

Estudio inmunohistoquímico de CD133 en cáncer colorrectal: adenocarcinoma y adenocarcinoma mucinoso

Gloria Perazzoli^{1,*}, Francisco Quiñonero², Cristina Mesas², Kevin Doello³

¹Departamento de Enfermería, Fisioterapia y Medicina. Universidad de Almería, 04120, Almería.

²Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), Centro de Investigaciones Biomédicas (CIBM), Universidad de Granada, 18016 Granada, España

³Servicio de Oncología Médica, Hospital Virgen de las Nieves, Granada, 18014 Granada, España

*Autor de Correspondencia: Dra. Gloria Perazzoli. gperazzoli@ ugr.es. Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), Centro de Investigaciones Biomédicas (CIBM) 18100 Granada, Spain.

Resumen

Las células madre de cáncer (CSC) son las responsables del inicio y progresión del tumor. En cáncer colorrectal (CCR), la prominina o CD133 se ha postulado como un posible marcador que permitiría detectarlas. Presentamos un estudio complementario sobre la detección inmunohistoquímica de este marcador en una colección de muestras de 123 pacientes de cáncer de colon tipo mucinoso y adenocarcinomatoso. Nuestros resultados demuestran que la expresión de CD133 en CCR se produce preferentemente en la superficie luminal del epitelio de las glándulas tumorales y que la expresión citoplasmática es poco frecuente y no suele estar asociada a expresión epitelial. Por otra parte, no existe una correlación significativa entre la expresión de CD133 y el tipo histológico del tumor cuando se consideran los tipos adenocarcinoma y mucinoso aunque esta fue más alta en adenocarcinoma.

Palabras clave: cáncer colorrectal, CD133, inmunohistoquímica

Abstract

Cancer stem cells (CSCs) are responsible for tumor initiation and progression. In colorectal cancer (CRC), prominin or CD133 has been postulated as a possible marker that would make it possible to detect them. We present a complementary study on the immunohistochemical detection of this marker in a collection of 123 samples from patients with mucinous and adenocarcinoma colon cancer. Our results show that the expression of CD133 in CCR occurs preferentially on the luminal surface of the epithelium of tumor glands and that cytoplasmic expression is rare and is not usually associated with epithelial expression. On the other hand, there is no significant correlation between the expression of CD133 and the histological type of the tumor when considering the adenocarcinoma and mucinous types, although this was higher in adenocarcinoma.

Key words: colorectal cancer, CD133, immunohistochemistry

Introducción

El cáncer colorrectal (CCR) se produce debido a un crecimiento incontrolado de las células epiteliales que forman parte de la pared del colon

y/o el recto. Los tumores malignos colorrectales pueden originarse en cada una de las tres capas: submucosa, muscular y serosa (1). La Organización Mundial de la Salud define el adenocarcinoma

colónico invasivo como un tumor que invade a través de la muscularis mucosa, llega a la submucosa o alcanza capas más internas del epitelio intestinal. Los adenocarcinomas se originan en las glándulas del tracto mucoso colorrectal, y es el tipo histológico de cáncer de colon y recto más frecuente (90-95%), seguido del adenocarcinoma coloide o mucinoso (10%) (2). El CCR se encuentra entre los cánceres más comunes, representando un 10-15% del total. Es el segundo tipo de cáncer más común en hombres, después de cáncer de pulmón, y en tercer lugar en mujeres, después del cáncer de mama y los cánceres ginecológicos (3). La incidencia de CCR incrementa con la edad (4), afectando a hombres y mujeres por igual (1). Los carcinomas son raros antes de los 40 años, excepto en individuos con predisposición genética o con riesgo de padecer enfermedades inflamatorias crónicas del intestino. Por lo general, es predominante en ancianos, siendo la edad media de presentación 69 años (2). Su etiología es desconocida, aunque existe una correlación entre el riesgo de padecer el CCR y la existencia de factores de riesgo como son los dietéticos (5-7), las enfermedades benignas (pólipos o enfermedades intestinales inflamatorias) y genéticos o familiares, entre otros. La sintomatología de CCR suele ser vaga o inespecífica (cambios en el hábito intestinal, dolor abdominal, etc), hasta que no se alcanzan estadios avanzados. El diagnóstico se suele realizar mediante un análisis de sangre oculta en heces y/o una colonoscopia que se completa con el análisis anatomopatológico. Una vez diagnosticado, en tratamiento se basa en la cirugía, la quimioterapia y/o anticuerpos monoclonales) y la radioterapia,

dependiendo del estadio de la enfermedad, entre otros factores (8).

Las Cancer Stem Cell (CSCs) (9-12) desempeñan un papel fundamental en el CCR (13,14). A lo largo de la progresión de la carcinogénesis colorrectal, el número de CSC se encuentra en torno al 1 % del número total de células, a pesar de que su frecuencia parece ser muy variable (15,16). Al igual que las células madre de tejido normal, las CSC residen en un microambiente idóneo, el cual, debido al desarrollo del tumor, adquiere características nuevas (17). Los componentes de este nuevo nicho tumorigénico interactúan con las células tumorales, favoreciendo su transformación maligna, su desdiferenciación celular, el desarrollo de carcinogénesis y la invasividad tumoral (18,19). Estas CSC son las responsables de la propagación de los tumores y la formación de metástasis (20,21). Un paso crucial en este proceso es la transición epitelio-mesénquima (EMT), evento que produce una mejora de la motilidad, la invasión, la resistencia de las células a la apoptosis y la adquisición de un fenotipo pluripotente similar al de la célula madre (22-25). Además, las CSCs, al contrario que las no-CSC, poseen una elevada resistencia a los tratamientos terapéuticos tradicionales empleados en cáncer, como la quimiorradioterapia (26-28). Estos tratamientos son capaces de destruir la mayoría de las células malignas del tumor e inducir su regresión, pero fallan a la hora de la reaparición de la enfermedad y la metástasis, debido a que dejan intacta a la población de CSC. (29-34). Esta resistencia es debida a que dichas células expresan mecanismos

de protección tales como procesos de reparación del DNA, enzimas detoxificantes y proteínas de membrana transportadoras de drogas, además de por la alteración del punto de control del ciclo celular, el incremento de la producción de IL-4, y el mal funcionamiento de la apoptosis debido a la activación de genes anti-apoptóticos (24,27,35–37).

CD133, también conocida como prominina-1, es un polipéptido de 865 aa y 120 kDa (38) tipo glicoproteína transmembrana (38). Interesantemente, CD133 es marcado de células madre en diversos tejidos y de CSCs en diferentes cánceres humanos (39,40). En CCR, se demostró que sólo las células CD133+ tenían la habilidad de auto-renovarse, diferenciarse y de reconstituir el fenotipo tumoral original en los ratones inmunodeficientes. Además fueron capaces de conservar la tumorigenicidad in vitro con cultivos esféricos y mostraron resistencia a drogas quimioterapéuticas, ambas características de las CSCs (13,14,35). Sin embargo, en el estudio de Shmelkov et al se descubrió que CD133 no sólo se expresaba en las células madre, y que también las células CD133- eran capaces de iniciar el tumor (41). La expresión de CD133 se correlacionó de forma independiente con un potencial SC, peor pronóstico y supervivencia baja (42,43). Además, en CCR, las células CD133+ son negativas para otros marcadores epiteliales, como CK19 o para el marcador de diferenciación epitelial intestinal citoqueratina 20 (CK20) (14,42,44), mientras que si mantienen positividad para la molécula de adhesión epitelial EpCAM (14), lo que sugiere que estas células tienen un fenotipo inmaduro o

indiferenciado. Algunos estudios demuestran que estas ICSCs poseen la capacidad de resistencia a los tratamientos quimioradioterapéuticos convencionales empleados en cáncer (33,45).

Material y Métodos

Pacientes y muestras

Nuestro estudio es complementario al realizado previamente Oliver et al., 2014 (46) utilizándose la misma serie de muestras de CCR. Se usaron tumores de 123 pacientes de los que se obtuvo consentimiento informado con un protocolo aprobado por el Comité Ético de Investigación Biomédica (Consejería de Salud; Servicio Andaluz de Salud). El tipo histológico del tumor se determinó por criterios histopatológicos estándar.

Estudio inmunohistoquímico

Los análisis inmunohistoquímicos de CD133 se realizaron siguiendo nuestro propio protocolo (46). Brevemente, cortes de biopsias de CCR embebidos en parafina y fijados en formalina fueron utilizados en la construcción de TissueMicroArrays (TMA). Los bloques de TMA se cortaron en secciones de 5 µm (Instrumedics, Inc., Hackensack, NJ), se desparafinaron, rehidrataron y se recuperaron epítomos (kit DakoAutostainer EnVision™ FLEX; Dako, Barcelona, España). Se usó el anticuerpo contra CD133 (1:50, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) siguiendo nuestro propio protocolo (46) y usando 3,3'-diaminobencidina (DAB) y contratinción de hematoxilina. La tinción con CD133 se clasificó

como 0%, <50%, o ≥50% y para el análisis estadístico bajo (<50%) y alto (≥50%).

Estadística

Una vez determinada la expresión inmunohistoquímica de CD133 se introdujeron los datos junto a las variables clínicas en el software estadístico SPSS 17.0. Se usaron para medias de las variables, la prueba T de Student, la prueba de Levene y la prueba de U de Mann-Whitney. Para la asociación, estadístico χ^2 o el estadístico exacto de Fisher. Para todas las pruebas y tests estadísticos se consideró significativo un valor $p < 0,05$ para la aceptación de la hipótesis alternativa.

Resultados y Discusión

Estudio de localización de CD133 en CCR

El estudio inmunohistoquímico permitió observar expresión de CD133 en la superficie de las células de las glándulas afectadas en el tumor que estaban en contacto directo con el lumen (Fig. 1 A y B). El detritus celular dentro del lumen glandular también fue positivo (Fig. 1C y D). Además, la mayor parte de las glándulas afectas por el tumor con células de la superficie luminal positivas para CD133 mostraron positividad para el detritus celular intraglandular (Fig. 1D). También se detectó expresión citoplasmática de CD133 en un pequeño porcentaje de casos (Fig. 1E y F). Por otro lado, en la mayoría de muestras de las biopsias del tumor donde se observa la estructura morfológica glandular que reproduce un patrón cribiforme se observó expresión positiva de CD133 (Fig. 1G y H). Por tanto, la expresión de CD133 en CCR tiene un patrón de expresión característico con una

localización en la superficie luminal de las glándulas del colon afectadas por el tumor, además de en el detritus intraglandular de células tumorales arrojadas al lumen. Botchkina et al. ya vieron que analizando colonosferas que fueron inducidas por células con diferencias en la expresión de CD133, positivas y negativas, el perfil de expresión génica relacionado con CSC era totalmente diferente (47). Esto apoya los hallazgos que indican una alta expresión de CD133 en las células tumorales circundantes (CTC) que pueden ser las responsables de la progresión tumoral y la metástasis (42), reforzando la importancia de las células CD133 en el CCR como ya indicó Shmelkov et al. (41). Estos autores demostraron que la mayoría de las células primarias de este tumor eran CD133+. No obstante, los mismos autores refieren que el 40 % de los tumores metastásicos fueron negativos para CD133, lo que sugiere que las células CD133+ no son las únicas responsables del crecimiento de esos tumores y que por tanto, la expresión de CD133 no está limitada a la iniciación del tumor o a las células madre intestinales. De hecho, sus resultados determinan que durante la metástasis, las células tumorales CD133+ generan células CD133- agresivas que también son capaces de iniciar tumores en ratones inmunodeprimidos.

Por el contrario, no se observó expresión de CD133 en la mucosa normal adyacente al tumor en la mayoría de los pacientes analizados (Fig. 2A y B). Sólo en tres casos se observó marcaje citoplasmático débil en glándulas de la mucosa colónica normal (Fig. 2C). No obstante, estos casos no presentaron marcaje ni en la membrana de las

células con superficie luminal ni en el detritus celular.

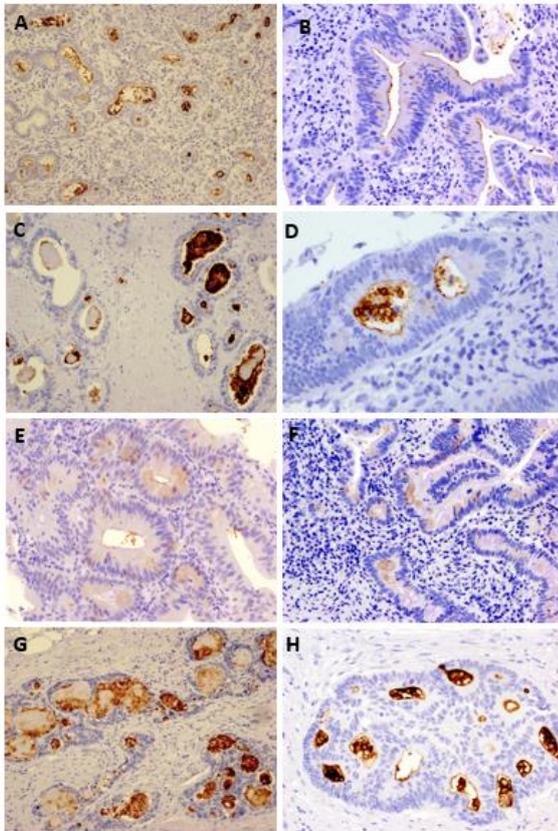


Figura 1. Expresión de CD133 en CCR. Localización de CD133 en la superficie celular en contacto con el lumen de las glándulas afectadas por el tumor (A y B). Expresión en el detritus luminal (C y D). Expresión citoplasmática (E y F). Presentación de un patrón cribiforme con marcaje positivo para CD133 (G y H-aumento del original). A, C, G (10X); B, E, F, H (20X) D (40X).

Además, los pacientes con tumores pobremente diferenciados, donde las glándulas estaban parcial o totalmente destruidas e inapreciables, o existía invasión a capas más profundas del colon, no mostraron un patrón claro de marcaje de CD133 (Fig. 2D y E). Estos resultados se corresponden con los obtenidos en anteriores estudios como los de Ricci-Vitiani et al. en el que muestran que solo aquellas poblaciones con expresión de CD133 son capaces de desarrollar tumores, mediante un estudio in vivo en ratones

inmunodeprimidos en el que tras varias generaciones de trasplante tumoral vieron que el patrón de expresión de CD133 se mantenía mientras que células CD133 negativas no desarrollaban ningún tipo de tumor (14). Horts et al. detectan mediante ensayos inmunohistoquímicos la detección de células CD133 positivas en la superficie glandular-luminal de las células pudiendo usarse como un marcador pronóstico independiente ya que se han visto diferencias significativas en cuanto a supervivencia de pacientes que presentan células CD133 positivas frente a negativas, siendo mayor en estos últimos (42). A esto se le suma el hecho de que la expresión de CD133 junto con la expresión de CXCR4 es un factor que contribuye a la progresión del cáncer de colon a largo plazo (48). Además, existen estudios que demuestran que las células CD133 positivas están directamente relacionadas con la resistencia tumoral. Saigusa et al. realizan un estudio in vitro en el que someten a radiación células de la línea tumoral de colon HT29 en dosis crecientes (33). Tras la radiación ponen de manifiesto que se produce un incremento de expresión de CD133 dosis dependiente.

Estudio de la expresión de CD133 en CCR mucinoso y adenocarcinoma

La expresión de CD133 se valoró en forma de % (ver material y métodos) obteniendo un marcaje diferencial tal y como se muestra en la Figura 3. De los pacientes en los que se pudo determinar el tipo tumoral (104 pacientes), 91 fueron adenocarcinoma de colon (87,5% del total) y 13 adenocarcinoma mucinoso (12,5%). El estudio

de la expresión de CD 133 en pacientes con adenocarcinoma mucinoso determinó que el 38,46% presentaron alta expresión de CD133 mientras que las proporciones con baja expresión o sin expresión fueron iguales (30,76%).

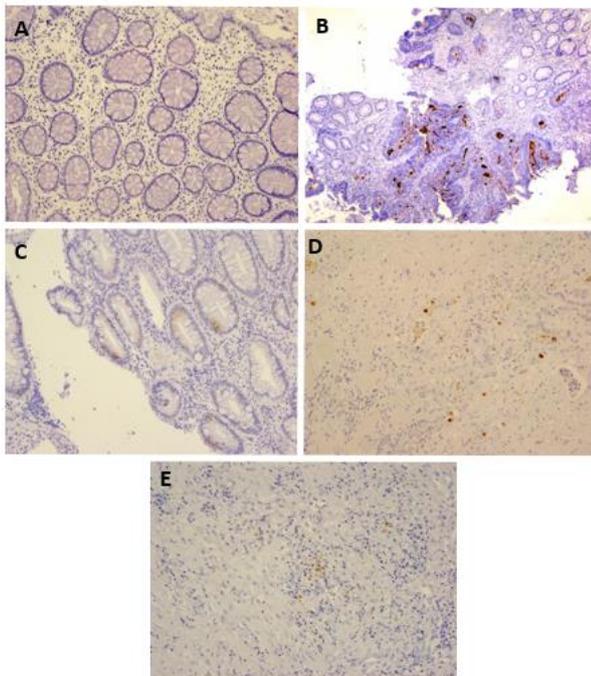


Figura 2. Expresión de CD133 en mucosa del colon normal adyacente al tumor. Destaca la no existencia de expresión de CD133 en las muestras de mucosa normal (A y B). En algunos casos aislados se detectó expresión citoplasmática débil (C). En los pacientes con tumores pobremente diferenciados, se observó un patrón poco claro de marcaje debido a la ausencia de estructura glandular (figura D y E). A (4X); B, C, E (10X); D (40X).

En el caso de los adenocarcinomas de colon la proporción con alta expresión alcanzó el 54,94% siendo mucho menores los porcentajes con baja o nula expresión (34,06% y 10,99 %, respectivamente). No se pudo demostrar una correlación significativa entre la expresión de CD133 y el tipo tumoral de CCR. El papel de CD133 en tumores mucinosos no está claro. Existen estudios que afirman que CD133 es un factor pronóstico independiente en este tipo de tumores

los cuales presentan tinción citoplasmática fuerte y difusa para CD133 con una clara inmunonegatividad de los núcleos (49) y otros estudios afirman que no es un factor independiente pero que si puede ayudar a decidir el tipo de tratamiento que debe someterse al paciente pudiendo decantarse, en este caso, por la terapia adyuvante (50).

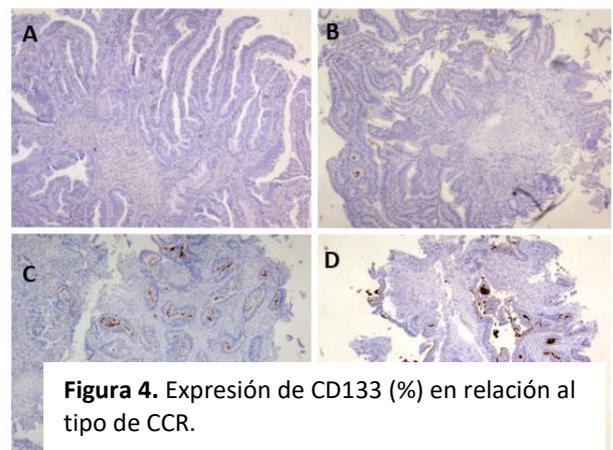


Figura 4. Expresión de CD133 (%) en relación al tipo de CCR.

Figura 3. Imagen representativa de los diferentes niveles de expresión de CD133 valorados en pacientes CRC. Tumores sin expresión de CD133 (A), con menos del 50% de positividad (B) y con más del 50% de positividad para CD133 (C y D). A, B, C y D (4X).

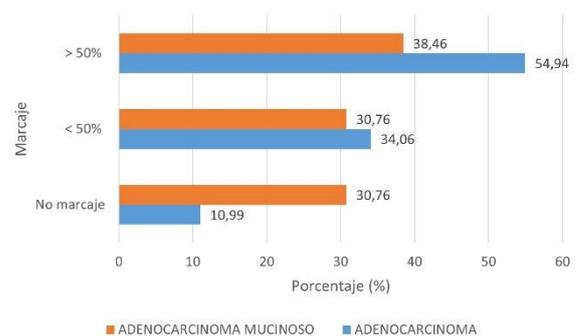


Figura 4. Expresión de CD133 (%) en relación al tipo de CCR.

Conclusión

Nuestro estudio refleja que los pacientes de CCR analizados la determinación de la expresión

de CD133 mediante inmunohistoquímica sigue un patrón preciso de marcaje preferentemente en la superficie luminal del epitelio de las glándulas tumorales con aparición de expresión en el lumen y con expresión citoplasmática difusa y poco frecuente, sólo observada en algunos casos. En cuanto a la expresión en función del tipo tumoral, se pudo determinar que la expresión alta de CD133 fue más frecuente en el adenocarcinoma que en el mucinoso. En este último, la expresión alta y baja de CD 133 presentó una proporción similar. No obstante, no se pudo demostrar una correlación significativa entre la expresión de CD133 y el tipo tumoral de CCR.

Referencias

1. Labianca R, Beretta GD, Kildani B, Milesi L, Merlin F, Mosconi S, et al. Colon cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. mayo de 2010;74(2):106-33.
2. Cappell MS. Pathophysiology, clinical presentation, and management of colon cancer. *Gastroenterol Clin North Am*. marzo de 2008;37(1):1-24, v.
3. Vukobrat-Bijedic Z, Husic-Selimovic A, Sofic A, Bijedic N, Gogov B, Djuran A, et al. The application of current diagnostic protocols of patients with colon cancer in preparation for therapy. *Acta Inform Med*. diciembre de 2012;20(4):238-41.
4. Levin B, Lieberman DA, McFarland B, Smith RA, Brooks D, Andrews KS, et al. Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: a joint guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. *CA Cancer J Clin*. 2008;58(3):130-60.
5. Forte A, De Sanctis R, Leonetti G, Manfredelli S, Urbano V, Bezzi M. Dietary chemoprevention of colorectal cancer. *Ann Ital Chir*. 2008;79(4):261-7.
6. Marshall JR. Prevention of Colorectal Cancer: Diet, Chemoprevention and Lifestyle. *Gastroenterol Clin North Am*. marzo de 2008;37(1):73-vi.
7. van Duijnhoven FJB, Bueno-De-Mesquita HB, Ferrari P, Jenab M, Boshuizen HC, Ros MM, et al. Fruit, vegetables, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Am J Clin Nutr*. mayo de 2009;89(5):1441-52.
8. Shawki S, Ashburn J, Signs SA, Huang E. Colon Cancer: Inflammation-Associated Cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. abril de 2018;27(2):269-87.
9. Visvader JE, Lindeman GJ. Stem cells and cancer – The promise and puzzles. *Mol Oncol*. octubre de 2010;4(5):369-72.
10. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. 18 de noviembre de 2004;432(7015):396-401.
11. Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, et al. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res*. 1 de octubre de 2004;64(19):7011-21.
12. Ishiguro T, Ohata H, Sato A, Yamawaki K, Enomoto T, Okamoto K. Tumor-derived spheroids: Relevance to cancer stem cells and clinical applications. *Cancer Sci*. marzo de 2017;108(3):283-9.
13. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*. 4 de enero de 2007;445(7123):106-10.

14. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, Liu R, Wang X, Cho RW, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*. 4 de enero de 2007;445(7123):111-5.
15. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer*. octubre de 2008;8(10):755-68.
16. Boman BM, Huang E. Human colon cancer stem cells: a new paradigm in gastrointestinal oncology. *J Clin Oncol*. 10 de junio de 2008;26(17):2828-38.
17. Burness ML, Sipkins DA. The stem cell niche in health and malignancy. *Semin Cancer Biol*. abril de 2010;20(2):107-15.
18. Medema JP, Vermeulen L. Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. *Nature*. 15 de junio de 2011;474(7351):318-26.
19. Vermeulen L, De Sousa E Melo F, van der Heijden M, Cameron K, de Jong JH, Borovski T, et al. Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat Cell Biol*. mayo de 2010;12(5):468-76.
20. Sleeman JP, Nazarenko I, Thiele W. Do all roads lead to Rome? Routes to metastasis development. *Int J Cancer*. 1 de junio de 2011;128(11):2511-26.
21. Dittmar T, Heyder C, Gloria-Maercker E, Hatzmann W, Zänker KS. Adhesion molecules and chemokines: the navigation system for circulating tumor (stem) cells to metastasize in an organ-specific manner. *Clin Exp Metastasis*. 2008;25(1):11-32.
22. Kong D, Li Y, Wang Z, Sarkar FH. Cancer Stem Cells and Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT)-Phenotypic Cells: Are They Cousins or Twins? *Cancers (Basel)*. 21 de febrero de 2011;3(1):716-29.
23. Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, Liu R, Wang X, Cho RW, et al. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 12 de junio de 2007;104(24):10158-63.
24. Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science*. 25 de marzo de 2011;331(6024):1559-64.
25. Singh A, Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene*. 26 de agosto de 2010;29(34):4741-51.
26. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 7 de diciembre de 2006;444(7120):756-60.
27. Rich JN. Cancer Stem Cells in Radiation Resistance. *Cancer Research*. 1 de octubre de 2007;67(19):8980-4.
28. Kozovska Z, Gabrisova V, Kucerova L. Colon cancer: cancer stem cells markers, drug resistance and treatment. *Biomed Pharmacother*. octubre de 2014;68(8):911-6.
29. Dalerba P, Cho RW, Clarke MF. Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med*. 2007;58:267-84.
30. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. noviembre de 2001;414(6859):105-11.
31. Iinuma H, Watanabe T, Mimori K, Adachi M, Hayashi N, Tamura J, et al. Clinical significance of circulating tumor cells, including cancer stem-like cells, in peripheral blood for recurrence and prognosis in patients with Dukes' stage B and C colorectal

- cancer. *J Clin Oncol*. 20 de abril de 2011;29(12):1547-55.
32. Deng S, Yang X, Lassus H, Liang S, Kaur S, Ye Q, et al. Distinct expression levels and patterns of stem cell marker, aldehyde dehydrogenase isoform 1 (ALDH1), in human epithelial cancers. *PLoS One*. 21 de abril de 2010;5(4):e10277.
33. Saigusa S, Tanaka K, Toyama Y, Yokoe T, Okugawa Y, Ioue Y, et al. Correlation of CD133, OCT4, and SOX2 in rectal cancer and their association with distant recurrence after chemoradiotherapy. *Ann Surg Oncol*. diciembre de 2009;16(12):3488-98.
34. Dylla SJ, Beviglia L, Park IK, Chartier C, Raval J, Ngan L, et al. Colorectal cancer stem cells are enriched in xenogeneic tumors following chemotherapy. *PLoS One*. 18 de junio de 2008;3(6):e2428.
35. Todaro M, Alea MP, Di Stefano AB, Cammareri P, Vermeulen L, Iovino F, et al. Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4. *Cell Stem Cell*. 11 de octubre de 2007;1(4):389-402.
36. Lugli A, Iezzi G, Hostettler I, Muraro MG, Mele V, Tornillo L, et al. Prognostic impact of the expression of putative cancer stem cell markers CD133, CD166, CD44s, EpCAM, and ALDH1 in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 27 de julio de 2010;103(3):382-90.
37. Schatton T, Frank NY, Frank MH. Identification and targeting of cancer stem cells. *Bioessays*. octubre de 2009;31(10):1038-49.
38. Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, Atkins K, Warnke R, Holden JT, et al. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood*. 15 de diciembre de 1997;90(12):5013-21.
39. Neuzil J, Stantic M, Zobalova R, Chladova J, Wang X, Prochazka L, et al. Tumour-initiating cells vs. cancer «stem» cells and CD133: what's in the name? *Biochem Biophys Res Commun*. 20 de abril de 2007;355(4):855-9.
40. Mizrak D, Brittan M, Alison MR. CD133: molecule of the moment. *J Pathol*. enero de 2008;214(1):3-9.
41. Shmelkov SV, Butler JM, Hooper AT, Hormigo A, Kushner J, Milde T, et al. CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors. *J Clin Invest*. junio de 2008;118(6):2111-20.
42. Horst D, Kriegl L, Engel J, Kirchner T, Jung A. CD133 expression is an independent prognostic marker for low survival in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 21 de octubre de 2008;99(8):1285-9.
43. Vaiopoulos AG, Kostakis ID, Koutsilieris M, Papavassiliou AG. Colorectal Cancer Stem Cells. *STEM CELLS*. 2012;30(3):363-71.
44. Immervoll H, Hoem D, Sakariassen PØ, Steffensen OJ, Molven A. Expression of the «stem cell marker» CD133 in pancreas and pancreatic ductal adenocarcinomas. *BMC Cancer*. 8 de febrero de 2008;8:48.
45. Ong CW, Kim LG, Kong HH, Low LY, Iacopetta B, Soong R, et al. CD133 expression predicts for non-response to chemotherapy in colorectal cancer. *Mod Pathol*. marzo de 2010;23(3):450-7.
46. Oliver JA, Ortiz R, Melguizo C, Álvarez PJ, Gómez-Millán J, Prados J. Prognostic impact of MGMT promoter methylation and MGMT and CD133 expression in colorectal adenocarcinoma. *BMC Cancer*. 11 de julio de 2014;14(1):511.
47. Botchkina IL, Rowe RA, Rivadeneira DE, Karpeh MS, Crawford H, Dufour A, et al. Phenotypic

subpopulations of metastatic colon cancer stem cells: genomic analysis. *Cancer Genomics Proteomics*. 2009;6(1):19-29.

48. Zhang NH, Li J, Li Y, Zhang XT, Liao WT, Zhang JY, et al. Co-expression of CXCR4 and CD133 proteins is associated with poor prognosis in stage II-III colon cancer patients. *Exp Ther Med*. junio de 2012;3(6):973-82.
49. Coco C, Zannoni GF, Caredda E, Sioletic S, Boninsegna A, Migaldi M, et al. Increased expression of CD133 and reduced dystroglycan expression are strong predictors of poor outcome in colon cancer patients. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 11 de septiembre de 2012;31(1):71.
50. Mia-Jan K, Jung SY, Kim IY, Oh SS, Choi E, Chang SJ, et al. CD133 expression is not an independent prognostic factor in stage II and III colorectal cancer but may predict the better outcome in patients with adjuvant therapy. *BMC Cancer*. 28 de marzo de 2013;13(1):166.