientes lo que en otros estudios anteriores se correlaciona con la tumorigenesis de CCR (Gauthier y cols., 2001; Goupille y

cols., 2002; Li y cols., 2002; Stierum y cols., 2003; Busserolles y cols., 2006). El fracaso de la apoptosis del epitelio colónico conduce a prolongar la supervivencia celular a través múltiples mutaciones involucradas en la carcinogénesis del colon y además la inducción de la HO-1 en las células tumorales de colon podría causar la resistencia a los efectos de los agentes quimioterapéuticos (Bedi y cols., 1995; Nishie y cols., 1999; Baek y cols., 2000; Ricchi y cols., 2002; Mayerhofer y cols., 2004; Busserolles y cols., 2006).

Ishikawa ha demostrado que la inhibición de la HO-1 por la ZnPP en el carcinoma de colon no tiene ningún efecto sobre la metástasis en el pulmón e incluso puede aumentar la incidencia de las metástasis en el hígado. La tasa de invasión ganglionar fue significativamente menor en las muestras de CCR que expresaban la HO-1. En contraste en otro estudio realizado por Sunamura y Was se vió que la sobreexpresión de la HO-1 en las células del cáncer de páncreas y melanoma se relacionaban con aumento de la presencia de las metástasis mientras la inhibición de la HO-1 inhibía la aparición de las mismas (Ishikawa y cols., 2003; Sunamura y cols., 2003; Was y cols., 2006; Becker y cols., 2007; Zhu y cols., 2010).

Resumiendo, la reducción de la actividad de la HO-1 provoca que las células tumorales sean más susceptibles a la apoptosis inducida por ROS, lo que aumenta la capacidad antitumoral de los fármacos convencionales utilizados en el tratamiento del cáncer. Algunos de estos fármacos como la doxorubicina y la camptotecina ejercen sus efectos antitumorales al inducir la producción de ROS tóxicas. Los estudios *in vivo* también ilustran claramente el efecto sinérgico de PEG-ZnPP más un agente anticanceroso generador de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la D-aminoácido oxidasa conjugada con PEG. Estos hallazgos sugieren fuertemente el uso potencial de PEG-ZnPP en tratamiento antitumoral especialmente cuando el PEG-ZnPP se combina con otros fármacos anticancerosos generadores de ROS (Simizu y cols., 1998; Fang y cols., 2002; Fang y cols., 2004; Fang y cols., 2004).

### **3.6.2. Impacto de la HO-1 en los tejidos tumorales mediante la modulación de la ferroptosis**

La ferroptosis es un fenómeno de muerte celular identificado recientemente y se relaciona con el acumulo de hierro intracelular (altamente prooxidante) lo que conduce a la producción de las ROS (especies reactivas del oxígeno). El exceso de las ROS genera una masiva peroxidación de los lípidos y las proteínas, daño oxidativo del ADN, mutaciones genéticas, carcinogénesis y muerte celular. Es el hecho de que las ROS pueden conducir a la muerte celular (a pesar la confirmada relación con la carcinogénesis) se está utilizando en oncología para tratamientos de diferentes cánceres - por ejemplo varios medicamentos como cisplatino, doxorubicina y 5-fluorouracil pueden causar la apoptosis en mecanismo dependiente de las ROS (Chiang y cols., 2018).

La relación entre la ferroptosis y la progresión del cáncer se observó induciendo la ferroptosis con algunas pequeñas moléculas como erastina, RSL3 y algunos fármacos antitumorales como sorafenib, sulfasalazina y artesunato y causando la muerte de las células cancerosas (Dixon y cols., 2012; Yang y cols., 2014; Chiang y cols., 2018). A la vez se confirmó que un retraso en la ferroptosis protege a los tejidos tumorales del estrés oxidativo y aumenta la supervivencia y favorece aparición de las metástasis (Piskounova y cols., 2015; Chiang y cols., 2018).

Dado que la degradación del hemo, el hierro libre intracelular y el acúmulo de las ROS secundario a estos procesos pueden tener el mismo efecto sobre las células tumorales se postuló el doble papel de la HO-1 en la modulación de la ferroptosis que podría servir como una potencial estrategia terapéutica. La inducción de la HO-1 puede proteger las células cancerosas del estrés oxidativo (en mecanismo anti-ferroptótico) a través de dos mecanismos: (1) aumento de la producción de la ferritina y del receptor de la transferrina lo que resulta en la alteración de la distribución intracelular del hierro y proporciona un efecto protector contra la citotoxicidad del hierro por degradación del hemo y (2) aumentando los niveles de la biliverdina y la bilirrubina que pueden inhibir la peroxidación de lípidos y proteínas mediante la eliminación ROS. Curiosamente la HO-1 a la vez puede tener efectos pro-ferroptóticos y puede potenciar la muerte celular en muchos cánceres (Ryter y cols., 2006; Loboda y cols., 2015 y 2016; Chiang y cols., 2018). Se han identificado varias pequeñas moléculas que provocan la ferroptosis a través de la regulación de expresión y actividad de HO-1. Estas moléculas generan la liberación del hierro y desencadenan una masiva producción de las ROS y son las anteriormente mencionadas: el grupo hemo, erastina, sorafenib, RSL3, isoglicirricinato de magnesio, BAY117085, y withferina A. A la vez el tratamiento con ZnPPIX (metaloporfirina, inhibidor de la HO-1) atenua significativamente el crecimiento tumoral y aumenta la sensibilidad a la quimioterapia en el modelo de ratón de xenoinjerto SW480 de cáncer de colon humano (Kwon y cols., 2015; Roh y cols., 2017; Fan y cols., 2017; Chiang y cols., 2018).

Varios estudios apoyan la hipótesis que el efecto pro- o antiferroptótico de la HO-1 depende de su inducción. Se ha postulado que un nivel moderado de activación de HO-1 ejerce un efecto citoprotector, mientras que la sobreactivación de HO-1 resulta citotóxico por el aumento excesivo del hierro que supera la capacidad amortiguadora de la ferritina (Wang e Yi, 2008; Chiang y cols., 2018). Las células neoplásicas se caracterizan por alta proliferación y se sabe que presentan niveles de las ROS más altas y probablemente esto las hace más sensibles a la muerte celular inducida por estrés oxidativo, mientras que los tejidos normales con un nivel de ROS basal más bajo son menos dependientes de los antioxidantes, lo que conduce que sean menos vulnerables al estrés oxidativo. La manipulación del nivel de ROS intracelular puede ser útil enfoque para el tratamiento del cáncer, aunque aún no se puede explicar como manipular los niveles de la HO-1 para matar selectivamente las células tumorales [Liou y Storz, 2014, Chiang y cols., 2018].

#### **4. CÁNCER STEM CELLS**

A pesar de los avances en el diagnóstico precoz y en el tratamiento de CCR los resultados a largo plazo no son favorables. El hecho de padecerlo conlleva un alto riesgo de recidiva local/regional y de aparición de las metástasis a distancia lo que se traduce en una pobre supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad más corta. Una de las hipótesis que justifica la progresión de la enfermedad neoplásica es la presencia de las células madre cancerosas (CMCs, *cancer stem cells* = CSCs, *tumour-initiating cells*). Dadas las características de las CMCs - como el potencial de diferenciación en múltiples tipos de células, autorrenovación y división infinita - se explican las principales causas de muerte por CCR secundarias a la recaída local/regional y la enfermedad metastásica. El desarrollo de las terapias específicas dirigidas a las CMCs es un reto terapéutico que

puede permitir combatir el cáncer en el futuro (Puglisi y cols., 2011; Ozgul y cols., 2016; Zhu y cols., 2017; Sasaki y Clevers, 2018; Zhou y cols., 2018).

#### **4.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS CÉLULAS MADRE**

Las células madre (CM, *stem cells*) son las células responsables de la homeostasis y de la regeneración de los tejidos que sufren constantes cambios y pérdidas. Se caracterizan por su habilidad de autorenovación, proliferación y a formar distintos tejidos mediante una diferenciación multidireccional (Trentin y cols., 2004; Barker y cols., 2007; Shyh-Chang y cols., 2013; Spit y cols., 2018). Tienen capacidad de división infinita que origina la aparición de nuevas células stem o células diferenciadas. El resultado de este proceso depende de la necesidad del tejido para la regeneración y diferenciación y está controlado por el microambiente tisular (Bu y Cao, 2012; Shen y Cao, 2012; Hardin y cols., 2017). Diferentes vías de señalización participan en este proceso como Wnt/ $\beta$ -catenina, Hedgehog, BMP (*bone morphogenetic protein*, proteína ósea morfogenética), Notch, EphB y EGF (*epidermal growth factor*, factor epidérmico de crecimiento) (Kasper y cols., 2006; Wang y cols., 2014; Spit y cols., 2018).

La región inferior del tracto gastrointestinal (colon y recto) tiene como principal función la reabsorción de iones y agua, posteriormente a la absorción de la mayor parte de los nutrientes en el intestino delgado. En este proceso, las células del epitelio colónico juegan un papel fundamental. El epitelio de la mucosa del colon es un epitelio columnar simple que forma un gran número de profundas invaginaciones hacia el interior de la lámina propia denominadas criptas de Lieberkühn. Este epitelio es renovado aproximadamente cada 3-4 días, lo que supone un proceso constante de regeneración de las células que constituyen las criptas. En el fondo de la cripta se encuentran las células pluripotentes, células madre o células stem, células indiferenciadas capaces de dividirse y responsables de la constante renovación del epitelio del colon (van der Flier y Clevers, 2009; Spit y cols., 2018). A lo largo del eje basal-apical de las criptas (referido a la posición apical de la luz intestinal), existen dos compartimentos celulares principales: un compartimento proliferativo que contiene, a su vez, (1) las células madre del epitelio en el fondo de la cripta, y (2) las células proliferantes precursoras de los tipos celulares diferenciados, y un compartimento no proliferativo terminalmente diferenciado por enterocitos, células endocrinas, células defensoras del sistema autoinmune, y otras que secretan factores necesarios para el mantenimiento de las células stem intestinales y del microambiente celular (Ireland y cols., 2005; Sato y cols., 2011; de Lau y cols., 2012; Gerbe y cols., 2016; Howitt y cols., 2016; von Moltke y cols., 2016).

La homeostasis celular del epitelio se mantiene por un balance dinámico entre la división celular continua y el desprendimiento de las células en la superficie de las criptas colónicas: las células precursoras proliferan en la parte baja de la cripta y van migrando de manera continua hacia las zonas más apicales. Durante esta migración tiene lugar salida del ciclo celular, en paralelo a la activación de programas de expresión génica propios de cada tipo celular diferenciado. En final de este trayecto culmina con la muerte celular por apoptosis y/o desprendimiento de las células hacia el lumen (Kyoung-Mee y cols., 2002; Lamprecht y cols., 2002). En caso de daño tisular importante existe la posibilidad de revertir el proceso en el cual las células diferenciadas vuelven a ganar las propiedades de las células madres por ejemplo en caso de radiación (Spit y cols., 2018; Yu y cols., 2018).

La señalización correcta de la vía Wnt, mediada por la  $\beta$ -catenina-TCF, es esencial para el mantenimiento del estado proliferativo/no diferenciado de las células del epitelio colónico (Korinek y cols., 1998). Las proteínas de la vía Wnt, provenientes probablemente de células mesenquimales o epiteliales de la parte inferior de la de la cripta, son las proteínas encargadas de mantener el potencial proliferativo de la misma, garantizando, por una parte, la supervivencia y/o mantenimiento del nicho de las células madre, y frenando, por otra, la transición de proliferación a diferenciación. Así pues, los genes activados por la vía de Wnt se expresan en el compartimento proliferativo de la cripta (y en la mayoría de los casos se encuentran sobre-expresados en el CCR), mientras que los genes reprimidos por esta vía están restringidos al compartimento diferenciado (Spit y cols., 2018).

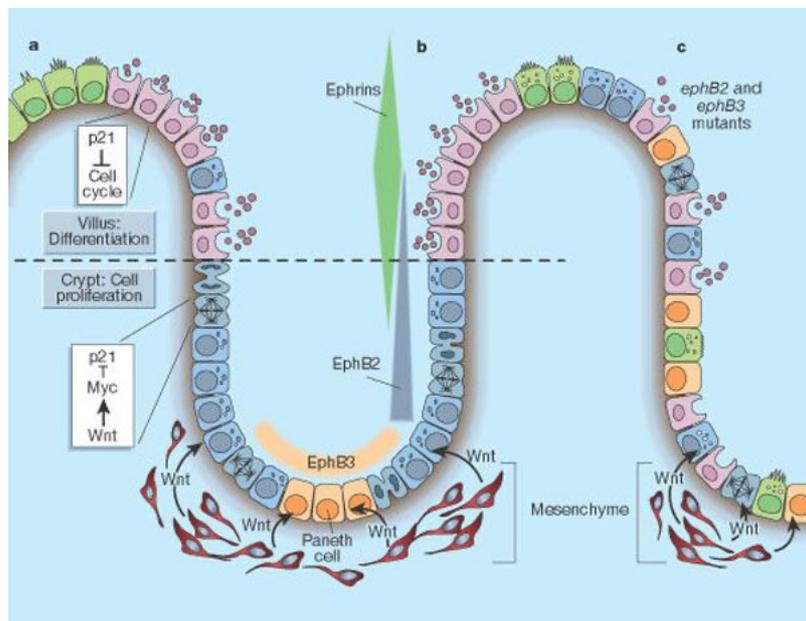
La señalización de la vía Wnt, se inicia por la activación de Frizzled (receptores de siete fragmentos transmembranas) por parte de proteínas Wnt. Una vez activado el receptor, la proteína, Dishevelled (Dsh) se fosforila e interacciona con la axina previniendo la actividad de la proteína GSK-3 $\beta$ . La GSK-3 $\beta$  es una proteína con actividad serina/treonina quinasa, y tiene como sustratos dentro de la vía a la axina, la proteína APC y a la  $\beta$ -catenina. En células epiteliales de mamífero, la transducción de señales de Wnt tiene lugar, al menos en parte, mediante la inactivación del complejo multiproteico formado por APC, GSK3- $\beta$ , axina/conductina. En células diferenciadas del epitelio intestinal, no existe señalización por Wnt, y este complejo participa en la degradación de  $\beta$ -catenina vía proteosoma al facilitar su fosforilación por GSK3- $\beta$ , fosforilación que actúa como señal de reconocimiento por ubiquitina ligasas. En estas condiciones, una fracción importante de  $\beta$ -catenina celular se encuentra formando parte del complejo de adhesión célula-célula mediado por E-cadherina. En presencia de señales Wnt, la inactivación de este complejo impide la degradación de  $\beta$ -catenina, y por tanto se acumula en el citoplasma, facilitándose su translocación al núcleo. Allí se une a proteínas de la familia TCF/LEF y actúa como coactivador transcripcional de la expresión de genes implicados en mantener el fenotipo indiferenciado de las células madre (Barth AI y cols., 1997; Eastman y Grosschedl, 1999; Polakis, 1999).

C-myc, diana directa de la actividad  $\beta$ -catenina-TCF, es uno de los mediadores del efecto proliferativo de la vía de Wnt ya que, al menos en parte, reprime la expresión de la molécula reguladora del ciclo celular p21CIP1 al evitar la activación de su promotor génico por el factor de transcripción MIZ-1 (Wu y cols., 2003). De forma similar, c-myc también puede reprimir la transcripción del inhibidor del ciclo p27KIP1 por unión directa del complejo Myc/Max al sitio Inr (elemento iniciador de la transcripción) presente en el promotor (Gartel y Shchors, 2003), aunque se desconoce si este mecanismo ocurre en el epitelio colónico como efecto de la regulación por Wnt. Además de c-myc, existen otras proteínas reguladoras del ciclo celular cuya transcripción está regulada por  $\beta$ -catenina-TCF: ciclina D1 (Tetsu y McCormick, 1999), c-jun y fra-1 que son componentes del factor de transcripción AP-1 (Mann y cols., 1999) e Id-2 (Rockman y cols., 2001).

El tránsito celular durante la migración a lo largo del eje basal-apical de la cripta puede ser explicado, al menos en parte, por la expresión de otro grupo de genes regulados también por  $\beta$ -catenina-TCF. La familia de receptores de Ephrina EphB2 y EphB3, están situados en las regiones más bajas de la cripta, y sus ligandos, las ephrinas, están localizadas en el compartimento diferenciado no proliferante. Los receptores EphB2 y EphB3 son inducidos por señales de Wnt, a diferencia de las Ephrinas, cuya expresión es reprimida por estas señales.

Las interacciones receptor-ligando, impuestas por Wnt a lo largo del eje de la cripta mediante el control de su expresión, determinan pues la migración celular hacia la zona apical de la cripta (Battle y cols., 2002). A medida que las células migran hacia las zonas más apicales de la cripta, la actividad  $\beta$ -catenina-TCF es inhibida con lo que se favorece una salida del ciclo celular. El principal mecanismo que suprime la actividad  $\beta$ -catenina-TCF es la degradación de  $\beta$ -catenina y, quizás también, la traslocación núcleo-citoplasma de  $\beta$ -catenina por parte de APC. Finalmente, también se ha sugerido que la modulación de los complejos de adhesión a nivel de membrana puede favorecer o impedir la actividad de  $\beta$ -catenina en el núcleo. Así, contactos de adhesión célula-célula mediados por E-cadherina podrían actuar secuestrando a  $\beta$ -catenina en la membrana (Barth y cols., 1997; Nelson y Nusse, 2004), y la acción de tirosina-quinasa moduladoras del complejo de adhesión podrían desestabilizar estos complejos con lo que se facilitaría la acumulación de  $\beta$ -catenina en el citosol (Gómez y cols., 1999; Roura y cols., 1999; Piedra y cols., 2003). En conjunto, es probable que la acción combinada de éstos y otros mecanismos contribuyan a la regulación de los niveles de  $\beta$ -catenina en sus distintos compartimentos y a la consecuente supresión de la actividad  $\beta$ -catenina-TCF durante la diferenciación celular en la cripta.

La señalización de la vía Notch es también esencial para regular la diferenciación y mantener a las células madre y a las células progenitoras. En mamíferos, se expresan cuatro genes Notch, cada uno de los cuales codifica un receptor trans-membrana (Notch1-4). La interacción entre los receptores Notch y sus ligandos (Jagged 1 y 2, y Delta-like 1, 3 y 4) produce una escisión proteolítica de Notch por la  $\gamma$ -secretasa y otras proteasas, que libera el dominio intracelular Notch (NICD) de la membrana plasmática e inicia su posterior translocación al núcleo.



**Figura 9.** Papel de la vía Wnt en la transición de proliferación a diferenciación del epitelio intestinal.

\* Extraído de Pfeifer M. Colon construction. *Nature* 2002;420:274-276.

Después de la translocación nuclear, el NICD se une y forma un complejo con uno de los tres reguladores de la transcripción, denominado CSL (un nombre colectivo de CBP o RBP-Jk en

vertebrados), MAML-1 y p300/CBP. Estos complejos activan la transcripción de los genes HES-1, -5, -7 y HEY-1, -2 y HEYL que codifican la hélice-bucle-hélice básica (bHLH) / naranja represores transcripcionales de dominio. La transducción de señales de los ligandos Notch típicos a través de la cascada CSL-NICD-MAML-1 también se conoce como la vía de señalización Notch "canónica". Se informa que NICD también interactúa con p50 o c-Rel en el núcleo para mejorar la actividad de NF- $\kappa$ B, que se conoce como la vía de señalización Notch "no canónica". La señalización de Notch a través del complejo NF- $\kappa$ B-NICD aumenta la activación transcripcional de los genes diana de NF- $\kappa$ B, como el IFN- $\gamma$ .

El papel de la señalización de Notch en el control de la diferenciación y la proliferación se ha confirmado recientemente utilizando ratones transgénicos. El silenciamiento de Hes-1, el gen diana más abundante y directo de la señalización de Notch, se ha asociado con un aumento significativo en el linaje secretor de las células epiteliales intestinales. La inactivación condicional específica de CSL da como resultado la pérdida completa de células progenitoras de la cripta, seguido de su conversión en células calciformes postmitóticas. En los estudios de ganancia de función recíproca, la expresión de NICD en el intestino inhibe la diferenciación de las células progenitoras de la cripta, lo que resulta en un gran aumento de las células amplificadoras transitorias indiferenciadas. Estos estudios indican un papel esencial de la señalización de Notch en el compartimento de células progenitoras intestinales.

Otros factores de transcripción implicados en la diferenciación terminal del epitelio intestinal han sido descritos recientemente: entre ellos se encuentran el factor de transcripción con dedos de zinc KLF4 (Kruppel-like factor 4) y el factor de transcripción ELF-3 (E74-like factor 3). KLF-4 se expresa en intestino delgado y colon adulto y su sobreexpresión provoca una salida del ciclo celular mediada por p21CIP1, encontrándose disminuida su expresión en tumores colorrectales (Zhao y cols., 2004). ELF-3 se identificó como un miembro de la familia de factores de transcripción EST, abundantemente expresado en intestino delgado, y cuya expresión, además, también se ha asociado a la maduración de células absortivas en el epitelio intestinal (Ng y cols., 2002).

Cdx1 y Cdx2 forman parte de otra familia de factores de transcripción del tipo homeobox, que promueven la diferenciación intestinal (Suh y Traber, 1996; Mallo y cols., 1997). Cdx2 se ha descrito que actúa como supresor tumoral al inhibir la proliferación en células epiteliales intestinales (Suh y Traber, 1996) y promover la activación de genes implicados en el fenotipo diferenciado, como es el caso de la lactasa durante la diferenciación absortiva (Fang y cols., 2000) o MUC2 en las células mucosecretoras (Yamamoto y cols., 2003). Cdx1, por su parte, se expresa en las criptas intestinales y su expresión requiere de la señalización por Wnt (Lickert y cols., 2000; Subramanian y cols., 1998), lo que hizo pensar en un principio que participaba en la regulación de la proliferación. Sin embargo, la expresión de ambos factores se silenciaba preferencialmente durante la progresión de tumores colorrectales humanos (Silberg y cols., 1997; Qualtrough y cols., 2002) así como en modelos animales (Chawengsaksophak y cols., 1997).

SOX9 también se expresa en la parte baja de las criptas tanto de intestino como colon adulto, correspondiente al compartimento proliferativo. Este factor de transcripción se encuentra fuertemente sobre-expresado en adenocarcinomas humanos, y su expresión es controlada por la actividad transcripcional de  $\beta$ -catenina-TCF4 en células de cáncer colorrectal, puesto que células deficientes para TCF4 muestran una reducción significativa de los niveles de ARN y proteína (Blache y cols., 2004).

La función de SOX9 en el epitelio intestinal contribuiría a mantener el potencial proliferativo de la cripta (conjuntamente con la vía de Wnt) mediante la represión de genes implicados en diferenciación celular.

Un fallo en el delicado equilibrio entre la proliferación y la diferenciación de las células en las criptas intestinales puede conducir a las mutaciones genéticas y las vías de señalización intercelular habituales provocan la proliferación y autorenovación descontrolada y formación de tejido tumoral (Hanahan y Weinberg, 2011; Spit y cols., 2018). Las vías de señalización más frecuentemente implicadas en el proceso neoplásico son las de Wnt (inactivación del gen APC), EGRF (genes KRAS, PIK3CA) - ambas relacionadas con el inicio y progresión del proceso tumoral; TGF- $\beta$ /BMP (gen SMAD4) - inhibe la diferenciación celular y estimula la proliferación; y p53 - responsable de la pérdida de la reparación los daños en el ADN y de la capacidad para escaparse de la apoptosis, todo ello conduce al inicio de carcinogenesis y aumento de supervivencia de las células cancerosas (Vogelstein y cols., 1988; Fearon y Vogelstein, 1990; Spit y cols., 2018).

## **4.2. CMCs Y CÁNCER COLORRECTAL**

Existen dos modelos que explican el proceso de carcinogénesis: (1) el modelo estocástico o de evolución clonal, que postula que cualquier célula puede acumular transformaciones genéticas y/o epigenéticas que la transformen en una célula tumoral y participar en el desarrollo del tumor; (2) el modelo jerárquico o de CMCs, según el cual solo un grupo minoritario de células del tumor es capaz de originar y ser responsable del crecimiento del tumor. Inicialmente se postuló que el origen del CCR podían ser las CM intestinales que, tras sufrir determinadas alteraciones genéticas y/o epigenéticas se transforman en CMCs. Sin embargo, las células amplificadoras temporales también pueden formar adenomas, aunque con menos potencia que las CM. Incluso, la presencia de mutaciones adicionales, la activación de vías inflamatorias o los cambios en el microambiente tumoral son capaces de dar lugar a CMCs desde células diferenciadas (Lau y cols., 2017; Spit y cols., 2018; Yu y cols., 2018; Zhou y cols., 2018).

Las CMCs tienen las propiedades de proliferación infinita, autorrenovación y diferenciación multidireccional (Bu y Cao, 2012; Melo y cols., 2017). Se consideran un grupo pequeño de células presentes en la masa tumoral, pero desempeñan un papel fundamental en la fisiopatología de la recurrencia y aparición de las metástasis a distancia lo que probablemente está relacionado con otras características importantes de las CMCs, que además de las mencionadas anteriormente, son también la quimio- y la radioresistencia. Se supone que no se eliminan con los tratamientos adyuvantes como el resto del tejido tumoral y dan lugar a la recaída de la enfermedad (Shen y Cao, 2012; Hardin y cols., 2017; Zhou y cols., 2018) aunque el mecanismo en el cual contribuyen en la aparición de las metástasis no está completamente conocido (Todaro y cols., 2014).

Si la resección del tumor durante la cirugía no llega a ser completa, incluso una mínima cantidad de las células CMCs restantes en el organismo puede conducir a la recurrencia mediante la estimulación del microambiente tumoral y autoproliferación (Munakata y cols., 2016; Zhou y cols., 2018).

**Tabla 7.** Marcadores de las células stem cancerosas del cáncer colorrectal (CCR-CMCs)

MARCADOR	DEFINICIÓN Y FUNCIÓN EN CÉLULA NORMAL	SIGNIFICADO EN EL CCR	REFERENCIAS
CD44	Glicoproteína, receptor de ácido hialurónico. Regula la interacción entre células como la adhesión y la migración; implicada en el crecimiento celular.	Proliferación agresiva, insensibilidad a la apoptosis, resistencia a la QT y RT. Inhibido disminuye la proliferación, migración, invasión celular pero a la vez frena la apoptosis.	Spring, 1988; Chu, 2009; Orian-Rousseau, 2010; Wang, 2012; Todaro, 2014; Lee, 2017.
CD133 (AC133, prominin-1)	Glicoproteína de células hematopoyéticas, epiteliales, endoteliales, neuroepiteliales.	Marcador específico del CCR primario. Relacionado con el tamaño tumoral y diferenciación celular, resistencia a la QT y RT y supervivencia. <i>CD133- pueden ser más agresivos!</i>	Dalerba, 2007; O'Brien, 2007; Ricci-Vitiani, 2007; Shmelkov, 2008; Chen, 2010; Todaro, 2007 y 2010; Puglisi, 2011; Li, 2012; Kazama, 2017.
CD166	Molécula de adhesión de leucocitos, células del sistema nervioso, intestinal y relacionados con angiogénesis.	Carcinogénesis (transformación del adenoma al adenocarcinoma). CD166+ relacionado con menor tamaño tumoral.	Barker, 2007; Dalerba, 2007; Tachezy, 2012; Ni, 2013; Koo, 2014; Spit 2018.
Lgr5	<i>Leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5.</i> Marcador de células madres intestinales normales.	Relacionado con la tumorigenesis, resistencia al 5-FU, recidiva tumoral. En el estadio IV su expresión indica mal pronóstico.	Uchida, 2010; Hsu, 2013; He, 2014; Beumer, 2016; Wu, 2016.
ALDH1	Aldehído deshidrogenasa	Su expresión está relacionada con baja diferenciación celular, la aparición de las metástasis, resistencia a la QT y RT. <i>ALDH1- encontrados en los estadios avanzados del CCR!</i>	Hessman, 2012; Deng, 2014; Rassouli, 2016.
EpCAM	Proteína relacionada con la adhesión, proliferación, migración, diferenciación celular.	Activa la expresión de protooncogenes c-myc y ciclina A. Activa la cascada de señalización WNT/ $\beta$ -catenina, Hedgehog, Notch, TGF $\beta$ . Relacionado con las metástasis ganglionares y a distancia e invasión vascular.	Trzpis, 2007; Maetzel, 2009; Mani, 2016.
CD22		Adhesión celular	Weichert, 2005; Seo, 2015.
Oct4		Invasión linfática y metástasis ganglionares	Matsuoka, 2012; Wahab, 2017.
SOX-2		Recidiva precoz	Matsuoka, 2012.
Nanog		Regulador transcripcional	Xu, 2012; Wahab, 2017.
CD29	Adhesión celular. Participa en la regulación de la embriogénesis, hemostasia, reparación tisular y respuesta inmunológica.	Diferenciación celular y metástasis	Hynes, 1992; Fujimoto, 2002; Vermeulen, 2008; Zou, 2011.
CD26	Adhesión celular.	Migración e invasión celular. Estrictamente relacionadas con metástasis hepáticas.	Pang, 2010; Todaro, 2014.
CD51		Migración celular y crecimiento tumoral	Wang, 2017.

\* Basado en Zhou Y, y cols. Cancer stem cells in progression of colorectal cancer. *Oncotarget* 9:33403-15 (2018).  
Modificado con otras publicaciones (ver referencias bibliográficas).

Al igual que las CM normales, las CMCs se encuentran instaladas en un nicho formado por células estromales, que incluyen células endoteliales, mesenquimales, inmunes y fibroblastos, además de la matriz extracelular. El nicho regula las CMCs a través de diversas interacciones y las protege del daño inducido por la terapia, dando lugar a resistencia. A su vez, las CMCs tienen una gran plasticidad y contribuyen a la reconstitución del nicho mediante su transdiferenciación en linajes celulares que forman el estroma, o la inducción del reclutamiento de diferentes tipos celulares, como macrófagos, fibroblastos, células endoteliales o CM mesenquimales, para lo que segregan citoquinas proinflamatorias y quimioquinas, como IL-4, IL-6, IL-8 o CXCL1, entre otras.

En tumores que muestran una jerarquía de CMCs unidireccional, las terapias dirigidas hacia su eliminación podrían ser suficiente para curar la enfermedad. Por el contrario, en el caso de tumores en los que existe plasticidad celular bidireccional (como es caso del cáncer de colon), las señales que provienen del microentorno (o nicho) pueden inducir propiedades de CMCs a células progenitoras o diferenciadas, lo que dará como resultado la regeneración del tumor y el fracaso de la terapia.

Sin embargo, a medida que aumenta la malignidad del tumor, las CMCs se hacen más independientes de las señales provenientes del nicho, lo que favorece la metástasis. Por tanto, para erradicar la enfermedad las terapias deben ir orientadas a las CMCs y/o al nicho dependiendo del cáncer en cuestión y el estadio de la enfermedad.

Como otras CMs, las CMCs tienen las propiedades de autorrenovación, diferenciación incontrolada, activación de las vías de señalización intercelular normal pero conduciendo a una proliferación anormal (por ejemplo Wnt/ $\beta$ -catenina, TGF- $\beta$ , Hedgehog, Notch), formación de tumores malignos, resistencia a la quimio y radioterapia (Jaiswal y cols., 2002; Elamin y cols., 2010; Dandawate y cols., 2013; Dorritie y cols., 2014; de Sousa y cols., 2016; Basu y cols., 2016; Cleophas y cols., 2017; Hardin y cols., 2017; Zhou y cols., 2018). La vía Wnt/ $\beta$ -catenina se considera la responsable de mantener las propiedades de estas células y de la resistencia a los fármacos en el CCR (Takebe y cols., 2011). Además, las células stem cancerosas presentan las características de las células stem intestinales normales como división intensa y diferenciación específica (Gao y cols., 2013; Cleophas y cols., 2017; Hardin y cols., 2017; Zhou y cols., 2018).

Las CMCs del CCR (CCR-CMCs) se identifican por los marcadores de superficie que además son moléculas con actividad biológica y diferentes funciones celulares. Pueden ser encontradas en las células diferenciadas no neoplásicas, en las células madres normales y cancerosas. En la actualidad existen algunos estudios sobre sus funciones biológicas con información contradictoria en la patogenia del desarrollo y progresión del CCR por lo cual precisan mejor caracterización y valoración de su utilidad en el tratamiento. Algunos de estos marcadores se creen ser específicos para las células stem del CCR como CD44, EpCAM, CD 166, CD 133, ALDH1 y Lgr5, aunque hay científicos que rechazan estas observaciones y confirman que estos marcadores se expresan también en otras células cancerosas y no cancerosas y no son tan propios para los CMCs (Puglisi y cols., 2011; Zhou y cols., 2018). El CD24, CD29 y  $\beta$ -catenina son otros marcadores que se pueden encontrar en otro tipo de células. Los resultados discordantes indican la necesidad de realizar estudios adicionales para una mejor caracterización de los CCR-CMCs e identificar el papel de los marcadores en la definición de entidad stem cell (Shmelkov y cols., 2008; Chu y cols., 2009; Puglisi y cols., 2011).

### 4.3. CÉLULAS MADRE CANCEROSAS Y PROGRESIÓN DEL CCR

#### 4.3.1 Métastasis

Aparentemente no todas las CMCs pueden invadir otros tejidos. Algunos autores distinguen dos grupos diferentes de las CMCs. Se trata de un grupo llamado células madre cancerosas migratorias (MCMCs, *migrating cancer stem cells*, MCSCs) y otro llamado células madre cancerosas estacionarias (SCMCs, *stationary cancer stem cells*, SCSCs). Las SCMCs son responsables del desarrollo de tejido tumoral de la lesión primaria e incremento progresivo de su tamaño, mientras que las MCMCs se consideran causantes del crecimiento más agresivo y tienen la posibilidad de la diseminación de las células malignas dentro del tumor primario y a otros órganos (Brabletz y cols., 2015; Oskarsson y cols., 2014; Zeuner y cols., 2014; Mukherjee y cols., 2016; Sun y Liu, 2017; Zhou y cols., 2018).

Las características de las MCMCs explican su potencial para iniciar la progresión de la enfermedad en forma de metástasis a distancia. Gracias a su división infinita y asimétrica, la diferenciación hacia una variedad de células y la posibilidad de migración, son capaces de invadir otros órganos y fácilmente formar las metástasis (Luzzi y cols., 1998; Zhou y cols., 2018). En el momento actual no hay suficientes estudios para demostrar todos los marcadores necesarios para la correcta identificación de las MCMCs y su distinción de otras CMCs. Se postula que algunos marcadores de superficie pueden vincular las MCMCs con las metástasis específicas para cada órgano (Tang, 2012; Gao y cols., 2013; Zhou y cols., 2018).

Las MCMCs pueden originar de las células cancerosas diferenciadas o de las SCMCs tanto en la lesión primaria como en el tejido metastásico mediante un proceso conocido como transición mesenquimatoso epitelial (*epithelial mesenchymal transition*, ETM) (Tang, 2012; Liao y cols., 2014; Zhou y cols., 2018). La ETM es un proceso natural de diferenciación de órganos durante el desarrollo embrionario donde las células pierden las características epiteliales y se convierten en células mesenquimales con todas sus propiedades. El mismo proceso sucede en la transición de las células cancerosas a las células cancerosas stem, incluyendo las MCMCs, lo que se confirma con la alta expresión de marcadores característicos para los tejidos sometidos a la ETM como Snail, CD133, CD44 y EpCAM (Zlobec y Lugli, 2009; Chaffer y cols., 2011; Brabletz, 2012; Puisieux y cols., 2014; Stavropoulou y cols., 2016; Shibue y Weinberg, 2017; Zhou y cols., 2018) y la participación de las vías de señalización asociadas con la ETM como TGF- $\beta$ , Wnt y Notch (Derynck y cols., 2014; Yuan y cols., 2014; Thien y cols., 2015; Zhou y cols., 2018).

Existen varios factores que contribuyen en la transición de las células normales y las células cancerosas a las CMCs y otros factores que previenen este proceso. El microambiente tumoral produce el factor de crecimiento de hepatocitos (*hepatocyte growth factor*, HGF), la prostaglandina E2 (PGE2), la proteína morfogenética ósea (*bone morphogenetic protein*, BMP), osteopontina (OPN), factor derivado de las células estromales 1 (*stromal cell-derived factor 1*, SDF1), TGF- $\beta$  e interleucinas que inducen el proceso de la transición celular. Los macrófagos presentes en el tejido tumoral secretan MFG-E8 (*milk fat globule-EGF factor 8 protein*, proteína de adhesión celular) que tiene función de mantener la autorenovación de las CMCs en el CCR. El bloqueo de la MFG-E8 en estos macrófagos inhibe la tumorigenicidad en ratones (Whiteside, 2008; Jinushi y cols., 2011; Zeuner y cols., 2014; Zhou y

cols., 2018). Parece que los quimioterapéuticos habituales son menos efectivos en la presencia de los factores pro CMC en el microambiente tumoral pero las terapias dirigidas podrían ser exitosas.

En el CCR se observa que el TGF- $\beta$ 1 induce la expresión de marcadores EMT como Slug, Twist1,  $\beta$ -catenina y N-cadherina y regula los marcadores de las CMCs como Oct4, Sox2, Nanog y KLF4. Señalización Snail y Nanog promueven la ETM y adquisición de las propiedades stem en las células cancerosas colorrectales como autorenovación, tumorigenicidad, quimioresistencia (Derynck y cols., 2014; Yuan y cols., 2014; Thien y cols., 2015; Yao y cols., 2016; Lee y cols., 2017; Zhou y cols., 2018) y la capacidad de migración e invasión a través de la degradación de la matrix extracelular e infiltración de otros tejidos (Meng y cols., 2016; Zhou y cols., 2018).

La capacidad de migración e invasión de otros tejidos por las CMCs está relacionada con la interacción de los microambientes del tumor y del órgano en el cual se asientan las metástasis. Esto sucede a través de las señales mediadas por algunos factores bioquímicos como oxígeno, ciclooxygenasas y receptores de las citoquinas quimiotácticas (quimioquinas). Por ejemplo, la CXCR4 (*chemokine receptor 4*, receptor de quimioquinas 4) y el factor 1 derivado de las células estromales (*stromal cell-derived factor 1*, SDF-1) cual está altamente expresado en el hígado. El SDF-1 provoca que las células del CCR que expresan CXCR4 se dirigen hacia el hígado. Lo mismo sucede con el TGF- $\beta$  que mediante la interacción con el PDGF- $\alpha$  (*platelet-derived growth factor receptor  $\alpha$* , receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas  $\alpha$ ) presente en las células hepáticas como componente de un microambiente favorable y promueve la migración de las células del CCR hacia el hígado. Además, las células mesenquimales óseas son capaces de migrar al tejido tumoral, pasar la diferenciación hacia los fibroblastos relacionados con el CCR y promover la invasión de otros tejidos (Shinagawa y cols., 2010 y 2013; Liu y cols., 2014; Yamada y cols., 2014; Wuidart y cols., 2016; Parsons y cols., 2017; Zheng y cols., 2017; Zhou y cols., 2018).

Torado y cols. demuestran la relación entre la capacidad de originar las metástasis por las CMCs del CCR y la expresión del marcador CD44v6. Es un marcador variante (isoforma) del marcador CD44 vinculado con un potencial alto de migración, invasión y progresión tumoral. Postulan que este marcador es imprescindible para la migración y formación de las metástasis. CD44v6 se expresa también en las células cancerosas diferenciadas, pero en menor medida, comparando con las CCR-CMCs. El microambiente tumoral que secreta las citoquinas mencionadas anteriormente como el SDF-1, HGF y la OPN, mediante la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina aumenta la expresión del CD44v6 en las CCR-CMCs abilitando la capacidad de la migración de las mismas. Además, las citoquinas pueden provocar el mismo resultado en las células cancerosas diferenciadas que adquieren las mismas propiedades de las CCR-CMCs. Otro hecho destacado por los mismos autores es que los fibroblastos asociados al cáncer (CAFs, cancer-associated fibroblasts) son otro factor del microambiente tumoral que intensifica la migración de las células que expresan el CD44v6 y además convierte las células CD44v6<sup>-</sup> en las CD44v6<sup>+</sup> migratorias aumentando el potencial invasivo de las CCR-CMCs.

Se ha observado que la inhibición de una enzima llamada fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase) elimina las células CD44v6 de forma selectiva y así frena el crecimiento de las masas metastásicas. Por otro lado, baja expresión del CD44v6 en la masa tumoral se vincula con mejor supervivencia por lo tanto los enfoques farmacológicos dirigidos al CD44v6 pueden promover un

nuevo abordaje terapéutico para los pacientes con CCR (Orlan-Rousseau y cols., 2002 y 2010; Brabletz y cols., 2005; Hanahan y Coussen, 2012; Todaro y cols., 2014; Zeilstra y cols., 2014).

#### **4.3.2. CCR-CMCs y resistencia a la quimio y radioterapia**

Se ha postulado que la quimio y radioresistencia de las CCR-CMCs es una de las principales causas del fracaso terapéutico y de la recurrencia posterior al tratamiento. Tanto la quimio como la radioterapia parecen ser mucho más efectivas en las células tumorales diferenciadas (no del grupo CMCs) (He y cols., 2014; Li y cols., 2016; Toden y cols., 2016; Su y cols., 2017; Zhou y cols., 2018) mientras que las CMCs parecen presentar propiedades que les permiten escaparse del efecto nocivo de este tipo de tratamiento (Vermeulen y cols., 2012). Esta hipótesis promovió los estudios destinados a descubrir los mecanismos implicados, pero existe todavía la necesidad de completar los ensayos para entender mejor los procesos.

Una de las teorías explica que las CMCs no presentan el ciclo completo de la proliferación celular, pero se quedan en reposo en la fase  $G_0$  y por lo cual demuestran la quimio y radioresistencia. En otra se supone que estas células tienen una alta capacidad de reparar los daños del ADN por lo cual no responden a los agentes terapéuticos cuya función es lesionar el material genético. Otra teoría trata de explicar el proceso apoyándose en las observaciones de que las CMCs expresan unas proteínas con propiedades antiapoptóticas y/o con la capacidad de extraer el medicamento de la célula en mecanismo de bomba (Kangwan y cols., 2016; Singh y cols., 2016; Butler y cols., 2017; Huang y cols., 2017; Zhou y cols., 2018).

Entre las proteínas identificadas como probablemente responsables de la quimioresistencia del CCR se nombran la galectina-3 (Gal3) - demostrando que las CMCs que las expresan son resistentes a las terapias con 5-FU, oxaliplatino, leucovorin y irinotecan - la proteína PER3 (*period circadian regulator 3 protein*) e interleucina-6 relacionadas con la resistencia al 5-FU (Ishihara y Hirano, 2002; Ilmer y cols., 2016; Kozłowska y cols., 2016; Zhang y cols., 2016; Butler y cols., 2017; Zhou y cols., 2018).

La resistencia a la radioterapia de las CMCs se relaciona con la mencionada ya capacidad de reparación de los daños en el ADN, frenar el ciclo celular, propiedades inhibitorias de las Especies Reactivas del Oxígeno (EOR o ROS - reactive oxygen species) y antiapoptóticas mediante la activación de vías Notch, quinasa c-Jun y  $C\delta$  (Alison y cols., 2012; Lagadec y cols., 2013; Rycaj y Tang, 2014; Li F y cols., 2016). Además, se estima que la radiación puede provocar la transformación de las células cancerosas no diferenciadas en las CMCs lo que intensifica la resistencia a la radioterapia (Ghisolfi y cols., 2012; Bastos y cols., 2014; Zhou y cols., 2018).

#### **4.4. CÉLULAS STEM Y HEMOOXIGENASA**

La relación entre la hemooxigenasa y las células madre se estudió en los ensayos sobre la médula ósea llevados a cabo por el grupo de profesor Ratajczak. Los estudios realizados demostraron que tanto la HO-1 como la inducible óxido nítrico sintasa (iNOS) inhiben la migración y movilización de las células stem desde la médula ósea hacia la sangre periférica. Ambas enzimas se estimulan en la presencia del daño celular, inflamación e infección por ejemplo en la existencia de estrés oxidativo, hipoxia, LPS, citoquinas como TNF $\alpha$  y IL-1 $\beta$ . La alta expresión de ambas enzimas previene la salida de las

células madre de la médula a través de la producción de NO (óxido nítrico) e inhibición del sistema del complemento y sus componentes C3a y C5a. Por otro lado, el sistema del complemento inhibe la HO-1 y sus componentes modulan la migración de las células madre durante la organogénesis (Ricklin y cols., 2010). Además, la función inhibidora de la HO-1 sobre las células madre hematopoyéticas está estimulada también en la presencia de SDF-1 y S1P (*sphingosine-1-phosphate*). A su vez la HO-1 regula los niveles de SDF-1 en el microambiente celular de la médula ósea y se observa que su inhibición mediante SnPP conduce a la movilización de las células stem de la médula. Estos resultados sirven para explicar algunos procesos implicados en el trasplante de la médula ósea y podrían ser utilizados para mejorar los resultados del trasplante (evitando la migración de las células transplantadas a la sangre periférica) especialmente en la situación de escaso número de células disponibles (Wysoczyński y cols., 2014; Adamiak y cols., 2016 y 2017; Abdelbaset-Ismail y cols., 2017).

Previamente a este estudio el mismo equipo de investigadores confirmó que la inhibición de la HO-1 y incremento de la actividad del sistema del complemento aumenta la movilidad de células malignas de las líneas hematopoyéticas relacionadas con diferentes tipos de leucemia. Los resultados demuestran que estas células tienen receptores para el C3a y C5a y se activan mediante fosforilación de p83MAPK y la PKB/AKT. La estimulación de las células leucémicas a través de la C3a y C5a y la activación de p83MAPK frena la expresión de la HO-1 y conduce a un aumento de la movilidad de las células. Las conclusiones de este estudio son que la activación del sistema del complemento en pacientes con leucemia (por ejemplo, en caso de una infección concomitante) inhibe la HO-1 en la vía dependiente de la p83MAPK (C3aR/C5aR-p38MPAK-HO-1) y permite la diseminación de las células malignas y que la HO-1 ocupa un papel importante en la inhibición de la movilidad de las células malignas y no malignas del sistema hematopoyético. Estos resultados son muy preocupantes considerando que se pueden dispersar las células malignas quimioresistentes tras la quimioterapia no eficaz. En cambio, permiten postular que la inhibición de p 38 MPAK o activación de la HO-1 a través del CoPP puede proporcionar una terapia dirigida contra la diseminación de las células leucémicas durante la activación del sistema del complemento (Abdelbaset-Ismail y cols., 2017; Adamiak y cols., 2017; Ratajczak, 2017).

Otro estudio realizado sobre el vínculo entre la HO-1 y las células madre cancerosas trata de evaluar esta relación en casos de glioblastoma multiforme (GBM). Es el tumor cerebral más frecuente en adultos y con supervivencia media de quince meses con importante resistencia a la quimio y radioterapia. Diferentes estudios confirmaron que la agresividad y la resistencia a los tratamientos estándar se debe a la existencia de las células cancerosas stem involucradas en la progresión de esta enfermedad, pero no existe ningún marcador específico para identificar estas células y valorar el pronóstico. El estudio realizado por el grupo dirigido por Ghosh confirma que la expresión de la HO-1 en las células del GBM está relacionada con las propiedades stem, con el potencial migratorio e invasivo de algunas de las células. La resección quirúrgica del tumor conduce a la disminución de los niveles de HO-1 en la sangre periférica e indica mejor pronóstico. La inhibición del gen de la HO-1 mediante el siRNA (*small interfering RNA*, utilizado para silenciar la expresión de los genes) conduce a la disminución de la invasión y del carácter invasivo de las células madre cancerosas del GBM. Estos resultados son prometedores para la búsqueda de nuevos fármacos y terapias para el glioblastoma multiforme (Ghosh y cols., 2016).

#### 4.5. CÉLULAS MADRE CANCEROSAS DEL CCR Y LA ENDOTELINA-1

Puglisi y cols. presentaron una muy interesante hipótesis sobre la relación entre las CCR-CMCs y la ET-1. Realizaron un estudio sobre cuatro diferentes líneas del CCR (CaCo-2, HT-29, HCT116, LoVo) para confirmar si el marcador CD133 puede ser utilizado como un marcador específico para estas células. Curiosamente además de observar la sobreexpresión del CD133 en las células CCR-CMCs (en dos de las líneas celulares estudiadas - CaCo-2 y HCT116) se comprobó que a su vez sobreexpresaban el gen de la ET-1 (en las líneas CaCo-2, HT-29 y LoVo), la cual está relacionada con la proliferación y diseminación metastásica del CCR. Se confirmó ausencia de esta relación en los tejidos no tumorales. Se demostró que a la inhibición del CD133 le correspondía la disminución de la expresión de la ET-1 en las líneas celulares y este efecto estaba asociado con la inhibición de la capacidad de migración celular. Estas observaciones pueden ayudar a entender el papel del CD133 y de la ET-1 que ocupan estas proteínas en las propiedades de células cancerosas stem y confirman las características de las células CCR-CMCs para la proliferación y formación de las metástasis (Puglisi y cols., 2011).

Cianfrocca y cols. estudiaron el vínculo entre la ET-1 y la resistencia a la quimioterapia convencional en el CRC. Postularon que este hecho puede estar ligado a la hiperactivación de algunas vías de señalización en las CCR-CMCs como la  $\beta$ -catenina, el receptor de la ET-1 y un transductor de la señalización  $\beta$ -arrestina1 ( $\beta$ -arr1). Se usaron las células CCR-CMCs derivadas de los pacientes reales que expresaban altamente la ET-1 y el receptor de la endotelina ETAR. Activando el receptor de la endotelina a través del transductor  $\beta$ -arrestina1 y la vía de señalización de  $\beta$ -catenina se logró confirmar que estas células presentan propiedades de células madre, con la mantenida ETM y la respuesta a la quimioterapia. En las células CCR-CMCs la vía de señalización de  $\beta$ -catenina está vinculada con el crecimiento tumoral, progresión de la enfermedad y mantenimiento de las características de las células madre cancerosas y se supone que es una de las más probables causas de la quimioresistencia de estos tumores y el escape contra la apoptosis inducida por los agentes quimioterapéuticos.  $\beta$ -catenina además de las funciones en el CCR ya mencionadas activa el gen de la ET-1. Igualmente, la  $\beta$ -arrestina1 se ha demostrado de tener funciones protectoras y ser responsable de la evasión de la apoptosis en las células madres intestinales.

Aplicando el tratamiento con macitentan, conocido como un antagonista de los receptores de la ET-1 se demostró que se puede modificar el microambiente tumoral y interferir con el eje ETAR/ $\beta$ -arr1/ $\beta$ -catenina y perjudicar la capacidad de sobrevivencia celular, proliferación, invasión, modular la ETM y mejorar la respuesta al tratamiento con oxiplatino y 5-fluorouracil. Aparentemente existe una conexión entre la ET-1, sus receptores y las propiedades de las CCR-CmCs y además se demuestra que puede haber una forma de mejorar la sensibilidad a la quimioterapia como utilizando la combinación de macitentan, oxiplatino y 5-fluorouracil puede ser un nuevo enfoque terapéutico para combatir el alarmante problema de la quimioresistencia en el CCR (Cianfrocca y cols., 2017).

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Estudios anteriores no relacionados con el cáncer han demostrado que la HO-1 y la vía ECE-1/ET-1 están relacionados. El CO producido por HO-1 regula la producción de ET-1 por las células del músculo liso en condiciones normales, en hipoxia [Goligorsky y cols., 1999] y en varios modelos de enfermedad [Morita y Kourembanas, 1995; Zhang y cols., 2004; Liou y cols., 2015]. Además, la inhibición química de ECE-1 conduce a la sobreexpresión de HO-1 en la lesión de la médula espinal por reperfusión química isquémica en ratas [Lin y cols., 2017].

Teniendo en cuenta esto y los antecedentes anteriormente expuestos, en este trabajo se ha planteado la siguiente **hipótesis**: “La HO-1 podría regular el fenotipo stem en el CCR a través del sistema ECE-1/ET-1”.

Para dar respuesta a esta hipótesis, se han planteado los **objetivos** que se detallan a continuación:

1. Analizar la expresión de los genes de HO-1, ECE-1 y los marcadores de CMCs, CD133 y CD44, en muestras de pacientes operados de CCR.
2. Estudiar la relación que existe entre estos genes según la expresión de los marcadores de CMCs y la presencia o no de mutaciones en el gen p53.
3. Determinar si la sobreexpresión de HO-1 induce la expresión de ECE-1 y el mecanismo por el que se lleva a cabo en modelos in vitro.
4. Comprobar si la sobreexpresión de HO-1 induce fenotipo stem en células de CCR en cultivo a través del sistema ECE-1/ET-1.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## 1. Cultivo celular y reactivos

En este estudio se utilizaron tres líneas celulares de CCR con diferente estado de p53: HCT-116 (p53 de tipo salvaje), HCT-116 p53 -/- (p53 null) y HT-29 (p53 mutado). Las líneas HCT-116 y HCT-116 p53 null se obtuvieron de Horizon Discovery (Cambridge, Reino Unido). Las células HT-29 se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, EE. UU.). Todas las líneas celulares se cultivaron en medio RPMI-1640 (Gibco, Carlsbad, CA, EE. UU.) suplementado con L glutamina 2 mM, FBS al 10% y un cóctel de antibiótico-antimicótico al 1% formado por penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 µg/ml) y anfotericina B (250 ng/ml) (Gibco, Carlsbad, CA, EE. UU.) a 37 ° C y 5% de CO<sub>2</sub>.

Los reactivos CORM3, biliverdina, hemina y CoPPIX se adquirieron de Sigma-Aldric Co. (St. Luis, MO, EE.UU.). El compuesto bosentan se adquirió de Selleckchem (Houston, TX, EE. UU.).

## 2. Pacientes

Para este estudio se han reclutado 150 pacientes intervenidos de CCR esporádico primario. Las muestras han sido gestionadas por la Red Andaluza de Banco de Tumores (RBTA) (Tabla 8). Los tejidos tumorales y la mucosa normal adyacente se congelaron inmediatamente en Tissue-Tek1 (Optimal Cutting Temperature Compuond, Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude).

**Tabla 8.** Características de los pacientes incluidos en el estudio

Característica	N (%)
<b>Edad</b>	
≤72	78 (52,0)
>72	72 (48,0)
<b>Sexo</b>	
Feminino	92 (61,3)
Masculino	58 (37,7)
<b>Localización</b>	
Colon	141 (94)
Recto	9 (6)
<b>Tipo histológico</b>	
Bien diferenciado	38 (25,3)
Moderadamente diferenciado	94 (62,7)
Pobrememente diferenciado	18 (12,0)
<b>pTMN</b>	
Estadio I	15 (10,0)
Estadio II	59 (39,3)
Estadio III	64 (42,7)
Estadio IV	12 (8,0)

Los criterios de inclusión del estudio han sido: personas mayores de 18 años, sin carga hereditaria, no tratadas con terapia neoadyuvante y no diagnosticadas o tratadas previamente por cáncer. Todos los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito para el uso de muestras en la investigación biomédica. El Comité Ético de Investigación Clínica de Granada (código del proyecto: PI-067/2013; fecha de aprobación: 24/01/2014) aprobó el estudio.

### **3. Transfección transitoria de la HO-1**

Las células al 60-70% de confluencia se transfectaron transitoriamente con el reactivo de transfección lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A continuación, se recogieron las células transfectadas 24-96 horas después de la transfección. El plásmido pCMV6 que contiene el gen HMOX1 humano y el vector vacío correspondiente se adquirieron de Origene Technologies (Rockville, MA, EE.UU.).

### **4. Western blot**

Después de los tratamientos, las células se lavaron en DPBS frío y se incubaron en tampón RIPA con inhibidores de proteasa (PMSF, leupeptina, pepstatina y aprotinina). Posteriormente, las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de PVDF. Finalmente, las membranas se incubaron con los anticuerpos frente a HO-1 (Abcam, Cambridge, Reino Unido), ECE-1 (Abcam, Cambridge, Reino Unido), NF- $\kappa$ B (p65; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, EE. UU. ), pNF- $\kappa$ B en Ser529 (phosphor-p65; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.), AP-1 (c-jun; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, EE. UU.), pAP-1 en Ser243 (phosphor-c-jun; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, EE. UU.) y  $\beta$ -actina (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, EE. UU.). Las proteínas se visualizaron mediante quimioluminiscencia utilizando los anticuerpos secundarios apropiados conjugados con HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, EE. UU.). La intensidad de las bandas se estimó utilizando la Quantity One 4.6.8 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EE. UU.) para el software analítico de Windows.

### **5. ELISA y ET-1**

La ET-1 se analizó en 100  $\mu$ L de medio condicionado utilizando un kit de ELISA colorimétrico (R & D Systems, Minneapolis, MN, EE. UU.) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Para la lectura de absorbancia se utilizó un lector de microplacas a 450 nm de la serie TRIAD Multimode Reader (Dynex Technologies, Chantilly, VA, EE. UU.). Los resultados se determinaron por comparación con las curvas estándar y se normalizaron respecto al número de células en cada pocillo.

### **6. Aislamiento del ARN y síntesis del ADNc**

El ARN total de las muestras de tejido se aisló usando el RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemania). La cantidad de ARN total se determinó mediante espectrofotometría UV y la integridad del ARN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa. El ADNc de primera hebra se preparó mediante un kit de síntesis de ADNc de transcripción inversa (qScript cDNA Synthesis, Quantabio, Beverly, MA, EE.UU.).

## 7. PCR en tiempo real

El análisis cuantitativo de la expresión de ARNm se realizó con el kit PerfeCTa SYBR Green SuperMix (Quantabio, Beverly, MA, EE. UU.) en un CFX96 Dx Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando cebadores específicos para cada gen diana (Tabla 9). La expresión del ARNm se evaluó mediante curvas estándar generadas para cada gen diana representando los valores de Ct frente a la dilución logarítmica de ADNc. Se usó UBC para normalizar los niveles de ARNm. Los productos de PCR se verificaron mediante un perfil de fusión y electroforesis en gel de agarosa para descartar productos de PCR inespecíficos y dímeros de cebadores.

**Tabla 9.** Cebadores utilizados para la amplificación de los genes utilizados en este estudio

Gen	Cebador sentido	Cebador antisentido
HO-1	gcatgaactccctggagatgactcccg	aagccctacagcaactgtcgccaccag
ECE-1	accagaactgggtgaagaagaacg	ttaccagacttcgcacttgtga
END-1	aaaggcaagccctccagagagcgttatgtg	ttctgctgagaggtccattgtcatccccag
CD44	gcttcaatagcacctgcccacaatgg	aaagaggtcctgtcctgtccaaatcttcc
CD133	tcttctggcatgctattcaa	Tgacgacatttcaagctgaa
UBC	tgggatgcaaactcttctgtaagaccctgac	accaagtgcagagtggtgactcttctggatg

## 8. Extracción del ADN y análisis de mutaciones del gen p53

El ADN se extrajo de los tejidos utilizando el mini kit QIAamp ADN (Qiagen, Hilden, Alemania) y se cuantificó con un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Implen GmbH, Munich, Alemania). Las mutaciones se analizaron en 2-10 exones usando cebadores específicos (Tabla 10) en dos amplificaciones independientes. Se consultó la base de datos p53 de IARC (<http://www.p53.iarc.fr/>) para la actividad del p53 de mutantes. Una actividad transcripcional <75% se consideró parcialmente funcional y se clasificó como mutante [Casado y cols., 2017].

**Tabla 10.** Cebadores utilizados para la secuenciación de p53

Exones	Primers	
	Sentido	Antisentido
2-4	agctgtctcagacactggcatggtgttg	cactgacaggaagccaaaggggtgaagagg
5-6	gttgctttatctgttcacttgtgccctgac	tagggaggtcaatatagcagcaggagaag
7-9	cagcctggggcgacagagcgagattccatc	aaccaggagccattgtctttgaggcatcac
10	tacttgaagtgcagtttctactaaatgcatg	Aggaagactaaaaaatgtctgtgcagggc

## 9. Ensayo ALDEFLUOR

Para detectar la actividad de la enzima ALDH1 en células cultivadas se utilizó el kit ALDEFLUOR™ (Stem Cell Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de los

tratamientos, las células se incubaron con BODIPY-aminoacetaldehído (BAAA), un sustrato fluorescente no tóxico para ALDH, que se convirtió en BODIPY-aminoacato (BAA) y contenido dentro de las células. Las células viables ALDH1+ se cuantificaron mediante citometría de flujo en ACS Aria IIIu (BD Biosciences, San José, CA, EE. UU.). El inhibidor específico de ALDH, dietilaminobenzaldehído (DEAB), se utilizó para controlar la fluorescencia de fondo.

## **10. Aislamiento y caracterización de las CMCs**

El enriquecimiento de las CMCs se realizó mediante tripsinización por etapas [Morata-Tarifa y cols., 2016; Witte y cols., 2021]. Para ello, las células al 60-80% de confluencia se lavaron con PBS y se trataron con tripsina al 0,05% durante 2 minutos a 37°C. Las células desprendidas se sembraron en placas y se dejaron adherir durante 24 horas. Luego se repitió el procedimiento anterior y las células obtenidas se consideraron CMCs. Después del primer tratamiento con tripsina, las células restantes unidas a las placas se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con tripsina al 0,05% durante 4 minutos a 37°C. Se descartaron las células desprendidas de esta tripsinización. Las células restantes que no se desprendieron tras esta última tripsinización se consideraron no CMCs.

Una vez aislados, los niveles de marcadores de superficie celular de las CMCs se determinaron con anticuerpos humanos anti-CD44-PE, anti-CD326-FITC y anti-CD133-APC (Biolegend, San Diego, CA, EE. UU.). Las muestras se analizaron mediante citometría de flujo en un FACS Aria IIIu (BD Biosciences, San José, CA, EE. UU.).

## **11. Ensayo de formación de las esferas**

Para el análisis de la autorrenovación las células CMCs y no CMCs se recogieron y se cuantificaron CMCs 24 horas después de la transfección con pCMV6-HMOX1 o con el vector vacío. Posteriormente, 3000 células se resuspendieron en medio de cultivo de esferas (DMEM: F12, penicilina/estreptomicina al 1%, B27, ITS 10 µg/ml, hidrocortisona 1 µg/ml, heparina 4 ng/ml, EGF 10 ng/ml, 20 ng/mL FGF) en placas de 24 pocillos de fijación ultrabaja (Corning). Las esferas >75 µm de diámetro se contaron después de 4 días mediante microscopía óptica.

## **12. Ensayo MTT**

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una concentración de 40.000 células/ml, y se transfectaron al día siguiente con pCMV6-HMOX1 o con vector vacío. Posteriormente, las células se trataron con un vehículo o un fármaco correspondiente 24 horas después de la transfección. Después de 72 h, se agregaron 10 µL de 5 mg/mL de MTT a cada pocillo. Cuatro horas más tarde, las células se lisaron con 100 µL de tampón (SDS al 20% en formamida al 50% a pH 4,7) a 37°C durante la noche. La absorbancia se midió en un lector multimodo TRIAD (Dynex Technologies, Chantilly, VA, EE. UU.) a 570 nm. Las medias de las medidas se estimaron a partir de los resultados de cuatro muestras en cada grupo experimental. Todos los experimentos se realizaron dos veces.

### **13. Análisis estadístico**

Para cada paciente, los niveles del ARNm de genes en muestras tumorales se normalizaron a los niveles del ARNm en mucosa normal. Para la estadística descriptiva, las variables continuas se expresaron mediante la mediana y el rango intercuartílico (IQR) y las variables categóricas como números y porcentajes. El cut-off para definir valores altos o bajos de expresión de marcadores de CMCs se obtuvo a través de la mediana de los niveles de expresión del ARNm en nuestra cohorte de pacientes. Las asociaciones entre las características clínico-patológicas de los pacientes con CCR y la expresión génica se analizaron con las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney. Para el análisis de correlación se utilizó la prueba de Pearson después de transformar las variables aplicando logaritmos naturales. Todos los intervalos de confianza (IC) se establecieron al nivel del 95%. La significación estadística se definió como  $P < 0,05$ . Todos los cálculos estadísticos se realizaron con el software SPSS versión 15.0 para Windows (IBM, Chicago, IL, EE. UU.).

# RESULTADOS

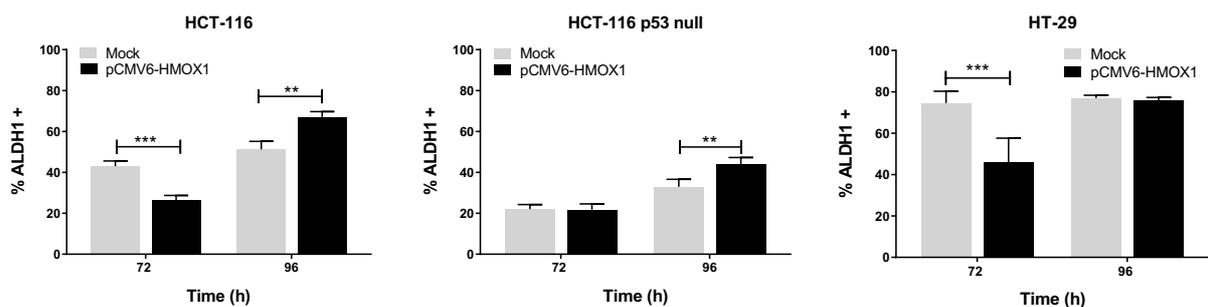
## 1. La sobreexpresión de la HO-1 induce un aumento de la subpoblación de CMCs en el CCR in vitro independientemente del estado de p53

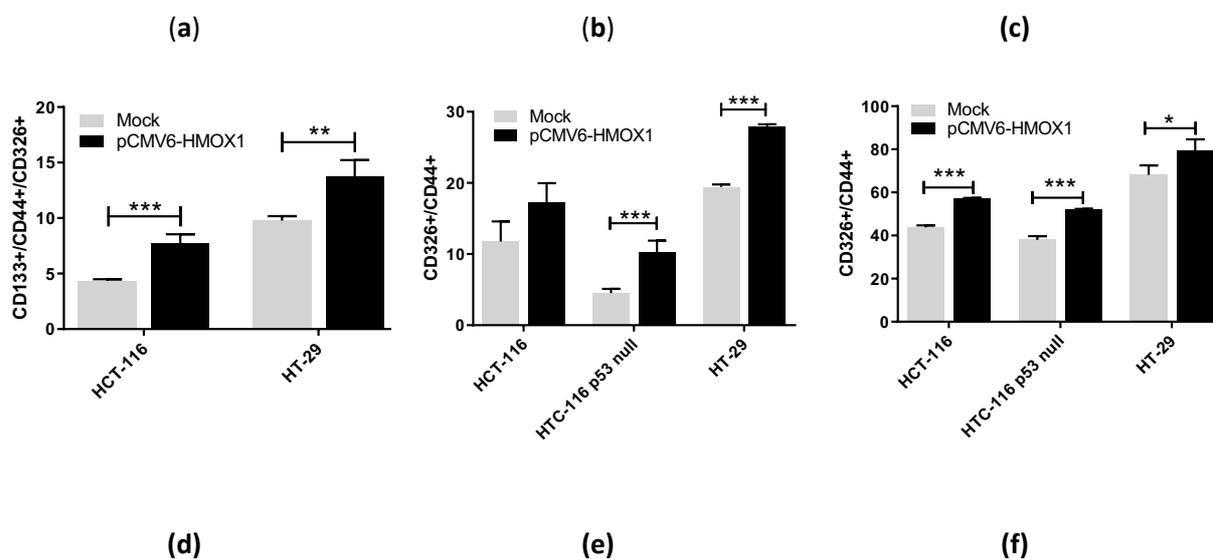
Para investigar si la HO-1 aumenta el carácter troncal en el CCR in vitro usamos el plásmido pCMV6-HMOX1 para sobreexpresar transitoriamente la HO-1 en las células HCT-116, HCT-116 p53 nula y HT-29.

La sobreexpresión de la HO-1 aumentó la subpoblación de ALDH1+ en las HCT-116 y células HCT-116 null a las 96 horas después de la transfección (Figuras 10a, 10b). En las células HT-29, el porcentaje de las células ALDH1+ fue menor en células transfectadas con pCMV6-HMOX1 frente a las células transfectadas con el vector (mock) a las 72 horas después de la transfección, mientras que el porcentaje de esta subpoblación fue similar en las células control (mock) y que sobreexpresan HO-1 a 96 horas (Figura 10c).

Por otro lado, el porcentaje de las células con alta expresión de marcadores de CMCs en la población total (TP) de las células aumentó en las células transfectadas con el plásmido pCMV6-HMOX1 frente a células mock a las 96 horas después de la transfección. A este tiempo, el porcentaje de células CD133+/CD44+/CD326+ aumentó significativamente en la TP de las células HCT-116 y HT29 que sobreexpresaron HO-1 (Figura 10d).

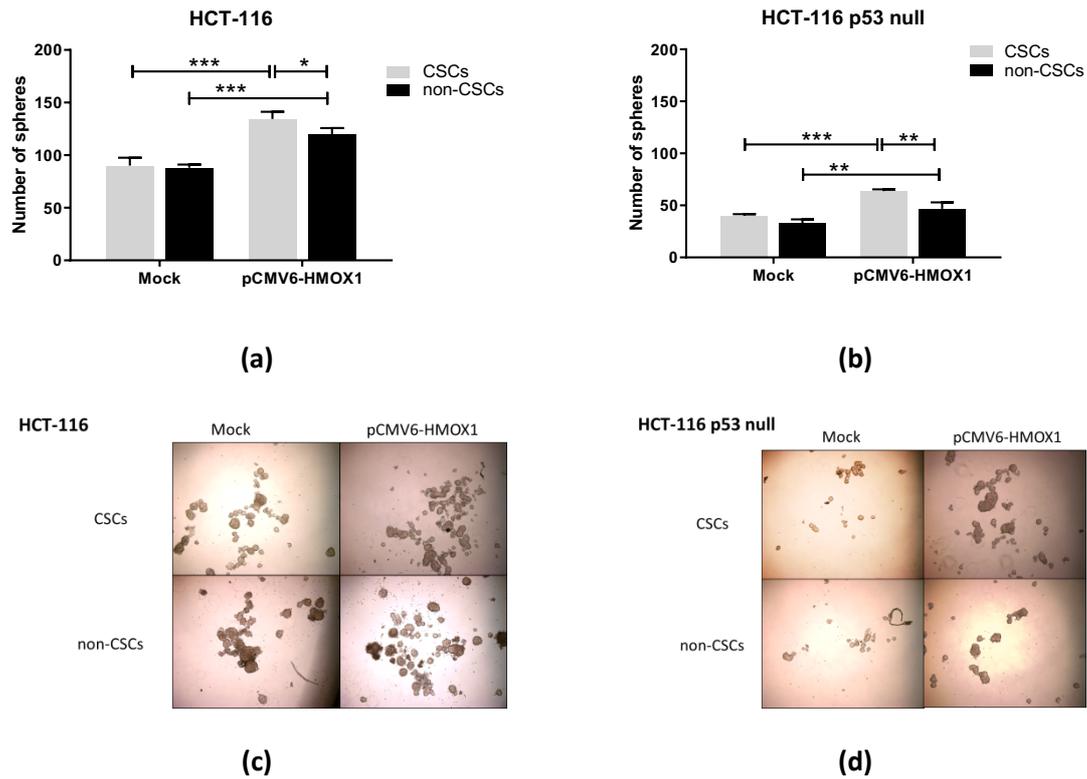
No se encontró subpoblación con triple marcaje en las células HCT-116 p53 null, sin embargo, el porcentaje de las células CD44+/CD326+ aumentó significativamente en la TP de células transfectadas con pCMV6-HMOX1 frente al control a las 96 horas después de la transfección (Figura 10e). De manera similar, en las células HT-29, el porcentaje de la subpoblación CD44+/CD326+ aumentó significativamente en la TP después de la transfección con pCMV6-HMOX1 frente a las células mock a las 96 horas después de la transfección (Figura 10e). Además, el porcentaje de células CD44+/CD326+ aumentó en la subpoblación de CMCs de las células transfectadas con el plásmido pCMV6-HMOX1 frente a las células mock a las 96 horas después de la transfección en las tres líneas celulares estudiadas (Figura 10f).





**Figura 10.** Las células fueron transfectadas con pCMV6-HMOX1 o vector, recogidas a las 72 y 96 horas después de la transfección y utilizadas para caracterizar el porcentaje de las células ALDH1+ por citometría de flujo en la población total (TP) de células de CCR (a) HCT-116, (b) HCT-116 p53 null, y (c) células HT-29 CCR. En otros experimentos, las células se recolectaron 96 horas después de las transfecciones con pCMV6-HMOX1 o vector vacío (mock) y se usaron para cuantificar en la TP (d) el porcentaje de células CD133+/CD44+/CD326+ y (e) el porcentaje de CD44+/CD326+ células, o (f) el porcentaje de células CD44+/CD326+ en subpoblaciones de las CMCs, obtenidas como se describe en la sección Materiales y métodos. Los datos representan la media  $\pm$  DE de dos experimentos realizados por duplicado. \*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,01$ ; \*\*\*,  $P < 0,001$ .

Para evaluar la capacidad de autorrenovación de subpoblaciones de las CMCs y no CMCs extraídas de HCT-116 y HCT-116 p53 null después de la sobreexpresión transitoria de la HO-1, estudiamos el crecimiento de las células sin suero en placas con muy baja probabilidad de anclaje. Como se muestra en la Figura 11, las subpoblaciones CMCs y las no CMCs de ambas líneas celulares formaron esferas con una eficiencia similar en las células transfectadas control (mock), sin embargo, las subpoblaciones de las CMCs formaron esferas de manera más eficiente que las no CMCs cuando las células parentales se transfectaron con el plásmido pCMV6-HMOX1.



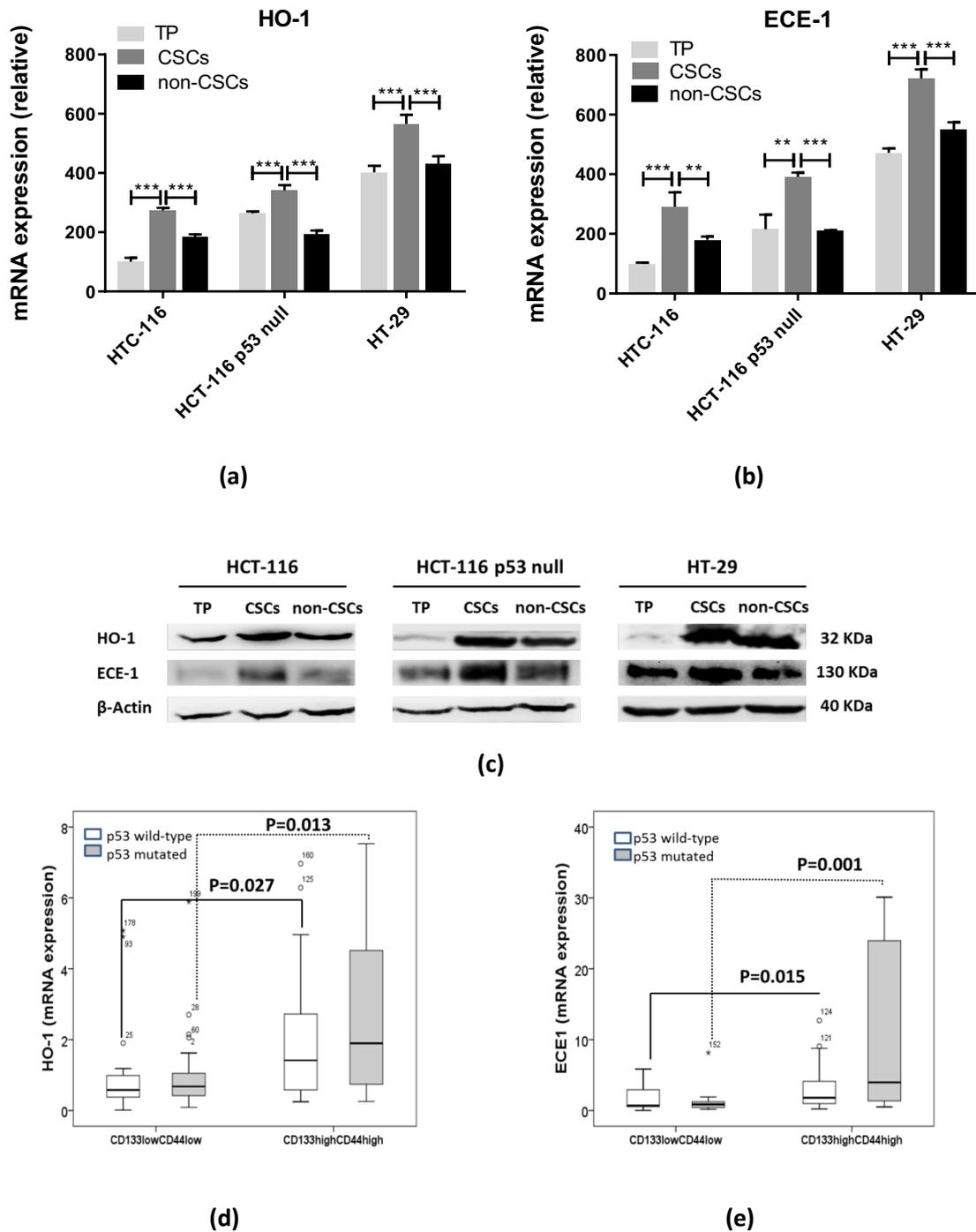
**Figura 11.** Influencia de la sobreexpresión de la HO-1 sobre la capacidad de formación de una esfera tumoral de subpoblaciones de CCR aisladas. Número de esferas formadas por subpoblaciones obtenidas de células simuladas y pCMV6-HMOX1 (a) HCT-116 y (b) HCT-116 p53 nulls transfectadas transitoriamente. Imágenes representativas de las esferas tumorales formadas a partir de diferentes subpoblaciones de pCMV6-HMOX1 (c) HCT-116 y (d) HCT-116 p53 null células transfectadas transitoriamente. TP: población total; CMCs: subpoblación de células madre cancerosas; no CMCs: subpoblación de células madre no cancerosas. \*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,01$ ; \*\*\*,  $P < 0,001$ .

## 2. La sobreexpresión de la HO-1 induce la expresión de ECE-1 y la producción de la ET-1 por las células CCR

A continuación, investigamos el mecanismo por el cual la HO-1 podría inducir las propiedades stem en el CCR. Como se mencionó anteriormente, la HO-1 podría modular la producción de la ET-1 en varios modelos fisiológicos y fisiopatológicos [Morata-Tarifa y cols., 2016; Sebastian y cols., 2018; Puentes-Pardo y cols., 2020; Germanova y cols., 2021; Hemmati y cols., 2021].

Encontramos un alto contenido del ARNm y las proteínas de la HO-1 y la ECE-1 en la subpoblación de las CMCs frente a las no CMCs en las tres líneas celulares estudiadas (Figuras 12a, 12b, 12c). También analizamos la expresión del ARNm de la HO-1, la ECE-1 y los marcadores CD44 y CD133 de las CMCs mediante RT-PCR cuantitativa en 150 casos de pacientes con CCR. Los tumores que muestran una alta expresión de marcadores de las CMCs (CD133highCD44high) también exhibieron una mayor expresión de HO-1 (Figura 12d) y ECE-1 (Figura 12e) que los tumores con baja expresión de estos marcadores (CD133lowCD44low). Fue muy interesante encontrar que la expresión de la HO-1 y la ECE-1 se correlacionaba en los tumores CD133highCD44high y CD133highCD44high, mientras que no

se encontraron correlaciones entre la HO-1 y la ECE-1 (Tabla 9). El estado de P53 no influyó en ninguno de los resultados mencionados anteriormente (Figura 12 y Tabla 9).

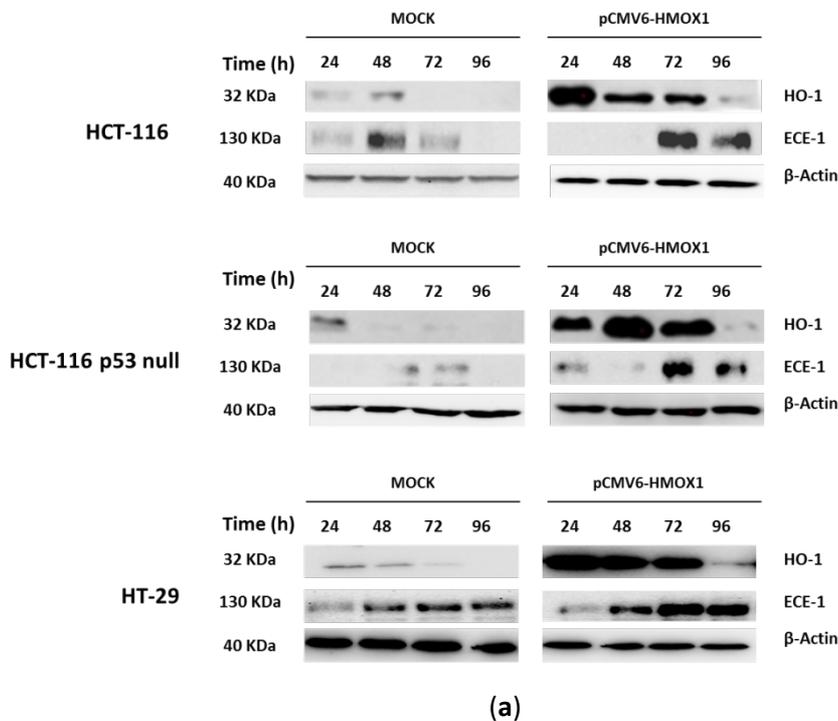


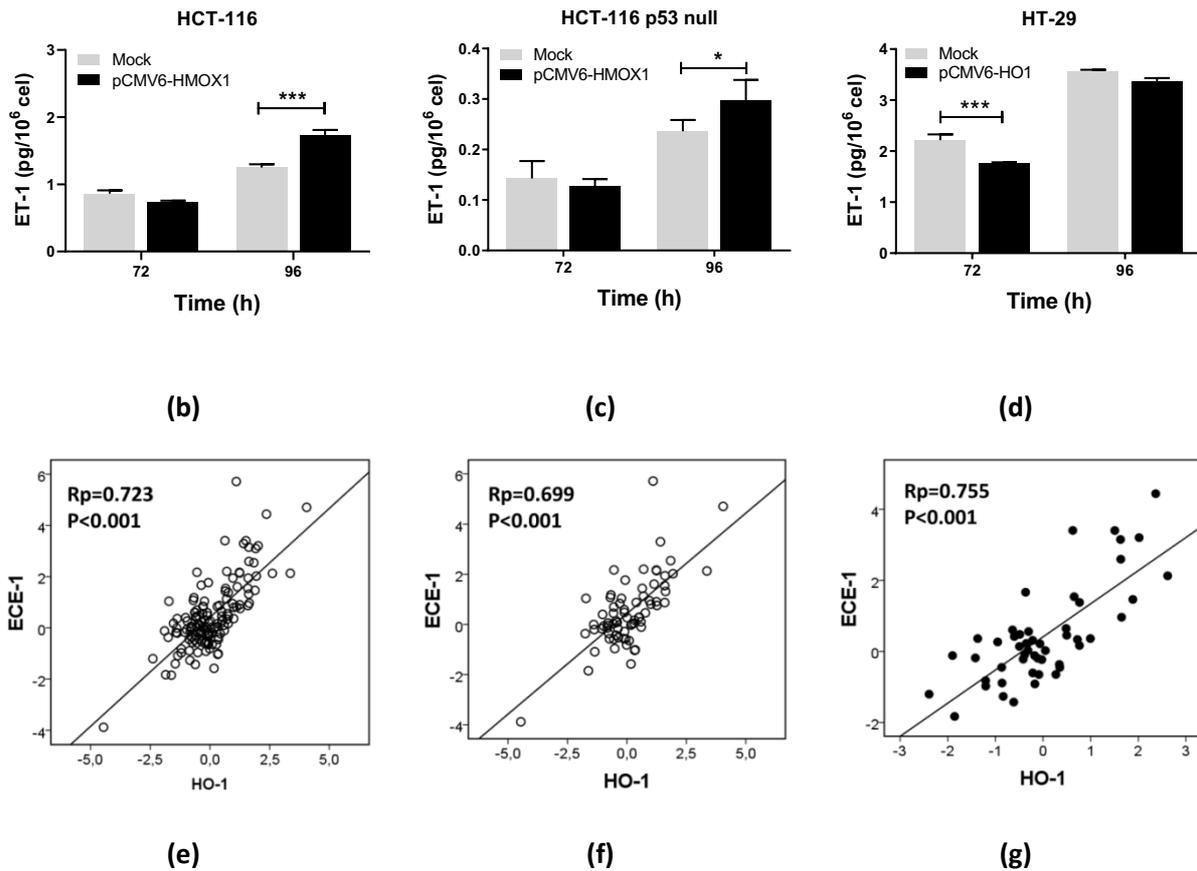
**Figura 12.** Expresión de la HO-1 y la ECE-1 en subpoblaciones de las CMCs y las no CMCs en CCR. Se obtuvieron subpoblaciones de las CMCs y las no CMCs de células HCT-116, HT-116 p53 null y HT-29 como se describe en la sección Materiales y métodos y se usaron para medir la expresión del ARNm de (a) HO-1 y (b) ECE-1. Los datos representan la expresión relativa de la HO-1 y la ECE-1 a la TP de HCT-116 y expresan la media  $\pm$  DE de dos experimentos realizados por duplicado. \*\*,  $P < 0,01$ ; \*\*\*,  $P < 0,001$ . (c) Expresión de proteínas de HO-1 y ECE-1 en

células HCT-116, HT-116 p53 nulas y HT-29 en subpoblaciones TP, CMCs y no CMCs. La  $\beta$ -actina se utilizó como limpieza del hogar. TP: población total; CMC: subpoblación de células madre cancerosas; no CMC: subpoblación de células madre no cancerosas. Expresión relativa del ARNm de (d) HO-1 y (e) ECE-1 en muestras del CCR de pacientes considerando los niveles de marcadores de CMC y el estado de p53. Los datos representan la mediana y el rango intercuartílico de los genes analizados.

A continuación, estudiamos si la HO-1 podría regular la producción de la ET-1 en el CCR. Como se muestra en la Figura 13a, la HO-1 induce la expresión de la ECE-1 a las 72 y 96 horas después de la transfección con el plásmido pCMV6-HMOX1 en las células HCT-116, HCT-116 p53 nulas y HT-29 frente a células transfectadas con vector (mock). Además, la sobreexpresión de la HO-1 induce la síntesis de la ET-1 en las células HCT-116 y HCT-116 p53 null a las 96 horas después de la transfección (Figuras 13b, 13c). En las células HT-29, la sobreexpresión de la HO-1 indujo la inhibición de la ET-1 a las 72 h, mientras que a las 96 h sus niveles aumentaron hasta alcanzar los niveles de las células de control (mock) (Figura 13d).

En la cohorte de pacientes con el CCR, las expresiones de la HO-1 y la ECE-1 se correlacionan positivamente en todos los casos ( $R_p = 0,723$ ,  $P < 0,001$ ; Figura 13e), en tumores que albergan un p53 de tipo salvaje ( $R_p = 0,699$ ,  $P < 0,001$ ; Figura 13f) y en tumores con mutaciones en este gen ( $R_p = 0,755$ ,  $P < 0,001$ ; Figura 13g). END-1, el primer gen implicado en la síntesis de la ET-1, no se correlacionó con la HO-1 en ninguna de las condiciones mencionadas anteriormente ( $R_p = 0,042$ ,  $P = 0,614$ ;  $R_p = 0,042$ ,  $P = 0,905$ ;  $R_p = 0,093$ ,  $P = 0,506$ , para todos los casos, tumores de tipo salvaje p53 y tumores mutados de p53, respectivamente).





**Figura 13.** La sobreexpresión de la HO-1 induce la expresión de la ECE-1 y la producción de la ET-1 en las células del CCR. Las células se transfectaron transitoriamente con pCMV6-HMOX1 o vector vacío y se recolectaron 24-96 horas después para (a) expresión de las proteínas HO-1 y ECE-1 mediante transferencia Western o mediciones de la ET-1 en sobrenadantes de (b) HCT-116, (c) HCT-116 p53 null, (d) células HT-29. Los datos representan la mediana  $\pm$  DE de dos experimentos por duplicado. \*,  $P < 0,05$ ; \*\*\*,  $P < 0,001$ . Correlación de la expresión de la ECE-1 y la HO-1 en los tumores de pacientes con el CCR considerando (e) todos los casos, (f) tumores de tipo salvaje p53 y (g) tumores mutados de p53.

Como se muestra en la Tabla 11, ninguno de estos genes se correlacionó con ninguna de las características clínico-patológicas de los pacientes incluidos en el estudio.

**Tabla 11.** Relación entre expresión de la HO-1 y ECE-1 con las características clínico-patológicas de los pacientes incluidos en el estudio

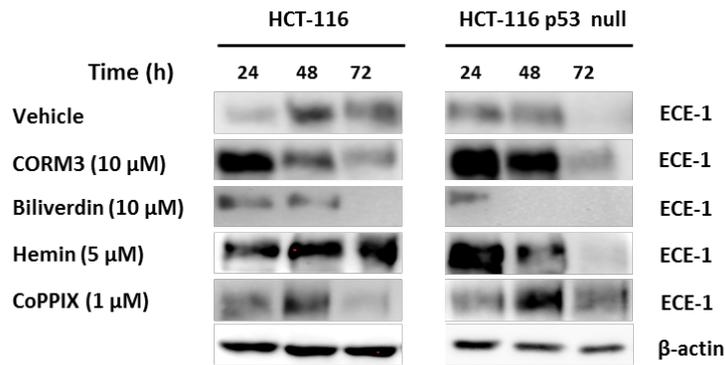
	P53 salvaje					
	HO-1	P <sup>a</sup>	ECE-1	P <sup>a</sup>	EDN-1	P
<b>Edad<sup>b</sup></b>						
≤ 72	0,78 (0,46-2,68)	ns	1,18 (0,80-3,81)	ns	0,85 (0,52-1,21)	ns
>72	1,14 (0,64-2,00)		1,11 (0,65-2,83)		0,80 (0,26-1,47)	
<b>Sexo</b>						
Male	0,90 (0,54-2,47)	ns	1,16 (0,85-4,91)	ns	1,14 (0,65-3,55)	ns
Female	0,74 (0,52-1,70)		1,15 (0,62-2,27)		1,32 (0,47-2,72)	
<b>TNM</b>						
I+II	0,90 (0,52-2,06)	ns	1,17 (0,77-2,53)	ns	0,86 (0,40-1,21)	ns
III+IV	0,74 (0,53-2,90)		1,11 (0,63-8,06)		0,84 (0,42-1,38)	

<b>Grado de diferenciación</b>						
	0,58 (0,45-1,23)	ns	1,04 (0,77-2,19)	ns	0,66 (0,42-1,21)	ns
Well	1,14 (0,58-2,94)		1,34 (0,70-4,51)		0,90 (0,38-1,51)	
Moderately	1,14 (0,71-3,52)		1,40 (1,06-3,79)		0,74 (0,31-1,08)	
Poor						
<b>P53 mutado</b>						
	<b>HO-1</b>	<b>P<sup>a</sup></b>	<b>ECE-1</b>	<b>P<sup>a</sup></b>	<b>EDN-1</b>	<b>P<sup>a</sup></b>
<b>Edad<sup>b</sup></b>						
≤72	1,18 (0,80-3,81)	ns	1,11 (0,46-5,26)	ns	0,85 (0,39-2,15)	ns
>72	1,11 (0,65-2,83)		1,25 (0,63-2,10)		0,92 (0,48-1,77)	
<b>Sexo</b>						
Male	1,16 (0,85-4,91)	ns	1,14 (0,65-3,55)	ns	0,90 (0,55-2,15)	ns
Female	1,15 (0,62-2,27)		1,32 (0,47-2,72)		0,86 (0,30-1,67)	
<b>pTNM</b>						
I+II	1,17 (0,77-2,53)	ns	1,40 (0,64-2,83)	ns	0,86 (0,40-2,10)	ns
III+IV	1,11 (0,63-8,06)		1,02 (0,53-3,13)		0,89 (0,50-1,70)	
<b>Grado de diferenciación</b>						
Well						
Moderately	1,04 (0,77-2,19)	ns	1,36 (0,64-2,31)	ns	0,72 (0,31-2,37)	ns
Poor	1,34 (0,70-4,51)		1,25 (0,52-4,66)		0,95 (0,64-1,74)	
	1,40 (1,06-3,79)		1,39 (0,70-0,85)		0,72 (0,32-1,33)	

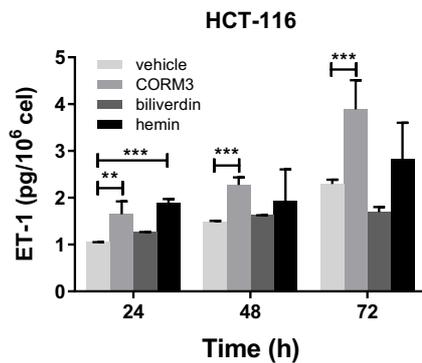
<sup>a</sup> los valores P se obtuvieron mediante las pruebas no paramétricas de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis non-parametric tests; <sup>b</sup> Dicotomizado por la mediana.

A continuación, investigamos cuál de los subproductos de la reacción enzimática de la HO-1 es responsable de la activación de la ECE-1. Para evaluar esto, tratamos las células con CORM3 10  $\mu$ M (un donante de CO) y biliverdina 10  $\mu$ M. También utilizamos tratamientos con 5  $\mu$ M de hemina y 1  $\mu$ M de CoPPIX como controles positivos. CORM3, hemina y CoPPIX indujeron la expresión de la proteína ECE-1 a las dosis utilizadas en las células HCT-116 y HCT-116 p53 null, mientras que la biliverdina no pudo inducirla (Figura 14a).

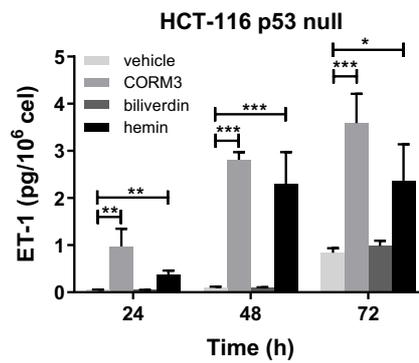
También estudiamos la producción de la ET-1 por las células después de los tratamientos a las dosis especificadas anteriormente (Figuras 14b, 14c). CORM3 indujo un aumento significativo en la producción de la ET-1 en todos los momentos analizados en ambas líneas celulares. El tratamiento con hemina indujo un aumento de la producción de la ET-1 en las células HCT-116, aunque solo después de 24 horas, mientras que este efecto apareció después de 24, 48 y 72 horas en las células HCT-116 p53 null. Como se muestra en la Figura 14d, el CO parecía inducir la expresión de la ECE-1 a través de la activación de pNF- $\kappa$ B y pc-Jun en HCT-116 y HCT-116 p53 null, respectivamente.



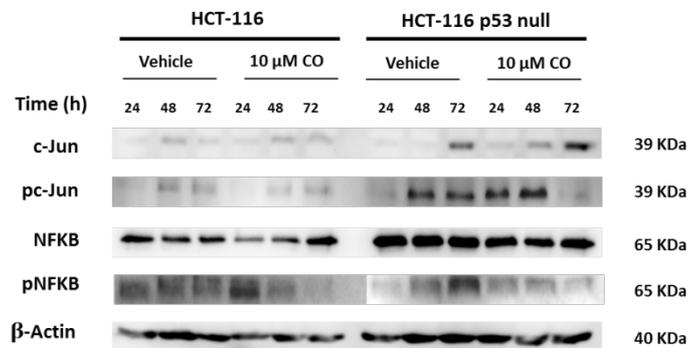
(a)



(b)



(c)



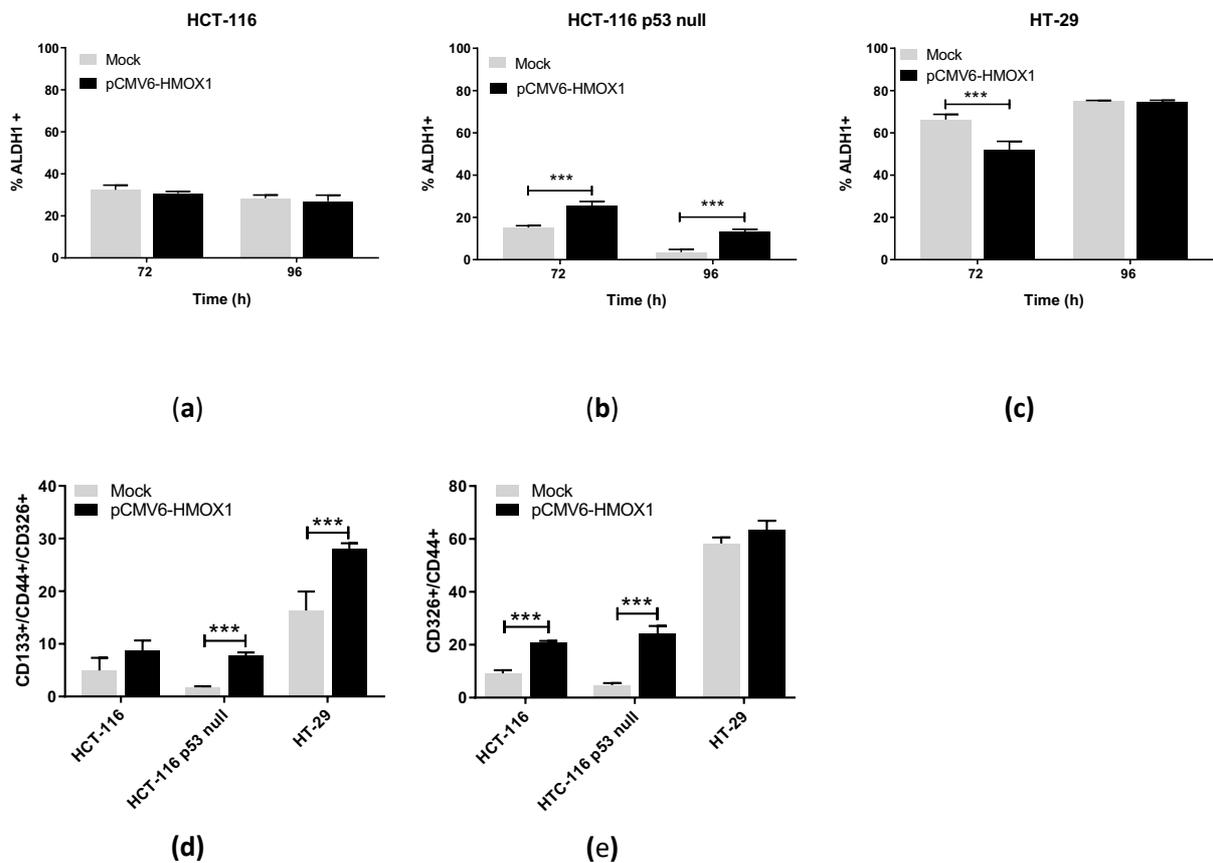
(d)

**Figura 14.** El CO induce la expresión de la ECE-1 en las células del CCR *in vitro*. Se trataron células nulas HCT-116 y HCT-116 p53 con CORM3 10 μM, biliverdina 10 μM, hemina 5 μM y CoPPIX 1 μM durante 24, 48 y 72 horas. Después de los tratamientos, recolectamos (a) células para el análisis de la expresión de la proteína ECE-1 por transferencia Western y sobrenadantes para el análisis de la ET-1 en (b) HCT-116 y (c) HCT-116 células nulas p53. Los datos representan la mediana ± DE de dos experimentos realizados por duplicado. \*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,01$ ; \*\*\*,  $P < 0,001$ . (d) Mecanismo de expresión de la ECE-1 inducida por el CO en las células CCR. Las células se trataron con CORM3 10 μM y se recogieron para el análisis de la expresión de las proteínas c-Jun, pc-Jun, NF-κβ y pNF-κβ en lisados de células completas mediante transferencia Western. La expresión de β-actina se utilizó como limpieza.

### 3. La sobreexpresión de la HO-1 induce las propiedades stem en las líneas celulares del CCR a través de ECE-1/ET-1 solo en células p53 salvaje

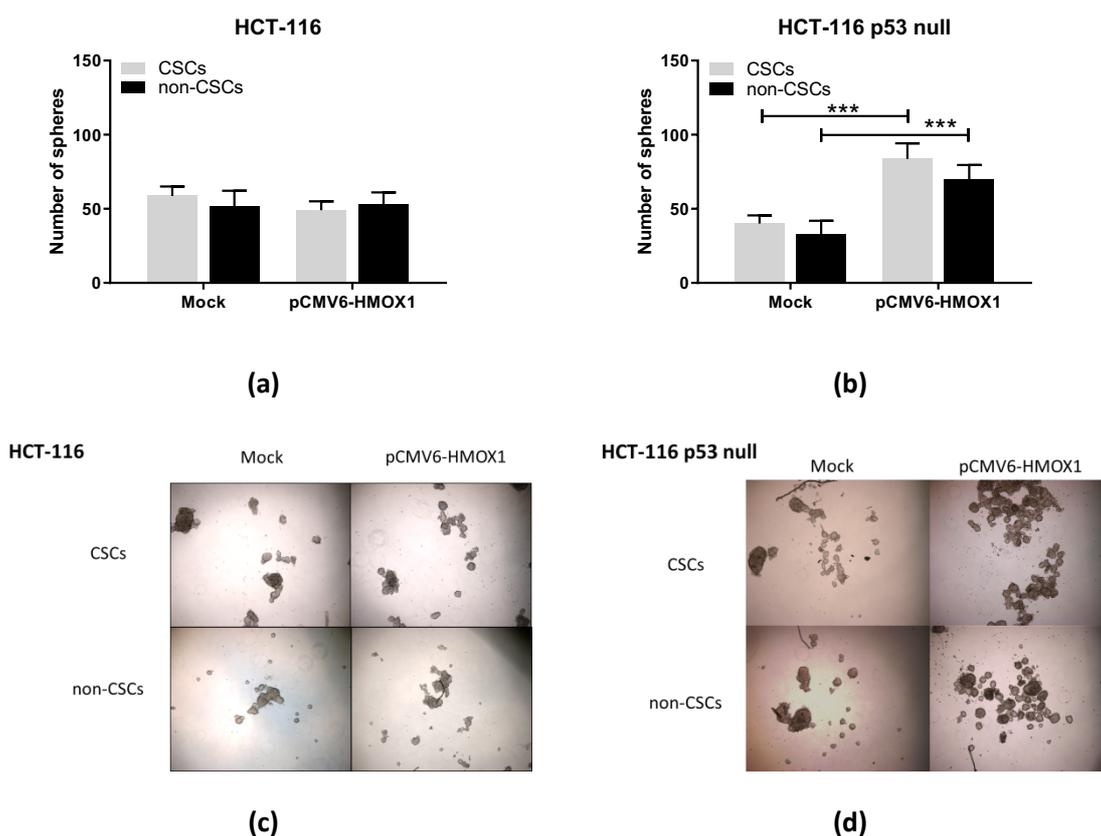
Para estudiar si la sobreexpresión de la HO-1 induce propiedades stem en nuestro modelo de CCR in vitro a través de la ET-1 producido por la ECE-1, analizamos el porcentaje de las células ALDH1+ después de la sobreexpresión de la HO-1 en presencia de bosentan, un antagonista de los receptores ETAR y ETBR. En este caso, y al contrario de lo que sucedió en ausencia de bosentan, la sobreexpresión de la HO-1 no fue capaz de inducir un aumento de la subpoblación ALDH1+ en células HCT-116 (Figura 15a), y el porcentaje de células CD133+/CD44+/CD326+ en la TP fue similar en pCMV6-HMOX1 frente a células transfectadas simuladas (Figura 15d). Sin embargo, el porcentaje de células CD44+/CD326+ aumentó en pCMV6-HMOX1 frente a células mock (Figura 15e).

Por el contrario, la adición de bosentan después de la sobreexpresión de la HO-1 condujo a un aumento en el porcentaje de las células ALDH1+ a las 72 y 96 horas después de la transfección (Figura 15b) y también a la aparición de la subpoblación CD133+/CD44+/CD326+ en HCT-116 p53 null (Figura 15e). En las células HT-29, la presencia de bosentan después de la sobreexpresión de la HO-1 no modificó el porcentaje de células ALDH1+, aunque la subpoblación CD44+/CD326+ parece disminuir mientras que la diferencia en el porcentaje de la subpoblación CD133+/CD44+/CD326+ aumentó en pCMV6-HMOX1 versus células transfectadas simuladas (Figuras 15d, 15e) al comparar este resultado en ausencia de bosentan (Figura 15d).



**Figura 15.** Las células fueron transfectadas con pCMV6-HMOX1 o simuladas, tratadas con bosentan 10  $\mu$ M 24 horas después, recolectadas a las 72 y 96 horas después de la transfección y utilizadas para caracterizar el porcentaje de células ALDH1+ por citometría de flujo en la TP de (a) HCT-116, (b) HCT-116 p53 null, y (c) células HT-29 CCR. En otros experimentos, las células se recolectaron 96 horas después de las transfecciones con pCMV6-HMOX1 o vector vacío (mock) y se usaron para cuantificar en TP (d) el porcentaje de células CD133+/CD44+ CD326+ y (e) CD44+/CD326+. Los datos representan la media  $\pm$  DE de dos experimentos realizados por duplicado. \*, P <0,05; \*\*, P <0,01; \*\*\*, P <0,001.

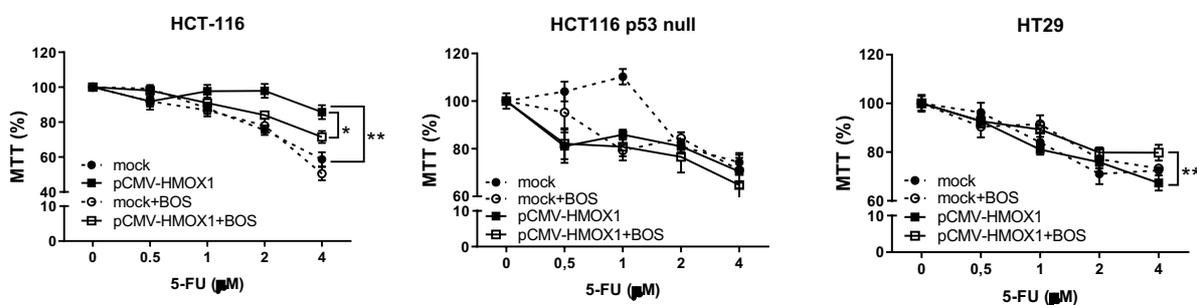
La presencia de bosentan en los medios de cultivo también influyó en la capacidad de autorrenovación de subpoblaciones de las CMCs y las no CMCs extraídas de HCT-116 y HCT-116 p53 null transfectadas transitoriamente con vector vacío (mock) y plásmido pCMV6-HMOX1. En estas condiciones de trabajo, la capacidad de las subpoblaciones para formar esferas fue similar en células HCT-116 transfectadas con pCMV6-HMOX1 y simuladas (Figura 16a). Sin embargo, las subpoblaciones de las CMCs y no CMCs de las HCT-116 p53 null aumentaron su capacidad para formar esferas (Figura 16b).



**Figura 16.** Influencia de la sobreexpresión de la HO-1 sobre la capacidad de formación de esfera tumoral de subpoblaciones del CCR aisladas en presencia de bosentan 10  $\mu$ M. Número de esferas formadas por subpoblaciones obtenidas a partir de las células simuladas y pCMV6-HMOX1 (a) HCT-116 y (b) HCT-116 p53 nulls transfectadas transitoriamente. Imágenes representativas de las esferas tumorales formadas a partir de diferentes subpoblaciones de pCMV6-HMOX1 (c) HCT-116 y (d) HCT-116 p53 null células transfectadas transitoriamente. \*, P <0,05; \*\*, P <0,01; \*\*\*, P <0,001.

#### 4. La sobreexpresión de la HO-1 induce resistencia al tratamiento con 5-FU en CCR in vitro

Dada la implicación de las CMCs en la resistencia a la terapia en el cáncer, analizamos el tiempo que la sobreexpresión de la HO-1 induce este efecto en el CCR in vitro y la mediación del sistema ECE-1/ET-1 en él. El tratamiento de las células HCT-116, HCT-116 p53 null y HT-29 transfectadas con pCMV6-HMOX1 y control con 5-fluorouracilo (5-FU) a diferentes dosis (0-4  $\mu\text{M}$ ) mostró que la sobreexpresión de la HO-1 inducía resistencia a este tratamiento en HCT-116 (Figura 17a). No encontramos sensibilidad diferente al 5-FU después de la sobreexpresión de la HO-1 ni en células HCT-116 p53 null ni en células HT-29 (Figuras 17b, 17c), al menos a las dosis de 5-FU utilizadas. La presencia de bosentan en los medios de cultivo sensibilizó a las células HCT-116 que sobreexpresan HO-1 a 5-FU (Figura 17a), sin embargo, no se encontró ningún efecto en las células HCT-116 p53 null (Figura 17b). Por el contrario, en las células HT-29 transfectadas con pCMV6-HMOX1, la presencia de bosentan indujo resistencia al 5-FU (Figura 17c).



**Figura 17.** Influencia de la sobreexpresión de la HO-1 sobre la resistencia a la terapia en el CCR. Como se describe en la sección Materiales y métodos, las células se sembraron en placas de 96 pocillos, se transfectaron con vector o plásmido pCMV6-HMOX1 y se trataron con dosis crecientes de 5-FU (0-4- $\mu\text{M}$ ) durante 72 horas en presencia o ausencia de bosentan 10  $\mu\text{M}$ . La viabilidad de las células se analizó usando el ensayo MTT en (a) HCT-116, (b) HCT-116 p53 null y (c) células HT-29. Los datos representan la media  $\pm$  DE de dos experimentos realizados por cuadruplicado. \*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,01$ ; \*\*\*,  $P < 0,001$ .

## DISCUSIÓN

En los últimos años, numerosos trabajos de investigación han intentado dilucidar el papel de la HO-1 en el cáncer colorrectal. Esta no ha sido una tarea fácil, ya que esta enzima se encuentra tanto en las células cancerosas como en las del estroma, incluidas las células inmunes [Sebastián y cols., 2018; Puentes-Pardo y cols., 2020; Germanova y cols., 2021; Hemmati y cols., 2021]. Además, la HO-1 en las células del CCR es capaz de regular la citotoxicidad inmunomediada contra las células CCR [Seo y cols., 2015]. En este complejo escenario, los resultados de la literatura científica muestran efectos contradictorios de la HO-1 en este tipo de cáncer [Hellmuth y cols., 2002; Becker y cols., 2007; Kim y cols., 2011; Andrés y cols., 2014; Lien y cols., 2014; Seo y cols., 2015], lo que pone de manifiesto la necesidad de continuar en este campo de investigación.

Usamos las líneas celulares de CCR HCT-116, HCT-116 p53 null y HT-29 para realizar nuestro modelo in vitro. Estas células tienen la capacidad de formar esferas tumorales dentro de 3-5 días después de ser sembradas en placas y con medios apropiados [Lee y cols., 2015; Ryoo y cols., 2016; Shiokawa y cols., 2020], lo que nos permitió llevar a cabo nuestro estudio a pesar de que la transformación de las células parentales se realizó mediante transfección transitoria. [Leis y cols., 2012; Sharif y cols., 2017].

En este estudio encontramos que la HO-1 regula la proporción y el fenotipo de CMCs en el CCR, un resultado que no es sorprendente considerando que también encontramos mayor expresión de esta proteína en la subpoblación de las CMCs en comparación con las no CMCs en los cultivos celulares. En los tumores de pacientes con el CCR, las muestras con mayor expresión de marcadores de las CMCs también mostraron una mayor expresión de la HO-1. Estos resultados concuerdan con trabajos previos que informaron una implicación directa de la HO-1 en la regulación de las CMCs en leucemia, glioma, melanoma, cáncer de mama, páncreas y pulmón [Leis y cols., 2012; Zhan y cols., 2012; Ghosh y cols., 2016; Abdalla y cols., 2019]. Según nuestros resultados, la HO-1 podría regular las propiedades stem en el CCR independientemente de p53, sin embargo, informes anteriores demostraron una relación importante entre ellos [Nam y Sabapathy, 2011; Andrés y cols., 2014]. De hecho, la HO-1 es un gen diana dependiente de p53 que es responsable de la supervivencia celular dependiente de p53 después del tratamiento oxidativo [Nam y Sabapathy, 2011]. Otros trabajos sugieren que la actividad de la HO está implicada en la regulación de la expresión de p53 en células normales [Lee y cols., 2008] y cancerosas [Kim y cols., 2014].

En nuestro modelo in vitro, el CO producido después de la sobreexpresión de la HO-1 conduce a una mayor expresión de la secreción de la ECE-1 y la ET-1 por las células del CCR, a través de la activación de NF- $\kappa$ B y AP-1 en células que albergan una p53 salvaje y en células con una p53 mutada, respectivamente. Estos factores de transcripción son esenciales para la activación de la ECE-1 en las células endoteliales [Martínez-Miguel y cols., 2017]. Se ha informado que la molécula liberadora de CO CORM3 activa la AP-1 in vitro [Serizawa y cols., 2015; Lin y cols., 2017]. La regulación de NF- $\kappa$ B por el CO se ha descrito previamente en varios modelos patofisiológicos [Brouard y cols., 2002; Chhikara y cols., 2009]. Esta molécula también es capaz de inducir la producción de las ROS in vitro [Mizuguchi y cols., 2010]. Curiosamente, la producción de las ROS y la activación de NF- $\kappa$ B son eventos

críticos en la aparición de las CMCs y la iniciación del CCR [Myant y cols., 2013]. La biliverdina no pudo activar la vía ECE-1/ET-1 en nuestro estudio. La biliverdina se convierte en bilirrubina por la bilirrubina reductasa [Vitek y Schwertner, 2007]. Las propiedades captadoras de las ROS de ambos metabolitos del hemo contribuyen a sus actividades antitumorales [Zheng y cols., 2014; Chiang y cols., 2018].

No analizamos el posible papel del ion ferroso en la inducción de ECE/ET-1 por sobreexpresión de la HO-1. De manera similar a la bilirrubina, la literatura hasta la fecha muestra efectos protectores del hierro ferroso contra el cáncer principalmente debido a la inducción de la ferroptosis y muerte celular [Trachootham y cols., 2009; Chiang y cols., 2018; Kajarabille y Latunde-Dada, 2019; Puentes-Pardo y cols., 2020].

El sistema de la endotelina regula las propiedades stem de las células en el CCR. El gen END-1 está altamente expresado en las CMCs aisladas de las células CCR cultivadas [Puglisi y cols., 2011]. La ET-1 regula vías importantes para el mantenimiento del fenotipo stem, como MAPK, PI3K/Akt y Wnt/ $\beta$ -catenina [Cianfrocca y cols., 2017]. Sin embargo, dada la corta vida media de la ET-1, sus efectos biológicos dependen totalmente del mantenimiento de una concentración crítica por la ECE-1 [Pérez-Moreno y cols., 2020]. De las cuatro isoformas descritas de la ECE-1 (a, b, c y d), la ECE-1c se ha implicado en la generación de las CMCs en el CCR [Pérez-Moreno y cols., 2020]. En nuestro estudio, no analizamos qué isoforma de la ECE-1 aumentó después de la sobreexpresión de la HO-1. Sin embargo, el bloqueo de los receptores ETAR y ETBR con bosentan provocó una disminución en la población ALDH1+, en el porcentaje de células CD133+/CD44+/CD326+ y en la resistencia al tratamiento con 5-FU en la población total, y una disminución en la capacidad de autorrenovación de la subpoblación de las CMCs p53 salvaje. Estudios previos informaron que los receptores ETAR son responsables de las propiedades stem mediadas por la ET-1 en el CCR [Cianfrocca y cols., 2017].

Por otro lado, el tratamiento con bosentan después de la sobreexpresión de la HO-1 induce un aumento en la ALDH1+ y la aparición de las subpoblaciones CD133+/CD44+/CD326+ en la población total, y una mayor capacidad para formar esferas en la subpoblación de las CMCs p53 null. De manera similar, en las células que albergan una p53 mutada, el bloqueo de ETAR indujo la pérdida de células CD44+/CD326+ y un aumento de las CD133+/CD44+/CD326+. Estos resultados podrían indicar que a pesar de que la sobreexpresión de la HO-1 induce una mayor expresión de la ECE-1 y la ET-1 en la producción de p53 independientemente, en células sin p53 activa o incluso p53 con ganancia de función, como las células HT-29, otro mecanismo que no implica el sistema ECE-1/ET-1 es responsable del aumento de la subpoblación madre en estas células. Más interesante aún, el sistema ECE-1/ET-1 inducido por la HO-1 parece ejercer un efecto protector en estas células del CCR no activas de p53 con ganancia de función. Contrariamente a estos resultados, informes anteriores mostraron que el tratamiento con bosentan es pro-apoptótico y antiproliferativo en las células HT-29 [Peduto y cols., 2003] y las sensibiliza a la muerte celular inducida por Fas-L [Eberl, Egidy y cols., 2000; Eberl, Valdenaire y cols., 2000; Eberl]. También se ha descrito un mecanismo de la ECE-1 independiente de la ET-1 en el CCR y otros cánceres, pero siempre actúa como una proteína protumoral [Pérez-Moreno y cols., 2020]. Por el contrario, los ensayos clínicos con antagonistas de los receptores de endotelina aprobados, incluido el bosentan, no fueron tan prometedores y no obtuvieron resultados

estadísticamente significativos, a pesar de que los fármacos fueron bien tolerados [Enevoldsen y cols., 2020]. Aunque se necesitan más investigaciones para confirmar nuestros resultados, probablemente la sobreexpresión de la HO-1 activa o inactiva ciertas rutas desconocidas que podrían inducir estas respuestas contrarias al bosentan en nuestro modelo.

## CONCLUSIONES

1. La sobreexpresión de HO-1 aumenta la proporción de células cancerosas con fenotipo stem en modelos in vitro de CCR e independientemente del estado de p53.
2. Así mismo, la sobreexpresión de HO-1 aumenta la capacidad de autorrenovación de la subpoblación de CMCs en modelos in vitro de CCR e independientemente del estado de p53.
3. La sobreexpresión de HO-1 también aumenta la expresión de ECE-1 y la producción de ET-1 en modelos in vitro de CCR e independientemente del estado de p53. El CO producido por la HO-1 parece ser responsable de este efecto. En el caso de células con p53 en estado salvaje, el CO induce la fosforilación de NF- $\kappa$ B, mientras que en células con p53 no activo, induce la fosforilación de AP-1.
4. El sistema ECE-1/ET-1 es responsable de la inducción del fenotipo stem por la HO-1 en el CCR únicamente en el caso de que p53 se encuentre en estado salvaje. En el caso de que p53 no se encuentre activo o esté mutado con ganancia de función, la ET-1 producida en el último paso de su síntesis por el ECE-1 actúa como protector e inhibe el fenotipo stem.
5. La sobreexpresión de HO-1 induce resistencia al tratamiento con 5-FU en células de CCR en cultivo en las que el gen p53 se encuentra en estado salvaje, mientras que no afecta cuando p53 se encuentra inactivo o mutado con ganancia de función. La ET-1 es responsable de la resistencia al tratamiento inducida por la sobreexpresión de HO-1 en células en las que p53 se encuentra en estado salvaje, mientras que cuando p53 está mutado con ganancia de función el bloqueo de los receptores de ET-1 aumenta la resistencia al tratamiento.
6. Los pacientes portadores de tumores con expresión alta de HO-1 y ECE-1 y un p53 no salvaje, deben ser considerados para terapias basadas en HO-1 en lugar de terapias basadas en antagonistas de los receptores de ET-1.

# ABREVIATURAS

**AJCC:** American Joint Committee on Cancer

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**Ang II:** angiotensina-II

**AKT:** proteína quinasa B

**ALDH:** aldehído deshidrogenasa

**AP:** proteína activadora

**APC:** gen Adenomatous polyposis coli

**ARN:** ácido ribonucleico

**ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero

**5-ASA:** ácido 5-aminosalicílico

**ATF:** focos atípicos aberrantes

**ABT-627:** atrasentan

**BAA:** BODIPY-aminoacato

**BAAA:** BODIPY-aminoacetaldehído

**$\beta$ -arr1:** transductor de la señalización  $\beta$ -arrestina1

**BMP:** bone morphogenetic protein, proteína ósea morfogenética

**BV:** biliverdina

**CA 19-9:** antígeno carbohidratado

**CCHNP:** carcinoma colorrectal hereditario no polipósico

**CCR:** carcinoma colorrectal

**CCR-CMCs:** células madres cancerosas del CCR

**CEA:** antígeno carcinoembrionario

**CIN:** chromosomal instability, inestabilidad cromosómica del genoma

**CORM3:** molécula liberadora del CO

**CM:** células madre

**CMCs:** células madre cancerosas (*cancer stem cells = CSCs, tumour-initiating cells*)

**CMT:** tratamiento neoadyuvante modalidad combinada.

**CO:** monóxido de carbono

**CoPP:** protoporfirina de cobalto

**COX:** ciclooxigenasa

**DEAB:** dietilaminobenzaldehído

**DCC:** gen Deleted in Carcinoma Colorrectal

**E74-like factor3:** factor de transcripción ELF-3

**ECE:** enzima convertidora de endotelina

**ECM:** matriz extracelular

**EDN:** gen codificador de endotelina

**EE.UU.:** Estados Unidos

**EGF:** epidermal growth factor, factor epidérmico de crecimiento)

**ELISA:** ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

**EOR:** secuestradores del sistema ROS

**ET:** endotelina

**ETAR:** receptor de endotelina A

**ETBR:** receptor de endotelina B

**FASL:** ligando FAS, proteína de superficie de la familia TNF

**FoxO1:** forkhead box protein O1

**5FU:** 5 fluorouracilo

**GC/GMPc:** guanilato ciclasa soluble/guanosina monofosfato cíclico

**GJCS:** desmontaje de las uniones intercelulares

**GLOBOCAN:** Global Cancer Observatory

**GM-CSF:** colonias de granulocitos y macrófagos

**GPCRs:** G protein – coupled receptors, receptores acoplados a las proteínas G

**HIF 1:** factor inducible por la hipoxia 1

**HO:** hemooxigenasa

**HSP-32:** heat shock protein-32

**IARC:** International Agency for Resaerch on Cancer

**IL:** Interleuquina

**ICAM-1:** molécula de adhesión intracelular endotelial (ICAM-1)

**iNOS:** la óxido nítrico sintasa endotelial

**IQR:** rango intercuartílico

**KLF4:** factor de transcripción con dedos de zinc (Kruppel-like factor 4)

**LPS:** lipopolisacárido bacteriano

**LV:** leucovorina

**MAP:** poliposis asociada al gen MYH

**MAPK:** proteína activada por mitógeno p38 quinasa

**MCC:** gen mutaded in carcinoma colorrectal

**MDF:** focos agotados de mucina

**mM:** milimolar

**MMP:** metaloproteinasas

**MMR:** mismatch repair, Sistema de Reparación de malapareamiento

**MSI:** microsatellite listability, inestabilidad de microsatélites

**MTT:** (3-[4,5-dimetil-fiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio)

**NEP:** endopeptidasa extracelular neutral, neprilisina

**NF- $\kappa$ B:** factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas, factor de transcripción nuclear-kB

**NO:** monóxido de nitrógeno

**Nrf2:** nuclear factor erythroid 2 related 2

**ONOO<sup>-</sup>:** peroxinitrito

**p53:** proteína supresora de tumores

**PAF:** poliposis adenomatosa familiar

**PAFA:** poliposis adenomatosa familiar Aatenuada

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa

**p125 FAK:** quinasa de adhesión focal

**PGE<sub>2</sub>:** dinoprostona

**PGI<sub>2</sub>:** prostaglandina I<sub>2</sub>

**PKA:** Proteína Quinasa A

**PKC:** Proteína Quinasa C

**PI3K:** Fosfatidilinositol 3 quinasa

**RBTA:** Red Andaluza de Banco de Tumores (RBTA)

**ROS:** especies reactivas de oxígeno

**siRNA:** células transfectadas con ARN interferente pequeño

**SOH:** sangre oculta en heces

**SMAD:** factores de transcripción SMAD. Son las proteínas principales transductoras de las vías de señalización TGF- $\beta$  (transforming growth factor-beta) y BMP (bone morphogenic protein)

**SNC:** sistema nervioso central

**SnPP:** protoporfirina de estaño

**TAC:** Tomografía Axial Computerizada

**TAM:** macrófagos asociados al tumor

**TCF-4:** zona específica de unión en la región promotora del gen de la ET-1

**TGF  $\beta$ :** transforming growth factor  $\beta$

**TIMP:** inhibidor tisular de la MMP1

**TNF- $\alpha$ :** factor de necrosis tumoral

**TNM:** T tamaño del Tumor, N afectación o no de ganglios linfáticos regionales, M presencia o no de metástasis a distancia

**TP:** población total

**UFT:** tegafur-uracilo

**UICC:** Unión Internacional Contra el Cáncer

**VEGF:** factor de crecimiento de endotelio vascular

**VEGFR3:** factor de crecimiento endotelial vascular del receptor 3

**ZD4054:** zibotentan

**ZnPP:** protoporfirina del zinc

## BIBLIOGRAFÍA

Aarnio M, Sankila R, Pukkala E. Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes. *Int J Cancer* 1999;81:214-8.

Abassi ZA, Tate JE, Golomb E, Keiser HR. Role of neutral endopeptidase in the metabolism of endothelin. *Hypertension* 1992;20:89-95.

Abbasoğlu SD, Erbil Y, Eren T, Giriş M, Barbaros U, Yücel R, Olgaç V, Uysal M, Toker G. The effect of heme oxygenase-1 induction by octreotide on radiation enteritis. *Peptides* 2006; 27:1570-1576.

Abdalla MY, Ahmad IM, Rachagani S, Banerjee K, Thompson CM, Maurer HC, Olive KP, Bailey KL, Britigan BE, Kumar S. Enhancing responsiveness of pancreatic cancer cells to gemcitabine treatment under hypoxia by heme oxygenase-1 inhibition. *Transl Res* 2019;207:56-69.

Abdelbaset-Ismail A, Borkowska-Rzeszotek S, Kubis S, Bujko K, Brzeźniakiewicz-Janus K, Ratajczak M. Activation of the complement cascade enhances motility of leukemic cells by downregulating expression of HO-1. *Leukemia* 2017;31:446-458.

Adamiak M, Abdelbaset-Ismail A, Moore J, Zhao J, Ratajczak M. Inducible Nitric Oxide Synthase Is a Novel Negative Regulator of Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Trafficking. *Stem Cell Rev and Rep* 2017;13:92-103.

Adamiak M, Moore JB, Zhao J, Abdelbaset-Ismail A, Grubczak K, Borkowska S, Ratajczak M. Downregulation of heme oxygenase 1 (HO-1) activity in hematopoietic cells enhances their engraftment after transplantation. *Cell Transplant* 2016;25:1265-1276.

Agarwal A, Balla J, Alam J, Croatt AJ, Nath KA. Induction of heme oxygenase in toxic renal injury: A protective role in cisplatin nephrotoxicity in the rat. *Kidney Int* 1995;48:1298-1307.

Akaike T, Sato K, Ijiri S, Miyamoto Y y cols. Bactericidal activity of alkyl peroxy radicals generated by heme-iron-catalyzed decomposition of organic peroxides. *Arch Biochem Biophys* 1992;294:55-63.

Akerley WL, Moritz TE, Ryan LS. y cols. Racial comparison of outcomes of male Department of Veterans Affairs patient with lung and colon cancer. *Arch Intern Med* 1993;153:1681-8.

Alam J, Cai J, Smith A. Isolation and characterization of the mouse heme oxygenase-1 gene. Distal 5' sequences are required for induction by heme or heavy metals. *J Biol Chem* 1994;269:1001-9.

Alam J, Cook JL. How many transcription factors does it take to turn on the heme oxygenase-1 gene? *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007;36:166-74.

Alanen K, Deng DX, Chakrabarti S. Augmented expression of endothelin-1, endothelin-3 and the endothelin-B receptor in breast carcinoma. *Histopathology* 2000;36:161-167.

Alberts SR, Sargent DJ, Nair S. Effect of oxiplatin, fluorouracil and leucovorin with or without cetuximab on survival among patients with resected stage III colon cancer: a randomized trial. *JAMA* 2012;307:1383-93.

Alcaraz MJ, Fernández P, Guillén MI. Anti-inflammatory actions of the heme oxygenase-1 pathway. *Curr Pharm Des* 2003;9:2541-51.

Alexander DD, Weed DL, Miller PE, Mohamed MA. Red Meat and Colorectal Cancer: A Quantitative Update on the State of Epidemiologic Science. *J Am Coll Nutr* 2015;34:521-543.

Alison MR, Lin WR, Lim SM, Nicholson LJ. Cancer stem cells: in the line of fire. *Cancer Treat Rev* 2012;38:589-98.

Allegra CJ, Yothers G, O'Connell MJ. Bevacizumab in stage II-III colon cancer: 5-year update of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project C-08 trial. *J Clin Oncol* 2013;31:359-64.

Amin MB; Green FL, Edge S, Schilsky RL, Gaspar LE, Washington MK, Sullinvan DC, Brookland RK. *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th edition. Milburn Jessup J and cols. Chapter 20: Colon and rectum. New York: Springer 2016.

Andre T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L. Oxaplatin, flourouracil and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Eng J Med* 2004;250:2343-51.

Andre T, Boni C, Navarro M. Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil and leucovorin as adjuvant treatment in stage II and III colon cancer in the MOCAIC Trial. *J Clin Oncol* 2009;27:3109-16.

Andrés, N.C, Fermento, M.E, Gandini, N.A, Romero, A.L, Ferro, A, Donna, L.G, Curino, A.C, Facchinetti, M.M. Heme oxygenase-1 has antitumoral effects in colorectal cancer: involvement of p53. *Exp Mol Pathol* 2014;97:321-331.

Anguelova E, Beuvon F, Leonard N, Chaverot N, Varlet P, Couraud PO. Functional endothelin ET B receptors are selectively expressed in human oligodendrogliomas. *Brain Res Mol Brain Res* 2005;137:77-88.

Appelt AL, Ploen J, Harling H, Jensen FS, Jensen LH, Jorgensen JC. High-dose chemioradiotherapy and watchful waiting for distal rectal cancer: A prospective observational study. *Lancet Oncol* 2015;16:919-27.

Arenas RB, Fichera A, Mhoun D, Michaellasi F. Incidence and therapeutic implications of synchronous colonic pathology in colorectal adenocarcinoma. *Surgery* 1997;122:706-10,

Aschele C, Pinto C, Cordio S. on behalf of STAR Network Investigators. Preoperative fluorouracil-based chemoradiation with and without weekly oxaliplatin in locally advanced rectal cancer; pathologic response analysis of the Studio Terapia Adiuvante Retto (STAR)-01 randomized phase III trial. *J Clin Oncol* 2010;28:CRA4008.

- Asham E, Shankar A, Loizidou M, Fredericks S, Miller K, Boulos PB. Increased endothelin-1 in colorectal cancer and reduction of tumour growth by ETA receptor antagonism. *Br J Cancer* 2001;85:1759–1763.
- Atkin WW, Morson BC, Cuzick J. Long-term risk of colorectal cancer after excision of rectosigmoid adenomas. *N Engl J Med* 1992;326:658-62.
- Baek JH, Jang JE, Kang CM, Chung HY, Kim ND, Kim KW. Hypoxia-induced VEGF enhances tumor survivability via suppression of serum deprivation-induced apoptosis. *Oncogene* 2000;19:4621–31.
- Bagnato A, Loizidou M, Pflug BR, Curven J, Growcott J. Role of the endothelin axis and its antagonists in the treatment of cancer. *Br J Pharmacol* 2011;163:220-233.
- Bagnato A, Rosanò L, Spinella F, Di Castro V, Tecce R, Natali PG. Endothelin B receptor blockade inhibits dynamics of cell interactions and communications in melanoma cell progression. *Cancer Res* 2004;64:1436–1443.
- Bagnato A, Rosanò L. The endothelin axis in cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40:1443–1451.
- Bagnato A, Spinella F, Rosano L. Emerging role of the endothelin axis in ovarian tumor progression. *Endocr Relat Cancer* 2005;12:761-772.
- Bagnato A, Spinella F. Emerging role of endothelin-1 in tumor angiogenesis. *Trends Endocrinol* 2002;14:44-50.
- Bakx R, Visser O, Josso J, Meijer S, Slors JF, van Lanschot JB. Management of recurrent rectal cancer: A population study in greater Amsterdam. *World J Gastroenterol* 2008;14:6018-23.
- Baltazares Lipp M, Rodríguez Crespo H, Ortega Martínez J, Sortes-Vega A, Baltazares Lipp ME. Sistema Endotelina. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2005;18(4): 308-320.
- Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M y cols. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* 2007, 449:1003-7.
- Baron JA, Beach M, Mandel JS. y cols, Calcium supplements for the prevention of colorectal adenomas. *N Engl J Med* 1999;340:101-7.
- Barrañano DE, Wolosker H, Bae BI, Barrow RK, Snyder SH, Ferris CD. A mammalian iron ATPase induced by iron. *J Biol Chem* 2000;275:15166-73.
- Barth AI, Näthke I, Nelson WJ. Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:683-690.
- Barton SG, Rampton DS, Winrow VR, Domizio P, Feakins RM. Expression of heat shock protein 32 (hemoxygenase-1) in the normal and inflamed human stomach and colon: an immunohistochemical study. *CellStress Chaperones* 2003;8:329-334.

Bastos LG, de Marcondes PG, de-Freitas-Junior JC, Leve F, Mencalha AL, de Souza WF, de Araujo WM, Tanaka MN y cols. Progeny from irradiated colorectal cancer cells acquire an EMT-like phenotype and active Wnt/beta-catenin pathway. *J Cell Biochem* 2014;115:2175-2187.

Basu S, Haase G, Ben-Ze'ev A. Wnt signaling in cancer stem cells and colon cancer metastasis. *F1000Res* 2016;5.

Battle E, Henderson JT, Beghtel H, van den Born MM, Sancho E, Meeldijk J y cols. Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell* 2002;111:251-63.

Becker JC, Fukui H, Imai Y, Sekikawa A, Kimura T, Yamagishi H, Yoshitake N, Pohle T, Domschke W, Fujimori T. Colonic expression of heme oxygenase-1 associated with a better long-term survival in patients with colorectal cancer. *Scand J Gastroenterol* 2007;42:852-8.

Bedi A, Pasricha PJ, Akhtar AJ, Barber JP, Bedi GC, Giardiello FM y cols. Inhibition of apoptosis during development of colorectal cancer. *Cancer Res* 1995;55:1811-16.

Belloni AS, Rossi GP, Andreis PG, et al. Endothelin adrenocortical secretagogue effect is mediated by the B receptor in rats. *Hypertension* 1996;27:1153-1159.

Benatti P, Gafa R, Barana D, Marino M, Scarselli A, Pedroni M, Maestri I, Guerzoni L, Roncucci L, Meningatti M. y cols, Microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *Clin Cancer Res* 2005;11:8332-8340.

Berberat PO, Yi AR, Yamashita K, Warny MM, Csizmadia E, Robson SC, Bach FH. Heme oxygenase-1-generated biliverdine ameliorates experimental murine colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11:350-359.

Beumer J, Clevers H. Regulation and plasticity of intestinal stem cells during homeostasis and regeneration. *Development* 2016;143:3639-49.

Biondo S, Ortiz H, Lujan J, Codina Cazador A, Espin E, García Granero E. Quality of mesorectum after laparoscopic resection for rectal cancer - results of an audited teaching programme in Spain. *Colorectal Dis* 2010;12:24-31.

Bittner M, Meltzer P, Chen Y, Jiang Y, Seftor E, Hendrix M. Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature* 2000;406:536-540.

Blache P, van de Wetering M, Duluc I, Domon C, Berta P, Freund JN, Clevers H, Jay P. SOX9 is an intestine crypt transcription factor, is regulated by the Wnt pathway, and represses the CDX2 and MUC2 genes. *J Cell Biol* 2004;166:37-47.

Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T. Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2005;5:744-9.

Brabletz T. EMT and MET in metastasis: where are the cancer stem cells? *Cancer Cell* 2012;22:699-701.

Bremnes T, Paasche JD, Mehlum A, Sandberg C, Bremnes B, Attramadal H. Regulation and intracellular trafficking pathways of the endothelin receptors. *J Biol Chem* 2000;275:17596–17604.

Brensinger JD, Laken SJ, Luce MC. Variable phenotype of familial adenomatous polyposis in pedigrees with 3' mutation in the APC gene. *Gut* 1998;43: 548-52.

Brouard S, Otterbein LE, Anrather J y cols. Carbon monoxide generated by heme oxygenase-1 suppresses endothelial cell apoptosis. *J Exp Med* 2000;192:1015-26.

Brouard S, Berberat PO, Tobiasch E, Seldon MP, Bach FH, Soares MP. Heme Oxygenase-1-derived Carbon Monoxide Requires the Activation of Transcription Factor NF- $\kappa$ B to Protect Endothelial Cells from Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -mediated Apoptosis\*. *Journal of Biological Chemistry* 2002;277:17950-17961.

Brüne B, Ullrich V. Inhibition of platelet aggregation by carbon monoxide is mediated by activation of guanylate cyclase. *Mol Pharmacol* 1987;32:497-504.

Bu Y, Cao D. The origin of cancer stem cells. *Front Biosci* 2012;4:819-30.

Busserolles J, Megías J, Terencio MC, Alcaraz MJ. Heme oxygenase-1 inhibits apoptosis in Caco-2 cells via activation of Akt pathway. *Int J Biochem Cell Biol* 2006;38:1510-7.

Butler SJ, Richardson L, Farias N, Morrison J, Coomber BL. Characterization of cancer stem cell drug resistance in the human colorectal cancer cell lines HCT116 and SW480. *Biochem Biophys Res Commun* 2017;490:29-35.

Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000;407:249-257.

Casado, J, Iñigo-Chaves A, Jiménez-Ruiz SM, Ríos-Arrabal S, Carazo-Gallego Á, González-Puga C, Núñez, MI, Ruíz-Extremera Á, Salmerón J, León J. AA-NAT, MT1 and MT2 Correlates with Cancer Stem-Like Cell Markers in Colorectal Cancer: Study of the Influence of Stage and p53 Status of Tumors. *Int J Mol Sci* 2017;18.

Cassidy J, Clarke S, Díaz-Rubio E. Randomized phase III study of capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil/folinic acid plus oxaliplatin as first-line therapy for metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:2006-12.

Cavicchi M, Gibbs L, Whittle BJ. Inhibition of inducible nitric oxide synthase in the human intestinal epithelial cell line, DLD-1, by the inducers of heme oxygenase-1, bismuth salts, heme, and nitric oxide donors. *Gut* 2000;47;771-8.

Chaffer CL, Breuckmann I, Ssheel C, Kaestli AJ, Wiggins PA, Rodrigues LO, Brooks M, Reinhardt F, Su Y, Polyak K, Arendt LM, Kuperwasser C, Bierie B. Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:7950-5.

Champan JT, Otterbein LE, Elias JA, Choi AM. Carbon monoxide attenuates aeroallergen-induced inflammation in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;281(1):209-16.

Chawengsaksohak K, James R, Hammond VE, Köntgen F, Beck F. Homeosis and intestinal tumours in Cdx2 mutant mice. *Nature* 1997;386:84-7.

Chau R, Dashti SG, Ouakrim DA, Buchanan DD, Clendenning M y cols. Multivitamin, calcium and folic acid supplements and the risk of colorectal cancer in Lynch syndrome. *Int J Epidemiol* 2016;45:940-953.

Chen HS, Sheen-Chen SM. Synchronous and early metachronous colorectal adenocarcinoma: analysis of prognosis and current trends. *Dis Colon Rectum* 2000;43:1093-9.

Chen T, Zhang Y, Guo WH, Meng MB, Mo XM, Lu Y. Effects of heterochromatin in colorectal cancer stem cells on radiosensitivity. *Chin J Cancer* 2010;29:270-6.

Chhikara M, Wang S, Kern SJ, Ferreyra GA, Barb JJ, Munson PJ, Danner RL. Carbon monoxide blocks lipopolysaccharide-induced gene expression by interfering with proximal TLR4 to NF-kappaB signal transduction in human monocytes. *PloS one* 2009;4:0008139.

Chiang SK, Chen SE, Chang LC. A Dual Role of Heme Oxygenase-1 in Cancer Cells. *Int J Mol Sci* 2018;20(1):39.

Chichorro JG, Fiuza CR, Bressan E, Claudino RF, Leite DF, Rae GA. Endothelins as pronociceptive mediators of the rat trigeminal system: Role of ETA and ETB receptors. *Brain Res* 2010;1345:73-83.

Choi BM, Pae HO, Kim YM, Chung HT. Nitric oxide-mediated cytoprotection of hepatocytes from glucose deprivation-induced cytotoxicity: involvement of heme oxygenase-1. *Hepatology* 2003;37(4):810-23.

Chu P, Clanton DJ, Snipas SL y cols. Characterization of a subpopulation of colon cancer cells with stem cell-like properties. *Int J Cancer* 2009;124:1312-1321.

Church JM. Other polyposis syndromes. *Semin Colon Rectal Surge* 1995;6:61-6.

Cianfrocca R, Rosano L, Tocci P, Sestito R, Caprara V y cols. Blocking endothelin-1-receptor/ $\beta$ -catenin circuit sensitizes to chemotherapy in colorectal cancer. *Cell Death Differ* 2017;24:1811-1820.

Clark JE, Green CJ, Motterlini R. Involvement of the heme oxygenase-carbon monoxide pathway in keratinocyte proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;241:215-220.

Cleophas MC, Joosten LA, Stamp LK, Dalbeth N, Woodward OM, Merriman TR. ABCG2 polymorphism in gout: insights into disease susceptibility and treatment approaches. *Pharmgenomics Pers Med* 2017;10:129-42.

Coeffier M, Le Pessot F, Leplingard A, Marion R, Lerebours E, Ducrotte P, Dechelotte P. Acute enteral glutamine infusion enhances heme oxygenase-1 expression in human duodenal mucosa. *J Nutr* 2002;132:2570-3.

Coito AJ, Buelow R, Shen XD. Heme oxygenase-1 gene transfer inhibits inducible nitric oxide synthase expression and protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 2002;74:96-102.

Collins JF, Franck CA, Kowdley KV, Ghishan FK. Identification of differentially expressed genes in response to dietary iron deprivation in rat duodenum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288: G964-71.

Compton CC, Fielding LP, Burkhardt LJ. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:979-994.

Compton CC, Green FL. The staging of colorectal cancer: 2004 and beyond. *CA Cancer J Clin* 2004;54:295-308.

Cotton PB, Durkalski VL, Pineau BC. Computed tomographic colonography (virtual colonoscopy): a multicenter comparison with standard colonoscopy for detection of colorectal neoplasia. *JAMA* 2004;291:17123-9.

Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, Liu R, Wang X, Cho RW, Hoey T, Gurney A, Huang EH, Simeone DM, Shelton AA, Parmiani G, Castelli C. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:10158-63.

Dalton RS, Velineni R, Osborne ME, Thomas R, Harries S, Gee AS. A single-centre experience of chemotherapy for rectal cancer: Is there potential for nonoperative management? *Colorectal Dis* 2012;14:567-71.

Dandawate P, Padhye S, Ahmad A, Sarkar FH. Novel strategies targeting cancer stem cells through phytochemicals and their analogs. *Drug Deliv Transl Res* 2013;3:165-82.

Datta PK, Gross EJ, Lianos EA. Interactions between inducible nitric oxide synthase and heme oxygenase-1 in glomerulonephritis. *Kidney Int* 2002;61:847-50.

Datta PK, Koukouritaki SB, Hopp KA, Lianos EA. Heme oxygenase-1 induction attenuates inducible nitric oxide synthase expression and proteinuria in glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:2540-50.

Davenport AP. International Union of Pharmacology. XXIX. Update on endothelin receptor Nomenclature. *Pharmacol Rev* 2002;54:219-226].

De Backer O, Elinc E, Blanckaert B, Leybaert L, Motterlini R, Lefebvre RA. Water-soluble Co-releasing molecules reduce the development of postoperative ileus via modulation of MAPK/HO-1 signalling and reduction of oxidative stress. *Gut* 2009;58:347-56.

De Lau W, Kujala P, Schneeberger K, Middendorp S, Li VS y cols. Peyer's patch M cells derived from Lgr5(+) stem cells require SpiB and are induced by RankL in culture "miniguts". *Mol Cell Biol* 2012;32:3639-47.

De Sousa E, Melo F, Vermeulen L. Wnt Signaling in Cancer Stem Cell Biology. *Cancers* 2016;8.

De Vogel J, Jonker-Termont DS, van Lieshout EM, Katan MB, van der Meer R. Green vegetables, red meat and colon cancer: chlorophyll prevents the cytotoxic and hyperproliferative effects of haem in rat colon. *Carcinogenesis* 2005;26:387-93.

Deiningner MH, Meyermann R, Trautmann K y cols. Heme oxygenase (HO)-1 expressing macrophages/microglial cells accumulate during oligodendroglioma progression. *Brain Res* 2000;882:1-8.

Del Bufalo D, Di Castro V, Biroccio A, Varmi M, Salani D, Rosano L, Trisciuglio D, Spinella S, Bagnato A. Endothelin-1 protects ovarian carcinoma cells against paclitaxel induced apoptosis: requirement for Akt activation. *Mol Pharmacol* 2002;61:524-532.

Delbeke D, Martin WH. PET and PET-CT for evaluation of colorectal carcinoma. *Semin Nucl Med* 2004;34:209-23.

Demunter A, De Wolf-Peeters C, Degreef H, Stas M, van den Oord JJ. Expression of the endothelin-B receptor in pigment cell lesions of the skin. Evidence for its role as tumor progression marker in malignant melanoma. *Virchows Arch* 2001;438:485-491.

Deng Y, Zhou J, Fang L, Cai Y, Ke J, Xie X, Huang Y, Huang M, Wang J. ALDH1 is an independent prognostic factor for patients with stages II-III rectal cancer after receiving radiochemotherapy. *Br J Cancer* 2014;110:430-4.

Denkert C, Kobel M, Pest S, Koch I, Berger S, Schwabe M, Siegert A, Reles A, Kolsterhalfen B, Hauptmann S. Expression of cyclooxygenase 2 is an independent prognostic factor in human ovarian carcinoma. *Am J Pathol* 2002;160:893-903.

Deramaudt BM, Braunstein S, Remy P, Abraham NG. Gene transfer of human heme oxygenase into coronary endothelial cells potentially promotes angiogenesis. *J Cell Biochem* 1998;68:121-7.

Derynck R, Muthusamy BP, Saeteurn KY. Signaling pathway cooperation in THF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition. *Curr Opin Cell Biol* 2014;31:56-66.

Dixo SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, Pate, DN, Bauer AJ, Cantley AM, Yang WS, et al. Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* 2012;149:1060-1072.

Doi K, Akaike T, Fujii S, Tanaka S, Ikebe N, Beppu T, Shibahara S, Ogawa M, Maeda H. Induction of haem oxygenase-1 by nitric oxide and ischaemia in experimental solid tumors and implication for tumour growth. *Br J Cancer* 1999;80(12):1945-54.

Dore S, Goto S, Sampei K y cols. Heme oxygenase-2 acts to prevent neuronal death in brain cultures and following transient cerebral ischemia. *Neuroscience* 2000;99:587-92.

Dore S, Sampei K, Goto S y cols. Heme-oxygenase-2 is neuro-protective in cerebral ischemia. *Mol Med* 1999;5:656-663.

Dore S, Takahashi M, Ferris CD y cols. Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:2445-50.

Dorritie KA, Redner RL, Johnson DE. STAT transcription factors in normal and cancer stem cells. *Adv Biol Regul* 2014; 56:30-44.

Durante W, Kroll MH, Christodoulides N, Peyton KJ, Schafer AI. Nitric oxide induces heme oxygenase-1 gene expression and carbon monoxide production in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1997;80:557-64.

Durante W. Carbon monoxide and bile pigments: surprising mediators of vascular functions. *Vasc Med* 2002;7(3):195-202.

Eastman Q, Grosschedl R. Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by Wnt and other signals. *Curr Opin Cell Biol* 1999;11:233-40.

Eberl LP, Egidy G, Pinet F, Juillerat-Jeanneret L. Endothelin receptor blockade potentiates FasL-induced apoptosis in colon carcinoma cells via the protein kinase C-pathway. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000;36:00005344-200036051.

Eberl, LP, Valdenaire O, Saintgiorgio V, Jeannin JF, Juillerat-Jeanneret L. Endothelin receptor blockade potentiates FasL-induced apoptosis in rat colon carcinoma cells. *Int J Cancer* 2000;86:182-187.

Edge SB, Byrd DR. Compton C.C. *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed. New York: Springer-Verlag (2010).

Egidy G, Juillerat-Jeanneret L, Jeannin JF, Korth P, Bosman FT, Pinet F. Modulation of human colon tumor-stromal interactions by the endothelin system. *Am J Pathol* 2000;157:1863-1874.

Elamin MH, Shinwari Z, Hendrayani SF, Al-Hindi H, Al-Shail K, Khafaga Y, Al-Kofide A, Aboussekhra A. Curcumin inhibits the Sonic Hedgehog signaling pathway and triggers apoptosis in medulloblastoma cells. *Mol Carcinog* 2010;49:302-14.

Elias DM, Pocard M. Treatment and prevention of peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 2003;12:543-59.

Emori T, Hirata Y, Ohta K, Kanno K, Eguchi S, Imai T, Shichiri M, Marumo F. Cellular mechanism of endothelin-1 release by angiotensin and vasopressin. *Hypertension* 1991;18:165-170.

Enevoldsen FC, Sahana J, Wehland M, Grimm D, Infanger M, Krüger M. Endothelin Receptor Antagonists: Status Quo and Future Perspectives for Targeted Therapy. *J Clin Med* 2020;9.

Erdman K, Grosser N, Schipporeit K, Schroder H. The ACE inhibitory dipeptide Met-Tyr diminishes free radical formation in human endothelial cells *via* induction of heme oxygenase-1 and ferritin. *J Nutr* 2006;136:2148-52.

Erkinheimo TL, Lassus H, Finne P, van Rees BP, Leminen A, Ylikorkala O, Haglund C, Butzow R, Ristimäki A. Elevated cyclooxygenase-2 expression is associated with altered expression of p53 and SMAD4 amplification of HER-2/neu, and poor outcome in serous ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004;10:538-545.

Exner M, Minar E, Wagner O, Schillinger M. The role of heme oxygenase-1 promoter polymorphism in human disease. *Free Radic Biol Med* 2004;37:1097-104.

Fan Z, Wirth AK, Chen D, Wruch CJ, Rauh M, Buchfelder M, Savaskan N. Nrf2-Keap1 pathway promotes cell proliferation and diminishes ferroptosis. *Oncogenesis* 2017;6:e371.

Fang J, Akaike T, Maeda H. Antiapoptotic role of heme oxygenase (HO) and the potential of HO as a target in anticancer treatment. *Apoptosis* 2004;9(1):27-35.

Fang J, Sawa T, Akaike T y cols. *In vivo* antitumor activity of pegylated zinc protoporphyrin: Targeted inhibition of heme oxygenase in solid tumor. *Cancer Res* 2003;63:3567-74.

Fang J, Sawa T, Akaike T, Greish K, Maeda H. Enhancement of chemotherapeutic response of tumor cells by a heme oxygenase inhibitor, pegylated zinc protoporphyrin. *Int J Cancer* 2004;109:1-8.

Fang J, Sawa T, Akaike T, Maeda H. Tumor-targeted delivery of polyethylene glycol-conjugated D-amino acid oxidase for antitumor therapy via enzymatic generation of hydrogen peroxide. *Cancer Res* 2002;62:3138-43.

Fang R, Santiago NA, Olds LC, Sibley E. The homeodomain protein Cdx2 regulates lactase gene promoter activity enterocyte differentiation. *Gastroenterology* 2000;118:115-27.

Fearhead NS, Wilding JL, Bodmer WF. Genetics of colorectal cancer: hereditary aspects and overview of colorectal tumorigenesis. *Br Med Bull* 2002;64: 27-43.

Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-67.

Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* 2007;18:581-592.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015;136:E359-86.

Ferrandina G, Lauriola L, Zannoni GF, Fagotti A, Fanfani F, Legge F, Maggino N, Gessi M, Mancuso S, Ranelletti FO, Scambia G. Increased cyclooxygenase-2 expression is associated with chemotherapy resistance and outcome in ovarian cancer patients. *Ann Oncol* 2002;13:1205-1211.

Ferris CD, Jaffrey SR, Sawa A, Takahashi M, Brady SD, Barrow RK, Tysoe SA, Wolosker H, Barañano DE, Doré S, Poss KD, Snyder SH. Haem oxygenase-1 prevents cell death by regulating cellular iron. *Nat Cell Biol* 1999;1(3):152-7.

Firth JD, Ratcliffe PJ. Organ distribution of the three rat endothelin messenger RNAs and the effects of ischemia on renal gene expression. *J Clin Invest* 1992;90:1023–1031.

Flores Valdez N. Endotelina-1: vasoconstrictor intrínseco del endotelio vascular. *Rev Med* 2013;21(2):64-78.

Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor. *Mol Cell Biol* 1996;16:4604-4613.

Fuchs CS, Giovannucci EL, Colditz GA. y cols. A prospective study of family history and the risk of colorectal cancer. *N Engl J Med* 1994;331:1669-74.

Fujimoto K, Beauchamp RD, Whitehead RH. Identification and isolation of candidate human clonogenic cells based on cell surface integrin expression. *Gastroenterology* 2002;123:1941-8.

Fujita T, Toda K, Karimova A, Yan SF, Naka Y, Yet SF, Pinsky DJ. Paradoxical rescue from ischemic lung injury by inhaled carbon monoxide driven by derepression of fibrinolysis. *Nat Med* 2001;7:598-604.

Galie N, Manes A, Branzi A. The endothelin system in pulmonary arterial hypertension. *Cardiovasc Res* 2004;61:227-237.

Gao P, Huang X, Song Y, Sun J, Chen X, Sun Y, Jiang Y, Wang Z. Impact of timing of adjuvant chemotherapy on survival in stage III colon cancer: a population-based study. *BMC Cancer* 2018;18:234.

Gao W, Chen L, Ma Z, Du Z, Zhao Z, Hu Z, Li Q. Isolation and phenotypic characterization of colorectal cancer stem cells with organ-specific metastatic potential. *Gastroenterology* 2013;145:636-46.

García Cabezas S, Rodríguez Liñán M, Otero Romero AM, Bueno Serrano CM, Gómez Barbadillo J, Palacios Eito A. Respuesta al tratamiento e intervalo de tiempo hasta la cirugía con radioterapia preoperatoria de curso corto en el cáncer de recto. *Cir Esp* 2016;94:460-6.

Gartel AL, Shchors K. Mechanisms of c-myc-mediated transcriptional repression of growth arrest genes. *Exp Cell Res* 2003;283:17-21.

Gauthier R, Harnois C, Drolet JF, Reed JC, Vezina A, Vachon PH. Human intestinal epithelial cell survival: Differentiation state-specific control mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;280:C1540-54.

Gerard JP, Azria D, Gourgou-Bourgade S. y cols. Comparison of two neoadjuvant chemoradiotherapy regimens for locally advanced rectal cancer: results of the fase III trial ACCORD 12/0405-Prodige 2. *J Clin Oncol* 2010;28:1638-44.

Gerbe F, Sidot E, Smyth DJ, Ohmoto M, Matsumoto I y cols. Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites. *Nature* 2016;529:226-30.

Germanova D, Keirse J, Kohler A, Hastir JF, Demetter P, Delbaue S, Elkrim Y, Verset L, Larbanoix L, Preyat N et al. Myeloid tumor necrosis factor and heme oxygenase-1 regulate the progression of colorectal liver metastases during hepatic ischemia-reperfusion. *Int J Cancer* 2021;148:1276-1288.

Ghosh D, Ulasov IV, Chen L, Harkins LE, Wallenborg K, Hothi P y cols. TGF $\beta$ -responsive HMOX1 expression is associated with stemness and invasion in GBM. *Stem Cells* 2016;34:2276-2289.

Giardiello FM, Welsh SB, Hamilton SR. y cols. Increased risk of cancer in the Peutz-Jeghers syndrome. *N Engl J Med* 1987;316:1511-4.

Giris M, Erbil Y, Oztezcan S, Olgaç V, Barbaros U, Devenci U, Kirgiz B, Uysal M, Toker GA. The effect of heme oxygenase-1 induction by glutamina on radiation-induced intestinal damage: the effect of heme oxygenase-1 on radiation enteritis. *Am J Surg* 2006;191:503- 9.

Ghisolfi L, Keates AC, Hu X, Lee DK, Li CJ. Ionizing radioation induces stemness in cancer cells. *PLoS One* 2012;7:e43628.

Glei M, Klenow S, Sauer J, Wegewitz U, Richter K, Pool-Zobel BL. Hemoglobin and hemin induce DNA damage in human colon tumor cells HT29 clone 19A and in primary human colonocytes. *Mutat Res* 2006; 594:162-71.

GLOBOCAN 2018. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. (<http://gco.iarc.fr>).

Goligorsky MS, Budzikowski AS, Tsukahara H, Noiri E. Co-operation between endothelin and nitric oxid in promoting endothelial cell migration and angiogenesis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999;26:269-271.

Golstein NS. Lymph node recoveries from 2427 pT3 colorectal resection specimens spanning 45 years: recommendatios for a minimum number of recovered lymph nodes based on predictive probabilities. *Am J Surg Pathol* 2002;26:179-89.

Gómez S, del Mont Llosas M, Verdú J, Roura S, Lloreta J, Fabre M, García de Herreros A. Independent regulation of adherens and tight junctions by tyrosine phosphorylation in Caco-2 cells. *Biochim Biophys Acta* 1999;1452:121-32.

González Castillo A, Biondo S, García Granero A, Cambray M, Martínez Villacampa M, Kreilser E. Resultados de la cirugía de la recidiva pélvica de cáncer de recto. Experiencia en un centro de referencia. *Cir Esp* 2016;94:518-24.

Goodman AI, Choudhury M, da Silva JL, Schwartzman ML, Abraham NG. Overexpression of the heme oxygenase gene in renal cell carcinoma. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997;214:54-61.

Goupille C, Marionneau S, Bureau V, Hallouin F, Meichenin M, Rocher J y cols. Alpha1, 2Fucosyltransferase increases resistance to apoptosis of rat colon carcinoma cells. *Glycobiology* 2000;10:375-82.

Greenson JK, Bonner JD, Ben-Yzhak O, Cohen HI, Mislavich I, Resnick MB, Trougouboff P, Tomsho LD, Kim E, Low M. y cols. Phenotype of microsatellite unstable colorectal carcinomas: Well-differentiated and focally mucinous tumors and the absence of dirty necrosis correlate with microsatellite instability. *Am J Surg Pathol* 2003;27:563-570.

Grosser N, Oberle S, Berndt G, Erdmann K, Hemmerle A, Schroder H. Antioxidant action of L-alanine: heme oxygenase-1 and ferritin as possible mediators. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;314:351-5.

Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, Aronson MD, Holowaty EJ, Bull SB, Redston M, Gallinger S. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000;342:69-77.

Guo JS, Cho CH, Wang JY, Koo MW. Expression and immunolocalization of heat shock protein in healing of gastric ulcers in rats. *Scand J Gastroenterol* 2002;37:17-22.

Guo X, Shin VY, Cho CH. Modulation of heme oxygenase in tissue injury and its implication in protection against gastrointestinal diseases. *Life Sci* 2001;69:3113-9.

Gupta RA, Tejada LV, Tong BJ, Das SK, Morrow JD, Dey SK, Dubois RN. Cyclooxygenase-1 is overexpressed and promotes angiogenic growth factor production in ovarian cancer. *Cancer Res* 2003;63:906-911.

Habr-Gama A, Gama Rodríguez J, Sao Juliao GP, Proscurshim I, Sabbagh C, Lynn PB. Local recurrence after complete clinical response and watch and wait in rectal cancer after neoadjuvant chemoradiation. Impact of salvage therapy on local disease control. *Int J Radiat Oncol Bio Phys* 2014;88: 822-28.

Haigis KM, Kendall KR, Wang Y, Cheung A, Haigis MC, Glickman JN. y cols. Differential effects of oncogenic K-ras and N-ras on proliferation, differentiation and tumor progression in the colon. *Nat Genet* 2008;40:600-608.

Hallberg L, Rossander-Hulthén L, Brune M, Gleerup A. Inhibition of haem-iron absorption in man by calcium. *Br J Nutr* 1993;69:533-40.

Haller DG, Catalano PJ, Macdonald JS. Phase III study of fluorouracil, leucovorin and levamisole in high-risk stage II and III colon cancer: final report of Intergroup 0089. *J Clin Oncol* 2005;23:8671-8.

Haller DG, Taberno J, Maroun J. Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer. *J Clin Oncol* 2011;29:1465-71.

Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 2012;21:309-322.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646-74.

Hangaishi M, Ishizaka N, Aizawa T y cols. Induction of heme oxygenase-1 can act protectively against cardiac ischemia-reperfusion *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;279:582-8.

Harder Y, Amon M, Schramm R, Rucker M, Scheuer C, Pittet B y cols. Ischemia-induced up-regulation of heme oxygenase-1 protects from apoptotic cell death and tissue necrosis. *J Surg Res* 2008;150:293-303.

Hardin H, Zhang R, Helein H, Buehler D, Guo Z, Lloyd RV. The evolving concept of cancer stem-like cells in thyroid cancer and other solid tumors. *Lab Invest* 2017;97:1142-51.

Hartley JE, López RA, Paty PB, Wong WD, Cohen AM, Guillem JG. Resection of locally recurrent colorectal cancer in the presence of distant metastases: Can it be justified? *Ann Surg Oncol* 2003;10:227-33.

Hasegawa Y, Takano T, Miyauchi A, y cols. Decreased expression of glutathione peroxidase ARNm in thyroid anaplastic carcinoma. *Cancer Lett* 2002;182:69-74.

Haynes W.G, Ferro C.E, Webb DJ. Physiologic role of endothelin in maintenance of vascular tone in humans. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995;26(3):183-185.

Hellmuth M, Wetzler C, Nold M, Chang JH, Frank S, Pfeilschifter J, Muhl H. Expression of interleukin-8, heme oxygenase-1 and vascular endothelial growth factor in DLD-1 colon carcinoma cells exposed to pyrrolidine dithiocarbamate. *Carcinogenesis* 2002;23:1273-1279.

Hemmati M, Yousefi B, Bahar A, Eslami M. Importance of Heme Oxygenase-1 in Gastrointestinal Cancers: Functions, Inductions, Regulations, and Signaling. *J Gastrointest Cancer* 2021;23:021-00587.

He S, Zhou H, Zhu X, Hu S, Fei M, Wan D, Gu W, Yang X, Shi D. Expression of Lgr5, a marker of intestinal stem cells, in colorectal cancer and its clinicopathological significance. *Biomed Pharmacother* 2014;68:507-13.

He YC, Zhou FL, Shen Y, Liao DF, Cao D. Apoptotic death of cancer stem cells for cancer therapy. *Int J Mol Sci* 2014;15:8335-51.

Heald RJ. Synchronous and metachronous carcinoma of the colon and rectum. *Ann R Coll Surg Engl* 1990;72:172-4.

Hegazi RA, Rao KN, Mayle A, Sepulveda AR, Otterbein LE, Plevy SE. Carbon monoxide ameliorates chronic murine colitis through a heme oxygenase-1-dependent pathway. *J Exp Med* 2005;202:1703-13.

Helmer KS, Suliburk JW, Mercer DW. Ketamine-induced gastroprotection during endotoxemia: role of heme oxygenase-1. *Dig Dis Sci* 2006;51:1571-1581.

Helmus DS, Thompson CL, Zelenskiy S, Tucker TC, Li L. Red meat-derived heterocyclic amines increase risk of colon cancer: a population-based case-control study. *Nutr Cancer* 2013;65:1141-1150.

Heriot AG, Byrne CM, Lee P, Dobbs B, Tilney H, Solomon MJ. Extended radical resection: the choice for locally recurrent rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2008;51:284-91.

Heriot AG, Tekkis PP, Darzi A, Mackay J. Surgery for local recurrence of rectal cancer. *Colorectal Dis* 2006;8:733-47.

Herter FP, Slanetz CA. Patterns and significance of lymphatic spread from cancer of the colon and rectum. En Weiss L, Gilbert HA, Ballon SC. Lymphatic system metastasis. Boston: G. K. Hall Medical Publishers: 1980;275-307.

Hessman CJ, Bubbers EJ, Billingsley KG, Herzig DO, Wong MH. Loss of expression of the cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1 correlates with advanced-stage colorectal cancer. *Am J Surg* 2012;203:649-53.

Hill-Kapturczak N, Chang SH, Agarwal A. Heme oxygenase and kidney. *DNA Cell Biol* 2002;21:307-21.

Hjortso MD, Andersen MH. The expression, function and targeting of heme oxygenase-1 in cancer. *Curr. Cancer Drug Targets* 2014;14:337-347.

Hosseini MM, Dashwood MR, Dawas K, Ali HM, Grant K, Savage F, Taylor I, Loizidou M. Altered endothelin receptor subtypes in colorectal cancer. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2007;19(9):775-782.

Horvath K, Varga C, Berko A, Posa A, Laszlo F, Whittle BJ. The involvement of heme oxygenase-1 activity in the therapeutic actions of 5-aminosalicylic acid in rat colitis. *Eur J Pharmacol* 2008;581:315-323.

Howitt MR, Lavoie S, Michaud M, Blum AM, Tran SC y cols. Tuft cells, taste-chemosensory cells, orchestrate parasite type 2 immunity in the gut. *Science* 2016;351:1329-33.

Hsu HC, Liu YS, Tseng KC, Hsu CL, Liang Y, Yang ST, Chen JS, Tang RP, Chen SJ. Overexpression of Lgr5 correlates with the resistance to 5-FU-based chemotherapy in colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2013;28:1535-46.

Huang TH, Wu ST, Huang YJ, Wei PL, Wu AT. The identification and validation of Trichostatin A as a potential inhibitor of colon tumorigenesis and colon cancer stem-like cells. *Am J Cancer Res* 2017;7:1227-37.

Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992;69:11-25.

Igguaggiato P, González Michaca L, Croatt AJ, Haggard JJ, Alam J, Nath KA. Cellular overexpression of heme oxygenase-1 up-regulates p21 and confers resistance to apoptosis. *Kidney Int* 2001;60:2181-91.

Ilmer M, Mazurek N, Byrd JC, Ramirez K, Halfey M, Alt E, Vykoukal J, Bresalier RS. Cell surface gallectin-3 defines a subset of chemoresistant gastrointestinal tumor-initiating cancer cells with heightened stem cell characteristics. *Cell Death Dis* 2016;7:e2337.

Imai K, Yamamoto H. Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics. *Carcinogenesis* 2008;29:673-680.

Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH. Colorectal Cancer Study Group. Fecal DNA versus fecal occult blood for colorectal cancer screening in an average-risk population. *N Engl J Med* 2004;351:2704-14.

Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T. The human endothelin family: Three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc. Natl. Acad. Sci* 1989;88:2863-2867.

Ireland H, Houghton C, Howard L, Winton DJ. Cellular inheritance of a Cre-activated reporter gene to determine Paneth cell longevity in the murine small intestine. *Dev Dyn* 2005;233:1332-6.

Irving AA, Duchow EG, Plum LA, DeLuca HF. Vitamin D deficiency in the APC<sup>Pirc/+</sup> rat does not exacerbate colonic tumorigenesis, while low dietary calcium might be protective. *Dis Model Mech* 2018;11:dmm032300.

Ishihara K, Hirano T. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferance disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002;13:357-68.

Ishikawa T, Yanagisawa M, Kimura S, Goto K, Masaki T. Positive inotropic action of novel vasoconstrictor peptide endothelin on guinea pig atria. *Am J Physiol* 1988;255(4 Pt 2):970-973.

Ishikawa T, Yoshida N, Higashihara H, Inoue M, Uchiyama K, Takahi T, Handa O, Kokura S, Naito Y, Okanoue T, Yoshikawa T. Different effects of constitutive nitric oxide synthase and heme oxygenase on pulmonary or liver metastasis of colon cancer in mice. *Clin Exp Metastasis* 2003;20:445-50.

Jaiswal AS, Marlow BP, Gupta N, Narayan S. Beta-catenin-mediated transactivation and cell-cell adhesion pathways are important in curcumin (diferuylmethane)-induced growth arrest and apoptosis in colon cancer cells. *Oncogene* 2002;21:8414-27.

Jass JR, Williams CB, Bussey HJ, Morson BC. Juvenile polyposis - a precancerous condition. *Histopathology* 1988;13:619-30.

Jayne DG, Fook S, Loi C, Seow-Choen F. Peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer. *Br J Surg* 2002;89:1545-50.

Jemal A, Tiwari RC, Murray T. American Cancer Society. *Cancer Statistic 2004*. *Ca Cancer J Clin* 2004;54:8-29.

Jeong SY, Shin KH, Shin JH, Shin YK, Ku JL, Park SY, Kim WH, Park JG. Microsatellite instability and mutation in DNA mismatch repair genes in sporadic colorectal cancers. *Dis Colon Rectum* 2003;46:1069-77.

Jessup JM, McGinnis LS, Steele GD. Jr. The national cancer data base. Report on colon cancer. *Cancer* 1996;78:918-26.

Jinushi M, Chiba S, Yoshiyama H, Masutomi K, Kinoshita I, Dosaka-Akita H. Tumor-associated macrophages regulate tumorigenicity and anticancer drug response of cancer stem/initiating cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:12425-30.

Jones S, Chen WD, Parmigiani G, et cols. Comparative lesion sequencing provides insights into tumor evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:4283-8.

Joško-Ochojska J, Gwóźdź B, Hendryk S, Jędrzejowska-Szypułka H, Słowiński J, Jochem J. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in rat brain after subarachnoid haemorrhage and endothelin receptor blockade with BQ-123. *Folia Neuropathol* 2001;39:243-251.

Kajarabille N, Latunde-Dada GO. Programmed Cell-Death by Ferroptosis: Antioxidants as Mitigators. *Int J Mol Sci* 2019;20.

Kanazawa A, Sawa A, Akaike T, Morimur S, Kida K, Maeda H. Generation of lipid peroxy radicals from edible oils and their biological activities: A need for consideration for anti-radical components and purification processing. *Biofactors* 2000;13:187-93.

Kangwan N, Kim YJ, HAN YM, Jeong M, Park JM y cols. Sonic hedgehog inhibitors prevent colitis-associated cancer via orchestrated mechanism of IL-6/gp130 inhibition, 15-PGDH induction, Bcl-2 abrogation, and tumorsphere inhibition. *Oncotarget* 2016;7:7667-82.

Kapitulnik J. Bilirubin: an endogenous product of heme degradation with both cytotoxic and cytoprotective properties. *Mol Pharmacol* 2004;66:773-9.

Karet FE, Davenport AP. Localization of endothelin peptides in human kidney. *Kidney Int* 1996;49:382-387.

Kasper M, Regl G, Frischauf AM, Aberger F. GLI transcription factors: mediators of oncogenic Hedgehog signalling. *Eur J Cancer* 2006;42:437-445.

Kazama S, Kishikawa J, Kiyomatsu T, Kawai K, Nozawa H, Ishihara S, Watanabe T. Expression of the stem cell marker CD133 is related to tumor development in colorectal carcinogenesis. *Asian J Surg* 2017;3:274-8.

Kerr D, Gray R, Quirke P y cols. A quantitative multigene RT-PCR assay for prediction of recurrence in stage II colon cancer: selection of pectively designed QUASAR validation study. *J Clin Oncol* 2009;27:15S.

Khodorova A, Montmayeur J-P, Strichartz G. Endothelin receptors and pain. *J Pain* 2009;10:4-28.

Kim DH, Song NY, Kim EH, Na HK, Joe Y, Chung HT, Surh YJ. 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 induces p53 expression through Nrf2-mediated upregulation of heme oxygenase-1 in human breast cancer cells. *Free radical research* 2014;48:1018-1027.

Kim GP, Colangelo LH, Wieand HS. y cols. Prognostic and predictive roles of high-degree microsatellite instability in colon cancer: a National Cancer Institute - National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Collaborative Study. *J Clin Oncol* 2007;25:767-72.

Kim TH, Xiong H, Zhang Z, Ren B. beta-Catenin activates the growth factor endothelin-1 in colon cancer cells. *Oncogene* 2005;24(4):597-604.

Kim TH, Hur EG, Kang SJ, Kim JA, Thapa D, Lee YM, Ku SK, Jung Y, Kwak MK. NRF2 blockade suppresses colon tumor angiogenesis by inhibiting hypoxia-induced activation of HIF-1 $\alpha$ . *Cancer research* 2011;71:2260-2275.

Knight LJ, Burrage J, Bujac SR, Haggerty C, Graham A, Gibson NJ. Epigenetic silencing of the endothelin-B receptor gene in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol* 2009;34:465–471.

Kohan DE. Endothelins in the normal and diseased kidney. *Am J Kidney Dis* 1997;29:2–26.

Kolonel LN, Wilkens LR. Migrant studies. En: *Cancer epidemiology and prevention*. Philadelphia: WB Saunders: 1982;194-207.

Koo BK, Clevers H. Stem Cells Marked by the R-Spondin Receptor Lgr5. *Gastroenterology* 2014;147:289-302.

Korinek V, Barker N, Moerer P, van Donselaar E, Huls G, Peters PJ, Clevers H. Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat Genet* 1998;19:379-83.

Kozłowska AK, Tseng HC, Kaur K, Topchyan P, Inagaki A, Bui VT y cols. Resistance to cytotoxicity and sustained release of interleukin-6 and interleukin-8 in the presence of decreased interferon-gamma after differentiation of glioblastoma by human natural killer cells. *Cancer Immunol Immunother* 2016;65:1085-97.

Kube R, Mroczkowski P, Steinert P, Sahm M, Schmidt M, Gastinger I. Anastomotic leakage following bowel resection for colon cancer. Multivariate analysis for risk factors. *Chirurg* 2009;80:1153-59.

Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:4651-5.

Kuc RE, Davenport AP. Comparison of endothelin-A and endothelin-B receptor distribution visualized by radioligand binding versus immunocytochemical localization using subtype selective antisera. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004;44 (Suppl.1):S224–S226.

Kusters M, Marijnen CA, van Velde CJ, Rutten HJ, Lahaye MJ, Kim JH. Patterns of local recurrence in rectal cancer; a study of the Dutch TME trial. *Eur J Surg Oncol* 2010;36:470-6.

Kwon MY, Park E, Lee SJ, Chung SW. Heme oxygenase-1 accelerates Erastin induced Ferroptotic cell death. *Oncotarget* 2015;6:24393–24403.

Kyoung-Mee K, Calabrese P, Tavaré S, Shibata D. Enhanced Stem Cell Survival in Familial Adenomatous Polyposis. *Am J Pathol* 2004;164:1369-77.

Lagadec C, Vlashi E, Alhiyari Y, Phillips TM, Bochkur Dravter M, Pajonk F. Radiation-induced Notch signaling in breast cancer stem cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2013;87:609-18.

Lahav R. Endothelin receptor B is required for the expansion of melanocyte precursors and malignant melanoma. *Int J Dev Biol* 2005;49:173–180.

Lamprecht SA, Lipkin M. Migrating colonic crypt epithelial cells: primary targets for transformation. *Carcinogenesis* 2002;23:1777-80.

Lau EY, Ho NP, Lee TK. Cancer Stem Cells and Their Microenvironment: Biology and Therapeutic Implications. *Stem Cell Int* 2017;37141190.

Laurie JA, Moertel CG, Fleming TR. Surgical adjuvant therapy of large bowel carcinoma: an evaluation of levamisole and the combination of levamisole and fluorouracil. *J Clin Oncol* 1989;7:1447-56.

Lavery IC, Chiulli RA, Jagelman DG. y cols. Survival with carcinoma arising in mucosal ulcerative colitis. *Ann Surg* 1982;195:508-12.

Le Marchand I, Wilkens L.R, Kolonel LN. y cols. Associatios of sedentary lifestyle, obesity, smoking, alcohol use, and diabetes with the risk of colorectal cancer. *Cancer Res* 1997;57:4787-94.

Lee PJ, Alam J, Wiegand GW, Choi AM. Overexpression of heme oxygenase-1 in human pulmonary epithelial cells results in cell growth arrest and increased resistance to hyperoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(19):10393-8.

Lee SY, Jo HJ, Kim KM, Song JD, Chung HT, Park YC. Concurrent expression of heme oxygenase-1 and p53 in human retinal pigment epithelial cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;365:870-874.

Lee SY, Jeong EK, Ju MK, Jeon HM, Kim MY. Induction of metastasis, cancer stem cell phenotype, and oncogenic metabolism in cancer cells by ionizing radiation. *Mol Cancer* 2017;16:10.

Lee SY, Kim KA, Kim CH, Kim YJ, Lee JH, Kim HR. CD44-shRNA recombinant adenovirus inhibits cell proliferation, invasion, and migration, and promotes apoptosis in HCT116 colon cancer cells. *Int J Oncol* 2017;50:329-36.

Lee TS, Chau LY. Heme oxygenase-1 mediates the antiinflammatory effect of interleukin-10 in mice. *Nat Med* 2002;8:240-6.

Leis O, Eguíara A, Lopez-Arribillaga E, Alberdi MJ, Hernandez-Garcia S, Elorriaga K, Pandiella A, Rezola R, Martín AG. Sox2 expression in breast tumours and activation in breast cancer stem cells. *Oncogene* 2012;31:1354-1365.

León J, Casado J, Jiménez Ruiz SM, Zurita Saavedra MS, González-Puga C, Rejón JD, Gila A, Muñoz de Rueda P, Pavón EJ, Reiter RJ, Ruiz-Extremera A, Salmerón J. [Melatonin reduces endothelin-1 expression and secretion in colon cancer cells through the inactivation of FoxO-1 and NF-κβ](#). *J Pineal Res*. 2014;56(4):415-26.

Lerman A, Edwards BS, Hallett JW, Heublein DM, Sandberg SM, Burnett JC Jr. Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *N Engl J Med* 1991;325(14):997-1001.

Leslie A, Carey FA, Pratt NR, Steele RJ. The colorectal adeno-carcinoma sequence. *Br J Surg* 2002;89:845-860.

Levin ER. Endothelins. *N Engl J Med* 1995;333:356–363.

Levine AD, Fiocchi C. Immunology of inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2000;16:306-9.

Lickert H, Domon C, Huls G, Wehrle C, Duluc I, Clevers H, Meyer BI, Freund JN, Kemler R. Wnt/(beta)-catenin signaling regulates the expression of the homeobox gene *Cdx1* in embryonic intestine. *Development* 2000;127:3805-13.

Li F, Zhou K, Gao L, Zhang B, Li W y cols. Radiation induces the generation of cancer stem cells: A novel mechanism for cancer radioresistance. *Oncol Lett* 2016;12:3059-65.

Li Volti G, Wang J, Traganos F, Kappas A, Abraham NG. Differential effect of heme oxygenase-1 in endothelial and smooth muscle cell cycle progression. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;296:1077-82.

Li Y, Rogoff HA, Keates S, Gao Y, Murikipudi S, Mikule K, Leggett D, Li W, Pardee AB, Li CJ. Suppression of cancer relapse and metastasis by inhibiting cancer stemness. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015;112:1839-1844, doi:10.1073/pnas.1424171112.

Li Y, Zhang H, Xie M, Hu M, Ge S, Yang D y cols. Abundant expression of *Dec1/stra13/sharp2* in colon carcinoma: Its antagonizing role in serum deprivation-induced apoptosis and selective inhibition of procaspase activation. *Biochem J* 2002;367:413–22.

Li YF, Xiao B, Tu SF, Wang YY, Zhang XL. Cultivation and identification of colon cancer stem cell-derived spheres from Colo205 cell line. *Braz J Med Bios Res* 2012;45:197-204.

Liao WT, Ye YP, Deng YJ, Bian XW, Ding YQ. Metastatic cancer stem cells: from the concept to the therapeutics. *Am J Stem Cells* 2014;3:46-62.

Lien GS, Wu MS, Bien MY, Chen CH, Lin CH, Chen BC. Epidermal growth factor stimulates nuclear factor-kappaB activation and heme oxygenase-1 expression via c-Src, NADPH oxidase, PI3K, and Akt in human colon cancer cells. *PloS one* 2014;9:e104891, doi:10.1371/journal.pone.0104891.

Lin CC, Yang CC, Hsiao LD, Chen SY, Yang CM. Heme Oxygenase-1 Induction by Carbon Monoxide Releasing Molecule-3 Suppresses Interleukin-1 $\beta$ -Mediated Neuroinflammation. *Front Mol Neurosci* 2017;10.

Liou GY, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res* 2014;44:1–5.

Liou SF, Hsu JH, Chen YT, Chen IJ, Yeh JL. KMUP-1 Attenuates Endothelin-1-Induced Cardiomyocyte 559 Hypertrophy through Activation of Heme Oxygenase-1 and Suppression of the Akt/GSK-3 $\beta$ , Calcineurin/NFATc4 and 560 RhoA/ROCK Pathways. *Molecules* 2015, 20. 10435-10449.

Lin HC, Su SL, Lu Cy, Lin AH, Lin WC, Liu SC, Yang YC, Wang HM, Lii CK, Chen HW. Andrografolide inhibits hypoxia-induced HIF-1 alpha-driven endothelin 1 secretion by activating Nrf/HO-1 and promoting the expression of profyl hydroxylases 2/3 in human endothelial cells. *Environmental Toxicology* 2017;32:918-30.

Lipkin M, Blattner WA, Gardner EJ. y cols. Classification and risk assessment of individuals with familial polyposis, Gardner's syndrome, and familial non-polyposis colon cancer form [3H] thymidine labeling patterns in colonic epithelial cells. *Cancer Res* 1984;44:4201-7.

Litvak AM, Cercek A, Segal NH. y cols. False-positive elevations of carcinoembryonic antigen in patients with a history of a resected colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2014;32:403.

Liu C, Li J, Xiang X, Guo L, Tu K. PDGF receptor-alpha promotes TGF-beta signaling in hepatic stellate cells via transcriptional and posttranscriptional regulation of TGF-beta receptors. *Am J Physiol* 2014;307:G749-59.

Liu XM, Chapman GB, Peyton KJ, Schafer AI, Durante W. Carbon monoxide inhibits apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 2002;55:396-405.

Liu XM, Chapman GB, Wang H, Durante W. Adenovirus-mediated heme oxygenase-1 gene expression stimulates apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 2002;105:79-84.

Loboda A, Jozkowicz A, Dulak J. HO-1/CO system in tumor growth, angiogenesis and metabolism - Targeting HO-1 as an anti-tumor therapy. *Vascul Pharmacol* 2015;74:11-22.

Loboda A, Damulewicz M, Pyza E, Jozkowicz A, Dulak J. Role of Nrf2/HO-1 system in development oxidative stress response and diseases: An evolutionarily conserved mechanism. *Cell Mol Life Sci* 2016;73:3221-3247.

Luscher T.F, Barton M. Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation* 2000;102:2434-2440.

Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, Kerkvliet N, Morris VL, Chambers AF, Groom AC. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after succesful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol* 1998;153:865-73.

Lynch HT, De la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 2003;348:919-932.

Lynch HT, Smyrk TC, Watson P. Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an update review. *Gastroenterol* 1993;104:1535-49.

Ma Y, Minguye H, Zhou L, Ling s, Li Y, Kong B, Huang P. Dietary fiber intake and risks of proximal and distal colon cancers. *Medecine* 2018;97:e11678.

Maas M, Beets-Tan RG, Lambgrets DM, Lammering G, Nelemans PJ, Engelen SM. Wait-and-see policy for clinical complete responders after chemioradiation for rectal cancer. *J Clin Oncol* 2011;29:4633-40.

Maas M, Nelemans PJ, Valentini V, Das P, Rodel C, Kuo LJ. Long-term outcome in patients with a pathological complete response after chemioradiation for rectal cancer: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Oncol* 2010;11:835-44.

Maetzel D, Denzel S, Mack B, Canis M, Went P, Benk M, Kieu C, Papior P, Baeuerle PA, Munz M, Gires O. Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. *Nat Cell Biol* 2009;11:162-71.

Maines MD. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J* 1988;2: 2557-68.

Maines MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997;37:517-54.

Mallo GV, Rechreche H, Frigerio JM, Rocha D, Zweibaum A, Lacasa M, Jordan BR, Duseti NJ, Dagorn JC, Iovanna JL. Molecular cloning, sequencing and expression of the ARNm encoding human Cdx1 and Cdx2 homeobox. Down-regulation of Cdx1 and Cdx2 ARNm expression during colorectal carcinogenesis. *Int J Cancer* 1997;74:35-44.

Mancuso C, Pani G, Calabrese V. Bilirubin: an endogenous scavenger of nitric oxide and reactive nitrogen species. *Redox Rep* 2006;11:207-13.

Mani SK, Zhang H, Diab A, Pascuzzi PE, Lefrancois L, Fares N, Bancel B, Merle P, Andrisani O. EpCAM-regulated intramembrane proteolysis induces a cancer stem cell-like gene signature in hepatitis B virus-infected hepatocytes. *J Hepatol* 2016;65:888-89.

Mann B, Gelos M, Siedow A, Hanski ML, Gratchev A y cols. Targets genes of beta-catenin-T cell factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:1603-8.

Markowitz A. Screening and surveillance. En *Colorectal cancer: multimodality management*. Humana Press: 1990:65-80.

Marra G, Boland CR. Hereditary non-polyposis colorectal cancer: the syndrome, the genes, and historical perspective. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:1114-25.

Martínez-Miguel P, Medrano-Andrés D, Grier-Merino M, Ortiz A, Rodríguez-Puyol M, Rodríguez-Puyol D, López-Ongil S. Tweak up-regulates endothelin-1 system in mouse and human endothelial cells. *Cardiovasc Res* 2017;113:207-221.

Matsuoka J, Yashiro M, Sakurai K, Kubo N, Tanaka H, Muguruma K, Sawada T, Ohira M, Hirakawa K. Role of the stemness factors sox2, oct3/4, and nanog in gastric carcinoma. *J Surg Res* 2012;174:130-5.

Matsushita Y, Kumagai H, Yoshimoto A. Antitumor activities of (2''R)-4'-O-tetrahydropyranyl-adriamycin (TPH) and its combination with other antitumor agents on murine tumors. *J Antibiot* 1985;38:1408-19.

Mayerhofer M, Florian S, Krauth MT, Aichberger KJ, Bilban M, Marculescu R y cols. Identification of heme oxygenase-1 as a novel BCR/ABL-dependent survival factor in chronic myeloid leukemia. *Cancer Res* 2004;64:3148-54.

Melo FS, Kurtova AV, Harnoss JM, Kljavin N, Hoeck JD, Hung J, Anderson JE, Storm EE, Modrusan Z, Koeppen H, Dijkgraaf GJ, Piskol R, de Sauvage FJ. A distinct role for Lgr5+ stem cells in primary and metastatic colon cancer. *Nature* 2017;543:676-80.

Meng Q, Wu W, Pei T, Li L, Tang X, Sun H. Novel markers for circulating tumor stem cells in colorectal carcinoma. *Am J Transl Res* 2016;8:4233-41.

Minetti M, Mallozzi C, Di Stasi AM, Pietraforte D. Bilirubin is an effective antioxidant of peroxynitrite-mediated protein oxidation in human blood plasma. *Arch Biochem Biophys* 1998;352:165-174.

Minsky BD, Mies C, Recht A. Resectable adenocarcinoma of the rectosigmoid and rectum. The influence of blood vessel invasion. *Cancer* 1988;61:1417-24.

Minsky BD, Mies C, Rich TA, Recht A. Lymphatic vessel invasion is an independent prognostic factor for survival in colorectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1989;17:311-8.

Mizuguchi S, Capretta A, Suehiro S, Nishiyama N, Luke P, Potter RF, Fraser DD, Cepinskas G. Carbon monoxide-releasing molecule CORM-3 suppresses vascular endothelial cell SOD-1/SOD-2 activity while up-regulating the cell surface levels of SOD-3 in a heparin-dependent manner. *Free radical biology & medicine* 2010;49:1534-1541.

Molenaar P, O'Reilly G, Sharkey A, Kuc RE, Harding DP, Plumpton C. Characterization and localization of endothelin receptor subtypes in the human atrioventricular conducting system and myocardium. *Circ Res* 1993;72:526-538.

Moore BA, Otterbein LE, Turler A, Choi AM, Bauer AJ. Inhaled carbon monoxide suppresses the development of postoperative ileus in the murine small intestine. *Gastroenterology* 2003;124:377-91.

Moore BA, Overhaus M, Whitcomb J, Ifedigbo E, Choi AM, Otterbein LE, Bauer AJ. Brief inhalation of low-dose carbon monoxide protects rodents and swine from postoperative ileus. *Crit Care Med* 2005;33:1317-26.

Moore HG, Riedel E, Minsky BD. y cols. Adequacy of 1cm distal margin after restorative rectal cancer resection with sharp mesorectal excision and preoperative combined-modality therapy. *Ann Surg Oncol* 2003;10:80-5.

Morán A, Ortega P, de Juan C, Fernández Marcelo T, Frías C, Sánchez Pernaute A, Torres J.A, Días Rubio E, Iniesta P, Benito M. Differential colorectal carcinogenesis: Molecular basis and clinical relevance. *World J Gastrointest Oncol* 2010;2(3):151-158.

Morata-Tarifa C, Jiménez G, García, MA, Entrena JM, Griñán-Lisón C, Aguilera M, Picon-Ruiz M, Marchal JA. Low adherent cancer cell subpopulations are enriched in tumorigenic and metastatic epithelial-to-mesenchymal transition-induced cancer stem-like cells. *Sci Rep* 2016;6.

Morioka I, Wong RJ, Abate A, Vreman HJ, Contag CH, Stevenson DK. Systemic effects of orally-administrated zinc and tin (IV) metalloporphyrins on heme oxygenase expression in mice. *Pediatr Res* 2006;59:667-72.

Morita T, Kourembanas S. Endothelial cell expression of vasoconstrictors and growth factors is regulated by smooth muscle cell-derived carbon monoxide. *J Clin Invest* 1995;96:2676-82.

Morita T, Perrella MA, Lee ME, Kourembanas S. Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:1475-9.

Mukherjee S, Manna A, Bhattacharjee P, Mazumdar M, Saha S, Chakraborty S, Guha D. Non-migratory tumorigenic intrinsic cancer stem cells ensure breast cancer metastasis by generation of CXCR4+ migrating cancer stem cells. *Oncogene* 2016;35:4937-48.

Mulvihill JJ. The frequency of hereditary large bowel cancer. *Ingall JRF* 1983;61.

Munakata K, Uemura M, Tanaka S, Kawai K, Kitahara T, Miyo M, Kano Y, Nishikawa S, Fukusumi T, Takahashi Y, Hata T, Nishimura J, Takemasa I. Cancer Stem-like properties in Colorectal Cancer Cells with Low Proteasome Activity. *Clin Cancer Res* 2016;22:5277-86.

Myant KB, Cammareri P, McGhee, EJ, Ridgway RA, Huels DJ, Cordero JB, Schwitalla S, Kalna G, Ogg EL, Athineos D, et al. ROS production and NF- $\kappa$ B activation triggered by RAC1 facilitate WNT-driven intestinal stem cell proliferation and colorectal cancer initiation. *Cell stem cell* 2013;12:761-773.

Na HK, Surh YJ. Oncogenic potential of Nrf2 and its principal target protein heme oxygenase-1. *Free Radic Biol Med* 2014, 67, 353–365.

Na HK, Lee JY. Molecular Basis of Alcohol-Related Gastric and Colon Cancer. *Int J Sci* 2017;18:1116.

Naito Y, Takagi T, Uchiyama K, Yoshikawa T. Heme oxygenase-1: a novel therapeutic target for gastrointestinal diseases. *J Clin Biochem Nutr* 2011;48:126-33.

Naito Y, Takagi T, Yoshikawa T. Heme oxygenase-1: a novel therapeutic target for inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;20:177-84.

Nam SY, Sabapathy K. p53 promotes cellular survival in a context-dependent manner by directly inducing the expression of haeme-oxygenase-1. *Oncogene* 2011;30:4476-4486.

Nava HR, Pagana TJ. Postoperative surveillance of colorectal carcinoma. *Cancer* 1982;49:1043-7.

Ng AY, Waring P, Ristevski S, Wang C, Wilson T, Pritchard M, Hertzog P, Kola I. Inactivation of the transcriptional factor Elf3 in mice results in dysmorphogenesis and altered differentiation of intestinal epithelium. *Gastroenterology* 2002;122:1455-66.

Nelson JB, Chan-Tack K, Hedican SP, Magnuson SR, Opgenorth TJ, Bova GS. Endothelin-1 production and decreased endothelin B receptor expression in advanced prostate cancer. *Cancer Res* 1996;56:663-668.

Nelson JB, Hedican SP, George DJ, Reddi AH, Piantadosi S, Eisenberger MA. Identification of endothelin-1 in the pathophysiology of metastatic adenocarcinoma of the prostate. *Nat Med* 1995;1:944-949.

Nelson J, Bagnato A, Battistini B, Nisen P. The endothelin axis: emerging role in cancer. *Nature Reviews Cancer* 2003;3:110-116.

Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 2004;303:1483-7.

Neurath MF, Becker C, Barbulescu K. Role of NF-kappaB in immune and inflammatory responses in the gut. *Gut* 1998;43:856-60.

Ni C, Zhang Z, Zhu X, Liu Y, Qu D, Wu P, Huang J, Xu AX. Prognostic value of CD166 expression in cancers of the digestive system: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2013;8:70958.

Nishie A, Ono M, Shono T, Fukushi J, Otsubo M, Onoue H y cols. Macrophage infiltration and heme oxygenase-1 expression correlate with angiogenesis in human gliomas. *Clin Cancer Res* 1999;5:1107-13.

Nuhn P, Kunzli BM, Hennig R, Mitkus T, Ramanauskas T, Nobiling R, Meur SC, Friess H, Berberat PO. Heme oxygenase-1 and its metabolites affects pancreatic tumor growth *in vivo*. *Mol Cancer* 2009;8:37.

Nunez DJ, Brown MJ, Davenport AP, Neylon CB, Schofield JP, Wyse RK. Endothelin-1 ARNm is widely expressed in porcine and human tissues. *J Clin Invest* 1990;85:1537-1541.

Nussdorfer GG, Rossi G.P, Malendowicz LK, Mazzocchi G. Autocrine-paracrine endothelin system in the physiology and pathology of steroid-secreting tissues. *Pharmacol Rev* 1992;51:403-438.

O'Brien CA, Pollet A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 2007;445:106-110.

O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:1420-5.

Oates PS, West AR. Heme in intestinal epithelial cell turnover, differentiation, detoxification, inflammation, carcinogenesis, absorption and motility. *World J Gastroenterol* 2006;12:4281-4295.

Orian-Rousseau V. CD44, a therapeutic target for metastasising tumours. *Eur J Cancer*;46:1271-1277.

Orozco Ibarra M, Pedraza Chaverri J. Hemo oxigenasa: aspectos básicos y su importancia en el sistema nervioso central. *Arch Neurocienc* 2010;15(1):47-55.

Oskarsson T, Batlle E, Massague J. Metastatic stem cells: sources, niches, and vital pathways. *Cell Stem Cell* 2014;14:306-21.

Otterbein LE, Bach FH, Alam J, Soares M, Tao Lu H, Wysk M, Davis RJ, Flavell RA, Choi AM. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med* 2000;6(4):422-8.

Otterbein LE, Choi AM. Carbon monoxide at low concentrations causes growth arrest and modulates tumor growth in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:A476.

Otterbein LE, Choi AM. Heme oxygenase colors of defense against cellular stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;279:1029-37.

Otterbein LE, Lee PJ, Chin BY, Petrache I, Camhi SL, Alam J, Choi AM. Protective effects of heme oxygenase-1 in acute lung injury. *Chest* 1999;116(1):61S-63S.

Otterbein LE, Soares MP, Yamashita K, Bach FH. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends Immunol* 2003;24(8):449-55.

Ozgul Ozdemir RB, Ozdemir AT, Oltulu F, Kurt K, Yigiturk G, Kirmaz C. A comparison of cancer stem cell markers and nonclassical major histocompatibility complex antigens in colorectal tumor and noncancerous tissues. *Ann Diagn Pathol* 2016;25:60-3.

Palmer G, Martling A, Cedermarck B, Holm T. A population-based study on the management and outcome in patients with locally recurrent rectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2007;14:447-54.

Pang R, Law WL, Chu AC, Poon JT, Lam CS, Chow AK, Ng L, Cheung LW, Lan XR, Lan HY, Tan VP, Yau TC, Poon RT. A subpopulation of CD26+ cancer stem cells with metastatic capacity in human colorectal cancer. *Cell Stem Cell* 2010;6:603-15.

Pao MM, Tsutsumi M, Liang G, Uzvolgyi E, Gonzales FA, Jones PA. The endothelin receptor B (EDNRB) promoter displays heterogeneous, site specific methylation patterns in normal and tumor cells. *Hum Mol Genet* 2001;10(9):903-910.

Paolillo M, Russo MA, Curti D, Lanni C, Schinelli S. Endothelin B receptor antagonists block proliferation and induce apoptosis in glioma cells. *Pharmacol Res* 2010;61:306-315.

Parilla Patricio P, Landa García JL. En: *Cáncer colorrectal: Aspectos generales y lesiones precancerosas*. Cirugía AEC 2ª Ed: 499-511. 2009.

Park EJ, Lim LH, Nam SI, Park JW, Kwon TK. Rottlerin induces heme oxygenase-1 (HO-1) up-regulation through reactive oxygen species (ROS) dependant and PKC delta-independent pathway in human colon cancer HT29 cells. *Biochimie* 2010;92:110-115.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2005;55:74-108.

Parsons BL, McKim KL, Myers MB. Variation in organ-specific PIK3CA and KRAS mutant levels in normal human tissues correlates with mutation prevalence in corresponding carcinomas. *Environ Mol Mutagen* 2017;58:466-76.

Paul G, Bataille F, Obermeier F, Bock J, Klebl F, Strauch U, Lochbaum D, Rummele P, Farkas S, Scholmerich J, Fleck M, Rogler G, Herfarth H. Analysis of intestinal heme oxygenase-1 (HO-1) in clinical and experimental colitis. *Clin Exp Immunol* 2005;140:547-555.

Pawlik TM, Raut CP, Rodríguez Bigas MA. Colorectal carcinogenesis: MSI-H vs MSI-L. *Dis Markers* 2004;20:199-206.

Peduto Eberl L, Bovey R, Juillerat-Jeanneret L. Endothelin-receptor antagonists are proapoptotic and antiproliferative in human colon cancer cells. *Br J Cancer* 2003;88:788-795.

Pérez-Moreno P, Indo S, Niechi I, Huerta H, Cabello P, Jara L, Aguayo F, Varas-Godoy M, Burzio VA, Tapia JC. Endothelin-converting enzyme-1c promotes stem cell traits and aggressiveness in colorectal cancer cells. *Mol Oncol* 2020;14:347-362.

Pfeifer M. Colon construction. *Nature* 2002;420:274-276.

Pickhardt PJ, Choi JR, Hwang I. Computed Tomographic virtual colonoscopy to screen for colorectal neoplasia in asymptomatic adults. *N Engl J Med* 2003;349:2191-200.

Piedra J, Miravet S, Castaño J, Pálmer HG, Heisterkamp N, García de Herreros A, Duñach M. p120 Catenin-associated Fer and Fyn tyrosine kinases regulate beta-catenin Tyr-142 phosphorylation and beta-catenin-alpha-catenin Interaction. *Mol Cell Biol* 2003;23:2287-97.

Pierre F, Freeman A, Taché S, Van der Meer R, Corpet DE. Beef meat and blood sausage promote the formation of azoxymethane-induced mucin-depleted foci and aberrant crypt foci in rat colons. *J Nutr* 2004;134:2711-6.

Pierre F, Taché S, Petit CR, Van der Meer R, Corpet DE. Meat and cancer: haemoglobin and haemin in a low-calcium diet promote colorectal carcinogenesis at the aberrant crypt stage in rats. *Carcinogenesis* 2003;24:1683-90.

Piskounova E, Agathocleous M, Murphy MM, Hu Z, Huddlestun SE, Zhao Z, Leitch AM, Johnson TM, DeBerardinis RJ, Morrison SJ. Oxidative stress inhibits distant metastasis by human melanoma cells. *Nature* 2015; 52:186–191.

Polakis P. The oncogenic activation of beta-catenin. *Curr Opin Genet Dev* 1999;9:15-21.

Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, Massague J. Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 1994;79(1):59-66.

Porru M, Pompili L, Caruso C, Biroccio A, Leonetti C. Targeting KRAS in metastatic colorectal cancer: current strategies and emerging opportunities. *J Exp Clin Cancer Res* 2018;

Poultides GA, Servais EL, Saltz LB. Outcome of primary tumor in patients with synchronous stage IV colorectal cancer receiving combination chemotherapy without surgery as initial treatment. *J Clin Oncol* 2009;27:33790-84.

Powell SM, Petersen GM, Krush AJ. y cols. Molecular diagnosis of familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 1993;329:1982-7.

Puentes-Pardo JD, Moreno-SanJuan S, Carazo Á, León J. Heme Oxygenase-1 in Gastrointestinal Tract Health and Disease. *Antioxidants* 2020:9.

Puglisi MA, Barba M, Corbi M, Errico MF, Giorda E y cols. Identification of Endothelin-1 and NR4A2 as CD133-regulated genes in colon cancer cells. *J Pathol* 2011;225:305-314.

Puisieux A, Brabletz T, Caramel J. Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors. *Nat Cell Biol* 2014;16:488-94.

Qualtrough D, Hinoi T, Fearon E, Paraskeva C. Expression of CDX2 in normal and neoplastic human colon tissue and during differentiation of an in vitro model system. *Gut* 2002;51:184-90.

Quirke P, Durdey P, Dixon MF, Williams NF. Local recurrence of rectal adenocarcinoma due to inadequate surgical resection: histopathological study of lateral tumour spread and surgical excision. *Lancet* 1986;2:969-9.

Rahbari NN, Ulrich AB, Bruckner T, Munter M, Nickles A, Contin P. Surgery for locally recurrent rectal cancer in the era of total mesorectal excision. *Ann Surg* 2011;253:522-33.

Rai A, Rajeshkumar NV, Gulati A. Effect of the ETB receptor agonist, IRL-1620, on paclitaxel plasma pharmacokinetics of breast tumor rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 2006;231:1120-1122.

Ransohoff DF, Riddell RH, Levin B. Ulcerative colitis and colonic cancer. Problems in assessing the diagnostic usefulness of mucosal dysplasia. *Dis Colon Rectum* 1985;28:383-8.

Rassouli FB, Matin MM, Saeinasab M. Cancer stem cells in human digestive tract malignancies. *Tumour Biol* 2016;37:7-21.

Ratajczak M. Ho-1 inhibits migration of leukemic cells. *Oncotarget* 2017;8:89429-89430.

Raut CP, Pawlik TM, Rodríguez Bigas MA. Clinicopathologic features in colorectal cancer patients with microsatellite instability. *Mutat Res* 2004;568:275-82.

Renehan AG, Malcomson L, Emsley R, Gollins S, Maw A, Myint AS. Watch-and-wait approach versus surgical resection after chemoradiotherapy for patients with rectal cancer (the OnCoRe project): A propensity-score matched cohort analysis. *Lancet Oncol* 2016;17:174-83.

Resink TJ, Hahn AW, Scott-Burden T, Powell J, Weber E, Buhler FR. Inducible endothelin ARNm expression and peptide secretion in cultured human vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;168:1303–1310.

Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, y cols. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *N Engl J Med* 2003;349:247-57.

Ricchi P, Di Matola T, Ruggiero G, Zanzi D, Apicella A, di Palma A y cols. Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on colon carcinoma Caco-2 cell responsiveness to topoisomerase inhibitor drugs. *Br J Cancer* 2002;86:1501–9.

Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M y cols. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 2007;445:111-115.

Ricklin D, Hajshengalis G, Yang K, Lambris LD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* 2010;11:785-97.

Rockman SP, Currie SA, Ciavarella M, Vincan E, Dow C, Thomas RJ, Phillips WA. Id2 is a target of the beta-catenin/T cell factor pathway in colon carcinoma. *J Biol Chem* 2001;276:45113-9.

Rodriguez-Bigas MA, Petrelli NJ. Management of hereditary colon cancer syndromes. En Saltz L.B: *Colorectal cancer: multimodality management*. Humana Press 2002: 99-114.

Roh MS, Yothers GA, O'Connell MJ. y cols. The impact of capecitabine and oxaliplatin in the preoperative multimodality treatment in patients with carcinoma of the rectum: NSABP R-04. *J Clin Oncol* 2011;29: 3503.

Roh JL, Kim EH, Jang H, Shin D. Nrf2 inhibition reverses the resistance of cisplatin-resistant head and neck cancer cells to artesunate-induced ferroptosis. *Redox Biol* 2017;11:254–262.

Rosano L, Spinella F, Bagnato A. Endothelin 1 in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Cancer* 2013;13:637–651.

Roselló S, Cervantes A. El tratamiento no quirúrgico del cáncer de recto localizado es una opción experimental. *Cir Esp* 2016;94:311-2.

Rosen SA, Buell JF, Yoshida A. Initial presentation with stage IV colorectal cancer: how aggressive should we be? *Arch Surg* 2000;135:530-4.

Rosenberg DW, Kappas A. Induction of heme oxygenase in the small intestinal epithelium: a response to oral cadmium exposure. *Toxicology* 1991; 67: 199-210.

Roura S, Miravet S, Piedra J, García de Herreros A, Duñach M. Regulation of E-cadherin/Catenin association by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 1999;274:36734-40.

Rubanyi GM, Polokoff MA. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol Rev* 1994;46:325–415.

Rubin SA, Levin ER. The endocrinology of vasoactive peptides: synthesis to functions. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78(1):6-10.

Ruiz-López PM, Rodríguez Cuellar E, Alcalde J, Landa I, Jaurrieta E. Informe sobre el Proyecto Nacional para la Gestión Clínica de Procesos Asistenciales. Tratamiento quirúrgico del cáncer colorrectal (II). Desarrollo de la vía clínica. *Cir Esp* 2003;74:206-20.

Rullier E, Laurent C, Bretagnol F. y cols. Sphincter-saving resection for all rectal carcinomas: the end of the 2cm distal rule. *Ann Surg* 2005;241:465-9.

Russell FD, Davenport AP. Secretory pathways in endothelin synthesis. *Br J Pharmacol* 1999;126:391–398.

Russo M, Siravegna G, Blaszkowsky LS, Corti G, Crisafulli G y cols. Tumor heterogeneity and lesion-specific response to targeted therapy in colorectal cancer. *Cancer Discov* 2016;6:147-153.

Rycaj K, Tang DG. Cancer stem cells and radioresistance. *Int J Radiat Biol* 2014;90:615-21.

Ryoo IG, Kim G, Choi BH, Lee SH, Kwak MK. Involvement of NRF2 Signaling in Doxorubicin Resistance of Cancer Stem Cell-Enriched Colonospheres. *Biomol Ther* 2016;24:482-488.

Ryter SW, Alam J, Choi AM. Heme-oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev* 2006;86:583-650.

Ryter SW, Tyrrell RM. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radic Biol Med* 2000;28:289-309.

Sachar DB. Cancer in Crohn's disease: dispelling the myths. *Gut* 1994;35:1507-8.

Salani D, Di Castro V, Nicotra MR, Rosano L, Tecce R, Venuti A, Natali PG, Bagnato A. Role of endothelin-1 in neovascularization of ovarian carcinoma. *Am J Pathol* 2000;157:1537-1547.

Saltz LB, Niedzwiedzki D, Hollis D. Irinotecan fluorouracil plus leucovorin is not superior to fluorouracil plus leucovorin alone as adjuvant treatment for stage III colon cancer: results of CALGB 89803. *J Clin Oncol* 2007;25:3456-61.

Samowitz WS, Curtin K, Ma KN, Schaffer D, Coleman LW, Leppert M, Slatery ML. Microsatellite instability in sporadic colon cancer is associated with an improved prognosis at the population level. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:917-923.

Sánchez C, Rodeiro I, Garrido G, Delgado R. Hemo-Oxigenasa 1: Un Promisorio Blanco Terapéutico. *Acta Farm Bonaerense* 2005;24(4):619-26.

Sancho-Muriel J, Frasson M, Hervás D, Flor-Lorente B. y cols. Resultados quirúrgicos estándar tras resección oncológica de colon. Creación de un nomograma para la autoevaluación. *Cir Esp* 2017;95: 30-7.

Sandler RS. Epidemiology and risk factors for colorectal cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 1996;25:717-35.

Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J Clin Oncol* 2010;28:3219-26.

Sasaki N, Clevers H. Studying cellular heterogeneity and drug sensitivity in colorectal cancer using organoid technology. *Curr Opin Genet Dev* 2018;52:117-22.

Sato K, Balla J, Otterbein L, Smith RN, Brouard S, Lin Y, Csizmadia E, Sevigny J, Robson SC, Vercellotti G, Choi AM, Bach FM, Soares MP. Carbon monoxide generated by heme oxygenase-1 suppresses the rejection of mouse-to-rat cardiac transplants. *J Immunol* 2001;166(6):4185-94.

Sato K, Ito K, Kohara H, Yamaguchi Y, Adachi K, Endo H. Negative regulation of catalase gene expression in hepatoma cells. *Mol Cell Biol* 1992;12:2525-33.

Sato T, van Es JH, Snippert HJ, Stange DE, Vries RG, et al. Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* 2011;469:415-8.

Sauer R, Becker H, Hohenberger W, et al. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med* 2004;351:1731-40.

Sawa T, Akaike T, Kida K, Fukushima Y, Takagi K, Maeda H. Lipid peroxyl radicals from oxidized oils and heme-iron: Implication of a high-fat diet in colon carcinogenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998;7:1007-12.

Schulz-Geske S, Erdmann K, Wong RJ, Stevenson DK, Schroder H, Groseer N. Molecular mechanism and functional consequences of lansoprazole-mediated heme oxygenase-1 induction. *World J Gastroenterol* 2009;15:4392-4401.

Scott JR, Cukiernik MA, Ott MC, Bihari A, Badhwar A, Gray DK, Harris KA, Parry NG, Potter RF. Low-dose inhaled carbon monoxide attenuates the remote intestinal inflammatory response elicited by hindlimb ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009;296:9-14.

Sebastián VP, Salazar GA, Coronado-Arrázola I, Schultz BM, Vallejos OP, Berkowitz L, Álvarez-Lobos MM, Riedel CA, Kalergis AM, Bueno SM. Heme Oxygenase-1 as a Modulator of Intestinal Inflammation Development and Progression. *Front Immunol* 2018;9.

Selting K, Kolli P, Henry C, Owen N, Wipke-Tevis D, Eisen M. Use of a novel endothelin-B agonist (SPI-1620) to alter blood flow to solid tumors for improved chemotherapy delivery in dogs with spontaneously-occurring tumors. *Proc Am Assoc Cancer Res* 2008;49:abst 365.

Seo GS, Jiang WY, Chi JH, Jin H, Park WC, Sohn DH, Park PH, Lee SH. Heme oxygenase-1 promotes tumor progression and metastasis of colorectal carcinoma cells by inhibiting antitumor immunity. *Oncotarget* 2015; 6:19792-19806.

Seo KJ, Kim M, Kim J. Prognostic implication of adhesion molecule expression in colorectal cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8:4148-57.

Serizawa F, Patterson E, Potter RF, Fraser DD, Cepinskas G. Pretreatment of human cerebrovascular endothelial cells with CO-releasing molecule-3 interferes with JNK/AP-1 signaling and suppresses LPS-induced proadhesive phenotype. *Microcirculation* 2015;22:28-36.

Sesink AL, Termont DS, Kleibeuker JH, Van der Meer R. Red meat and colon cancer: the cytotoxic and hyperproliferative effects of dietary heme. *Cancer Res* 1999;59:5704-9.

Sesink AL, Termont DS, Kleibeuker JH, Van Der Meer R. Red meat and colon cancer: dietary haem, but not fat, has cytotoxic and hyperproliferative effects on rat colonic epithelium. *Carcinogenesis* 2000;21:1909-15.

Sesink AL, Termont DS, Kleibeuker JH, Van der Meer R. Red meat and colon cancer: dietary haem-induced colonic cytotoxicity and epithelial hyperproliferation are inhibited by calcium. *Carcinogenesis* 2001;22:1653-9.

Sharif T, Dai C, Martell E, Ghassemi-Rad MS, Hanes MR, Murphy PJ, Kennedy BE, Venugopal C, Subapanditha M, Giacomantonio CA, et al. TAp73 Modifies Metabolism and Positively Regulates Growth of Cancer Stem-Like Cells in a Redox-Sensitive Manner. *Clin Cancer Res* 2019;25:2001-2017.

Shen Y, Cao D. Hepatocellular carcinoma stem cells: origins and roles in hepatocarcinogenesis and disease progression. *Front Biosci* 2012;4:1157-69.

Shibue T, Weinberg RA. EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implication. *Nat Rev Clin Oncol* 2017;14:611-629.

Shinagawa K, Kitadai Y, Tanaka M, Sumida T, Kodama M. Mesenchymal stem cells enhance growth and metastasis of colon cancer. *Int J Cancer* 2010;127:2323-33.

Shinagawa K, Kitadai Y, Tanaka M, Sumida T, Onoyama M y cols. Stroma-directed imatinib therapy impairs the tumor-promoting effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in orthotopic transplantation model of colon cancer. *Int J Cancer* 2013;132:813-23.

Shiokawa D, Sakai H, Ohata H, Miyazaki T, Kanda Y, Sekine S, Narushima D, Hosokawa M, Kato M, Suzuki Y, et al. Slow-Cycling Cancer Stem Cells Regulate Progression and Chemoresistance in Colon Cancer. *Cancer Research* 2020;80:4451-4464.

Shmelkov SV, Butler JM, Hooper AT, Hormigo A, Kushner J, Milde T, St Clair R, Baljevic M, White I, Jin DK, Chadburn A, Murphy AJ, Valenzuela DM. CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors. *J Clin Invest* 2008;118:2111-20.

Shyh-Chang N, Daley GQ, Cantley LC. Stem cell metabolism in tissue development and aging. *Development* 2013;140:2535-47.

Sikorski EM, Hock T, Hill-Kapturczak N, Agarwal A. The story so far: Molecular regulation of the heme oxygenase-1 gene in renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;286:425-41.

Silberg DG, Furth EE, Taylor JK, Schuck T, Chiou T, Traber PG. CDX1 protein expression in normal, metaplastic, and neoplastic human alimentary tract epithelium. *Gastroenterology* 1997;113:478-86.

Simizu S, Takada M, Umezawa K, Imoto M. Requirement of caspase-3 (-like) protease-mediated hydrogen peroxide production for apoptosis induced by various anticancer drugs. *J Biol Chem* 1998;273:26900-7.

Singh P, O'Connell M, Shubhashish S. Epigenetic regulation of human DCLK-1 gene during colon-carcinogenesis: clinical and mechanistic implication. *Stem Cell Investig* 2016;3:51.

Sinicrope FA, Foster NR, Thibodeau SN, y cols. DNA mismatch repair status and colon cancer recurrence and survival in clinical trials of 5-fluorouracil-based adjuvant therapy. *J Natl Cancer Inst* 2011;103:863-75.

Siow RC, Sato H, Mann GE. Heme oxygenase-carbon monoxide signalling pathway in atherosclerosis: anti-atherogenic actions of bilirubin and carbon monoxide. *Cardiovasc Res* 1999;41:385-94.

Slebos DJ, Ryter SW, Choi AM. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide in pulmonary medicine. *Respir Res* 2003;4:7.

Smakman N, Borel Rinkes IH, Voest EF, Kranenburg O. Control of colorectal metastasis formation by K-ras. *Biochim Biophys Acta* 2005;1756:103-114.

Smollich M, Wülfing P. Targeting the endothelin system: novel therapeutic options in gynecological, urological and breast cancers. *Expert Rev Anticancer Ther* 2008;8:1481-1493.

Soares MP, Seldon MP, Gregoire IP, Vassilevskaia T, Berberat PO, Yu J, Tsui TY, Bach FH. Heme oxygenase-1 modulates the expression of adhesion molecules associated with endothelial cell activation. *J Immunol* 2004;172:3553-63.

Solomon MJ, Schnitzler M. Cancer and inflammatory bowel disease: bias, epidemiology, surveillance, and treatment. *World J Surg* 1998;22:352-8.

Song R, Kubo M, Morse D, Zhou Z, Zhang X, Dauber JH, Fabisiak J, Alber SM, Watkins SC, Zuckerbraun BS, Otterbein LE, Ning W, Oury TD, Lee PJ, McCurry KR, Choi AM. Carbon monoxide induces cytoprotection in rat orthopic lung transplant via anti-inflammatory and anti-apoptotic effects. *Am J Pathol* 2003;163:231-42.

Spinella F, Rosano L, Di Castro V, Natali PG, Bagnato A. Endothelin-1 induces vascular endothelial growth factor by increasing hypoxia-inducible factor -1-alpha in ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem* 2002;277:27850-27855.

Spit M, Koo BK, Maurice M. Tales from the crypt: intestinal niche signals in tissue renewal, plasticity and cancer. *Open Biol* 2018;8:180120.

Spratt JC, Goddard J, Patel N, Strachan FE, Rankin AJ, Webb DJ. Systemic ETA receptor antagonism with BQ-123 blocks ET-1 induced forearm vasoconstriction and decreases peripheral vascular resistance in healthy men. *Br J Pharmacol* 2001;134:648–654.

Spring FA, Dalchau R, Daniels GL, Mallison G, Judson PA, Parsons SF, Fabre JW, Anstee DJ. The Ina and Inb blood group antigens are located on a glycoprotein of 80,000 MW (the CDw44 glycoprotein) whose expression is influenced by the In(Lu) gene. *Immunology* 1988;64:37-43.

Stavropoulou V, Kaspar S, Brault L, Sanders MA, Juge S, Morretini S. MLL-AF9 Expression in Hematopoietic Stem Cells Drives a Highly Invasive AML Expressing EMT-Related Genes Linked to Poor Outcome. *Cancer Cell* 2016;30:43-58.

Stierum R, Gaspari M, Dommels Y, Ouatas T, Pluk H, Jespersen S y cols. Proteome analysis reveals novel proteins associated with proliferation and differentiation of the colorectal cancer cell line Caco-2. *Biochim Biophys Acta* 2003;1650:73–91.

Stocker R. Antioxidant activities of bile pigments. *Antioxid Redox Signal* 2004;6:841-9.

Subramanian V, Meyer B, Evans GS. The murine Cdx1 gene product localises to the proliferative compartment in the developing and regenerating intestinal epithelium. *Differentiation* 1998;64:11-8.

Su YK, Shih PH, Lee WH, Bamodu OA, Wu ATH y cols. Antrodia cinnamomea sensitized radio-/chemotherapy of cancer stem-like cells by modulating microRNA expression. *J Ethnopharmacol* 2017;207:47-56.

Suh E, Traber PG. An intestine-specific homeobox gene regulates proliferation and differentiation. *Mol Cell Biol* 1996;16:619-25.

Sun X, Liu X. Cancer metastasis: enactment of the script for human reproductive drama. *Cancer Cell Int* 2017;17:51.

Sunamura M, Duda DG, Ghattas MH, Lozonschi L, Motoi F, Yamauchi J, Matsuno S, Shibahara S, Abraham NG. Heme oxygenase-1 accelerates tumor angiogenesis of human pancreatic cancer. *Angiogenesis* 2003;6:15-24.

Tachezy M, Zander H, Gebauer F, Marx A, Kaifi JT, Izbicki JR, Bockhorn M. Activated leukocyte cell adhesion molecule (CD166) - its prognostic power for colorectal cancer patients. *J Surg Res* 2012;177:15-20.

Takagi T, Naito Y, Okada H, Ishii T, Mizushima K, Akagiri S, Adachi S, Handa O, Kokura S, Ichikawa H, Itoh K, Yamamoto M, Matsui H, Yoshikawa T. Lansoprazole, a proton pump inhibitor, mediates anti-inflammatory effect in gastric mucosal cells through the induction of heme oxygenase-1 via activation of NF-E2-related factor 2 and oxidation of kelch-like ECH-associating protein 1. *J Pharmacol Exp Ther* 2009;331:255-264.

Takagi T, Naito Y, Yoshikawa T. The expression of heme oxygenase-1 induced by lansoprazole. *J Clin Biochem Nutr* 2009;45:9-13.

Takai M, Umemura I, Yamasaki K, Watakabe T, Fujitani Y, Oda K. A potent and specific agonist, Suc-[Glu9,Ala11,15]-endothelin-1(8-21), IRL 1620 for the ETB receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;184:953-959.

Takamiya R, Murakami M, Kajimura M, Goda N, Makino N, Takamiya Y, Yamaguchi T, Ishimura Y, Hozumi N, Suematsu M. Stabilization of mast cells by heme oxygenase-1: an anti-inflammatory role. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:H861-70.

Takebe N, Harris PJ, Warren RQ, Ivy SP. Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog pathways. *Nat Rev Clin Oncol* 2011;8:97-106.

Tanaka S, Akaike T, Fang J y cols. Antiapoptotic effect of heme oxygenase-1 induced by nitric oxide in experimental solid tumor. *Br J Cancer* 2003;88:902-9.

Tang DG. Understanding cancer stem cell heterogeneity and plasticity. *Cell Res* 2012;22:457-72.

Temple LK, Bacik J, Savatta SG. y cols. The development of a validated instrument to evaluate bowel function after sphincter-preserving surgery for rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2005;48:1353-65.

Temple LK, Hsieh L, Wong WD. Use of surgery among elderly patients with stage IV colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2004;22:3475-84.

Tenhuen R, Marver HS, Schmid R. Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *J Biol Chem* 1969;244:6388-94.

Tenhuen R, Marver HS, Schmid R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1968;61:748.

Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 1999;398:422-6.

Thien A, Prentzell MT, Holzwarth B, Klasener K, Kuper I, Boehlke C, Sonntag AG. TSC1 activates TGF-beta-Smad2/3 signaling in growth arrest and epithelial-to-mesenchymal transition. *Dev Cell* 2015;32:617-30.

Todaro M, Alea MP, Di Stefano AB, Cammareri P, Vermeulen L y cols. Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4. *Cell Stem Cell* 2007;1:389-402.

Todaro M, Francipane MG, Medema JP, Stassi G. Colon cancer stem cells: promise of targeted therapy. *Gastroenterology* 2010;138:2151-62.

Todaro M, Gaggianesi M, Catalano V, Benfante A, Iovino F y cols. CD44v6 Is a Marker of Constitutive and Reprogrammed Cancer Stem Cells Driving Colon Cancer Metastasis. *Cell Stem Cell* 2014;14:342-356.

Toden S, Tran Hm, Tovar-Camargo OA, Okugawa Y, Goel A. Epigallocatechin-3-gallate targets cancer stem-like cells and enhances 5-fluorouracil chemosensitivity in colorectal cancer. *Oncotarget* 2016;7:16158-71.

Torisu-Itakura H, Furue M, Kuwano M, Ono M. Co-expression of thymidine phosphorylase and heme oxygenase-1 in macrophages in human malignant vertical growth melanomas. *Jpn J Cancer Res* 2000;91:906-10.

Tournigand C, Andre T, Bonnetain F. Adjuvant therapy with fluorouracil and oxaplatin in stage II and elderly patients (between ages 70 y 75 years) with colon cancer: subgroup analyses of the Multicenter International Study of Oxaliplatin, Fluorouracil and Leucovorin in the Adjuvant Treatment of Colon Cancer trial. *J Clin Oncol* 2012;30:3353-60.

Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov* 2009;8:579-591.

Trentin A, Glavieux-Pardanaud C, Le Douarin NM, Dupin E. Self-renewal capacity is a widespread property of various types of neural crest precursor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:4495-4500.

Trzpis M, McLaughlin PM, de Leij LM, Harmsen MC. Epithelial cell adhesion molecule: more than a carcinoma marker and adhesion molecule. *Am J Pathol* 2007;171:386-95.

Tsuji MH, Yanagawa T, Iwasa S y cols. Heme oxygenase-1 expression on oral squamous cell carcinoma as involved in lymph node metastasis. *Cancer Lett* 1999;138:53-59.

Tulis DA, Durante W, Liu X, Evans AJ, Peyton KJ, Schafer AI. Adenovirus-mediated heme oxygenase-1 gene delivery inhibits injury-induced vascular neointima formation. *Circulation* 2001;104:2710-15.

Tullius SG, Nieminen-Kelha M, Buelow R. Inhibition os ischemia-reperfusion injury and chronic graft deterioration by a single-donor treatment with cobalt-protoporphyrin for the induction of heme oxygenase-1. *Transplantation* 2002;74:591-8.

Turner ND, Lloyd SK. Association between red meat consumption and colon cancer: A systemic review of experimental results. *Exp Biol Med* 2017;242:813-839.

Twelves C, Wong A, Nowacki MP. Capecitabine as adjuvant treatment for stage III colon cancer. *N Engl J Med* 2005;352:2696-704.

Uc A, Britigan BE. Does heme oxygenase-1 have a role in Caco-2 cell cycle progression? *Exp Biol Med (Maywood)* 2003;228:590-5.

Uchida H, Yamazaki K, Fukuma M, Yamada T, Hayashida T, Hasegawa H, Kitajima M, Kitagawa Y, Sakamoto M. Overexpression of leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 in colorectal cancer. *Cancer Sci* 2010;101:1731-7.

Vachharajani TJ, Work J, Issekutz AC, Granger DN. Heme oxygenase modulates selectin expression in different regional vascular beds. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;278:H1613-17.

Van Cutsem E, Labianca R, Bodoky G. Randomized phase III trial comparing biweekly infusional fluorouracil/leucovorin alone or with irinotecan in the adjuvant treatment of stage III colon cancer: PE-TACC-3. *J Clin Oncol* 2009;27:3117-25.

Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, Sobrero A, Van Krieken JH, Aderka D y cols. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 2016;27:1386-422.

Van der Flier LG, Clevers H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Anny Rev Physiol* 2009;71:241-60.

Van der Meer-van Kraaij C, Kramer E, Jonker-Termont D, Katan MB, van der Meer R, Keijer J. Differential gene expression in rat colon by dietary heme and calcium. *Carcinogenesis* 2005;26:73-9.

Van der Pas MH, Haglind E, Cuesta MA. Colorectal cancer. Laparoscopic or Open Resection II Study Group (COLOR II). Short-term outcomes of a randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2013;14:210-8.

Varga C, Lszlo F, Fritz P, Cavicchi M, Lamarque D, Horvath K, Posa A, Berko A, Whittle BJ. Modulation by heme and zinc prptoporphyrin of colonic heme oxygenase-1 and experimental inflammatory bowel disease in the rat. *Eur J Pharmacol* 2007;561:164-171.

Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT. Hereditary non-polypisis colorectal cancer. *Lancet* 1991;338:877.

Vasen HF, Moslein G, Alonso A. Guidelines for the clinical management of Lynch Syndrome (HNPCC). *J Med Genet* 2007;44(6):353-362.

Vermeulen L, de Sousa e Melo F, Richel DJ, Medema JP. The developing cancer stem-cell model: clinical challenges and opportunities. *Lancer Oncol* 2012;13:e83-9.

Vermeulen L, Todaro M, de Sousa Mello F, Sprick MR, Kemper K, Perez Alea M, Richel DJ, Stassi G, Medema JP. Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:13427-32.

Vijayan V, Mueller S, Baumgart-Vogt E, Immenschuh S. Heme oxygenase-1 as a therapeutic target in inflammatory disorders of gastrointestinal track. *World J Gastroenterol* 2010;16:3112-3119.

Vile GF, Tyrrell RM. Oxidative stress resulting from ultraviolet A irradiation of human skin fibroblasts leads to a heme oxygenase-dependent increase in ferritin. *J Biol Chem* 1993;268:14678-81.

Vitek L, Schwertner HA. The heme catabolic pathway and its protective effects on oxidative stress-mediated diseases. *Adv Clin Chem* 2007;43:1-57.

Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR. Genetic alteration during colorectal tumor developoment. *New England J Med* 1988;319:525-32.

Von Moltke J, Ji M, Liang HE, Locksley RM. Tuff-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2-epithelial response circuit. *Nature* 2016;529:221-5.

Wagener FA, da Silva JL, Farley T, de Witte T, Kappas A, Abraham NG. Differential effects of heme oxygenase isoforms on heme mediation of endothelial intracellular adhesion molecule 1 expression. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;291(1):416-23.

Wagner M, Cadetg P, Ruf R, Mazzucchelli L, Ferrari P, Redaelli CA. Heme oxygenase-1 attenuates ischemia-reperfusion-induced apoptosis and improves survival in ran renal allografts. *Kidney Int* 2003;63:1564-73.

Wahab SM, Islam F, Gopalan V, Lam AK. The Identification and Clinical Implication of Cancer Stem Cells in Colorectal Cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2017;16:93-102.

Wang J, Yi J. Cancer cell killing via ROS: To increase or decrease, that is the question. *Cancer Biol Ther* 2008;12:1875-1884.

Wang J, Zhang B, Wu H, Cai J, Sui X, Wang Y, Li H, Qui Y, Wang T, Chen Z, Zhu Q, Xia H, Song W. CD51 correlates with the TGF- $\beta$  pathway and is a functional marker for colorectal cancer stem cells. *Oncogene* 2017;36:1351-63.

Wang JY, Chang CC, Chiang CC, Chen WM, Hung SC. Silibinin supresses the maintainance of colorectal cancer stem-like cells by inhibiting PP2A/AKT/mTor pathways. *J Cell Biochem* 2012;113:1733-43.

Wang, R. Epigenetic inactivation of endothelin-2 and endothelin-3 in colon cancer. *Int. J. Cancer* 2013;132:1004-1021.

Wang RN, Green J, Wang Z, Deng Y, Qiao M y cols. Bone Morphogenetic Protein (BMP) signalling in development and human diseases. *Genes Dis* 2014;1:87-105.

Wang WP, Guo X, Koo MW, Wong BC, Lam Sk, Ye YN, Cho CH. Protective role of heme oxygenase-1 on trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281:G586-G594.

Ward R, Meagher A, Tomlinson I, O'Connor T, Norrie M, Wu R, Hawkins N. Microsatellite instability and the clinicopathological features of sporadic colorectal cancer. *Gut* 2001;48:821-9.

Was H, Cichon T, Smolarczyk R, Rudnicka D, Stopa M, Chevalier C, Leger JJ, Lackowska B, Grochot A, Bojkowska K, Ratajska A, Kieda C, Szala S, Dulak J, Jozkowicz A. Over-expression of heme oxygenase-1 in murine melanoma: increased proliferation and viability of tumor cells, decreased survival of mice. *Am J Pathol* 2006;169:2181-98.

Watanabe T, Wu TT, Catalano PJ, Ueki T, Satriano R, Haller DG, Benson AB, 3rd, Hamilton SR. Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancers. *N Engl J Med* 2001;344:1196-1206.

Wei CL, Lee KH, Khoo HE, Hon WM. Expression of heme oxygenase in cirrhotic rat liver. *J Pathol* 2003;199:324-34.

Weichert W, Denkert C, Burkhardt M, Gansukh T, Bellach J, Altevoigt P, Dietel M, Kristiansen G. Cytoplasmic CD24 expression in colorectal cancer independently correlates with shortened patient survival. *Clin Cancer Res* 2005;11:6574-81.

Weiser MR, Quah HM, Shia J, et al. Sphincter preservation in low rectal cancer is facilitated by preoperative chemoradiation and intersphincteric dissection. *Ann Surg* 2009;249:236-42.

Weiser MR, Saltz LB. Colorectal Adenocarcinoma. *SciAm. Gastrointest Tract and Abdominal Surgery* 2015;2:1-35.

Whiteside TL. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene* 2008;27:5904-5912.

Willis D, Moore AR, Federick R, Willoughby DA. Heme oxygenase: a novel target for the modulation of the inflammatory response. *Nat Med* 1996;2:87-90.

Willis D, Moore AR, Willoughby DA. Heme oxygenase isoform expression in cellular and antibody-mediated models of acute inflammation in the rat. *J Pathol* 2000;190(5):627-34.

Winawer SJ, Zauber AG, Ho MN. Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med* 1993;329:1977-81.

Wise CD, Drabkin DL. Degradation of haemoglobin and heme to biliverdin by a new cell-free system obtained from hemophagous organ of dog placenta. *Fed proc* 1964;23:323.

Witte KE, Hertel O, Windmüller BA, Helweg LP, Höving AL, Knabbe C, Busche T, Greiner JFW, Kalinowski J, Noll T, et al. Nanopore Sequencing Reveals Global Transcriptome Signatures of Mitochondrial and Ribosomal Gene Expressions in Various Human Cancer Stem-like Cell Populations. *Cancers* 2021;13:1136.

Wu W, Cao J, Ji Z, Wang J, Jiang T, Ding H. Co-expression of Lgr5 and CXCR4 characterizes cancer stem-like cells of colorectal cancer. *Oncotarget* 2016;7:81144-55.

Wu S, Cetinkaya C, Muñoz-Alonso MJ, von der Lehr N, Bahram F, et al. Myc represses differentiation-induced p21<sup>CIP1</sup> expression via Miz-1-dependent interaction with p21 core promoter. *Oncogene* 2003;22:351-60.

Wuidart A, Ousset M, Rulands S, Simons BD, Van Keymeulen A, Blanpain C. Quantitative lineage tracing strategies to resolve multipotency in tissue-specific stem cells. *Genes Dev* 2016;30:1261-77.

Wunder C, Potter RF. The heme oxygenase system: its role in liver inflammation. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2003;3:199-208.

Wysoczyński M, Ratajczak J, Pedziwiatr D, Rokosh G, Ratajczak M. Identification of heme oxygenase 1 (HO-1) as a novel negative regulator of mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cells Rev* 2014;11:110-118.

Xu D, Emoto N, Giaid A, Slaughter C, Kaw S, de Wit D, Yanagisawa M. ECE-1: a membrane bound metal-loprotease that catalyses the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell* 1994;78:472-485.

Xu F, Dai C, Zhang R, Zhao Y, Peng S, Jia C. Nanog: a potential biomarker for liver metastasis of colorectal cancer. *Dig Dis Sci* 2012;57:2340-6.

Yamada S, Shimada M, Utsunomiya T, Morine Y, Imura S. CXC receptor 4 and stromal cell-derived factor 1 in primary tumors and liver mesastasis of colorectal cancer. *J Surg Res* 2014;187:107-12.

Yamamoto H, Bai YQ, Yuasa Y. Homeodomain protein CDX2 regulates goblet-specific MUC2 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;300:813-8.

Yang WS, SriRamaratnam R, Welsch ME, Shimada K, Skouta R, Viswanathan VS, Cheah JH, Clemons PA, Shamji AF, Clish CB, et al. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell* 2014;156: 317–331.

Yao C, Su L, Shan J, Zhu C, Liu L, Liu C. IGF/STAT3/NANOG/Slug Signaling Axis Simultaneously Controls Epithelial-Mesenchymal Transition and Stemness Maintenance in Colorectal Cancer. *Stem Cells* 2016;34:820-31.

Ychou M, Raoul JL, Douillard JY. A phase III randomised trial of LV5FU2 + irinotecan versus LV5FU2 alone in adjuvant high-risk colon cancer (FNCLCC Accord02/FFCD9802). *Ann Oncol* 2009;20:674-80.

Yet SF, Tian R, Layne MD y cols. Cardiac-specific expression of heme oxygenase-1 protects against ischemia and reperfusion injury in transgenic mice. *Cir Res* 2001;89:168-73.

Yiu HY, Whittemore AS, Shibata A. Increasing colorectal cancer incidence rates in Japan. *Int J Cancer* 2004;109:777-81.

Yu HP, Choudhry MA, Shimizu T, Hsieh YC, Schwacha MG, Yang S, Chaudry IH. Mechanism of the salutary effects of flutamide on intestinal myeloperoxidase activity following trauma-hemorrhage: up-regulation of estrogen receptor- $\beta$ -dependent HO-1. *J Leukoc Biol* 2006; 79: 277-284.

Yu S, Tong K, Zhao Y, Balasubramanian I, Yap GS y cols. Paneth Cell Multipotency Induced by Notch Activating following injury. *Cell Stem Cell* 2018;23:46-59.

Yuan JH, Yang F, Wang F, Ma JZ, Guo YJ. A long noncoding RNA activated by TGF- $\beta$  promotes the invasion-metastasis cascade in hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell* 2014;25:666-81.

Yun KJ, Choi SC, Oh JM. Expression of heme oxygenase-1 in ischemic colitis. *Korean J Gastroenterol* 2005;45:335-339.

Zauber AG, Winawer SJ, Bond J. Guidelines for colonoscopy surveillance after polypectomy. *Gastroenterology* 1997;112:A50.

Zeilstra J, Joosten SP, van Andel H, Tolg C, Berns A y cols. Stem cell CD44s isoforms promote intestinal cancer formation in Apc(min) mice downstream of Wnt signaling. *Oncogene* 2014;33:665-670.

Zeuner A, Todaro M, Stassi G, De Maria R. Colorectal cancer stem cells: from the crypt to the clinic. *Cell Stem Cell* 2014;15:692-705.

Zhang F, Kaide JI, Yang L, Jiang H, Quan S, Kemp R, Gong W, Balazy M, Abraham NG, Nasjletti A. CO modulates pulmonary vascular response to acute hypoxia: relation to endothelin. *American Journal of physiology* 2004;286:H137-144.

Zhang F, Sun H, Zhang S, Yang X, Zhang G, Su T. Overexpression of PER3 inhibits self-renewal capability and chemoresistance of colorectal cancer stem-like cells via inhibition of notch and beta-catenin signaling. *Oncol Res* 2016;25:709-719.

Zhao W, Hisamuddin IM, Nandan MO, Babbin BA, Lamb NE, Yang VW. Identification of Krüppel-like factor 4 as a potential tumor suppressor gene in colorrectal cancer. *Oncogene* 2004;23:395-402.

Zhan L, Zhang H, Zhang Q, Woods CG, Chen Y, Xue P, Dong J, Tokar EJ, Xu Y, Hou Y, et al. Regulatory role of KEAP1 and NRF2 in PPAR $\gamma$  expression and chemoresistance in human non-small-cell lung carcinoma cells. *Free radical biology & medicine* 2012;53:758-768.

Zhang CD, Wang JN, Siu BQ, Zeng YJ, Chen JQ, Dai DQ. Prognostic and Predictive Model for Stage II Colon Cancer Patients With Nonemergent Surgery. Who Should Receive Adjuvant Chemotherapy? *Medecine* 2016;95:e2190.

Zheng F, Zhang Z, Flamini V, Jiang WG, Ciu Y. The Axis of CDCR4/SDF-1 Plays a Role in Colon Cancer Cell Adhesion Through Regulation of the AKT and IGF1R Signaling Pathways. *Anticancer Res* 2017;37:4361-9.

Zheng J, Nagda, DA, Lajud SA, Kumar S, Mouchli A, Bezpalko O, O'Malley BW Jr, Li D. Biliverdin's regulation of reactive oxygen species signalling leads to potent inhibition of proliferative and angiogenic pathways in head and neck cancer. *Br J Cancer* 2014;110:2116-2122.

Zhong W, Xia Z, Hinrichs D, Rosenbaum JT, Wegmann Kw, Meyrowitz J, Zhang Z. Hemin exerts multiple protective mechanism and attenuates dextran sulfate sodium-induced colitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2010;50:132-139.

Zhou Y, Xia L, Wang H, Oyang L, Su M, Liu Q, Lin J, Tan S, Tian Y, Liao Q, Cao D. Cance stem cells in progresion of colorectal cancer. *Oncotarget* 2018;9:33403-415.

Zhu B, Zhou L, Yu L, Wu S, Song W, Gong X, Wang D. Evaluation of the correlation of vasculogenic mimicry, ALDH1, KAI1 and microvessels density in the prediction of metastasis and prognosis in colorectal carinoma. *BMC Surg* 2017;17:47.

Zhu X, Fan WG, Li DP, Kung H, Lin MCM. Heme oxygenase-1 system and gastrointestinal inflamation: a short review. *World J Gastroenterol* 2011;17(38):4283-88.

Zhu X, Fan WG, Li DP, Lin MC, Kung H. Heme oxygenase-1 system and gastrointestinal tumors. *World J Gatroenterol* 2010;16:2633-7.

Zlobek I, Lugli A. Invasive front of colorectal cancer: dynamic interface of pro-/anti-tumor factors. *World J Gastroenterol* 2009;15:5898-906.

Zou J, Yu XF, Bao ZJ, Dong J. Proteome of human colon cancer stem cells: a comparative analysis. *World J Gastroenterol* 2011;17:1276-85.