

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

PARTICIPACIÓN DE $\Delta Np73$ EN PROCESOS DE PROLIFERACIÓN,
QUIMIORRESISTENCIA Y COMUNICACIÓN INTERCELULAR EN
CÁNCER DE COLON. APLICACIÓN EN EL CONTEXTO CLÍNICO.

TESIS DOCTORAL

Beatriz Soldevilla Navarro

Madrid 2014

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

PARTICIPACIÓN DE $\Delta Np73$ EN PROCESOS DE PROLIFERACIÓN,
QUIMIORRESISTENCIA Y COMUNICACIÓN INTERCELULAR EN
CÁNCER DE COLON. APLICACIÓN EN EL CONTEXTO CLÍNICO.

TESIS DOCTORAL presentada por
BEATRIZ SOLDEVILLA NAVARRO
Licenciada en Bioquímica,
Para optar al grado de Doctor.

DIRECTORES:
DRA. GEMMA DOMÍNGUEZ MUÑOZ
DR. FÉLIX BONILLA VELASCO

Universidad Autónoma de Madrid
Hospital Universitario Puerta de Hierro

La Dra. Gemma Domínguez Muñoz, Profesora del Departamento de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid e investigadora principal del Grupo en Diagnóstico y Pronóstico Molecular del Cáncer del Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda, y el Dr. Félix Bonilla Velasco, Jefe de Sección del Servicio de Oncología Médica e investigador principal del Grupo en Mecanismos Moleculares Tumorales del Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda,

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado “Participación de *ΔNp73* en procesos de proliferación, quimiorresistencia y comunicación intercelular en cáncer de colon. Aplicación en el contexto clínico”, que presenta BEATRIZ SOLDEVILLA NAVARRO para la obtención del GRADO DE DOCTOR por la Universidad Autónoma de Madrid, ha sido realizado bajo su dirección en el Grupo de investigación en Diagnóstico y Pronóstico Molecular del Cáncer del Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda reúne las condiciones de calidad, contenido y forma exigibles para ser presentado ante el tribunal correspondiente.

Para que conste a los efectos oportunos, expiden el presente certificado en Majadahonda a 30 de Abril de 2014.

Dra. Gemma Domínguez Muñoz

Directora de Tesis

Dr. Félix Bonilla Velasco

Director de Tesis

Esta tesis doctoral, realizada en el Grupo de investigación en Diagnóstico y Pronóstico Molecular del Cáncer del Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda, ha sido financiada por el Instituto de Salud Carlos III-Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI08/0605 y PI11/00593), UAM-CAM (CCG10-UAM/BIO-5880), Fundación para la Investigación Biomédica Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda, S-GEN-266-2006, ISCIII-RTICC-RD06/0020/0020, Fundación científica AECC, Comunidad de Madrid S2010/BMD-2344, SAF2007-60214 y SAF2010-20750.

A mis padres, Conchi y Juan

AGRADECIMIENTOS

Gracias a tod@s. A todas las personas e instituciones que de una manera u otra me han apoyado durante estos años y han hecho posible la realización de este trabajo.

RESUMEN

TP73, un miembro de la familia de *TP53*, codifica para múltiples isoformas con funciones opuestas. El conjunto de datos obtenidos a día de hoy por la comunidad científica apoyan el papel de las variantes $\Delta TAp73$ en procesos tumorigénicos. Los análisis realizados en pacientes diagnosticados con cáncer de colon han permitido identificar a *HMGB1* y *ABCBI*, genes relacionados con procesos de resistencia a drogas, como genes diana de las formas $\Delta TAp73$, cuya asociación *in vivo* no había sido previamente documentada. En este trabajo, además se muestra por primera vez el valor pronóstico de las isoformas $\Delta TAp73$ y de sus genes diana en los pacientes con cáncer colorrectal. El incremento de la tasa de proliferación celular y la resistencia al tratamiento con oxaliplatino relacionado con la sobre-expresión de las formas $\Delta TAp73$ podrían explicar las supervivencias más cortas en estos pacientes. El hecho de que las dianas de *TP73* descritas durante este trabajo, *ABCBI* y *HMGB1* predigan de manera independiente, y con una potencia estadística mayor que las propias variantes $\Delta TAp73$, el pronóstico de los pacientes confirma la importancia de determinar las dianas efectoras de *TP73*.

Algunos estudios recientes han asociado a *TP73* con la vía de autofagia. En este trabajo mostramos datos en los que $\Delta Np73$ activa la vía de autofagia, pudiendo ser este hecho responsable, al menos en parte, de la resistencia a oxaliplatino desarrollada por su sobre-expresión. Así, los tratamientos con algunos inhibidores de la vía recuperan la sensibilidad a drogas como el oxaliplatino en las líneas celulares o xenotransplantes tumorales con sobre-expresión de $\Delta Np73$. Los resultados obtenidos en la serie de pacientes con cáncer colorrectal apoyan la correlación entre la expresión de $\Delta Np73$ y los genes relacionados con la autofagia, y algunos de éstos podrían ser buenos marcadores pronóstico.

El estudio del contenido de los exosomas derivados de células tumorales y su papel durante la transmisión horizontal de información oncogénica entre células está en auge. Así, se ha descrito que el contenido de los exosomas es biológicamente activo en la célula receptora, siendo esencial su identificación para determinar su función durante las diferentes etapas del proceso tumoral. En este trabajo hemos identificado por primera vez la presencia y el enriquecimiento de los niveles de ARN mensajero de $\Delta Np73$ en los exosomas derivados de células tumorales, sugiriendo el empaquetamiento específico y la liberación activa de esta isoforma a través de este tipo de microvesículas. Además, la transmisión de $\Delta Np73$ contenido en los exosomas incrementa el potencial proliferativo y la resistencia a drogas quimioterápicas en diferentes tipos de células receptoras, tanto *in vitro* como *in vivo*. Finalmente, los análisis realizados en pacientes diagnosticados con cáncer colorrectal apoyan el valor pronóstico del $\Delta Np73$ contenido en los exosomas.

TP73, a member of the *TP53* family, is expressed in multiple variants. Currently, cumulative data of the scientific community support the role of the $\Delta TAp73$ variants in tumorigenic processes. Our analysis performed in colorectal cancer patients have identified *HMGB1* and *ABCB1*, genes related to drug resistance processes, as target genes of the $\Delta TAp73$ isoforms. In addition, this is the first work describing the prognostic value of these variants and their target genes involved in drug resistance in these patients. The increase in proliferation and drug resistance observed in cells overexpressing $\Delta TAp73$ isoforms support their plausible value as prognostic marker. *HMGB1* and *ABCB1* strongly predicts survival in an independent manner making clear the importance of determining downstream *TP73* targets that could predict colorectal patients outcome better than $\Delta TAp73$ themselves do.

Recent studies have associated *TP73* gene with autophagy pathway. Our data show that $\Delta Np73$ promotes autophagy pathway, which could be responsible, at least in part, of the drug resistance phenotype related with its over-expression. Thus, treatments with autophagy inhibitors decrease the viability of cells over-expressing $\Delta Np73$ after drug exposure. Our results in patients diagnosed with colorectal cancer supports the correlation between $\Delta Np73$ expression and autophagy-related genes, and some of them could predict patients survival.

The cargo of tumor-derived exosomes and their role as cell-to-cell mediators in the horizontal transfer of oncogenic information is emerging. Thus, other groups have describe that the exosomal content is biologically active when uptake by the recipient cell. Identifying the specific molecular cargo of exosomes is essential to determine their function in specific steps of the tumor development. In this work, we identified the presence and enrichment of $\Delta Np73$ messenger in exosomes derived from tumor cells, suggesting the specific packaged and active sorting of this isoforms in this type of microvesicles. In addition, the transmission of this exosome cargo to different cell types increases proliferation and confers drug resistance to the acceptor cells in vitro and in animal models. Finally, our data support the potential prognostic value of exosomal $\Delta Np73$ in colorectal cancer patients.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	22
1.1	Epidemiología y origen del cáncer	23
1.2	Cáncer colorrectal	23
1.3	Ciclo celular y cáncer	25
1.4	La familia <i>TP53</i>	26
1.5	<i>TP73</i>	28
1.5.1	Gen	28
1.5.2	<i>TP73</i> y cáncer	29
1.5.3	Función biológica de <i>TP73</i>	30
1.5.4	Mecanismos reguladores	31
1.6	Implicación de <i>TP73</i> en proliferación	33
1.7	Implicación de <i>TP73</i> en procesos de quimiorresistencia	33
1.8	Autofagia	35
1.9	<i>TP73</i> en pacientes con cáncer	37
1.10	Consideraciones finales/Hipótesis I	38
1.11	Comunicación intercelular	39
1.12	Exosomas: biogénesis, composición molecular y función	39
1.12.1	Biogénesis de los exosomas	39
1.12.2	Composición molecular de los exosomas	40
1.12.3	Función de los exosomas	42
1.13	Exosomas y cáncer	42
1.14	Exosomas y aplicaciones clínicas	43
1.15	Consideraciones finales/Hipótesis II	44
2	OBJETIVOS	45
3	MATERIALES Y MÉTODOS	48
3.1	Pacientes y muestras tumorales	49
3.2	Características clínico-patológicas de los pacientes	50
3.3	Cultivos celulares	52
3.4	Anticuerpos	53
3.5	Extracción de ARN de tejidos, líneas celulares y exosomas	54
3.6	Transcripción reversa (RT) y cuantificación a tiempo real (qRT-PCR)	54
3.6.1	Transcripción reversa (RT)	54
3.6.2	Cuantificación a tiempo real (qRT-PCR)	54
3.7	Vectores de expresión	56
3.7.1	Transfección transitoria	56
3.7.2	Transfección estable	56
3.8	Aislamiento, cuantificación e identificación de exosomas	56
3.9	Experimentos con incubación de exosomas	57

3.10	Marcaje de exosomas.....	57
3.11	Tratamientos	58
3.11.1	Oxaliplatino	58
3.11.2	Cloroquina	58
3.11.3	Tratamientos combinados.....	58
3.12	Inmunodetección de proteínas	58
3.12.1	Inmunotransferencia (Western Blot)	58
3.12.2	Inmunohistoquímica Ki67	59
3.12.3	Inmunocitoquímica LC3I-II	59
3.13	Ensayos funcionales.....	60
3.13.1	Ensayo MTT	60
3.13.2	Ensayo de impedancia	60
3.13.3	Ensayo TUNEL	60
3.13.4	Citometría de flujo.....	60
3.13.5	Ensayo angiogenesis.....	61
3.14	Animales de experimentación y xenotransplantes tumorales.....	61
3.15	Análisis estadístico	62
4	RESULTADOS	64
4.1	Implicación de las isoformas de <i>TP73</i> en procesos oncogénicos en cáncer de colon. Valor pronóstico de su expresión aberrante.....	65
4.1.1	Los niveles de expresión de las isoformas Δ TAp73 se asocian con estadio tumoral.....	65
4.1.2	Los niveles de expresión de las isoformas Δ TAp73 se asocian con el pronóstico de los pacientes	65
4.1.3	La sobre-expresión de Δ Np73 modifica los niveles de ARNm de los genes ABCB1, CASP1 y HMGB1 in vitro.....	67
4.1.4	Los niveles de expresión de las isoformas Δ TAp73 se correlacionan con la expresión de genes relacionados con resistencia a drogas.....	68
4.1.5	Los niveles de expresión de los genes asociados con resistencia a drogas HMGB1 y ABCB1 pueden predecir el pronóstico de los pacientes.....	68
4.1.6	La sobreexpresión de Δ Np73 incrementa la proliferación celular y la resistencia a drogas quimioterápicas	70
4.1.7	La isoforma Δ Np73 incrementa la proliferación celular y la resistencia a quimioterápicos “in vivo”	76
4.1.8	Δ Np73 activa la ruta de autofagia	78
4.1.9	La autofagia inducida por Δ Np73 incrementa la resistencia al tratamiento con oxaliplatino en células de cáncer de colon.	79
4.1.10	La autofagia inducida por Δ Np73 incrementa la resistencia al tratamiento con oxaliplatino “in vivo”	80

4.1.11	Los niveles de expresión de $\Delta Np73$ se correlacionan con la expresión de genes relacionados con el proceso autofágico en pacientes con cáncer de colon.....	81
4.1.12	Los niveles de expresión de los genes relacionados con la vía de autofagia identifican subgrupos de pacientes con evoluciones diferente	82
4.2	Implicación de las isoformas $\Delta TAp73$ en comunicación intercelular.....	84
4.2.1	Identificación y caracterización de exosomas	84
4.2.2	$\Delta Np73\beta$ se incorpora en los exosomas liberados por células tumorales.....	85
4.2.3	La transferencia del $\Delta Np73\beta$ exosomal es específica del tipo celular	86
4.2.4	$\Delta Np73\beta$ exosomal regula la proliferación celular y confiere resistencia a drogas en las células receptoras.....	87
4.2.5	La transferencia de $\Delta Np73\beta$ exosomal en xenotransplantes tumorales regula su crecimiento in vivo	89
4.2.6	$\Delta Np73$ está contenido en los exosomas derivados de pacientes con cáncer de colon.....	92
4.2.7	Valor pronóstico de $\Delta Np73$ exosomal	94
5	DISCUSIÓN.....	97
5.1	Implicación de las isoformas de $TP73$ en procesos oncogénicos	98
5.2	Implicación de las isoformas $\Delta TAp73$ en comunicación intercelular.....	103
6	CONCLUSIONES.....	106
7	BIBLIOGRAFÍA	109
8	ANEXO I.....	136
9	ANEXO II.....	139

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Progresión del cáncer colorrectal y acumulación de alteraciones genéticas. Basado en el modelo de Fearon y Vogelstein (Vogelstein et al., 1988).....	24
Figura 2. El ciclo celular.....	25
Figura 3. Organización estructural y homología entre los miembros de la familia de <i>TP53</i>	28
Figura 4. Esquema de la arquitectura del gen <i>TP73</i>	29
Figura 5. Actividades supresoras tumorales y oncogénicas diferencialmente reguladas por las isoformas <i>TAp73</i> y Δ <i>TAp73</i>	31
Figura 7. Biogénesis y secreción de exosomas.....	40
Figura 8. Composición proteica y lipídica de los exosomas	41
Figura 9. Niveles altos de expresión de las isoformas Δ <i>Ex2/3p73</i> y Δ <i>Np73</i>	67
Figura 10. Niveles altos de expresión de <i>HMGB1</i> disminuyen la supervivencia global de los pacientes con cáncer de colon.....	69
Figura 11. Niveles altos de expresión de <i>ABCBI</i> disminuyen la supervivencia global de los pacientes con cáncer de colon.....	70
Figura 12. La expresión ectópica de Δ <i>Np73</i> incrementa la proliferación en las células de cáncer de colon HCT116	72
Figura 13. Las células con sobre-expresión para Δ <i>Np73</i> modifican su ciclo celular. Cuantificación de las fases del ciclo celular mediante citometría de flujo en células con expresión ectópica de Δ <i>Np73</i> y su control.....	73
Figura 14. El incremento de la proliferación celular es proporcional a los niveles de expresión de Δ <i>Np73</i>	73
Figura 15. La sobre-expresión de Δ <i>Np73</i> induce resistencia al tratamiento con oxaliplatino en las células de cáncer de colon.....	74
Figura 16. La sobre-expresión de Δ <i>Np73</i> previene la apoptosis desencadenada por el tratamiento con oxaliplatino.. ..	75
Figura 17. La inducción de resistencia por Δ <i>Np73</i> es directamente proporcional a su expresión. Tras el tratamiento con oxaliplatino en las poblaciones de Δ <i>Np73</i> se evaluó la viabilidad celular mediante citometría de flujo.).....	76
Figura 18. La sobre-expresión de Δ <i>Np73</i> incrementa la proliferación celular y confiere resistencia al tratamiento con oxaliplatino <i>in vivo</i>	77

Figura 19. La sobre-expresión de $\Delta Np73$ incrementa el número de autofagosomas. En células que que sobre-expresan $\Delta Np73$ y su control.	78
Figura 20. La inhibición de la ruta de autofagia incrementa la sensibilidad al tratamiento con oxaliplatino en las células que sobre-expresan $\Delta Np73$	79
Figura 21. La autofagia inducida por $\Delta Np73$ protege contra la muerte celular inducida por oxaliplatino.....	80
Figura 22. Efectos del tratamiento con oxaliplatino y cloroquina sobre los xenotransplantes tumorales con sobre-expresión para $\Delta Np73$ y sus controles..	81
Figura 23. Niveles altos de expresión de <i>ATG4D</i> disminuyen la supervivencia libre de enfermedad de los pacientes con cáncer de colon	83
Figura 24. Análisis de la identidad de los exosomas.....	84
Figura 25. Análisis de los niveles de expresión de ARN mensajero por PCR cuantitativa a tiempo real en los exosomas liberados por las células transfectadas transitoriamente con $\Delta Np73\beta$ y su respectivo control.	85
Figura 26. Transformación bacteriana para confirmar la ausencia del vector de expresión en los exosomas liberados.....	85
Figura 27. La transferencia de $\Delta Np73\beta$ es específica del tipo celular.....	86
Figura 28. La transferencia del $\Delta Np73\beta$ exosomal incrementa la proliferación en las células receptoras de cáncer de colon y en los fibroblastos.	87
Figura 29. La transferencia de $\Delta Np73\beta$ exosomal incrementa la resistencia a drogas en las células aceptoras.....	88
Figura 30. Ensayo de formación de vasos con células HUVECs después de los tratamientos con exosomas $\Delta Np73\beta$ o exosomas control.....	88
Figura 31. La transferencia del $\Delta Np73\beta$ exosomal confiere potencial oncogénico en los xenotransplantes tumorales.....	90
Figura 32. Niveles de expresión de $\Delta Np73$ en exosomas y en el tumor (n= 4 ratones por grupo, Prueba t de <i>Student</i> * $P = 0.01$)	90
Figura 33. Análisis del crecimiento tumoral de los xenotransplantes tumorales con un tumor contralateral que sobreexpresan $\Delta Np73$. Los ratones con un solo tumor control en uno de los flancos se utilizaron como control.	91
Figura 34. Efecto de los niveles de $\Delta Np73$ sobre la supervivencia global, curvas de <i>Kaplan-Meier</i> y valores <i>P</i>	92
Figura 35. Análisis de los niveles de $\Delta Np73$ en los exosomas derivados de pacientes con cáncer de colon.	93

Figura 36. Análisis por PCR cuantitativa a tiempo real de los niveles de expresión de $\Delta Np73$ en la línea celular HCT116 tras ser incubada con exosomas derivados de individuos sanos y pacientes con cáncer de colon con niveles bajos o altos del gen)....	94
Figura 37. Asociación entre los niveles de $\Delta Np73$ y el pronóstico de los pacientes con cáncer de colon	96

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Características clínico-patológicas de los pacientes con cáncer de colon.	51
Tabla II. Líneas celulares.....	52
Tabla III. Anticuerpos monoclonales y policlonales.	53
Tabla IV. Secuencias de oligonucleótidos utilizados en qRT-PCR	55
Tabla V. Numero de recaídas y muertes en las diferentes categorías.	66
Tabla VI. Correlaciones entre los niveles de expresión de las isoformas de <i>TP73</i> y <i>HMGB1</i> , <i>ABCBI</i> y <i>CASP1</i> en pacientes con cáncer de colon.....	68
Tabla VII. Análisis univariante y multivariante de la asociación entre los niveles de expresión de las isoformas de <i>TP73</i> y <i>ABCBI</i> , <i>HMGB1</i> y <i>CASP1</i> , y las características clínico-patológicas y la supervivencia global de los pacientes con cáncer de colon.	71
Tabla VIII. Correlaciones entre los niveles de expresión de $\Delta Np73$ y <i>ULK1</i> , <i>ULK2</i> , <i>ATG4C</i> , <i>ATG4D</i> Y <i>BECNI</i> en pacientes con cáncer de colon.....	81
Tabla IX. Número de recaídas y muertes en las diferentes categorías para cada variable.	82
Tabla X. Número de recaídas y muertes en las diferentes categorías	94

ABREVIATURAS

ABCB1	Del inglés <i>ATP-Binding Cassette, Sub-Family B, Member 1</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPK	Quinasa activada por AMP (del inglés <i>AMP-activated protein kinase</i>)
APC	Del inglés <i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ASPP	Del inglés <i>Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase</i>
ATG4C	Del inglés <i>Autophagy Related Gene 4C</i>
ATG4D	Del inglés <i>Autophagy Related Gene 4D</i>
BAX	Del inglés <i>BCL2-Associated X</i>
BECN1	Del inglés
BECN1	Del inglés <i>beclin 1, autophagy related</i>
BRAF	Del inglés <i>V-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B</i>
BSA	Seroalbúmina bovina (del inglés <i>Bovine Serum Albumine</i>)
CASP1	Del inglés
CC	Ciclo celular
CCR	Cáncer Colorectal
CCT	Del inglés <i>Cataract Congenital Total</i>
CDK	Del inglés <i>Cyclin-Dependent Kinase</i>
CLRN1	Del inglés <i>Clatrine1</i>
DRAM1	Del inglés <i>DNA-Damage Regulated Autophagy Modulator 1</i>
E-Cadherina	Del inglés <i>Epithelial Cadherin 1, Type 1</i>
E2F1	Del inglés <i>E2F Transcription Factor 1</i>
EPLIN	Del inglés <i>Epithelial Protein Lost in Neoplasm</i>
ESCRT	Del inglés <i>Endosomal Sorting Complexes Required for Transport</i>
FITC	Isotiocinato de fluoresceína
G6PD	Del inglés <i>Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase</i>
GLS2	Del inglés <i>Glutaminase 2</i>
HMGB1	Del inglés <i>High Mobility Group Protein B1</i>
HSP	Del inglés <i>Heat Shock Proteins</i>
HUVEC	Células endoteliales humanas de la vena del cordón umbilical (del inglés <i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>)
ILVs	Del inglés <i>Intraluminal Vesicles</i>
INF α	Del inglés <i>Interferon alfa</i>
iPS	Del inglés <i>induce Ploripotent Stem cells</i>
ITCH	Del inglés <i>Itchy E3 Ubiquitin Protein Ligase</i>
KRAS	Del inglés <i>Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog</i>

LC3	Del inglés <i>Microtubule-Associated Protein 1 Light Chain 3 Alpha</i>
MHC	Del inglés <i>Major Histocompatibility Complex</i>
MMR	Del inglés <i>Mismatch repair</i>
mTOR	Del inglés <i>Mechanistic Target Of Rapamycin</i>
MTT	Agente 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
MVBs	Del inglés <i>Mulivesicular Bodies</i>
PE	Del inglés <i>phosphatidylethanolamine</i>
PEDF	Del inglés <i>Pigment epithelium-derived factor</i>
PTEN	Del inglés <i>Phosphatase And Tensin Homolog</i>
PUMA	Del inglés <i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
qRT-PCR	PCR cuantitativa a tiempo real (de inglés <i>Quantitative Real Time Polymerase chain reaction</i>)
SDHA	Del inglés <i>Succinate Dehydrogenase Complex, Subunit A</i>
TEM	Transición Epitelio Mesénquima
TGFβ	Del inglés <i>Transforming Growth Factor Beta 1</i>
TNM	Tamaño tumoral, número de ganglios afectados y presencia o no de metástasis
TP53	Del inglés <i>Tumor Protein P53</i>
TP63	Del inglés <i>Tumor Protein P63</i>
TP73	Del inglés <i>Tumor Protein P73</i>
TSC2	Del inglés <i>Tuberous Sclerosis 2</i>
ULK	Del inglés <i>Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase</i>
VEGF	Del inglés <i>Vascular endothelial growth factor</i>
ZEB1	Del inglés <i>Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1</i>

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Epidemiología y origen del cáncer

El término genérico cáncer engloba un amplio número de enfermedades que pueden afectar a cualquier tejido del organismo y que tienen en común la acumulación secuencial de alteraciones a nivel de material genético. Estas alteraciones producen el crecimiento excesivo y descontrolado de la célula modificada, resultando en la formación de un tumor maligno o neoplasia. Aquellas células cuyas alteraciones genéticas les permitan obtener ventajas en crecimiento serán seleccionadas, pudiendo desarrollar, tras adquisición de alteraciones adicionales, capacidades migratorias o invasivas que les permitirán colonizar otros tejidos u órganos (metástasis). Las causas de estas alteraciones suelen ser interacciones entre una serie de factores endógenos (hormonas, productos del metabolismo celular) y exógenos (tabaco, alcohol, dieta, radiaciones, factores ocupacionales, virus y/o fármacos). Hay que destacar que algunas de estas alteraciones pueden haber sido heredadas de los progenitores. Así, podemos definir cáncer como una enfermedad heterogénea cuya base molecular principal es la alteración en genes que controlan la progresión del ciclo celular.

Se ha observado un aumento en la incidencia de cáncer a nivel mundial siendo la principal causa el incremento de la esperanza de vida de la población (Muñoz, 2004), creciendo el número de diagnósticos por cáncer de 11,3 millones en 2007 a 15,5 millones en 2030 (WHO | World Health Organization). Este hecho pone de manifiesto la necesidad de acumular alteraciones genéticas a lo largo de la vida para el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, el número de jóvenes afectados, aunque con una incidencia mucho menor, no es despreciable, asociándose con la exposición excesiva a carcinógenos o a la herencia de un gen o alteración de predisposición a la enfermedad. En nuestro país, los tumores se han situado como la segunda causa de muerte de la población total (27,5% de todas las defunciones), aunque en hombres son la primera causa superando a las enfermedades cardiovasculares (<http://www.seom.org>). Aunque se prevé que la mortalidad relacionada con cáncer alcanzará los 12 millones en 2030, descenderá un 10% en hombres y 7% en mujeres como consecuencia de los importantes avances que se realizan en el tratamiento y manejo de la enfermedad (<http://www.cancer.gov>).

1.2 Cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal (CCR) es el tumor más frecuente en España (aproximadamente un 15% de los tumores diagnosticados) teniendo en cuenta a ambos sexos de forma conjunta. Este tipo de tumor supone la segunda causa de muerte por cáncer tanto en hombres como en mujeres, tras los tumores de pulmón y mama, respectivamente. La supervivencia de estos pacientes estimada a los 5 años se ha incrementado en los últimos años hasta el 50%, dependiendo fundamentalmente del estadio tumoral en el momento del diagnóstico. Así, en los pacientes con CCR en estadio I, II, III, IV de acuerdo con la clasificación TNM (tamaño tumoral, número de ganglios afectados y presencia o no de metástasis), la supervivencia a 5 años es de 95-100%, 70-85%, 50-70% y 5-15%, respectivamente. Afortunadamente, la tasa de

mortalidad muestra un descenso significativo en mujeres y una estabilización en hombres, probablemente como consecuencia de la detección precoz debida a la buena accesibilidad de estos tumores y al desarrollo de las técnicas diagnósticas (endoscopias), así como de los avances en las terapias disponibles (www.aecc.es; www.cne.isciii.es). Aún así, todavía existe un gran desconocimiento sobre la biología del tumor que podría predecir su comportamiento y por tanto permitir una práctica clínica más efectiva.

Como otros tumores, el CCR surge como resultado de la acumulación de alteraciones genéticas heredadas y/o causadas por factores exógenos que provocan la transformación de un epitelio normal en un adenocarcinoma invasivo (Markowitz and Bertagnolli, 2009). La exposición continuada a factores ambientales de riesgo, entre los que destaca la dieta (alto consumo de triglicéridos, carne roja y un bajo consumo de fibra, vitamina D o fosfatos) y algunos metabolitos procedentes de la flora intestinal o de las heces (Sharpe et al., 2002a, 2002b; Winawer et al., 1990), puede producir mutaciones en cada etapa de la carcinogénesis en uno o varios genes reguladores del metabolismo celular (*MMR*, *APC*, *KRAS*, *PTEN*, *TP53* o la vía supresora tumoral de TGF- β , entre otros) que dispararán la formación del tumor. La progresión de la carcinogénesis de colon está bien descrita en el modelo clásico de Fearon and Vogelstein (Vogelstein et al., 1988), en la que se destacan alteraciones en los genes *APC*, *KRAS*, *TP53* y *BRAF* (Jasperson et al., 2010)(Figura 1).

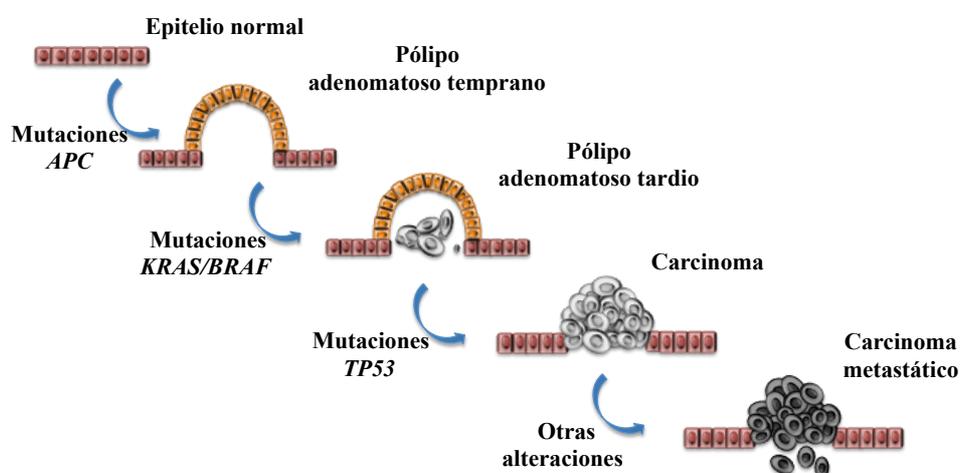


Figura 1. Progresión del cáncer colorrectal y acumulación de alteraciones genéticas. Basado en el modelo de Fearon y Vogelstein (Vogelstein et al., 1988).

El 25% de los casos de CCR se atribuyen a la herencia de las alteraciones en genes de predisposición a esta neoplasia (10%) o a factores de contribución genética (exposición de los miembros de la familia a un agente cancerígeno, 15%). En el conjunto de las lesiones asociadas a factores de riesgo hereditarios se diferencian dos formas caracterizadas molecularmente. La primera se denomina Poliposis Adenomatosa Familiar, FAP (Familiar Adenomatous Polyposis), representa el 0.01% de los casos hereditarios y se caracteriza por alteraciones genéticas en el

gen *APC* (Kinzler et al., 1991; Spirio et al., 1993). La segunda forma es conocida como Cáncer Colorrectal Hereditario no Polipósico, HNPCC (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cáncer), representa entre el 5-10% de los tumores asociados a herencia y se caracteriza por mutaciones germinales en los genes de reparación de ADN. Un tercer grupo de tumores de colon engloba a familias con una clara agregación de adenomas o cánceres de colon, Cáncer Colorrectal Familiar, FCC (Familiar Colorectal Cáncer) (Fuchs et al., 1994) para los que todavía no se conocen mutaciones relevantes (Jasperson et al., 2010). Sin embargo, la mayoría de los cánceres de colon diagnosticados (75%) son formas esporádicas causadas por mutaciones adquiridas espontáneamente a lo largo de la vida de los individuos y, aunque se desconocen los factores genéticos que se asocian con la enfermedad, en muchos casos se observan mutaciones similares a los síndromes hereditarios.

Para el caso particular del CCR, y el del cáncer en general, es fundamental la identificación de marcadores moleculares que permitan la detección del tumor en estadios tempranos, así como aquéllos con valor pronóstico. Aunque actualmente son pocos los marcadores útiles, los avances en las técnicas de biología molecular que permiten el estudio y la descripción molecular de la neoplasia hacen que el traslado del conocimiento genético del cáncer de colon a la práctica clínica habitual esté cada vez más cerca, facilitando el diagnóstico en estadios tempranos de la enfermedad y la elección de tratamientos específicos para cada tipo de paciente.

1.3 Ciclo celular y cáncer

Las múltiples alteraciones genéticas que favorecen la transformación de una célula normal a una célula cancerígena son la consecuencia de la pérdida de fidelidad en los procesos de replicación, reparación y de segregación del genoma. Por tanto, la desregulación del ciclo celular, donde se testa la calidad y eficiencia de estos procesos, puede desencadenar la formación de un tumor maligno.

El ciclo celular (CC) comprende dos etapas bien diferenciadas: la interfase, constituida por G_1 (gap o intervalo 1) y G_2 (gap o intervalo 2) en las que se produce el crecimiento en masa de la célula, y la fase S, donde se produce la replicación del ADN y sus proteínas asociadas; y la fase M, en la que se produce la división de todos los componentes celulares para generar dos células hijas idénticas (Figura 2).

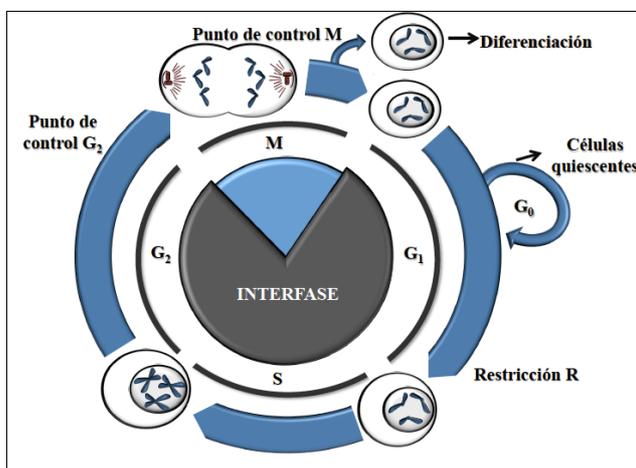


Figura 2. El ciclo celular

Ante determinadas condiciones, las células pueden entrar en un periodo de latencia denominado fase G_0 (en ausencia de estímulo mitogénico), parar el ciclo celular en G_1 o G_2 (ante estímulos específicos o daños en el ADN) o desencadenar señales apoptóticas (ante daños irreparables) (Collins et al., 1997).

La regulación del CC está dirigida por una red de interacción de proteínas altamente compleja y estrictamente regulada cuyos principales efectores son las proteínas CDKs, ciclinas y los inhibidores de ambas. Éstas, además de ejercer una regulación positiva o negativa sobre el CC, se encargan de supervisar los cuatro puntos de control de la célula en división y del medio para dar lugar o restringir las acciones propias de cada una de las fases del ciclo. En el caso de un contexto aberrante, cualquier anomalía en los puntos de control se puede traducir en la proliferación descontrolada de las células y la formación de un tumor. A su vez, la aceleración de la proliferación favorece la acumulación de nuevas mutaciones por fallo o falta de tiempo de los puntos de control y /o reparación, confiriéndole más agresividad a las células tumorales.

De manera general, podemos clasificar a los genes reguladores del CC en proto-oncogenes y genes supresores tumorales. Los primeros favorecen la progresión del ciclo celular e inhiben las rutas de senescencia y apoptosis. Cuando su expresión se altera el CC se descontrola y pasan a denominarse oncogenes, siendo su expresión dominante en todos los casos (Gruber et al., 1999). A diferencia de los proto-oncogenes, los genes supresores tumorales son activadores de apoptosis y senescencia o inhibidores de la progresión del CC. El desarrollo de un tumor maligno está asociado con la pérdida de su expresión o la expresión de una forma mutada, cuya alteración siempre se manifiesta con carácter recesivo (Knudson, 1971). El gen supresor por excelencia es *TP53*, también conocido como “el guardián del genoma” dada su función principal de responder en contextos celulares donde se ha producido daño genómico o alteraciones en la progresión del CC, ejerciendo su acción en el punto de control G_1/S , bloqueando el progreso del ciclo o induciendo procesos de apoptosis y/o senescencia en función del tipo de daño celular.

1.4 La familia *TP53*

El gen *TP53* se sitúa en la región cromosómica 17p13 y codifica para un factor de transcripción tetramérico que se activa en respuesta a señales de estrés, incluyendo daño en el ADN y la activación de oncogenes. P53 se describe como una proteína supresora tumoral de vida corta capaz de regular la expresión de un largo número de genes efectores implicados en múltiples procesos (regulación del ciclo celular, apoptosis, senescencia, diferenciación y reparación de ADN (Maddika et al., 2007; Yu, 2006, p. 53), contribuyendo así al mantenimiento de la estabilidad genómica de la célula. Recientemente se ha definido a *TP53* como un regulador central del metabolismo celular y cómo esta nueva función puede desencadenar procesos supresores tumorales, como la inducción de senescencia (Jiang et al., 2013a;

Maddocks and Vousden, 2011), u oncogénicos, regulando positivamente la proliferación celular (Maddocks et al., 2013).

El papel de *TP53* en cáncer fue claro desde el desarrollo del primer ratón nulo para el gen que mostraba una alta susceptibilidad al desarrollo de tumores, tanto inducidos como espontáneos (Donehower et al., 1992). Este hecho se confirmó posteriormente en cánceres humanos cuando múltiples estudios describieron que entre un 50 y un 70% de los tumores presentaban mutaciones en la secuencia de *TP53* o alteraciones en los genes reguladores o efectores de su vía de señalización (<http://p53.free.fr>; Meek, 2009; Vogelstein et al., 2000). La inactivación de P53 es esencial para la iniciación del tumor, así como para su mantenimiento y progresión. Sin embargo, no se ha encontrado una estrecha correlación con el pronóstico de los pacientes (Brosh and Rotter, 2009), lo que apunta a la existencia de otros genes clave para la progresión del tumor.

En el año 1997 se identificaron dos genes con alta homología estructural y funcional con *TP53*, *TP63* (Schmale and Bamberger, 1997; Trink et al., 1998; Yang et al., 1998) y *TP73* (Kaghad M y col., Cell, 1997) y *TP73* (Kaghad et al., 1997) que constituirían la familia de *TP53* (Figura 3). Todos los miembros de la familia de *TP53* participan en la regulación coordinada de múltiples procesos, existiendo una compleja regulación entre ellos. Como consecuencia, en determinados contextos, el destino celular depende de la relación entre los niveles de expresión de cada miembro de la familia, así como de sus genes reguladores (Wei et al., 2011).

La estructura génica de *TP53*, *TP63* y *TP73* está altamente conservada en la evolución siendo el dominio de transactivación NH₂-terminal (TA), el dominio de unión al ADN (DBD) y el dominio de oligomerización COOH-terminal (OD) los más conservados (Moll and Slade, 2004). Adicionalmente, entre *TP63* y *TP73* son comunes un segundo dominio de transactivación (TA₂), un dominio de interacción proteína-proteína tipo *steril alpha motif* (SAM), y un dominio inhibitorio de la transcripción (TI). El hecho de que los tres genes compartan una homología de más del 60% en su dominio de unión al ADN apoya el hecho de que pueden regular la transcripción de los mismos genes efectores (Grob et al., 2001; Jost et al., 1997; Zhu et al., 1998) (Figura 3). Sin embargo, pequeñas diferencias encontradas en su estructura cristalográfica podrían explicar por qué presentan diferentes patrones de expresión (Candi et al., 2014). Es importante destacar, que la conservación de este dominio a lo largo de la evolución indica la importancia de la regulación de la transcripción en las funciones biológicas atribuidas a esta familia de proteínas.

Debido al procesamiento alternativo del ARN mensajero (ARNm) tanto en la región amino- como en la carboxi-terminal, todos los miembros de la familia pueden dar lugar a diferentes isoformas, algunas presentan funciones supresoras tumorales y otras claramente oncogénicas (Bourdon et al., 2005; De Laurenzi et al., 1998, 1999; Grob et al., 2001).

P53, P63 y P73 son transcripcionalmente activos en forma de homo-tetrameros (de dos homodímeros), de cuya unión depende la activación de la proteína, además de una serie de

modificaciones post-traduccionales (Coutandin et al., 2009). A pesar de su homología, sólo P63 y P73 son capaces de interactuar entre sí formando heterotetrámeros, siendo más estables que los homo-tetrámeros (Coutandin et al., 2009; Davison et al., 1999; Joerger et al., 2009).

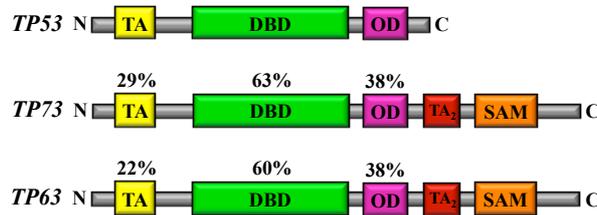


Figura 3. Organización estructural y homología entre los miembros de la familia de TP53

1.5 TP73

1.5.1 Gen

El gen *TP73* se mapeó en el cromosoma 1p36.33 por Jost y colaboradores en 1997 (Jost et al., 1997). Consta de 14 exones que como resultado de un procesamiento alternativo del ARNm y/o del uso de dos promotores distintos dan lugar a un complejo número de isoformas. Las variantes completas que se transcriben a partir del primer promotor y que no sufren modificaciones en su región amino-terminal se denominan *TAp73*, mientras que aquellas que presentan esta región truncada o que se transcriben a partir del segundo promotor, carecen completamente o en parte del dominio de transactivación (TA) y se conocen colectivamente como $\Delta TAp73$ e incluyen a las isoformas $\Delta Ex2p73$, $\Delta Ex2/3p73$, $\Delta Np73$ y $\Delta N'p73$. Como consecuencia del procesamiento alternativo de la región amino terminal, $\Delta Ex2p73$ y $\Delta Ex2/3p73$ pierden los exones 2 ó 2 y 3, respectivamente (Domínguez et al., 2006a; Kaghad et al., 1997; Sherr and Weber, 2000). La variante $\Delta N'p73$ se genera a partir del primer promotor e incluye en su secuencia 198 pares de bases del exón 3' que dan lugar a 13 aminoácidos adicionales (Domínguez et al., 2006a; Ishimoto et al., 2002). Un segundo promotor situado en la región intrónica del exón 3 da lugar a la forma $\Delta Np73$, en la que se incluye un exón adicional 3'(Domínguez et al., 2006a; Wilhelm et al., 2010). Llamativamente, el producto proteico resultante de la traducción de $\Delta N'p73$ y $\Delta Np73$ es indistinguible (Domínguez et al., 2006a; Ishimoto et al., 2002). A su vez, todos los transcritos pueden ser procesados desde el exón 10 al 14, en la región carboxi-terminal generando, al menos, 8 variantes diferentes (α , β , γ , ζ , δ , ϵ , η , ηI) (De Laurenzi et al., 1998). No todas las isoformas se expresan en un tipo celular, lo que sugiere que algunas de ellas pueden tener funciones solapantes (Ishimoto et al., 2002) (Figura 4).

1.5.2 TP73 y cáncer

Aunque inicialmente se atribuyeron funciones supresoras tumorales para *TP73* similares a las descritas para su homólogo *TP53*, la ausencia de mutaciones en su secuencia, la sobre-expresión de la forma nativa en distintos tumores y, la ausencia de fenotipo tumoral en el ratón nulo, sugerían que *TP73* tenía un mecanismo de acción diferente en el contexto tumoral. Estudios posteriores mostraban datos controvertidos en los que algunos autores atribuían actividades oncogénicas a *TP73* (Petrenko et al., 2003; Stiewe et al., 2002; Zaika et al., 2001, 2002), mientras que otros apostaban por las funciones supresoras tumorales (Jost et al., 1997; Pozniak et al., 2000). La identificación posterior de distintas isoformas ayudó a describir, al menos en parte, la polémica que existía sobre su función.

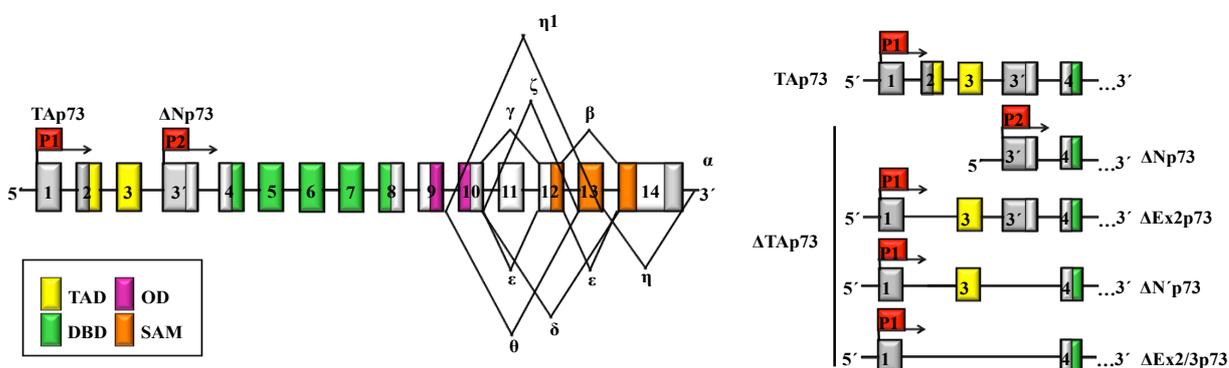


Figura 4. Esquema de la arquitectura del gen *TP73*. Los exones se organizan según la siguiente estructura de dominios: dominio de transactivación (TAD), dominio de unión al ADN (DBD), dominio de oligomerización (OD) y motivo alfa esteril (SAM). Se indican las dos regiones promotoras (P1 y P2) y el procesamiento de la región COOH-terminal. Las isoformas NH₂-terminal (*TA* y *ΔTA*) pueden ser procesadas simultáneamente con el COOH-terminal.

Igual que P53, TAp73 induce parada del ciclo celular, apoptosis y diferenciación celular a través de la transactivación de los mismos genes diana de P53; es por ello que se le atribuyen características de supresor tumoral. Sin embargo, las isoformas ΔTAp73 pueden operar como oncogenes actuando como reguladores negativos de P53 y TAp73 mediante la formación de hetero-tetrámeros transcripcionalmente inactivos (Zorić et al., 2013) y por competición directa por los sitios de unión en los promotores de los genes diana (Buhlmann and Pützer, 2008; Ishimoto et al., 2002). Existe un mecanismo de regulación negativa mediante el que las formas TAp73 y P53 pueden adicionalmente activar la expresión de ΔNp73 por unión directa al segundo promotor (Grob et al., 2001). Además, algunas proteínas P53 mutadas son capaces de formar hetero-tetrámeros con P63 y TAp73 inactivándolas (Gaiddon et al., 2001; Li and Prives, 2007). Por otro lado, se ha descrito que las isoformas truncadas, concretamente ΔNp73, codifica para una proteína más estable y de vida media más larga que las variantes TAp73 (Grob et al., 2001; Stiewe et al., 2002) con las ventajas que este hecho conlleva en determinados contextos celulares. Además, las recientes publicaciones que apoyan la función

exclusiva de $\Delta Np73$ activando la transcripción de su propio conjunto de genes efectores con funciones oncogénicas (mediante el dominio de transactivación presente en los 13 aa adicionales del exón 3') (Lin et al., 2009) y la identificación de las isoformas $\Delta TAp73$ como piezas clave en diferentes procesos pro-tumorales (angiogénesis, transición epitelio-mesénquima –TEM-) justifican, al menos en parte, su potencial oncogénico (Díaz et al., 2008; Vilgelm et al., 2008a; Y. Zhang et al., 2013; Zhang et al., 2012).

La asignación de funciones opuestas para las isoformas de *TP73* se confirmó con el desarrollo de los modelos de ratón nulos específicos para *TAp73* y la forma $\Delta TAp73$. El modelo deficiente para *TAp73* además de presentar defectos meióticos, infertilidad, envejecimiento prematuro, inestabilidad genómica y defectos en el desarrollo neuronal, mostraba mayor susceptibilidad al desarrollo de tumores tanto espontáneos como inducidos, principalmente adenocarcinomas de pulmón (Tomasini et al., 2008). Por el contrario, los ratones deficientes para las isoformas $\Delta Np73$ no desarrollaban tumores, además de incrementar la sensibilidad a los agentes genotóxicos y la apoptosis mediada por P53, y de mostrar signos de neurodegeneración (Wilhelm et al., 2010). Estos resultados apoyan la función supresora tumoral para las isoformas *TAp73* y un papel oncogénico para la variante $\Delta Np73$.

Aunque existen pocos estudios de funcionalidad, los resultados obtenidos hasta la fecha apoyan el papel oncogénico de las formas $\Delta TAp73$, específicamente para la variante $\Delta Np73$. Así, es esencial llevar a cabo estudios que completen la funcionalidad de estas isoformas describiendo en qué otras actividades oncogénicas adicionales de iniciación o progresión tumoral están implicadas para determinar su papel en el proceso tumoral.

1.5.3 Función biológica de *TP73*

A pesar del solapamiento funcional existente entre *TP73* y *TP53*, existen suficientes evidencias para afirmar que *TP73* puede desempeñar funciones exclusivas. Al igual que P53, P73 se acumula tras daño genotóxico regulando el ciclo celular y controlando la estabilidad genómica, aunque distintos tipos de daño en el ADN afectan a su expresión de manera diferente (Levrero et al., 2000). Específicamente, se han detectado niveles altos de expresión de las formas *TAp73* y $\Delta Np73$ tras tratamientos a drogas quimioterápicas como cisplatino y doxorubicina (Shinbo et al., 2002; Vossio et al., 2002), aunque su implicación en la inducción de la apoptosis mediada por las drogas parece contraria (*TAp73* pro-apotótico y $\Delta Np73$ anti-apotótico). Algunos grupos han descrito la transactivación de genes implicados en vías de reparación de ADN por parte de las isoformas de *TP73* (Lin et al., 2009).

Se ha descrito que el papel de *TAp73* en el mantenimiento de la polaridad celular mediante la inhibición de la TEM. En el contexto tumoral, algunos estudios indican que *TAp73* podría inhibir TEM (Zhang et al., 2012) mediante la regulación negativa de *Snail*, *Slug* y *Twist*, mientras que $\Delta Np73$ induciría este proceso (Y. Zhang et al., 2013). Además, $\Delta Np73$ podría

contribuir a la progresión tumoral transactivando los genes diana de TGF- β (Niemantsverdriet et al., 2012) y activando la cascada de invasión/metástasis mediante la regulación del eje EPLIN (Steder et al., 2013). Adicionalmente, *TP73* parece estar implicado en angiogénesis mediante la regulación de *VEGF* y de *PEDF*, aunque su mecanismo sigue siendo una incógnita (Díaz et al., 2008; Farhang Ghahremani et al., 2013). Curiosamente, la sobre-expresión de Δ Np73 puede aumentar la eficiencia de generación de células madre pluripotentes inducidas (iPS) (Lin et al., 2012).

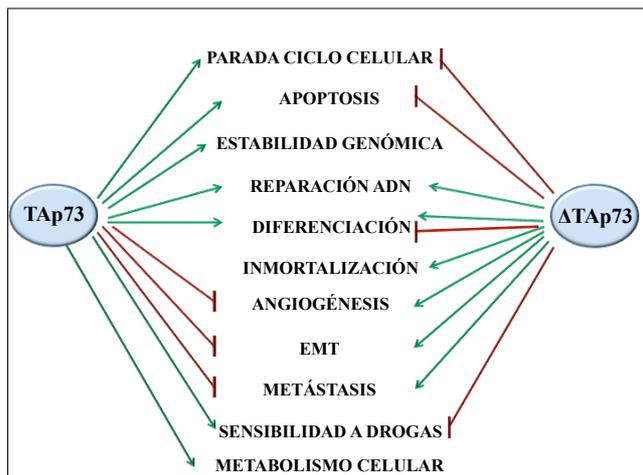


Figura 5. Actividades supresoras tumorales y oncogénicas diferencialmente reguladas por las isoformas *TAp73* y Δ *TAp73*.

Como ya hemos adelantado, las funciones de *TP73* no se limitan a una respuesta ante un contexto poco fisiológico. Muchos estudios han descrito el papel fundamental de *TP73* en embriogénesis (Killick et al., 2011; Tomasini et al., 2008; Yang et al., 2000) y en diferenciación de múltiples tipos celulares, específicamente, en desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso (Alexandrova et al., 2013; Yang et al., 2000). Se ha descrito a TAp73 como inductor de diferenciación neuronal (De Laurenzi et al., 2000; Tomasini et al., 2008) y del mantenimiento de los progenitores (Agostini et al., 2011; Gonzalez-Cano et al., 2010), mientras que Δ Np73 parece favorecer la supervivencia neuronal (Jacobs et al., 2006; Lee et al., 2004).

1.5.4 Mecanismos reguladores

Tras más de una década de investigación, los mecanismos de regulación de la actividad de *TP73* todavía constituyen un paradigma para la comunidad científica. A nivel transcripcional E2F-1 es la pieza clave, ya que es capaz de activar o inhibir a P73 en función de las modificaciones post-traduccionales que esta última haya sufrido (Aoki et al., 2012; Irwin et al., 2000; Kontaki and Talianidis, 2010; Logotheti et al., 2010; Pediconi et al., 2009; Seelan et al., 2002; Stiewe and Pützer, 2000; Urist et al., 2004; Wang et al., 2013; S. Wu et al., 2008). Sin embargo, algunos datos muestran que el segundo promotor del gen presenta una regulación independiente de E2F1 (Stiewe et al., 2004).

Al igual que ocurre con P53, en condiciones fisiológicas los niveles de proteína de las isoformas TAp73 y $\Delta Np73$ se mantienen muy bajos por acción de su modulador ITCH, que regula la degradación de estas proteínas por la vía del proteasoma (Oberst et al., 2005; Rossi et al., 2005). Sin embargo, como respuesta a estrés, ITCH se degrada permitiendo la rápida acumulación de TAp73 y su efecto pro-apoptótico (Kubo et al., 2010), mientras que $\Delta Np73$ es degradado para bloquear sus actividades anti-apoptóticas (Oberst et al., 2005; Rossi et al., 2005). Además, la estabilidad de P73 va a depender de la aplicación secuencial de una serie de modificaciones post-traduccionales, siendo la fosforilación la más importante tras un daño genotóxico (Agami et al., 1999; Gaiddon et al., 2001; Mantovani et al., 2004; Nyman et al., 2009; Sanchez-Prieto et al., 2002; Toh et al., 2004; Tomlinson et al., 2010; Tsai and Yuan, 2003; Urist et al., 2004; Wang, 2000).

La función de *TP73*, y por tanto el destino celular, está altamente determinado por el ratio entre los niveles de expresión de las isoformas *TAp73* y $\Delta TAp73$. Así, en condiciones fisiológicas los niveles de $\Delta Np73$ son relativamente altos en algunos tejidos (útero, glándulas salivares y lengua), mientras que son comparables a los de *TAp73* en otros tejidos (Buhlmann and Pützer, 2008). Sin embargo, en un contexto no fisiológico cuando el balance de este ratio se inclina hacia las isoformas con funciones anti-apoptóticas la célula puede adquirir propiedades pro-tumorogénicas. Los mecanismos que controlan este ratio son todavía desconocidos. Se ha descrito que la unión de la proteína $\Delta E F 1 / Z E B - 1$ en el primer intrón del gen inhibe la expresión de *TAp73* y $\Delta Np73$, incluso en presencia E2F1 (Fontemaggi et al., 2001; Pipaon et al., 2005). En 2006 nuestro grupo observó en pacientes con cáncer de colon que una delección en la región de unión de ZEB-1 se traducía en la disminución de los niveles de *TAp73*, inclinándose el ratio en favor de la expresión de las isoformas oncogénicas $\Delta TAp73$ (Coates, 2006; Domínguez et al., 2006). Además, estudios recientes han identificado otras vías de degradación selectiva de las isoformas de P73 dependientes del tipo y el contexto celular (Dulloo et al., 2010; Gonzalez-Cano et al., 2013; Sayan et al., 2010).

Muchos de los artículos que describen alteraciones en la función de *TP73* se basan en su interacción con una lista interminable de proteínas como ASPP1/2 y iASPP (Bell and Ryan, 2008; Bell et al., 2007; Bergamaschi et al., 2003; Cai et al., 2012; Patel et al., 2008; Robinson et al., 2008; Sullivan and Lu, 2007). Describir las proteínas clave en esta red de regulación nos proporcionan nuevos mecanismos reguladores que pueden ser dianas farmacológicas importantes. En este sentido, se han descrito múltiples compuestos capaces de inhibir o desplazar a los reguladores negativos de *TAp73* (Achour et al., 2013; Díaz et al., 2010; Onoda et al., 2011; Shammas et al., 2006; Sharif et al., 2010; Tiwary et al., 2011; Wong et al., 2011).

1.6 Implicación de *TP73* en proliferación

Uno de los primeros procesos que se ve alterado en el inicio del desarrollo de un tumor es la proliferación de la célula tumoral. Como ya hemos comentado anteriormente, las primeras alteraciones genéticas acumuladas perturban el ciclo celular normal produciendo el crecimiento excesivo de la célula modificada. Además de *TP53*, múltiples estudios han demostrado el control que pueden ejercer las isoformas de *TP73* sobre el ciclo celular. Se ha descrito que *TAp73* puede inducir parada en G1 mediante la transactivación de p21 y p57/Kip2 (Merlo et al., 2005), además de interactuar con las proteínas clave en la formación huso mitótico (*BUB1*, *BUB3* and *BUBR1*) y cooperar con su actividad (Allocati et al., 2012; Tomasini et al., 2009; Vernole et al., 2009). Por su parte, las isoformas Δ *TAp73* por interferencia con la actividad de *TAp73* y *P53*, inhiben apoptosis y favorecen la progresión del ciclo celular (Buhlmann and Pützer, 2008). Así, aunque algunos grupos descartan la asociación entre los niveles altos de expresión de la variante Δ *Np73*, el incremento en la tasa de proliferación celular y el desarrollo de un fenotipo más agresivo (Marabese et al., 2005), múltiples estudios sugieren que la disminución de estos niveles aumentan las tasas de muerte celular y disminuyen la proliferación en células de neuroblastoma (Simões-Wüst et al., 2005), mioblastoma (Belloni et al., 2006) y cáncer de cervix (C.-X. Di et al., 2013). Los estudios realizados en el modelo de ratón deficiente para esta isoforma confirmaron estos resultados (Pozniak et al., 2000; Wilhelm et al., 2010).

Actualmente, la controversia vuelve al panorama científico con las recientes publicaciones que sitúan a *TP73* como un gen central en el control del metabolismo celular. Específicamente, se ha descrito que *TAp73* regula positivamente la expresión de varias enzimas metabólicas, *G6PD*, *Cox4i1* y *GLS2* que, en un contexto tumoral, favorecen la progresión tumoral mediante el incremento de la tasa de proliferación de las células modificadas (Amelio et al., 2013; Du et al., 2013; Jiang et al., 2013b; Velletri et al., 2013).

1.7 Implicación de *TP73* en procesos de quimiorresistencia

Una de las mayores causas del fallo clínico de las terapias convencionales en el tratamiento del cáncer es la resistencia que desarrollan las células tumorales a las drogas citotóxicas empleadas (Buhlmann and Pützer, 2008; Soldevilla et al., 2013). Aunque inicialmente existe una respuesta positiva al tratamiento, el 50% de los pacientes acaban desarrollando resistencia (Kirschner et al., 1992) por mecanismos celulares innatos o adquiridos durante la administración de los tratamientos (Lehnert, 1996). Este fallo constituye la base de las recaídas y/o de las progresiones tumorales. Por ello, la identificación de los genes implicados en la sensibilidad a las drogas utilizadas en la clínica es crítica para predecir la respuesta y elegir el tratamiento más efectivo para los pacientes.

La respuesta celular tras el daño genómico producido por el tratamiento quimioterápico implica la sobre-expresión de *TP53* y de las isoformas *TAp73* (Concin et al.,

2005; Vilgelm et al., 2008a) que desencadenan la activación de la vía apoptótica mediante la transcripción de genes diana comunes (Lin et al., 2009, p. 73; Zhu et al., 1998) o exclusivos (Lin et al., 2009, p. 73; Scian et al., 2008, p. 53). Específicamente, se ha descrito in vitro que TAp73 puede inducir la expresión de *CASP1* tras el tratamiento con INF- α y cisplatino (Jain et al., 2005). *CASP1* está implicada en el procesamiento proteolítico de los precursores de las citoquinas pro-inflamatorias (Gupta et al., 2001), así como en la inducción de apoptosis (Denes et al., 2012). Los ratones nulos para esta proteína son deficientes en la producción de citoquinas, además de mostrar un defecto parcial en la respuesta apoptótica (Kuida et al., 1995; Li et al., 1995). Adicionalmente, se ha descrito la sobreexpresión de *CASP1* en líneas celulares resistentes a cisplatino Nagatani and Nomoto et al. 2001 aunque su pérdida también ha sido asociada con supervivencias más cortas en varios tipos de tumores humanos (Jarry et al., 1999; Winter et al., 2001).

Por el contrario, algunos estudios han descrito la presencia de niveles altos de expresión de las isoformas $\Delta TAp73$, y especialmente de $\Delta Np73$, y su asociación con el desarrollo de resistencia a las drogas utilizadas (Müller et al., 2006) mediante la regulación de genes pro-apoptóticos como *Bax* o *PUMA*, entre otros (Buhlmann and Pützer, 2008; C. Di et al., 2013) del eje $\Delta Np73$ -*miR205* modulado por E2F1 (Alla et al., 2012; Vera et al., 2013), o por la transactivación de genes clásicamente asociados con procesos de resistencia a drogas como *ABCB1* y *HMGB1* (Johnson et al., 2005; Uramoto et al., 2003; Vilgelm et al., 2008a). *ABCB1* codifica para una glicoproteína transportadora asociada a membrana, glicoproteína P, responsable de la eliminación de compuestos del interior celular, evitando su acumulación y favoreciendo el fenotipo resistente (Ambudkar et al., 2003). A diferencia de P53, las isoformas TAp73 no parecen regular negativamente la expresión de *ABCB1* (Johnson et al., 2005), aunque existen datos que asocian a las variantes $\Delta TAp73$ con sobre-expresión de *ABCB1* mediante la inhibición de p53 (Vilgelm et al., 2008a). Por otra parte, *HMGB1* está implicado en multitud de procesos biológicos entre los que se incluye invasión, transcripción, diferenciación, señalización extracelular, reparación de ADN y resistencia a drogas (Degryse et al., 2001; Thomas and Travers, 2001). En ensayos in vitro se observó que la sobreexpresión de *HMGB1* inducida por el tratamiento con estrógenos en células de cáncer de mama, podría aumentar su sensibilidad al cisplatino (He et al., 2000). Contradictoriamente, se ha descrito que la expresión ectópica de *HMGB1* disminuye la expresión de genes pro-apoptóticos como *Bax* (Stros et al., 2002). A pesar de la controversia, tanto *ABCB1* como *HMGB1* se han asociado con un peor pronóstico de los pacientes diagnosticados con diferentes tipos tumorales (Sinicrope et al., 1994; D. Wu et al., 2008; Yao et al., 2010). Por su parte, aunque las variantes $\Delta TAp73$ se han relacionado con supervivencias más cortas en múltiples tipos tumorales (Becker et al., 2006; Casciano et al., 2002; Concin et al., 2005; Domínguez et al., 2006a; Liu et al., 2006; Müller et al., 2005; Sun, 2002; Uramoto et al., 2004; Wager et al., 2006; Zitterbart et al., 2007), su asociación con sus

dianas putativas implicadas en procesos de resistencia a drogas todavía no ha sido evaluada in vivo.

En la actualidad, todavía se desconocen los mecanismos específicos que capacitan al tumor a adquirir resistencia a los agentes citotóxicos de tratamiento, aunque el aumento de la capacidad de reparación del ADN y la inhibición de las vías que desencadenen la muerte de las células malignas parecen ser elementos básicos.

1.8 Autofagia

La descripción de la ruta de autofagia y de su papel dual en tumorigénesis, tanto como desencadenante de muerte de células tumorales como de su supervivencia, la ha situado como una diana de estudio para las estrategias terapéuticas en desarrollo como alternativa a los tratamientos quimioterápicos convencionales (Sui et al., 2013). Se define como un mecanismo de degradación intracelular evolutivamente conservado que permite el mantenimiento de la homeostasis celular a través del reciclaje de proteínas, componentes citoplasmáticos y orgánulos celulares (Klionsky, 2007; Kuma et al., 2004; Mizushima and Klionsky, 2007; Mizushima et al., 2004), incluyendo la autofagia mediada por chaperonas, la micro- y la macroautofagia (para la que se utiliza el término general de autofagia) (Mizushima and Klionsky, 2007). Adicionalmente, existen rutas de autofagia selectivas cuya nomenclatura depende del contenido a degradar (mitofagia, mitocondrias, xenofagia, patógenos, etc) (Yorimitsu and Klionsky, 2005). Debido a su importancia en la homeostasis celular, existe una activación basal en condiciones normales (autofagia basal), que se ve alterada bajo múltiples condiciones de estrés celular (autofagia inducida). El proceso general se divide en varias etapas reguladas por un conjunto de genes relacionados con la autofagia (*autophagy-related genes, ATGs*). A nivel molecular, el primer paso implica la generación de una estructura pre-autofagosomal (fagóforo) que se expandirá hasta formar la doble membrana que aislará el material a degradar. Este paso está regulado negativamente por la proteína diana de rapamicina en las células de mamífero (mTOR) a través de dos complejos moleculares formados por la proteína ATG1 (ULK1, ULK2 y ULK3 en mamíferos) (Kamada et al., 2000) y la quinasa lipídica VPS34 (hVPS34 en humanos) (Simonsen and Tooze, 2009). Posteriormente, la maquinaria autofágica permitirá la expansión de la membrana de aislamiento, cuya formación depende de dos sistemas de conjugación como ubiquitina: ATG12-ATG5-ATG16L y de LC3-PE (the Atg5-Atg12-Atg16 y el Atg8 (LC3) (Geng and Klionsky, 2008), dependientes de la actividad de la quinasa fosfatidilinositol 3 (PIK3) y de BECN1. La fusión con los lisosomas permitirá la degradación del material contenido, cuyos productos resultantes serán liberados al citosol y reutilizados en los procesos anabólicos (Levine and Klionsky, 2004; Rabinowitz and White, 2010) (Figura 6).

La autofagia constituye un mecanismo básico de supervivencia celular en respuesta a diferentes tipos de estrés (Lum et al., 2005; Mortimore and Pösö, 1988;), aunque puede constituir una vía alternativa de muerte celular programada (González-Polo et al., 2005). Por

ello, está implicada en numerosos procesos fisiológicos, entre los que destaca su papel en diferenciación y desarrollo (Levine and Klionsky, 2004), y en algunos escenarios patológicos (Levine and Kroemer, 2008). Así, debido a su papel promotor de supervivencia, la relación entre autofagia y tumorigénesis es controvertida. Por un lado, la autofagia puede ejercer funciones supresoras tumorales, especialmente en etapas iniciales, limitando la inestabilidad genómica, disminuyendo el estrés celular desencadenado por la activación de rutas oncogénicas, y/o por reducción de la necrosis y de la inflamación intratumoral (Degenhardt et al., 2006; Liang et al., 1999; Lu and Harrison-Findik, 2013; Qu et al., 2003). Por otro lado, en el contexto tumoral, la activación de la ruta de autofagia puede favorecer a las células tumorales permitiéndolas adaptarse a las condiciones metabólicas adversas y/ o desarrollando resistencia a las terapias convencionales (Ravikumar et al., 2006). Además, podría ser la clave del mantenimiento y la auto-renovación de las células madre tumorales (Lu and Harrison-Findik, 2013) Así, se han descrito inhibidores farmacológicos de la vía de autofagia o de sus proteínas esenciales que sensibilizan a las células tumorales a algunos agentes de daño en el ADN, terapias dirigidas y radioterapia (Morselli et al., 2009).

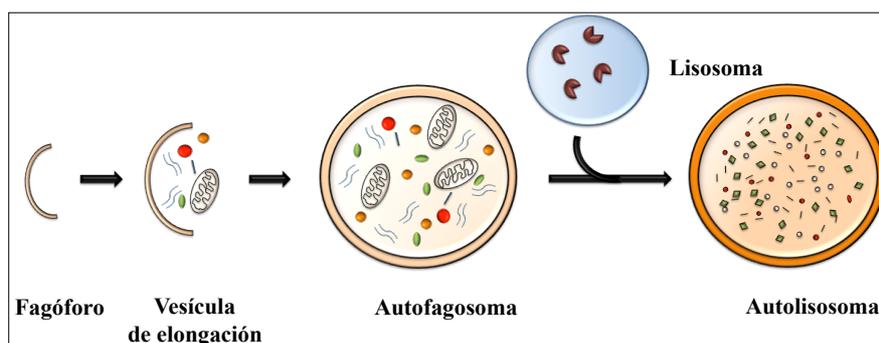


Figura 6. Proceso básico de autofagia celular.

La autofagia está íntimamente relacionada con el metabolismo celular y principalmente controlada por mTOR. En un contexto tumoral, mTOR está relacionado con múltiples procesos supresores tumorales, además de constituir el principal regulador negativo de la ruta de autofagia, mientras que AMPK constituye el principal activador (Meley et al., 2006). Otro de los reguladores clave de la vía, por su conexión con todas las vías metabólicas o tipos de estrés, es *TP53*, siendo determinante su localización subcelular (Lorin et al., 2013; Napoli and Flores, 2013). Tras una señal de daño, *P53* podría inducir autofagia mediante la transactivación de genes relacionados como *TSC2* (tuberosa escleriosis 2), *AMPK* (Di Nardo et al., 2014) o *PTEN* (Errafiy et al., 2013). Algunos estudios revelan a *DRAM1* (*DNA damage-regulated autophagy modulator 1*), como el principal mediador de autofagia dependiente de *TP53* (X.-D. Zhang et al., 2013). Además, estudios recientes revelan que la acumulación de *P53* citoplasmático podría inhibir la ruta de autofagia (Lorin et al., 2013; Morselli et al., 2009; Tasdemir et al., 2008).

Pocos estudios, aunque con datos relevantes, asocian a *TP73* con autofagia haciendo aún más compleja su red de regulación. Recientemente, un completo estudio realizado por Kenzelmann y colaboradores describe un nuevo conjunto de genes relacionados con autofagia, dianas tanto de *TP53* como de sus familiares *TP73* Y *TP63*. Estos datos sugieren un control de la homeostasis celular por parte de la familia completa (Kenzelmann Broz et al., 2013). En estudios anteriores ya se apuntaba hacia la regulación de la autofagia por *TP73* ya que, a diferencia de *P53*, las condiciones de activación de la autofagia, como son la falta de nutrientes y el inhibidor de la vía de mTOR, Rapamicina, incrementan la estabilidad de *TAp73*. Así, *TAp73* podría activar su programa transcripcional para inducir autofagia, mediante la regulación de la expresión de genes dianas de la ruta mTOR (Rosenbluth et al., 2008).

1.9 *TP73* en pacientes con cáncer

Los primeros estudios sobre la implicación *TP73* en tumorigénesis mostraban la delección frecuente de la región cromosómica de *TP73* (Romani et al., 1999). Además se describió la sobre-expresión de *TP73* en múltiples tipos tumorales: meduloblastoma (Remke et al., 2011), neuroblastoma (Casciano et al., 2002; Romani et al., 1999), gliomas (Wager et al., 2006), hepatocarcinoma (Müller et al., 2005), tumores gástricos (Vilgelm et al., 2010), cáncer de ovario (Concin et al., 2005, 2005, 2004), célula escamosa cervical (Liu et al., 2006), mama (G Domínguez et al., 2006), pulmón (Ott and Geiser, 2012), cabeza y cuello (Faridoni-Laurens et al., 2008, 2001), melanoma (Tuve et al., 2004), próstata (Takahashi et al., 1998), tiroides (Ferru et al., 2006), vejiga (Puig et al., 2003) y en algunos tumores no sólidos (Leupin et al., 2004; Meier et al., 2006; Rizzo et al., 2004). Desde la descripción de las distintas isoformas de *TP73*, varios estudios han demostrado que la co-expresión de *TAp73* y de las variantes Δ *TAp73* es frecuente en cánceres humanos, aunque el balance entre ambas suele inclinarse hacia las formas oncogénicas (Soldevilla et al., 2013). A pesar de que es clara la relevancia de *TP73* en la fisiología tumoral, pocos estudios evalúan su valor pronóstico (Becker et al., 2006; Casciano et al., 2002; Concin et al., 2005, 2004; Domínguez et al., 2006; Faridoni-Laurens et al., 2008; Liu et al., 2006; Müller et al., 2005; Remke et al., 2011; Romani et al., 1999; Uramoto et al., 2004; Vilgelm et al., 2010; Wager et al., 2006). En este sentido, varios estudios describen la asociación entre la sobreexpresión de las isoformas Δ *TAp73* con una menor tasa de supervivencia en pacientes con diferentes tipos de cáncer (Soldevilla et al., 2013).

1.10 Consideraciones finales/Hipótesis I

La mayoría de las aproximaciones que evalúan el papel de las isoformas de *TP73* en el contexto tumoral apoyan el papel supresor tumoral de las formas *TAp73* y las propiedades oncogénicas para las formas $\Delta TAp73$. Además, se ha observado sobre-expresión de las formas $\Delta TAp73$ en muestras de pacientes con diferentes tipos de tumores, y en algunos casos, asociadas con un peor pronóstico de éstos. Algunos resultados han sugerido que las isoformas $\Delta TAp73$ pueden participar en procesos de quimiorresistencia en células tumorales que expresan P53 y *TAp73*. Así, se ha descrito que *TP73* puede regular la expresión de varios genes relacionados con procesos de resistencia a drogas como son *ABCBI*, *HMGB1* y *CASP1*. Basándonos en estos resultados, nuestras hipótesis de trabajo son:

- En pacientes con cáncer de colon esperamos encontrar una asociación directa entre la expresión de las isoformas $\Delta TAp73$ y los genes asociados con resistencia a drogas *ABCBI* y *HMGB1*; y *TAp73* y *CASP1*, lo que apoyaría que estos genes serían también diana de las distintas variantes de P73 in vivo.
- Tanto las variantes $\Delta TAp73$ como sus genes diana *ABCBI*, *HMGB1* y *CASP1* podrían tener un valor importante como marcador pronóstico en estos pacientes.
- La sobreexpresión ectópica de la isoforma $\Delta Np73$ in vitro induce resistencia a agentes quimioterápicos clásicos, como el oxaliplatino, en células de cáncer de colon y aumento de su tasa proliferativa.
- La sobreexpresión ectópica de la isoforma $\Delta Np73$ en líneas celulares derivadas de tumores de colon humanos activa vías asociadas a mecanismos de quimiorresistencia, como la de autofagia. Esperamos encontrar una asociación positiva entre los niveles de expresión de $\Delta Np73$ y de genes implicados en el proceso autofágico en las muestras de los pacientes tumorales y su asociación con el pronóstico de los pacientes.

1.11 Comunicación intercelular.

En los organismos multicelulares la comunicación intercelular es necesaria e imprescindible para coordinar el desarrollo y promover las funciones y adaptaciones al ambiente de células y tejidos (Mittelbrunn and Sánchez-Madrid, 2012). Los mecanismos clásicos implican contacto físico y la liberación de factores solubles o vesículas derivadas de la membrana plasmática (Raposo and Stoorvogel, 2013). Dependiendo de su origen, el término “vesícula extracelular o microvesícula” engloba a los cuerpos apoptóticos, los ectosomas y los exosomas (Sadallah et al., 2011), cuyas características físico-químicas son específicas para cada uno de ellos (EL Andaloussi et al., 2013). Un concepto más reciente es el intercambio de información genética entre células mediado por exosomas (Mittelbrunn and Sánchez-Madrid, 2012).

Los cuerpos apoptóticos son liberados por las células apoptóticas o bajo estrés, tienen un tamaño $> 1 \mu\text{m}$ de diámetro y se caracterizan por contener fragmentos de ADN. Los ectosomas, más pequeños (entre $1\mu\text{m}$ - 100nm), se forman por evaginaciones de la membrana plasmática celular y su tasa de liberación es muy baja, con excepción de las células tumorales. Por último, los exosomas constituyen la población de microvesículas más pequeñas que participan en procesos de comunicación intercelular, de entre 30 – 100nm , y cuyo origen es endosomal (Mittelbrunn and Sánchez-Madrid, 2012). Los exosomas se observaron por primera vez en 1985 en reticulocitos diferenciados asignándoles funciones relacionadas con la eliminación de moléculas no funcionales (Pan et al., 1985). Sin embargo, datos recientes han demostrado su importancia como mediadores de comunicación celular en procesos fisiológicos normales (respuesta inmune, lactancia, funciones neuronales) y patológicos (enfermedades autoinmunes, neurodegenerativas y cáncer)(Yang and Robbins, 2011). Así, se han detectado diferentes tipos de ARN en exosomas derivados de diversos fluidos corporales como orina (Conde-Vancells et al., 2010), fluido broncoalveolar (Admyre et al., 2003; Rodríguez et al., 2014), plasma (Caby et al., 2005; Rodríguez et al., 2014), saliva (Ogawa et al., 2011) o leche materna (Admyre et al., 2007), que facilitan su transferencia a otras células receptoras donde modulan su función.

1.12 Exosomas: biogénesis, composición molecular y función

1.12.1 Biogénesis de los exosomas

En la actualidad los mecanismos de biogénesis de exosomas no están completamente definidos, aunque los modelos descritos sugieren que se forman en endosomas tardíos denominados cuerpos multivesiculares (MVBs) dentro de la ruta endosomal y se liberan al medio extracelular por fusión de éstos orgánulos con la membrana plasmática (Simons and Raposo, 2009). Los endosomas tempranos generados durante la endocitosis sufren una serie de modificaciones para convertirse en endosomas tardíos. Tras la invaginación inversa de su

membrana limitante, se acumulan en su interior vesículas intraluminales (ILVs) con contenido selectivo resultando en la formación de los MVBs. Éstos pueden seguir una ruta degradativa por fusión con los lisosomas o fusionarse con la membrana plasmática para liberar las ILVs al medio extracelular. Una vez liberadas pasan a denominarse exosomas (Akers et al., 2013) (Figura 7).

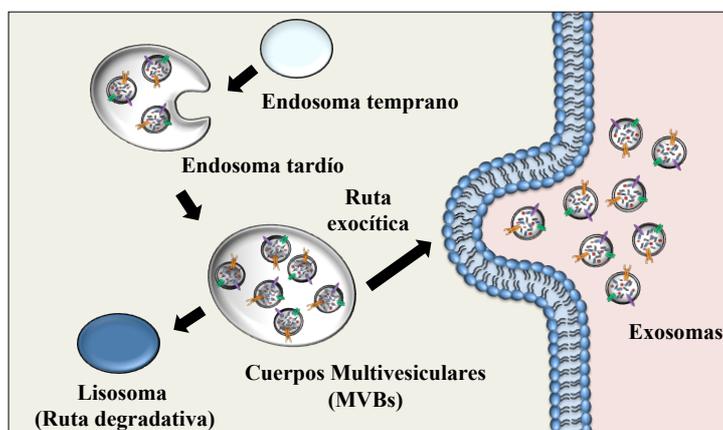


Figura 7. Biogénesis y secreción de exosomas.

Hasta la fecha poco se conoce sobre la maquinaria de liberación de exosomas, aunque parece estar claro que se trata de un proceso no aleatorio muy controlado en el que los complejos de liberación endosomal (ESCRT) tienen un papel central. Asimismo, parecen existir rutas independientes implicadas en la formación de los MVBs, liberación y secreción.

Para que los exosomas puedan ejercer su función biológica deben liberar su contenido en una célula diana aceptora. Aunque todavía se desconoce cómo estas vesículas interaccionan y regulan la función en las células receptoras se han propuesto los siguientes mecanismos: i) endocitosis mediada por receptor (Morelli et al., 2004); ii) adhesión a la superficie celular (Al-Nedawi et al., 2009; Escrevente et al., 2011; Nolte-t Hoen et al., 2009; Segura et al., 2007) iii) fusión con la membrana plasmática (Parolini et al., 2009) y iv) fagocitosis (Feng et al., 2010).

1.12.2 Composición molecular de los exosomas

Los exosomas son liberados por una gran variedad de células (Abusamra et al., 2005; Chavez-Muñoz et al., 2008; Fevrier et al., 2004; Graner et al., 2009; Hegmans et al., 2004; Johnstone et al., 1987; Kesimer et al., 2009; Lai et al., 2010; Laulagnier et al., 2004; Potolicchio et al., 2005; Segura et al., 2005; Turiák et al., 2011; Vallhov et al., 2011; van Niel et al., 2001; Wolfers et al., 2001; Zhang et al., 2006) por lo que su composición molecular depende del tipo celular del que procedan, así como del estado fisiológico de la misma. Sin embargo, los extensos estudios sobre su composición han revelado que existe un patrón proteico común para todos ellos en el que destacan: a) proteínas implicadas en la biogénesis de los cuerpos multivesiculares como ALIX, TSG101 y CLRN b) proteínas implicadas en el transporte

vesicular y encargadas de regular el acoplamiento y fusión de los exosomas con la membrana plasmática como la familia de GTPasas, Rabs y las anexinas c) tetraspaninas, de las que se encuentran especialmente enriquecidas CD63, CD81 y CD9; d) proteínas de choque térmico de respuesta a estrés como HSP60, HSP70, HSPA5, CCT2 y HSP90 e) enzimas metabólicas, proteínas ribosomales, proteínas implicadas en señales de traducción, ATPasas, y proteínas del citoesqueleto; y f) proteínas específicas del tipo celular como A33 para epitelio del colon, MHC-II (células presentadoras de antígeno) o CD86 (células dendríticas) (Mathivanan et al., 2010). Aunque el mecanismo de direccionamiento de las proteínas hacia los MBVs no se conoce con exactitud, parecen estar implicados varios mecanismos: ESCRT, que reconoce señales de ubiquitinación; la agregación de las proteínas en oligómeros; y la presencia de proteínas en rafts lipídicos (de Gassart et al., 2003; Vidal et al., 1997) (Figura 8).

Aunque menos estudiada, la composición lipídica de los exosomas también juega un papel importante en su biología. Mayoritariamente, los exosomas presentan un contenido lipídico enriquecido en esfingomiélin, colesterol y ceramida exponiéndose hacia el exterior de la membrana exosomal (de Gassart et al., 2003; Laulagnier et al., 2004; Morelli et al., 2004; Parolini et al., 2009; Wubbolts et al., 2003). A pesar de que estos autores sugieren que la composición lipídica de los exosomas es un reflejo de la célula que los ha liberado, otros resultados apoyan que la membrana exosomal es similar a la de la membrana plasmática de origen (Vidal et al., 1989).

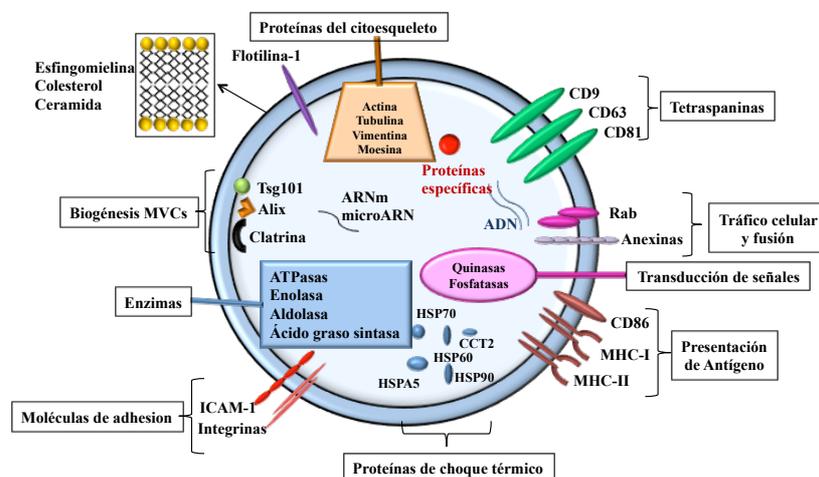


Figura 8. Composición proteica y lipídica de los exosomas indicando su nombre y localización

Estudios recientes han descrito la capacidad de transferencia horizontal de material genético llevada a cabo por los exosomas mediante el transporte de ARNm y otros ARN no codificantes como microARNs (miRNAs). En 2007, Valadi y colaboradores demostraron la transferencia de ARNm y miARNs contenidos en exosomas secretados por mastocitos, confiriéndole a las células receptoras nuevas funciones (Valadi et al., 2007). Poco después, se

confirmó la presencia de estas moléculas en los exosomas secretados por una línea de glioblastoma humano (Skog et al., 2008), seguido de múltiples estudios en los que se ha descrito el transcriptoma de exosomas liberados por diferentes tipos celulares y/o presentes en varios fluidos corporales (Bellingham et al., 2012; Gibbings et al., 2009; Mittelbrunn et al., 2011; Nazarenko et al., 2010; Palanisamy et al., 2010; Pegtel et al., 2010; Rabinowits et al., 2009, 2009). Recientemente se ha descrito la presencia de moléculas de ADN de doble cadena en el interior de los exosomas (Thakur et al., 2014). Estos datos sugieren un mecanismo de direccionamiento para el material genético, ya que los exosomas se encuentran enriquecidos en determinados ARNs dependiendo del tipo celular de origen. Además, ponen de manifiesto la importancia de la identificación de moléculas específicas contenidas en el exosoma responsables de su efecto biológico en la célula receptora.

1.12.3 Función de los exosomas

Como ya hemos mencionado, los exosomas secretados son biológicamente activos y tienen importantes funciones tanto en procesos fisiológicos normales como en patológicos.

Los exosomas tienen la capacidad de modular el sistema inmune. Varios estudios han demostrado que los exosomas pueden llevar en su superficie complejos presentadores de antígeno (MHC/péptido) (Chaput and Théry, 2011). Así, se ha descrito que los exosomas liberados por células tumorales o células infectadas con algunos patógenos contienen antígenos derivados de dichas células o patógenos capaces de activar una respuesta inmune. Además, en determinados contextos, los exosomas pueden inhibir la respuesta inmune mediante mecanismos independientes de antígeno; es el caso de los exosomas derivados de la leche materna o de la placenta (Li et al., 2006).

Los exosomas participan en otros procesos biológicos como la fertilización y el desarrollo embrionario (Entchev and González-Gaitán, 2002; Kravets et al., 2000). Además, se ha descrito que los exosomas pueden tener un papel determinante en la propagación de algunos priones responsables de enfermedades neurodegenerativas (Porto-Carreiro et al., 2005), e incluso en el desarrollo de Alzheimer (Rajendran et al., 2006). Múltiples estudios han descrito la habilidad de algunos virus para utilizar el sistema endosomal para ser secretados a través de la membrana plasmática vía exosomas, lo que representaría una forma de evasión del sistema inmune (Izquierdo-Useros et al., 2011; Novellino et al., 2012; Wurdinger et al., 2012).

1.13 Exosomas y cáncer

El desarrollo y la progresión de un tumor dependen de las interacciones entre las células cancerígenas entre sí, y con su estroma, dentro del que se incluyen células endoteliales, fibroblastos y células del sistema inmune. La relación celular no se limita a una interacción espacial, si no que existe una comunicación entre ellas mediante el intercambio de proteínas solubles específicas y factores genéticos. Se ha descrito en varios tipos de cáncer que las células

tumorales liberan exosomas en mayor cantidad que las células normales (Silva et al., 2012). Los exosomas tumorales actúan como mediadores de comunicación intercelular mediante el transporte de i) onco-proteínas, cuya transferencia puede modular rutas de señalización de la célula receptora y tener un papel decisivo en proliferación y metástasis ; ii) onco-ARNs: el ARNm liberado en la célula receptora puede ser funcional al traducirse por la maquinaria de la célula receptora (Valadi et al., 2007). Adicionalmente, múltiples estudios han descrito la transferencia de miRNAs específicos contenidos en exosomas tumorales de cáncer gástrico (Ohshima et al., 2010) o hígado (Kogure et al., 2011).

Aunque los exosomas derivados de células tumorales pueden tener habilidades anti-tumorales por activación del sistema inmune, o incluso por activación de la ruta apoptótica en células tumorales, la mayoría de los estudios sobre su funcionalidad indican que favorecen las actividades tumorogénicas. Estudios recientes han descrito que pueden incrementar la proliferación, la migración, la invasión o la angiogénesis, conferir resistencia a drogas quimioterápicas e incluso contribuir a la formación de un nicho pre-metastático (Vader et al., 2014). A pesar de estos controvertidos resultados, el papel dual descrito para los exosomas derivados de las células tumorales no deja claro si su constante producción es un beneficio o una desventaja para la célula tumoral. En pacientes con cáncer, los efectos anti o pro-tumorales desencadenados por los exosomas derivados del tumor podrían depender del estadio tumoral, así como del estado del sistema inmune (Yang and Robbins, 2011).

1.14 Exosomas y aplicaciones clínicas

El hecho de que la composición de los exosomas sea un reflejo del tipo y estado fisiológico de la célula de la que derivan, además del potencial biológico de su contenido sobre la célula receptora, los ha colocado en el punto de mira como potentes biomarcadores para el diagnóstico y/o pronóstico de varias enfermedades humanas como el cáncer (Chaput and Théry, 2011).

Múltiples estudios sobre su contenido han mostrado la presencia de marcadores tumorales específicos en el interior de los exosomas en pacientes de cáncer de próstata (Mitchell et al., 2009; Nilsson et al., 2009), vejiga (Beckham et al., 2014), ovario (Beach et al., 2014) y neuroblastoma (Marimpietri et al., 2013). Adicionalmente, determinados perfiles de microARNs contenidos en exosomas derivados del plasma de pacientes se han descrito como marcadores diagnóstico y/o pronóstico (Properzi et al., 2013). En el mismo sentido, algunos estudios han descrito la interferencia del contenido de los exosomas derivados del tumor en el efecto de algunas drogas quimioterápicas (Hannafon and Ding, 2013). Así, debido a su potencial pro-tumorogénico, algunos autores han propuesto la eliminación de los exosomas derivados del tumor del plasma de pacientes o inhibición de su liberación facilitando la respuesta inmune antitumoral y frenando la progresión del tumor (Yang and Robbins, 2011). Esta posible vía de tratamiento se ve limitada, además de por las barreras técnicas, por el hecho de que no en todos

los casos los exosomas derivados del tumor están presentes en plasma (Yang and Robbins, 2011).

Además de como biomarcadores, los exosomas también se han postulado como agentes de tratamiento en cáncer. Se han desarrollado vacunas basadas en exosomas derivados de células del sistema inmune que pueden desencadenar una respuesta antitumoral en pacientes con cánceres avanzados (Viaud et al., 2010).

1.15 Consideraciones finales/Hipótesis II

Estudios recientes ponen en evidencia la importancia biológica, en diferentes contextos, de la identificación de moléculas específicas que se encuentran en el interior de los exosomas y de su participación en la comunicación intercelular. Basándonos en los últimos datos que parecen indicar que $\Delta Np73$ tiene un papel crítico en distintas etapas del proceso tumoral, nuestras hipótesis son:

- $\Delta Np73$ es incorporado en exosomas liberados por células de cáncer de colon y adquirido por diferentes tipos celulares con efectos funcionales.
- Asociación entre los niveles de expresión de $\Delta Np73$ en los exosomas del plasma con un peor pronóstico de los pacientes.

2 OBJETIVOS

Las funciones supresoras tumorales y/u oncogénicas de las isoformas de *TP73* son tema de debate en la actualidad. Este trabajo tiene la finalidad de describir mecanismos moleculares que apoyen el papel oncogénico de las isoformas $\Delta TAp73$ en diferentes procesos relacionados con la progresión tumoral y su posible traslado al ámbito clínico. Así se plantearon los siguientes objetivos:

- **OBJETIVO I: Identificación de las etapas del proceso tumoral donde están implicadas las variantes oncogénicas de *TP73*: Proliferación y resistencia a drogas. Valor pronóstico en pacientes con cáncer de colon.**

- I. Recogida de los datos de seguimiento de una serie de 113 pacientes con cáncer colorrectal donde se evaluaron los niveles de expresión de las distintas isoformas de *TP73*.
- II. Determinar los niveles de expresión de los genes asociados a resistencia a drogas *ABCB1*, *HMGB1* y *CASP1*, descritos como regulados por las isoformas de *TP73* *in vitro*, en la serie anterior. Evaluar la correlación entre los niveles de expresión de *ABCB1*, *HMGB1* y *CASP1* y de las isoformas de *TP73*.
- III. Analizar el valor pronóstico de los niveles de expresión de las isoformas de *TP73* y de *ABCB1*, *HMGB1* y *CASP1* en estos pacientes.
- IV. Determinar el papel de la isoforma $\Delta Np73$ en proliferación y resistencia a drogas quimioterápicas convencionales *in vitro* y en animales de experimentación.
- V. Evaluar si la vía de autofagia es activada por $\Delta Np73$, y si este hecho es el responsable de la resistencia a drogas quimioterápicas de uso clínico. Confirmar estos resultados en modelos animales.
- VI. Analizar los niveles de expresión de $\Delta Np73$ y de genes clave en el proceso de autofagia en una serie de 160 pacientes diagnosticados con cáncer de colon y su valor pronóstico.

- **OBJETIVO II: Implicación de las isoformas de TP73 en procesos de comunicación intercelular.**

- I. Determinar si $\Delta Np73$ es incorporado de manera dirigida y específica en exosomas derivados de células tumorales, y transferido a células del microambiente tumoral.
- II. Evaluar la funcionalidad de $\Delta Np73$ en la célula receptora, analizando los parámetros biológicos descritos anteriormente para este gen (proliferación y resistencia a drogas). Confirmar estos resultados en modelos animales.
- III. Analizar los niveles de $\Delta Np73$ en exosomas aislados del plasma de una serie de 69 pacientes con cáncer de colon y su valor pronóstico.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Pacientes y muestras tumorales

El estudio ha sido diseñado y realizado en el Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda y aprobado por su Comité de Ética e Investigación Clínica. Se ha contado con tres series independientes de pacientes con cáncer de colon de los que se han obtenido muestras de tejido normal y tumoral, y muestras de sangre. El consentimiento informado se ha obtenido de todos los pacientes. Todos los casos de cáncer de colon fueron considerados esporádicos, ya que aquellos que pertenecían a familias con poliposis adenomatosa familiar o cáncer de colon hereditario no polipósico, según los criterios de Ámsterdam, fueron excluidos del estudio.

Tanto el tejido tumoral como el normal se obtuvieron secuencialmente, inmediatamente después de la cirugía, y se conservaron a -80°C hasta su posterior procesamiento. Todas las muestras tumorales fueron histológicamente evaluadas por patólogos para: a) establecer el diagnóstico de adenocarcinoma de colon b) confirmar que cada muestra presentaba al menos un 75% de tejido tumoral; y c) especificar el estadio patológico.

Se han utilizado tres series independientes de pacientes con cáncer de colon para cada una de las partes de este trabajo, así:

- El estudio de comparación entre tejido normal y tumoral para establecer los niveles de expresión de *ABCBI*, *HMG1* y *CASP1*, la posible correlación entre dichos genes con las distintas isoformas de *TP73* y sus asociaciones con la supervivencia libre de enfermedad y global, se realizó en 77 pacientes operados de cáncer de colon entre los años 1998 y 2003 (Serie 1). La media de seguimiento de esta serie de pacientes fue de 70 meses (rango del seguimiento de los pacientes: 3-104 meses). Durante este periodo, el 19% de los pacientes progresaron y el 27,3% falleció.
- El estudio de comparación entre tejido normal y tumoral para establecer los niveles de expresión de los genes relacionados con autofagia, la posible correlación entre dichos genes con las distintas isoformas de *TP73* y sus asociaciones con la supervivencia libre de enfermedad y global, se realizó en 175 pacientes operados de cáncer de colon entre los años 2002 y 2006 (Serie 2). La media de seguimiento de esta serie de pacientes fue de 60 meses (rango del seguimiento de los pacientes: 1-136 meses). Durante este periodo, el 23.6% de los pacientes progresaron y el 50% falleció.
- El estudio de comparación entre el tejido normal y tumoral para establecer los niveles de $\Delta Np73$, así como los niveles de dicho gen en el contenido de los exosomas circulantes en el plasma de los pacientes y su valor pronóstico, se llevó a cabo en 69 pacientes operados de cáncer de colon entre los años 2003 y 2009 (Serie 3). La media de seguimiento de esta serie de pacientes fue de 19 meses (rango del seguimiento de los pacientes: 1-72 meses). Durante este periodo, el 24% de los pacientes progresaron y el 16% falleció.

3.2 Características clínico-patológicas de los pacientes

Se revisaron las historias clínicas de cada uno de los pacientes de cáncer de colon para determinar su sexo, fecha de nacimiento y los siguientes parámetros patológicos: sexo, estadio, invasión vascular, localización tumoral, afectación ganglionar, estadio, invasión vascular, diferenciación tumoral y niveles de CEA. Los datos para las tres series se presentan en la Tabla I.

El estadio fue calculado según la clasificación TNM que valora el tamaño tumoral, la afectación ganglionar y la existencia de metástasis. La afectación ganglionar se evaluó por microscopía óptica. No se utilizó ninguna otra técnica de biología molecular.

El seguimiento clínico de los pacientes, después de la cirugía, que incluía perfil bioquímico (con niveles de CEA) y estudio radiológico, se realizó cada tres meses durante el primer año, seis meses durante el segundo año y después anualmente, excepto en caso de recaída donde el seguimiento se ajustó a las necesidades del paciente. Se consideró supervivencia libre de enfermedad (SLE) al periodo de tiempo que abarca desde el momento de la cirugía hasta el día de diagnóstico de una recaída, por lo que su evaluación no incluye a pacientes en estadio IV; y supervivencia global (SG) al periodo que comprende desde el día de la cirugía hasta la fecha de la última revisión o fallecimiento del paciente

Características Clínico-patológicas	SERIE 1		SERIE 2		SERIE 3	
	Número	%	Número	%	Número	%
Sexo						
Hombre	42	54.5	109	63.5	40	58
Mujer	35	45.5	64	36.5	29	42
Estadio						
I	8	10.4	12	6.8	5	7.2
II	44	57.1	89	50.2	30	43.4
III	21	22.2	64	36.5	27	39.9
IV	4	5.9	10	6.6	7	9.5
Invasión Vascular						
No	46	54.1	128	73.1	45	65.8
Sí	29	34.1	46	26.0	24	34.2
Localización						
Recto	29	24.7	30	17.2	29	42.0
Izquierda	47	42.8	81	46.3	18	26.0
Derecha	37	32.5	17	9.7	22	32.0
Afect. ganglionar						
No	52	67.5	101	56.1	38	55.1
Sí	25	32.5	73	40.6	31	44.9
Diferenciación						
Bien	46	59.7	74	41.1	9	13.3
Moderado	26	33.7	93	51.7	48	69.5
Poco	5	6.6	7	3.9	12	17.2
CEA						
≤ 3mg/ml	-	-	-	-	21.1	30.6
≥3mg/ml	-	-	-	-	47.9	69.4

Tabla I. Características clínico-patológicas de los pacientes con cáncer de colon.

3.3 Cultivos celulares

Todos los tipos celulares se mantuvieron a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂. De forma rutinaria se analizó mediante PCR el medio de cultivo para descartar contaminación por *Mycoplasma* utilizando el sistema *Mycoplasma Plus TM Primer Ser* (Stratagen).

En la tabla I se indican las líneas celulares utilizadas:

Línea celular	Proveedor	Tipo celular	Especie	Medio de cultivo
HCT116	ATCC	Epiteliales cáncer de colon	Humano	DMEM-C
SW480-ADH	Prof. Alberto Muñoz	Fenotipo adhesivo de cáncer de colon	Humano	DMEM-C
Fibroblastos BJ-hTER	ATCC	Fibroblastos de prepucio	Humano	DMEM-C
Pericitos (HBVP)	ScienCell	Pericitos de vasculature de cerebro	Humano	PM-C
HUVEC	Lonza	Células endoteliales embrionarias	Humano	EGM-2

ATCC: *American Type Cell Culture Collection*. DMEM-C: DMEM-Completo, medio DMEM (Lonza) suplementado con 10% (vol/vol) de FCS (suero fetal bovino), 2 mM L-glutamina (Invitrogen, Paisley, UK), penicillina (100 units/ml), estreptomiciina (100 ng/mL) y fungizona (0.25 µg/mL). PM-C: PM-Completo suplementado con 2% (vol/vol) de FCS y factores de crecimiento específicos (ScienCell). EGM-2: medio EBM-2 suplementado con 2% (vol/vol) de FCS y factores de crecimiento específicos (Lonza).

Tabla II. Líneas celulares

3.4 Anticuerpos

Los anticuerpos primarios empleados para la detección de proteínas durante este trabajo se especifican en la tabla II. Se utilizaron las concentraciones sugeridas por el fabricante.

Antígeno	Clon	Especie	Conjugación	Proveedor
β Actina	Monoclonal	Ratón	-	Abcam
β Actina	Policlonal	Conejo	-	Abcam
Caspasa-3	Policlonal	Conejo	-	Cell Signalling
LC3I-II	Policlonal	Conejo	-	Cell Signalling
Ki67	Policlonal	Conejo	-	DAKO
CD63	TS63	Ratón	-	Abcam
CD9	EPR2949	Ratón	-	Abcam
Ber-EP4	Ber-EP4	Ratón	FITC	DAKO
E-Cadherina	36/E-Cadherin	Ratón	-	BD Biosciences
IgG ratón	Policlonal	Conejo	FITC	Abcam
IgG ratón	Policlonal	Conejo	Alexa Fluor 456	Invitrogen
IgG conejo	Policlonal	Burro	IRDye800	Rockland Immunoc.
IgG conejo	Policlonal	Burro	IRDye700	Rockland Immunoc.
IgG ratón	Policlonal	Conejo	IRDye800	Rockland Immunoc.
IgG ratón	Policlonal	Conejo	IRDye700	Rockland Immunoc.

Tabla III. Anticuerpos monoclonales y policlonales. FITC: isotiocianato de fluoresceína

3.5 Extracción de ARN de tejidos, líneas celulares y exosomas

La extracción de ARN total de tejidos y líneas celulares se llevó a cabo utilizando los kits de extracción *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN) y *TRIzol* (Bioline) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para mejorar la calidad de la extracción de ARN en exosomas se utilizó *mirVanaTM miRNA Isolation Kit* (Ambion). En el caso de los tejidos, el primer paso del protocolo fue modificado de la siguiente manera: 30 mg de cada muestra fueron homogenizados y disgregados mecánicamente siguiendo las instrucciones del equipo *MAGNA Lyser* (Roche Diagnostics) en presencia de 600µl del primer solución de lisis y de 6 µl de *β-mercaptoetanol*. Los pasos siguientes se mantuvieron según protocolo. En algunos casos se incorporó al final del protocolo el tratamiento con *DNase I* (Ambion).

La concentración de ARN total extraído se calculó a partir del valor de absorbancia obtenido en un espectrofotómetro *NanoDrop ND-1000* (NanoDrop, Wilmington, DE). La pureza de las muestras se valoró mediante el ratio de las absorbancias 260/280 nm, que en todas las muestras oscilaba entre 1.6 y 2, óptimo para muestras diluidas en agua. Cada muestra fue diluida a una concentración de 100 ng/µl para continuar con el análisis por qRT-PCR.

3.6 Transcripción reversa(RT) y cuantificación a tiempo real (qRT-PCR)

3.6.1 Transcripción reversa (RT)

La síntesis de ADN copia (ADNc) se llevó a cabo partiendo de 400µg u 800µg de ARN total de tejido o líneas celulares y exosomas, respectivamente, utilizando hexámeros aleatorios. Para todas las reacciones de retro-transcripción se utilizó el kit *Transcription First-Strand cDNA Synthesis kit* (Roche Diagnostics) según las instrucciones del fabricante.

3.6.2 Cuantificación a tiempo real (qRT-PCR)

El análisis del ARNm se realizó mediante qRT-PCR, basada en la incorporación de un fluoróforo en las nuevas cadenas de ADN sintetizadas en cada ciclo de amplificación. La cantidad de fluorescencia obtenida en cada uno de los ciclos es equivalente a la cantidad de ADN del gen analizado en la muestra de partida. Para el marcaje se utilizó un agente intercalante de ADN de doble hebra (*SYBER Green I*) cuya unión a la molécula amplifica 100 veces su fluorescencia

Las diferencias de expresión de los genes analizados entre las muestras problema y sus respectivos controles se calculó según el *Ratio Relativo Normalizado* $= E_T^{CpT(C)-CpT(S)} \times E_R^{CpR(S)-CpR(C)}$; donde Cp = número de ciclo, E =eficiencia, T= gen diana, R=gen de referencia, C= control, S=muestra. Para los exosomas, los niveles de ARNm fueron normalizados con la concentración de ADNc (ng/µl). En los pacientes, la expresión de los niveles del gen de estudio se calculó para cada individuo como un ratio entre los valores obtenidos en el tejido tumoral con

respecto a los valores del mismo en el tejido normal. En los experimentos en animales y ensayos *in vitro* el ratio se define como los niveles de expresión del gen de estudio en el ratón o línea celular modificado y/o tratado con respecto a los valores del mismo en el control correspondiente.

Para la cuantificación relativa de los genes problema se utilizó la media geométrica de tres genes de referencia, *SDHA* (subunidad A del complejo succinato deshidrogenasa), *UBC* (Ubiquitina C) y *TBP* (proteína de unión a TATA). Las parejas de oligonucleótidos para los genes de referencia y las diferentes isoformas de *TP73* han sido descritos previamente por nuestro grupo (Domínguez et al., 2006b). Las parejas de oligonucleótidos diseñados para la amplificación de otros genes de estudio en este trabajo se especifican en la Tabla III. Todos las parejas de oligonucleótidos se diseñaron hibridando en exones distintos para evitar amplificaciones de ADN genómico. La especificidad de cada pareja de oligonucleótidos se confirmó por la curva de disociación (*curva de melting*) de los productos amplificados por PCR.

Todas las reacciones de PCR de este trabajo se llevaron a cabo en un *Light Cycler* (Roche Diagnostics) utilizando el kit *Light Cycler FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I* (Roche Diagnostics). El volumen final de cada reacción fue de 20 µl en los que se incluía 2 ó 4 µl de los productos de RT, 0.5 µM de cada uno de los oligonucleótidos directo y reverso, una concentración variable de dimetil sulfoxido así como un 1x de la reacción mezcla que contenía la polimerasa FastStart DNA, buffer de reacción, dNTPs, MgCl₂ y SYBR Green I.

Gen	Oligonucleótidos	Secuencia (5'-3')
<i>ABCBI</i>	Directo	CTATGCATCTTATGCTCTGGCC
	Reverso	CCTGTCCAACACTAAAAGCCC
<i>HMGB-1</i>	Directo	TGCCATATCTTCAAATTTTCCTTTC
	Reverso	ACCCAGATGCTTCAGTCAACTTC
<i>CASP1</i>	Directo	AGTTACCTGGCAGGGACGCT
	Reverso	TGGAAAGGAAGAAAGTACTCCTTGA
<i>ULK1</i>	Directo	CATCATGTTGCTCTGGAGGT
	Reverso	ACCTGAAACCGCAGAACATC
<i>ULK2</i>	Directo	ATGTACCATCGGGGATCCACA
	Reverso	CAAGTGTCAGTCCTATTCGC
<i>ATG4D</i>	Directo	GAGACTCTCAACCCCGTGTA
	Reverso	AGTACAGTGAGTGTCGCGGT
<i>ATG4C</i>	Directo	ACAGTGTGGGAAGTCCATGA
	Reverso	CACATTGAGAACTGGCCAGA
<i>BECN1</i>	Directo	AGGGAGGCAATGGCATGTGTT
	Reverso	TATTGCTTCTGGCTGCCTAG

Tabla IV. Secuencias de oligonucleótidos utilizados en qRT-PCR

3.7 Vectores de expresión

3.7.1 *Trasfección transitoria*

La construcción sobre el vector *pcDNA3.1* para expresar ectópicamente la isoforma $\Delta Np73\beta$ fue cedida por la Dra. Carmen Marín Vieira (Instituto de biomedicina IBIOMED, Universidad de León, España). Para suprimir la expresión de $\Delta Np73\beta$ se utilizó un ARN de interferencia (siARN) descrito previamente (Papoutsaki et al., 2004). Tras llevar las células a una confluencia de 50-80%, éstas se transfectaron con el gen problema y el correspondiente vector vacío (*pcDNA3.1*), o el siARN para $\Delta Np73\beta$ por triplicado, con el reactivo *Lipofectamine 2000* (Invitrogen Corp) según las instrucciones del fabricante. 24, 48, 72 o 96 horas post-transfección se realizaron los análisis adecuados.

3.7.2 *Trasfección estable*

La construcción sobre el vector *pEGFP-1* para expresar ectópicamente la isoforma $\Delta Np73\beta$ fue cedida por la Dra. Carmen Marín Vieira (Instituto de biomedicina IBIOMED, Universidad de León, España). Las células HCT116 se transfectaron con 60 μ g de ADN *pEGFP-1* $\Delta Np73\beta$ ó *pEGFP-1* (vector vacío) tras alcanzar un 50% de confluencia en placas p100. Después de 7 días de post-transfección las células que expresaban *pEGFP-1*, y por tanto habían incorporado $\Delta Np73\beta$ en su genoma, fueron seleccionadas por citometría de flujo (*cell sorting*) (FACS-Aria II SORTER BD Biosciences) y expandidas en *DMEM* suplementado con 20% de FBS.

3.8 Aislamiento, cuantificación e identificación de exosomas

Se transfectaron transitoriamente 6×10^6 células HCT116 con $\Delta Np73\beta$ o el vector vacío (*pcDNA3.1*) y se mantuvieron en medio *DMEM* suplementado con 10% de FBS sin exosomas. La eliminación de los exosomas del suero se realizó mediante la filtración del FBS por filtros de *PVDF* de 0.22 μ m (Millipore) y ultracentrifugación (Optima™ MAX-XP) a 120,000g durante 70 minutos. 72 horas post-transfección, los sobrenadantes fueron recogidos (40 mL de 24×10^6 células) y centrifugados a 500g durante 10 minutos para eliminar restos celulares. El sobrenadante se centrifugó de nuevo a 17000g durante 20 minutos y filtrado a través de filtros de *PVDF* de 0.22 μ m. Los exosomas sedimentaban por ultracentrifugación a 120000g durante 70 minutos. Los exosomas se resuspendieron en 400 μ l de tampón fosfato salino (PBS) o *DMEM* suplementado con un 1% de FBS sin exosomas. La sangre periférica obtenida de pacientes y ratones se centrifugó a 500g durante 10 min a 4°C y los exosomas circulantes se aislaron del plasma según el protocolo descrito anteriormente.

Para la cuantificación de exosomas se utilizó: a) la medida de la actividad de la acetilcolinesterasa (Savina et al., 2002); b) la concentración de proteína total exosomal; y c) la

proteína específica de exosomas Ber-EP4 (Silva et al., 2012). Para la cuantificación de exosomas por citometría de flujo, las muestras se incubaron con un anticuerpo monoclonal de ratón Ber-EP4 (DAKO) conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Un anticuerpo de ratón IgG1-FITC irrelevante (Abcam) fue utilizado como control negativo del marcaje.

Para la identificación por microscopia confocal (Leica TCS SP5 Confocal Microscopy System), los exosomas se marcaron con el anticuerpo para CD63 y Ber-EP4. Las imágenes se capturaron con un escáner a una velocidad de 400 Hz y una resolución de 1,024 píxeles, finalmente se analizaron con el software Leica Application Suite 2.02.

3.9 Experimentos con incubación de exosomas

Las células HCT116, SW480-ADH, Fibroblastos BJ-hTER, HBVP y HUVEC se sembraron en cuadruplicados en placas p24 y tras 24 horas, se incubaron con 5 μ g de exosomas $\Delta Np73$ o exosomas control derivados de las transfecciones transitorias de las células HCT116. En los experimentos con exosomas procedentes de pacientes, las células HCT116 se incubaron con 5 μ g de exosomas procedentes de: un pool de 5 donantes sanos, 10 pacientes de cáncer de colon que mostraban niveles de expresión bajos de $\Delta Np73$ y 10 que presentaban una alta expresión en el tejido. El ARNm de las células receptoras fue extraído 72 horas después de la incubación, y los niveles de $\Delta Np73$ se evaluaron por RT-PCR.

3.10 Marcaje de exosomas

Los exosomas purificados de las células HCT116 transfectadas con $\Delta Np73\beta$ o el vector vacío se marcaron con PKH67 (Sigma) según las instrucciones del fabricante. Tras sembrar 50.000 células HCT116 por cuadruplicado en portaobjetos para cultivo celular (Thermo Scientific) se incubaron con exosomas $\Delta Np73\beta$ o exosomas control marcados con PKH67 durante 24 horas. Tras su fijación con paraformaldehído al 4% y varios lavados con PBS se incubaron con el anticuerpo E-Cadherina (BD Biosciences) 1/20 toda la noche a 4°C. Posteriormente, se realizaron lavados con PBS y se incubaron con el anticuerpo anti-ratón Alexa Fluor 546 (Invitrogen) durante 45 minutos a temperatura ambiente. El marcaje del núcleo se realizó con Tropo-3 (Invitrogen) durante 15 min. Las secciones se montaron con PBS-glicerol (1:1).

3.11 Tratamientos

Para los diferentes ensayos funcionales las células correspondientes se trataron con:

3.11.1 Oxaliplatino

100µM de oxaliplatino o el volumen correspondiente del vehículo (PBS) durante 16 ó 36 horas, según las necesidades del ensayo posterior.

3.11.2 Cloroquina

25µM de cloroquina difosfato (Sigma) o el volumen correspondiente del vehículo (PBS) durante 12 y 36 horas, según las necesidades del ensayo posterior.

3.11.3 Tratamientos combinados

25µM de cloroquina difosfato (Sigma) y 100µM de oxaliplatino durante 36 horas para su evaluación posterior.

3.12 Inmunodetección de proteínas

3.12.1 Inmunotransferencia (*Western Blot*)

Las células se lisaron con solución *RIPA* (Sigma), al que se le añade un cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasa (Thermo scientific). El lisado resultante se centrifugó a 15000 rpm durante 15 minutos para eliminar los componentes no proteicos que quedan sedimentados y se recuperó el sobrenadante que será usado para la detección de proteínas por inmunotransferencia. Para la cuantificación de proteínas se utilizó el ensayo de proteínas de Bio-Rad *Protein Assay* (Bio-Rad). Entre 30 y 60 µg de proteína total se desnaturalizaron en buffer 2XSDS a 95°C y se analizaron en geles de *SDS*-poliacrilamida con diferentes porcentajes según el tamaño de cada proteína. A continuación, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa con un diámetro de poro de 0.45µm (BioRad) mediante el sistema *iBlot Western Blotting System* y los reactivos *iBlot Gel Transfer Stacks Nitrocellulose* (Invitrogen Life Technologies). La membranas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con *Odissey Blocking Buffer* (Li-COR Bioscience) y se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes durante toda la noche a 4°C o 3 horas a temperatura ambiente. Tras varios lavados con *PBS 0.01% Tween20* y con *PBS*, la membrana se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpos anti-IgG de ratón y anti-IgG de conejo conjugados con *IRDye 800* o *IRDye700* (Rockland Immunochemicals) diluidos en solución de bloqueo 1/15000. Tras eliminar los restos de anticuerpo secundario con varios lavados con *PBS 0.01% Tween20* y

PBS, las bandas se visualizaron y cuantificaron por densitometria mediante el equipo *Odyssey Infrared Imaging System* (Li-COR Biosciences).

3.12.2 *Inmunohistoquímica Ki67*

Se realizaron secciones de 2 a 4 μm de grosor del tejido de estudio (embebido previamente en parafina) para ser procesadas según protocolos estándar antes de ser incubadas con el anticuerpo primario de interés durante toda la noche. La inmuno-detección se realizó con la técnica *Streptavidina Biotina Peroxidasa* (LSA; DAKO) usando cromógeno diaminobenzidina como sustrato. Todas la inmunotinciones se realizaron usando el dispositivo de inmunotinción automático *TechMate 500* (DAKO).

Para el análisis de Ki67 se utilizó el anticuerpo policlonal anti-Ki67 (DAKO) utilizado habitualmente en la clínica. La cuantificación de la expresión de Ki67 se llevo a cabo por dos observadores independientes mediante el contaje de células positivas a través de un microscopio óptico. El porcentaje de marcaje nuclear para ki67 se determinó por cada 1000 células, contadas en 5 campos de 200 células cada uno. Los casos que no exhibían tinción nuclear fueron considerados negativos.

3.12.3 *Inmunocitoquímica LC3I-II*

Se sembraron 100000 células de las líneas *HCT116-pEGFP-1- $\Delta\text{Np73}\beta$* o *HCT116-pEGFP-1* en portaobjetos adaptados para el cultivo celular (*Chambers* Thermo Scientific) La inmuno-detección se realizó según el protocolo convencional. Las células se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% para ser posteriormente permeabilizadas con una solución de Triton X-100 al 0,025%. A continuación, se bloquearon con BSA al 3% durante 30 minutos a 37°C y se incubaron con LC3I-II (Cell Signalling) 1/100 en una cámara húmeda a 37°C durante 3 horas. Tras eliminar los restos de anticuerpo con PBS, las muestras se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpos anti-IgG de conejo conjugados con Alexa Fluor 546 (Invitrogen). Después de los correspondientes lavados, las células se incubaron con una dilución Topro (Invitrogen) durante 10 minutos y se prodeció al motaje con PBS-glicerol (1:1).

3.13 Ensayos funcionales

3.13.1 Ensayo MTT

Para los ensayos de proliferación se sembraron 20000 células HCT116 en placas de p96 y se transfectaron transitoriamente con $\Delta Np73\beta$. Para las líneas estables, *HCT116-pEGFP-1- $\Delta Np73\beta$* o *HCT116-pEGFP-1*, se sembraron el mismo número de células en las mismas placas. Tras 24, 48 o 72 horas se añadió el reactivo MTT y se obtuvo la medida de absorbancia en un lector de microplacas a 570nm (Multiskan Ex; Thermo Scientific).

Para los ensayos con exosomas, se sembraron 20000 células HCT116 y 30000 fibroblastos BJ-hTER en cuadruplicado en placas p96 y se incubaron con 100 μ l de exosomas $\Delta Np73\beta$ o exosomas control durante 0, 24 y 48 horas. Para el ensayo de resistencia a drogas, 24 horas después de la transfección con $\Delta Np73\beta$ o 48h tras la incubación con los exosomas las células HCT116 se trataron con oxaliplatino durante 36 horas. Después de 48 y 72 horas de incubación (HCT116 y fibroblastos BJ-hTER, respectivamente) o tras el tratamiento con oxaliplatino, cloroquina o el tratamiento combinado, el reactivo MTT fue añadido y se reveló como se indica arriba.

3.13.2 Ensayo de impedancia

Se sembraron 20000 células HCT116 en cuadruplicado una placa de 96 y se situó en el lector de placas en el interior del incubador donde se cuantificaba los datos de impedancia cada 10 minutos durante 96 horas como representación del índice celular (Abassi et al., 2009). Las células se transfectaron 15 horas después de la siembra, y los cambios de impedancia empezaron a detectarse 12 horas post-transfección.

3.13.3 Ensayo TUNEL

Las células HCT116 se transfectaron con $\Delta Np73$ y se trataron con oxaliplatino según el protocolo descrito anteriormente. Después del tratamiento, 20000 células se añadieron a portaobjetos tratados con poly-L-lisine (Sigma) para ser fijadas con paraformaldehído al 4% y permeabilizadas con Triton X-100 al 0.2%. Se evaluaron los niveles de apoptosis de cada muestra según la fragmentación del ADN a través del kit DeadEndTMColorimetric TUNEL System (Promega).

3.13.4 Citometría de flujo

Las células HCT116 se transfectaron con $\Delta Np73\beta$ y se trataron con oxaliplatino según el protocolo descrito anteriormente. Tanto las células en suspensión como las adheridas se

tripsinizaron y recogieron para evaluar su viabilidad mediante la cuantificación de células marcadas para el anticuerpo de anexina con el *Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit* (BD Pharmingen). Los datos fueron adquiridos en *FACS-Aria II SORTER BD Biosciences*. El programa *FACSDiva Software (BDB)* fue utilizado para el análisis de los datos. Para los experimentos con exosomas, previamente al tratamiento con oxaliplatino, las células HCT116 fueron incubadas con 100 μ l de exosomas $\Delta Np73\beta$ o exosomas control durante 0, 24 y 48 horas. Los datos fueron adquiridos y examinados con el equipo y software mencionados. El programa *Infinicyt* (Cytognos SL, Salamanca, Spain) fue utilizado para el análisis de los datos. Los experimentos se realizaron en cuadruplicado y los resultados se presentan como el porcentaje de células positivas y negativas para ambos marcadores.

3.13.5 Ensayo angiogenesis

Las células HUVEC fueron sembradas en cuadruplicados en una placa p96 y preincubadas con 100 μ l de exosomas derivadas de células transfectadas con $\Delta Np73\beta$ o exosomas derivadas de células control. Después de 24 horas, las células fueron tripsinizadas y sembradas en una matriz de matrigel (10.6 mg/mL, Matrigel™ Basement Membrane Matrix, BD Biosciences) con una nueva adición de exosomas en una placa de 96. La matriz se formó previamente a 37°C y 5% CO₂ durante 1 hora. Después de 16 horas de incubación, las estructuras tubulares fueron analizadas y fotografiadas con la ayuda de un microscopio invertido y una cámara digital. Las estructuras vasculares fueron cuantificadas según el número de nudos y vasos, y la longitud de cada uno de ellos.

3.14 Animales de experimentación y xenotransplantes tumorales

Todos los experimentos con animales llevados a cabo en este trabajo se diseñaron de acuerdo con las normas de experimentación y bienestar animal del Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda.

Para los experimentos de proliferación y resistencia a drogas, se inyectaron subcutáneamente 1×10^6 células *HCT116-pEGFP-1- $\Delta Np73\beta$* o *HCT116-pEGFP-1* resuspendidas en 20% de matrigel (10.6 mg/mL, Matrigel™ Basement Membrane Matrix, BD Biosciences) en el flanco de X ratones atímicos (ratones Hsd:Athymic Nude-Foxn1nu, hembras, edad de 6 semanas, Harlan Laboratories). Los ratones fueron distribuidos en 7 grupos (5 por grupo): con tumores generados por la línea *HCT116-pEGFP-1- $\Delta Np73\beta$* y los generados por la línea control *HCT116-pEGFP-1*. El volumen tumoral se determinó mediante los valores de diámetro obtenidos con un calibre y aplicados a la siguiente fórmula: ancho² x largo x 0.52. Dos grupos, uno por cada tipo de xenotransplante, se mantuvieron para evaluar la progresión del tamaño tumoral. En el resto de grupos, una vez que el volumen tumoral alcanzaba un tamaño entre 400

– 600 mm³, se administraron las siguientes pautas de tratamiento: (i) oxaliplatino (3mg/kg), (ii) cloroquina (20mg/kg), (iii) vehículo y oxaliplatino (3mg/kg) y (iv) cloroquina (20mg/kg) y oxaliplatino (3mg/kg). Desde el comienzo del tratamiento, las drogas se administraron vía intraperitoneal durante 5 días, seguido de un periodo de descanso de 5 días, pauta que se repitió durante dos ciclos (Ta et al., 2009).

Para los experimentos con exosomas, 20 ratones fueron distribuidos en 4 grupos (5 ratones por grupo): un grupo de ratones con un tumor subcutáneo generado por la línea HCT116-pEGFP-1 en uno de sus flancos, otro grupo de ratones con un tumor subcutáneo generado por la línea HCT116-pEGFP-1- $\Delta Np73\beta$ en uno de sus flancos y un tumor HCT116-pEGFP-1 contralateral, y dos grupos de ratones con tumores HCT116-pEGFP-1 y tratados con exosomas derivados de células transfectadas con $\Delta Np73\beta$ y exosomas derivados de células control. Para la inoculación de exosomas, un día después de la inoculación celular, 200 μ l de exosomas derivados de células con sobre-expresión de $\Delta Np73\beta$ o exosomas control resuspendidos en PBS (20 μ g de proteína total) inyectaron por la vena de la cola 3 veces por semana durante 3 semanas.

Al término de los experimentos o cuando los tumores alcanzaban un tamaño de 2000mm³, los ratones se anestesiaron vía inhalatoria con isoflurano y se obtuvo una muestra de sangre periférica por punción intracardiaca en el ventrículo izquierdo. Posteriormente, los ratones se sacrificaron y sus tumores se diseccionaron y procesaron para los análisis correspondientes.

3.15 Análisis estadístico

Para las series de pacientes, se comprobó a través del test de *Kolmogorov-Smirnov* que los datos que representan la expresión génica y el ratio entre tejido tumoral y normal (T/N) no seguían una distribución normal.. Por ello, fueron normalizados mediante la aplicación del \log_{10} , y su análisis se realizó mediante el test de *Spearman*. Los niveles de CEA se contrastaron con los niveles de $\Delta Np73$ en exosomas en plasma y con la expresión de $\Delta Np73$ en los tumores por los test de *Kruskal-Wallis* y la *Chi-cuadrado de Pearson*. En los análisis de supervivencia, la relación entre la probabilidad acumulativa de la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad así como los predictores analizados, se calculó por el método de *Kaplan-Meier*, y las diferencias significativas entre curvas se evaluaron con el test *long-rank* de Mantel. El análisis multivariante para identificar los factores pronósticos independientes, se llevó a cabo con el modelo de Cox. El riesgo relativo para todos los factores se calculó con intervalos de confianza (IC) del 95%. Las posibles relaciones entre los distintos parámetros clínico-patológicos y la expresión de los distintos genes analizados se contrastaron con el test de ANOVA.

Los ensayos realizados con cultivos celulares y ratones se han representado como la media \pm desviación típica de al menos tres experimentos independientes. Para valorar la igualdad de varianzas se utilizó el test de Levene. Para el análisis estadístico de los resultados se ha utilizado el test de Student.

En todos los análisis estadísticos se han considerado significativos (p) los valores inferiores a 0,05 en contrastes de dos colas; todos ellos se han llevado a cabo con el programa SPSS versión 14.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

4 RESULTADOS

4.1 Implicación de las isoformas de TP73 en procesos oncogénicos en cáncer de colon.

Valor pronóstico de su expresión aberrante.

4.1.1 Los niveles de expresión de las isoformas $\Delta TAp73$ se asocian con estadio tumoral

El estadio tumoral es el parámetro clínico-patológico que de manera más ajustada predice el pronóstico de los pacientes con cáncer de colon. En resultados previos del laboratorio se encontró una asociación entre el estadio tumoral y los niveles de expresión de las isoformas oncogénicas $\Delta Ex2/3p73$ y $\Delta Np73$ en una serie de 113 pacientes diagnosticados con cáncer de colon (Domínguez et al., 2006b). De esta serie pudimos obtener datos de seguimiento a los 5 años de 77 pacientes. En este grupo se confirmó la asociación entre los niveles de expresión de $\Delta Ex2/3p73$ y el estadio tumoral, siendo significativamente mayor para el estadio IV ($P=0.04$), con medias geométricas de 0.24 para estadio I, 0.25 para estadio II, 0.16 para estadio III y 7 para estadio IV. Se obtuvo el mismo resultado para la isoforma $\Delta Np73$, incrementándose sus niveles de expresión en paralelo con el estadio tumoral ($P=0.03$), con medias geométricas de 0.009, 0.27, 0.36 y 5.33 en estadios I, II, III y IV, respectivamente.

4.1.2 Los niveles de expresión de las isoformas $\Delta TAp73$ se asocian con el pronóstico de los pacientes

El periodo de seguimiento de la serie de 77 pacientes engloba el intervalo desde la cirugía hasta la última visita médica o el fallecimiento del paciente. El seguimiento medio de la serie ha sido de 70 meses (rango de seguimiento de entre 3 y 140 meses). Durante este periodo, se registraron 19 recaídas (24.3%) y 21 fallecimientos (27%). La descripción del número de recaídas y de fallecimientos en las diferentes categorías para cada variable se detalla en la Tabla IV.

Supervivencia libre de enfermedad (SLE)

Para determinar la influencia del estadio y de los niveles de expresión de las isoformas de TP73 sobre la SLE, se realizaron los análisis de *Kaplan-Meier* y *Cox* univariante. Como esperábamos, el estadio tumoral se correlacionó en las dos aproximaciones con la SLE ($P=0.002$ y $P=0.02$ para los análisis de *Kaplan-Meier* y univariante, respectivamente). Los pacientes con estadio tumoral III presentaban una tasa de SLE a los 5 años del 59,6% (95% IC, 36.3-82.9), 76,4% (95% IC, 57.6-95.) con estadio tumoral II y un 100% con estadio tumoral I. En el análisis multivariante el estadio tumoral se mantiene como una variable independiente de predicción de la SLE ($P=0.015$). Entre los niveles de expresión de las isoformas de TP73 y la SLE no se encontraron asociaciones estadísticas.

Variable	Categoría	Recurrencias (n = 19/77)	%	Exitus (n = 21/77)	%
Estadio	I	0/9	0	1/9	11
	II	7/42	16,6	5/42	12
	III	9/20	45	9/20	45
	IV	3/6	50	6/6	100
Invasión Vascular	No	7/48	14,6	7/48	14,6
	Sí	12/29	41,4	14/29	48,3
Diferenciación del tumor	Bien	8/50	16	11/50	22
	Moderado	10/22	45	9/22	41
	Poco	1/5	20	1/5	20
Afectación ganglionar	No	8/53	15	7/53	13
	Sí	11/24	46	14/24	58
Expresión $\Delta Ex2p73$ (bicentiles)	Bajo	10/38	26	9/38	24
	Alto	9/39	23	12/39	31
Expresión $\Delta Ex2/3p73$ (bicentiles)	Bajo	11/38	29	8/38	21
	Alto	8/39	21	13/39	33
Expresión $\Delta Np73$ (bicentiles)	Bajo	11/38	29	8/38	21
	Alto	8/39	21	13/39	33
Expresión $TAp73$ (bicentiles)	Bajo	11/38	29	12/38	32
	Alto	8/39	21	9/39	23
Expresión $ABCBI$ (bicentiles)	Bajo	11/51	22	9/51	18
	Alto	8/26	31	12/26	46
Expresión $HMGB1$ (bicentiles)	Bajo	3/26	11	4/26	15
	Alto	16/51	31	17/51	33
Expresión $CASP1$ (bicentiles)	Bajo	10/38	26	12/38	32
	Alto	9/39	23	9/39	23

Tabla V. Numero de recaídas y muertes en las diferentes categorías para cada variable.

Supervivencia global (SG)

La SG a los 5 años de seguimiento fue del 57% (95% IC, 43.5-70.5%). Los análisis de Kaplan-Meier y Cox univariante mostraban una correlación entre el estadio tumoral y la SG, siendo del 20% (95% IC, 0-55.1%), para los pacientes con estadio IV, 32.4% (95% IC, 57.6-95.2%) con estadio tumoral III, 76.7% (95% IC, 57.6-95.2%) con estadio tumoral II y un 87.7% con estadio tumoral I. Mediante los mismos análisis estadísticos se encontró una asociación entre la SG y los niveles de expresión de $\Delta Ex2/3p73$ agrupados en bicentiles ($P=0.038$) (Figura 9.A). Los pacientes con baja expresión de $\Delta Ex2/3p73$ presentaban una tasa de SG a los 5 años del 66.8% (95% IC, 47.2-86.4), mientras que para aquéllos que presentaban niveles altos era del 48.2% (95% IC, 31.1-65.3). Además, se observó una tendencia para la expresión de $\Delta Np73$

($P=0.06$), siendo la tasa de SG a los 5 años del 72.4% (95% IC, 56.9-87) y del 39.6% (95% IC, 17.3-61.9) para los pacientes con baja y alta expresión, respectivamente (Figura 9.B).

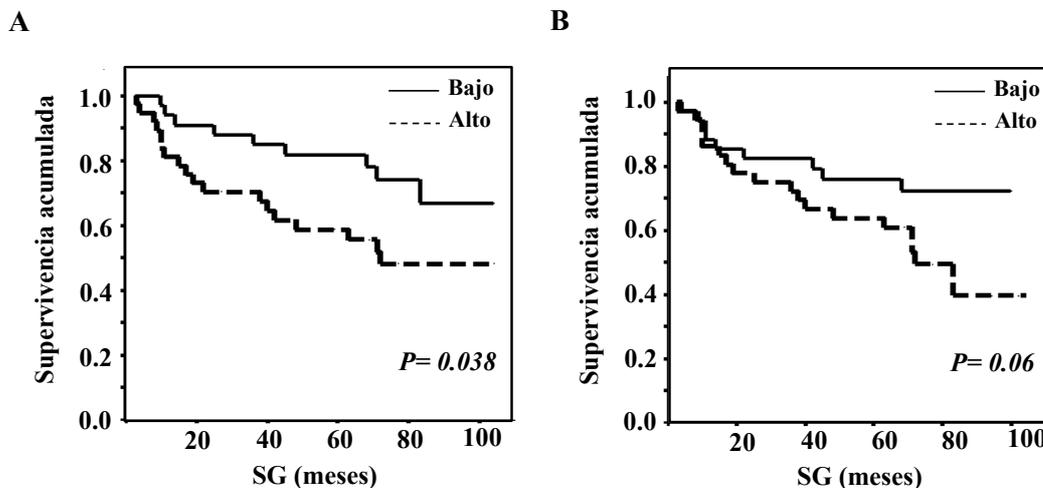


Figura 9. Niveles altos de expresión de las isoformas $\Delta Ex2/3p73$ (A) y $\Delta Np73$ (B) disminuyen la supervivencia global de los pacientes con CCR. Curvas de *Kaplan-Meier* y valores de *P*. Los niveles de expresión se distribuyeron en niveles bajos y altos según la mediana.

4.1.3 La sobre-expresión de $\Delta Np73$ modifica los niveles de ARNm de los genes *ABCBI*, *CASPI* y *HMGB1* *in vitro*

Con el fin de corroborar los resultados obtenidos por otros grupos *in vitro*, se evaluó si la sobreexpresión de $\Delta Np73$ se asociaba a un aumento en la expresión de los genes *ABCBI*, *CASPI* y *HMGB1*. El incremento de expresión de $\Delta Np73$ se asoció a un incremento significativo mayor de 2 veces de los niveles de ARNm de los genes *ABCBI* y *HMGB1*. No se detectaron modificaciones en los niveles de *CASPI*.

4.1.4 Los niveles de expresión de las isoformas $\Delta TAp73$ se correlacionan con la expresión de genes relacionados con resistencia a drogas

Se encontraron correlaciones directas estadísticamente significativas entre los niveles de expresión de $\Delta Ex2p73$, $\Delta Ex2/3p73$ y $\Delta Np73$ y la expresión de *HMGB1*. En el mismo sentido, se observó una tendencia entre los niveles de expresión de las mismas isoformas de *TP73* y *ABCB1*. No se encontraron correlaciones para *CASP1* (Tabla V).

	$\Delta Ex2p73$	$\Delta Ex2/3p73$	$\Delta Np73$	<i>TAp73</i>
<i>HMGB1</i>	$P < 0.0001$ $r = 0.4$	$P = 0.012$ $r = 0.28$	$P = 0.04$ $r = 0.23$	NS
<i>ABCB1</i>	$P = 0.06$ $r = 0.28$	$P = 0.08$ $r = 0.25$	$P = 0.08$ $r = 0.25$	NS
<i>CASP1</i>	NS	NS	NS	NS

P se calcula mediante el análisis de la varianza;
r representa el coeficiente de Pearson
 NS, correlación estadísticamente no significativa

Tabla VI. Correlaciones entre los niveles de expresión de las isoformas de *TP73* y *HMGB1*, *ABCB1* y *CASP1* en pacientes con cáncer de colon

4.1.5 Los niveles de expresión de los genes asociados con resistencia a drogas *HMGB1* y *ABCB1* pueden predecir el pronóstico de los pacientes

Supervivencia libre de enfermedad (SLE)

Para determinar la influencia de los niveles de expresión de *ABCB1*, *CASP1* y *HMGB1* sobre la SLE se llevaron a cabo los estudios de *Kaplan-Meier* y *Cox* univariante. No se encontraron asociaciones estadísticas.

Supervivencia global (SG)

Los pacientes se agruparon en bicentiles según la media de los niveles de expresión para los genes *HMGB1*, *CASP1* y *ABCB1*. No se encontraron diferencias entre los grupos, así que se realizó una nueva división en terciles según presentaban niveles de expresión bajos, medios o altos para cada uno de los tres genes de estudio. No se encontró ninguna asociación para la expresión de *HMGB1* ($P=0.1$), siendo la tasa de SG a los 5 años para pacientes con baja expresión de *HMGB1* del 69.7 % (95% IC, 44.2-95.2), del 45.2% (95% IC, 24-66.4) con expresión media y del 58.3 % (95% IC, 38.5-78.1) para aquéllos que presentaban niveles altos (Figura 10.A). Sin embargo, la gráfica de *Kaplan-Meier* mostraba que los grupos con niveles medios y altos tenían un comportamiento similar (Figura 10.A). Así, estos pacientes fueron agrupados y los análisis posteriores se llevaron a cabo con sólo dos categorías: niveles de

expresión de *HMGB1* bajos y altos. Cuando analizamos la SG en estos dos grupos se encontró una asociación estadísticamente significativa ($P=0.04$) siendo la SG a los 5 años para los pacientes con baja expresión era del 69.7 % (95% IC, 44.2-95.2), mientras que para aquellos que presentaban alta expresión era del 51 % (95% IC, 36.1-65.9) (Figura 10.B).

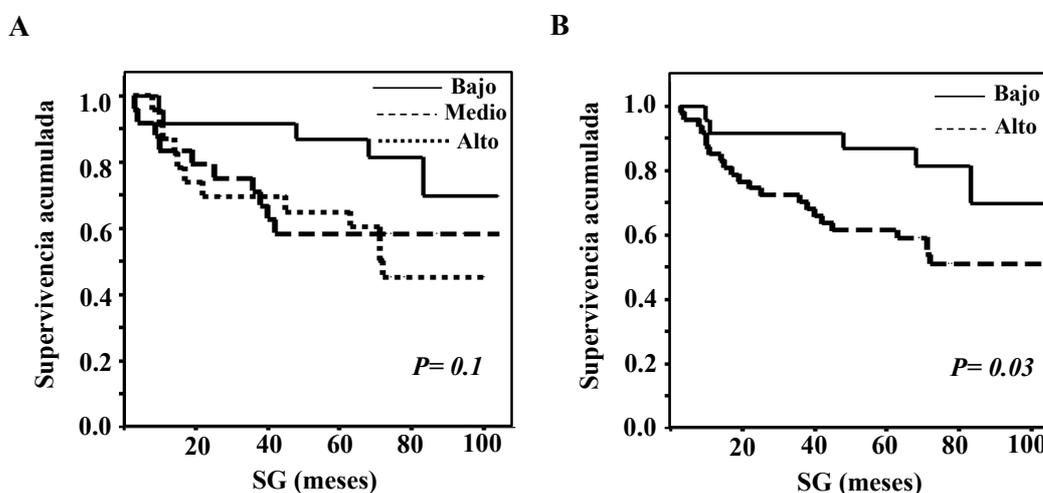


Figura 10. Niveles altos de expresión de *HMGB1* disminuyen la supervivencia global de los pacientes con CCR. Curvas de *Kaplan-Meier* y valores de *P*. A) Expresión de *HMGB1* distribuida en terciles según niveles bajos, medios y altos. B) Expresión de *HMGB1* distribuida en dos grupos: niveles de expresión bajos y altos (nueva variable combinando los niveles medios y altos).

Se realizó un procedimiento similar para el análisis de *ABCBI*. No se encontró ninguna asociación para la expresión de *ABCBI* ($P=0.1$), ya que los pacientes con baja expresión de *ABCBI* tenían una tasa de SG a los 5 años del 74.9 % (95% IC, 55.7-94.1); del 69.6% (95% IC, 50.8-88.4) con expresión media y del 35.5 % (95% IC, 12.6-58.4) para aquéllos que presentaban niveles altos (Figura 11.A). De manera similar a los resultados obtenidos con *HMGB1*, la gráfica de *Kaplan-Meier* mostraba un comportamiento similar en los grupos con niveles bajos y medios (Figura 11.A). Así, estos pacientes fueron agrupados y se realizaron los estudios estadísticos con sólo dos categorías: niveles de expresión de *ABCBI* bajos y altos. Cuando analizamos la SG en estos dos grupos se encontró una asociación estadísticamente significativa ($P=0.03$) siendo la SG a los 5 años del 71.8 % (95% IC, 58.3-85.3) y del 35.5 % (95% IC, 12.6-58.4) para los pacientes con baja y alta expresión de *ABCBI*, respectivamente (Figura 11.B).

El análisis multivariante mostraba que, *ABCBI* y *HMGB1* tenían un valor predictivo de la SG independientemente de los niveles de expresión de *TP73*, con una potencia similar al obtenido con estadio tumoral (Tabla VI).

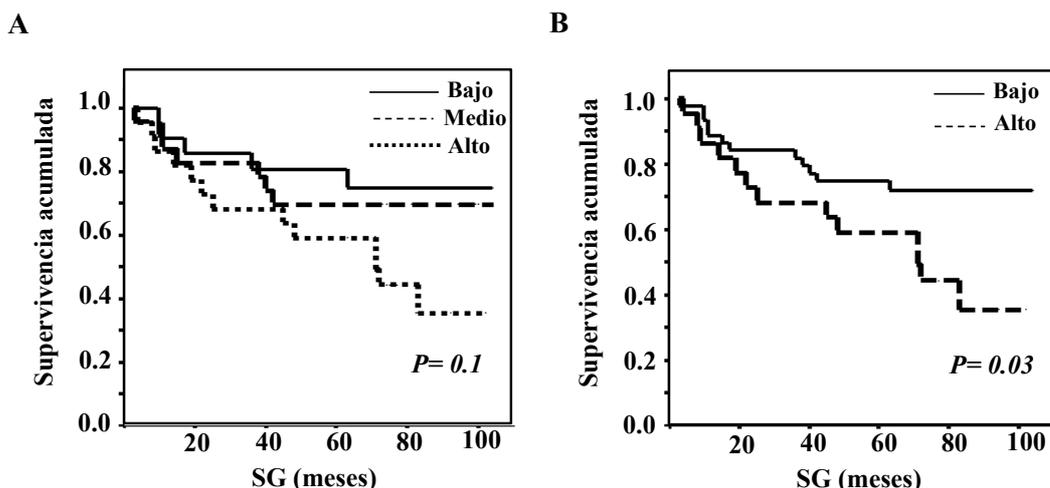


Figura 11. Niveles altos de expresión de *ABCB1* disminuyen la supervivencia global de los pacientes con CCR. Curvas de *Kaplan-Meier* y valores de *P* A) Expresión de *ABCB1* distribuida en terciles según niveles bajos, medios y altos. B) Expresión de *ABCB1* distribuida en dos grupos: niveles de expresión bajos (nueva variable combinando los niveles bajos y medios) y altos.

4.1.6 La sobreexpresión de $\Delta Np73$ incrementa la proliferación celular y la resistencia a drogas quimioterápicas

Proliferación celular

Para testar los efectos funcionales *in vitro* de la sobre-expresión de $\Delta Np73$ se transfectó de manera transitoria y estable la línea de cáncer de colon HCT116 con una construcción de $\Delta Np73\beta$, incrementando la expresión de este gen en al menos 180 veces en el caso de la transfección transitoria y 50 veces en el caso de la estable con respecto a las células control, transfectadas con el vector vacío (Figura 12.A). Tras comprobar que la sobreexpresión de $\Delta Np73$ no comprometía la viabilidad celular en ninguno de los casos (95-98%, datos no mostrados), se observó que el número de células y la tasa de proliferación era mayor en aquellas que expresaban ectópicamente $\Delta Np73$ (Figura 12.B, C y D). Además, se detectó una disminución en el tiempo de inicio de la proliferación, y un incremento significativo en el ratio de proliferación medida a través del índice celular y la pendiente de la curva en un sistema *RT-CES* (Figura 12.E). La evaluación del perfil del ciclo celular confirmó que las células que sobre-expresan $\Delta Np73$ presentaban un porcentaje mayor de células en fase S y en mitosis (M), así como un menor número celular en las fases G_0/G_1 (Figura 13).

Variable	Categoría	Análisis univariante			Análisis multivariante		
		HR	(95% CI)	P Valor	HR	(95% CI)	P Valor
Estadio	I vs II	1.6	0.19-12.86	0.66	0.57	0.06-5.5	0.63
	I vs III	8.8	1.13-68.5	0.037	7.18	0.86-60.1	0.069
	I vs IV	75.6	7.47-764.8	<0.0001	26.5	2.42-289.9	0.007
Invasión vascular	Sí vs No	5.13	2.23-11.81	<0.0001			
Diferenciación tumoral	Bien vs Poco	2.29	0.83-6.3	0.11			
	Moderado vs Poco	1.69	0.21-13.64	0.62			
LNM	Sí vs No	7.23	3.19-16.37	<0.0001			
Bicentiles $\Delta Ex2p73$	Bajo vs Alto	1.53	0.7-3.35	0.28			
Bicentiles $\Delta Ex2/3p73$	Bajo vs Alto	2.28	1.02-5.1	0.044			
Bicentiles $\Delta Np73$	Bajo vs Alto	2.1	0.94-4.68	0.07			
Bicentiles $TAp73$	Bajo vs Alto	0.73	0.34-1,56	0.4			
Bicentiles <i>ABCBI</i>	Bajo vs Alto	2.28	1.04-4.99	0.04	4.5	1.48-13.92	0.008
Bicentiles <i>HMGB1</i>	Bajo vs Alto	2.61	0.99-6.9	0.05	6.25	1.61-24.19	0.008
Bicentiles <i>CASPI</i>	Bajo vs Alto	0.70	0.31-1.57	0.39			

Tabla VII. Análisis univariante y multivariante de la asociación entre los niveles de expresión de las isoformas de *TP73* y *ABCBI*, *HMGB1* y *CASPI*, y las características clínico-patológicas y la supervivencia global de los pacientes con cáncer de colon. Las casillas en blanco corresponden a las variables que no muestran una relación independiente con la SG en el análisis multivariante.

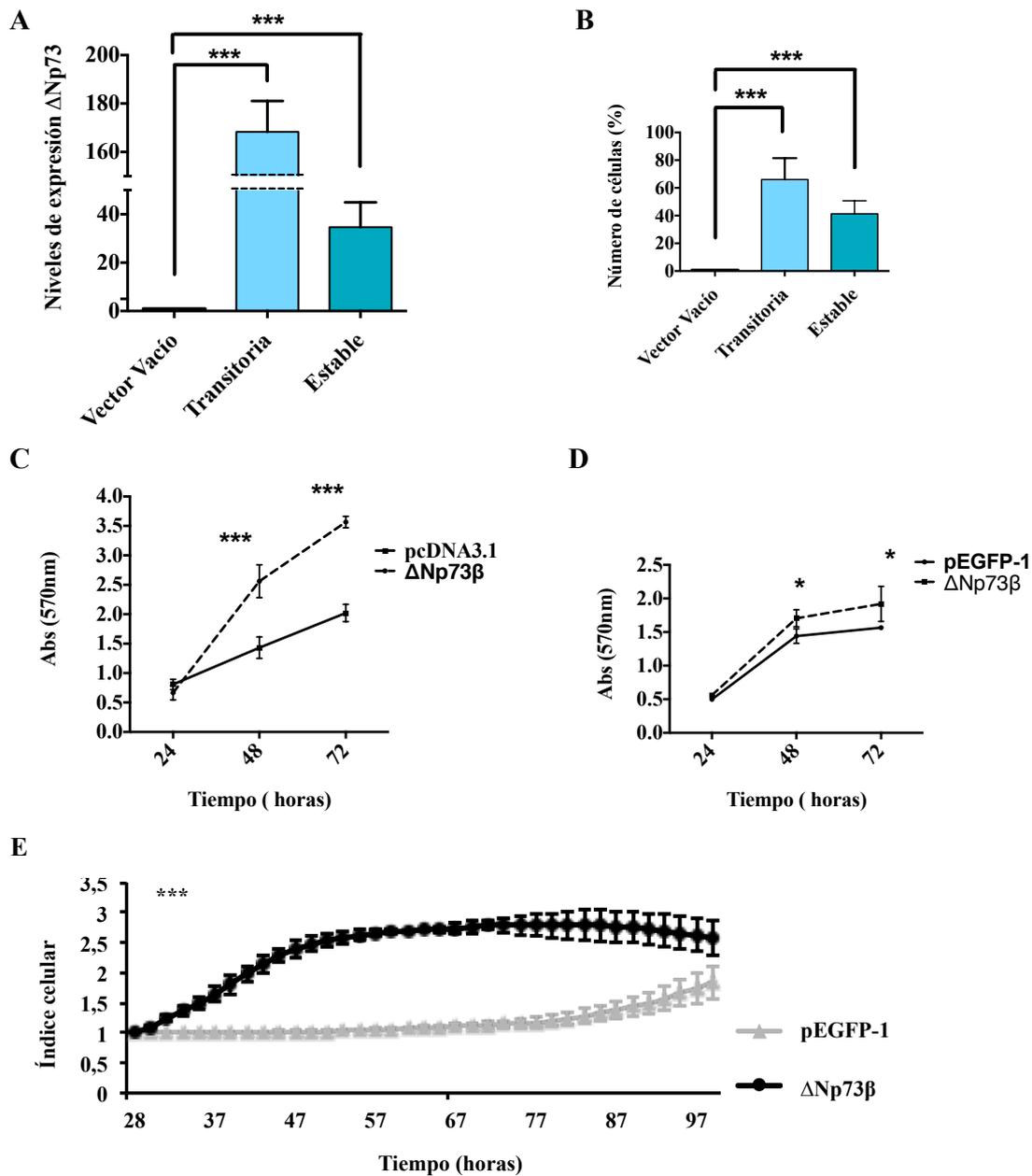


Figura 12. La expresión ectópica de $\Delta Np73$ incrementa la proliferación en las células de cáncer de colon HCT116 (A) Niveles relativos de ARNm de $\Delta Np73$ después de la transfección transitoria (72 horas) o estable; (B) Contaje celular; (C) Cuantificación de la viabilidad celular mediante el ensayo MTT 24, 48, y 72 horas post-transfección; (D) Evaluación del inicio y la tasa de proliferación medida mediante el índice celular y la pendiente de la curva en el sistema RT-CES. El valor P se calculó mediante los diferentes datos de índice celular en la fase exponencial de la curva de crecimiento. Los resultados representan 3 experimentos independientes (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

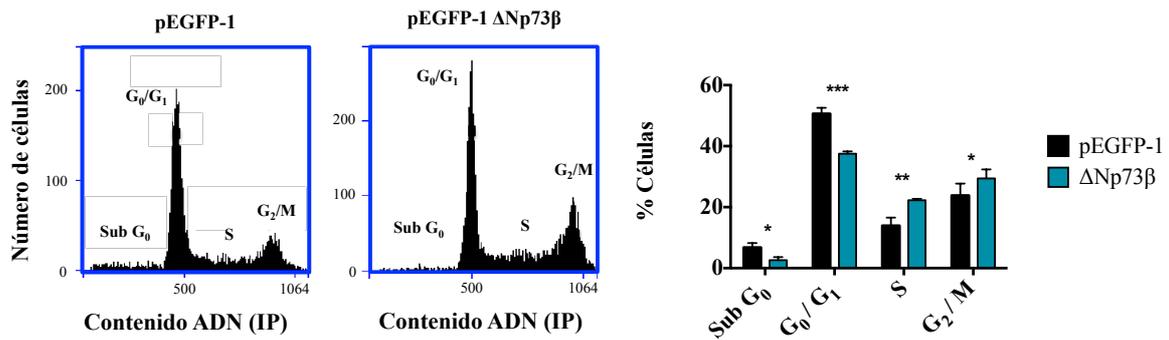


Figura 13. Las células con sobre-expresión para $\Delta Np73$ modifican su ciclo celular. Cuantificación de las fases del ciclo celular mediante citometría de flujo en células con expresión ectópica de $\Delta Np73$ y su control. Los resultados representan 3 experimentos independientes (* $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$).

La separación de tres poblaciones según niveles bajos, medios o altos de expresión de $\Delta Np73$ (Figura 14.A) reveló que el incremento de la proliferación celular era directamente proporcional a la expresión del gen (Figura 14.B).

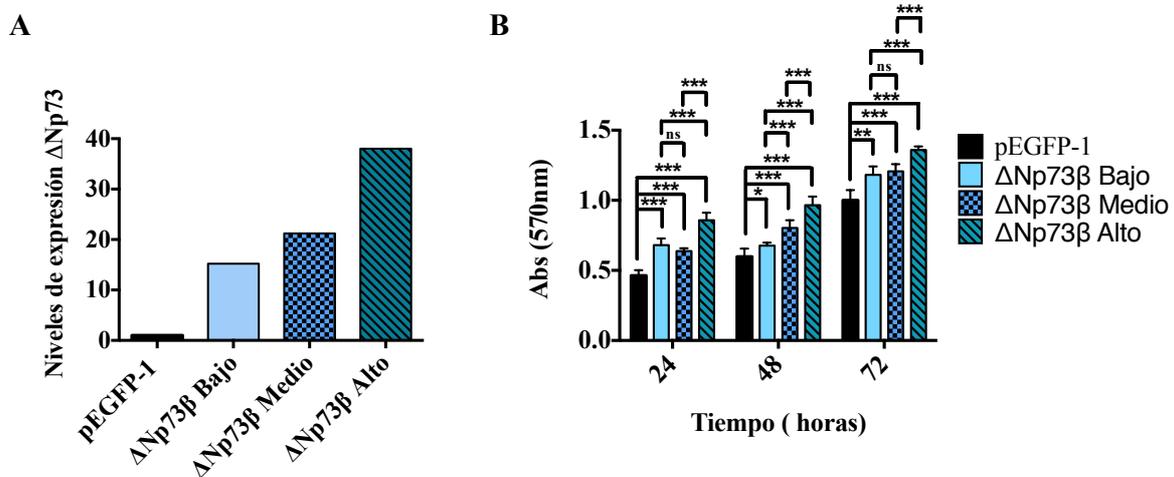


Figura 14. El incremento de la proliferación celular es proporcional a los niveles de expresión de $\Delta Np73$ (A) Poblaciones celulares que expresan de manera estable niveles bajos, medios o altos de $\Delta Np73$ relativos a los niveles expresados por células transfectadas de manera estable con el vector vacío. (B) Cuantificación de la viabilidad celular mediante el ensayo *MTT* en las líneas celulares con niveles de expresión bajos, medios y altos para $\Delta Np73$. Los resultados representan 3 experimentos independientes (NS, no significativo; * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$).

Resistencia a tratamiento quimioterapéutico

Con el fin de evaluar la asociación entre los niveles de expresión de $\Delta Np73$ y la respuesta al tratamiento con oxaliplatino, las células transfectadas con $\Delta Np73$, tanto de manera transitoria como estable, se trataron durante 36 horas con 100 μ M de oxaliplatino presentando un 20- 30% más de viabilidad con respecto a las células control tras el tratamiento (Figura 15).

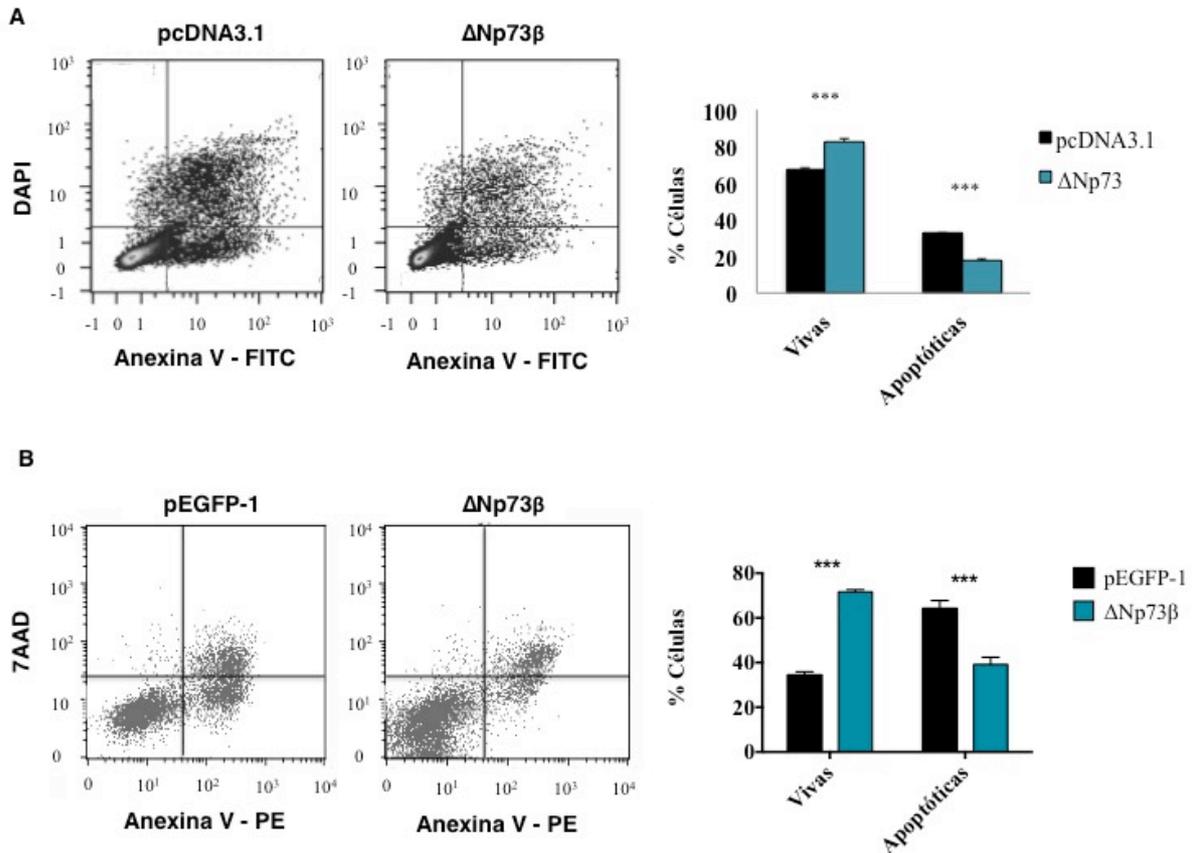


Figura 15. La sobre-expresión de $\Delta Np73$ induce resistencia al tratamiento con oxaliplatino en las células de cáncer de colon. Tras el tratamiento con 100 μ M de oxaliplatino durante 36 horas se evaluó la viabilidad celular mediante citometría de flujo, tanto en células transfectadas con $\Delta Np73$ transitoriamente (A) como de manera estable (B). Los resultados representan 3 experimentos independientes. (***) $P < 0,001$.

La disminución en la inducción de apoptosis de las células se confirmó mediante el ensayo TUNEL (Figura 16.A) y la evaluación de los niveles de expresión de la proteína CASP3 (Figura 16.B). Adicionalmente se observó que la resistencia al tratamiento con oxaliplatino era directamente proporcional a los niveles de expresión de $\Delta Np73$ bajos, medios y altos de nuestras poblaciones de estudio (Figura 17). El tratamiento con oxaliplatino no modificó los niveles de $\Delta Np73$.

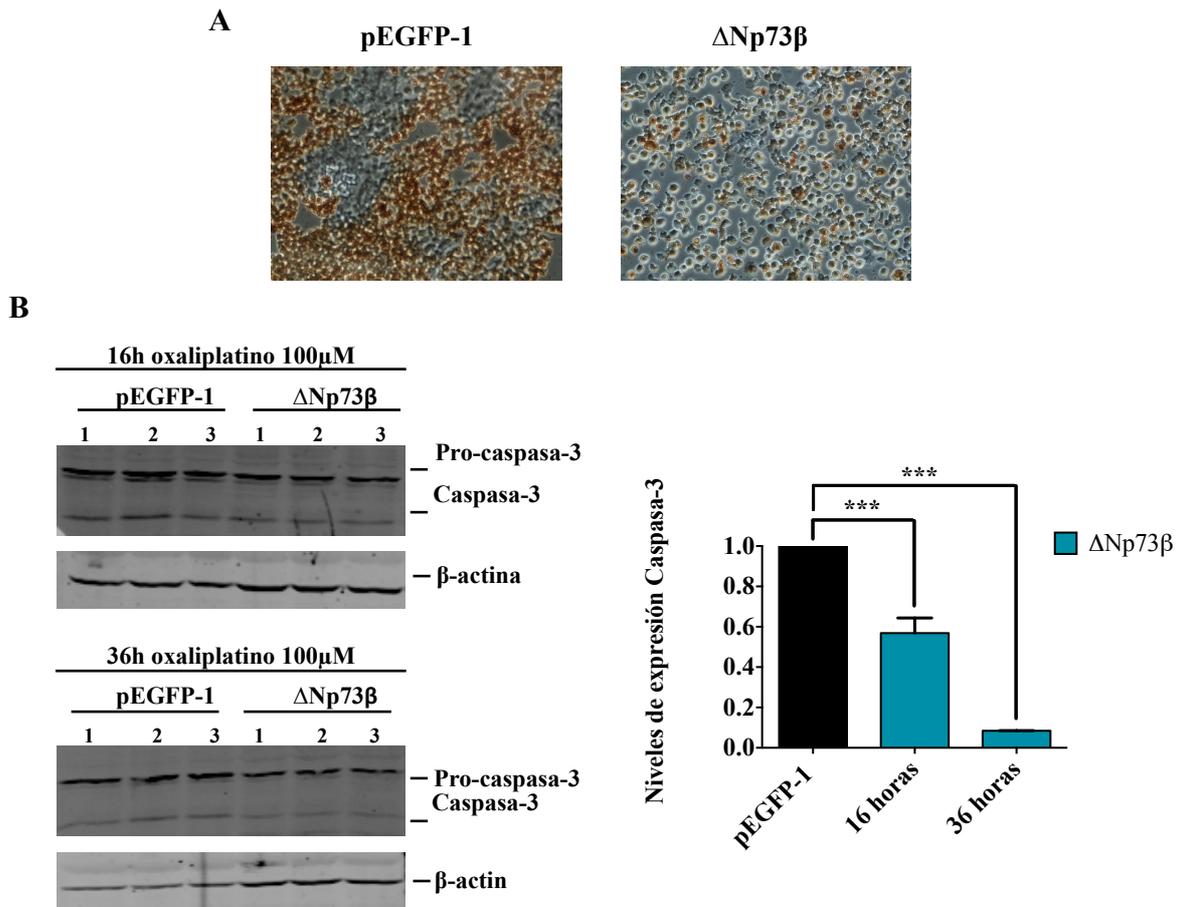


Figura 16. La sobre-expresión de $\Delta Np73$ previene la apoptosis desencadenada por el tratamiento con oxaliplatino. (A) Análisis del número de células apoptóticas tras el tratamiento con oxaliplatino mediante el ensayo TUNEL (20X) (B) Inmunotransferencia de CASP3 en células que sobreexpresan $\Delta Np73$ y en células control tras el tratamiento con oxaliplatino. Los resultados representan tres experimentos independientes (***) $P < 0,001$.

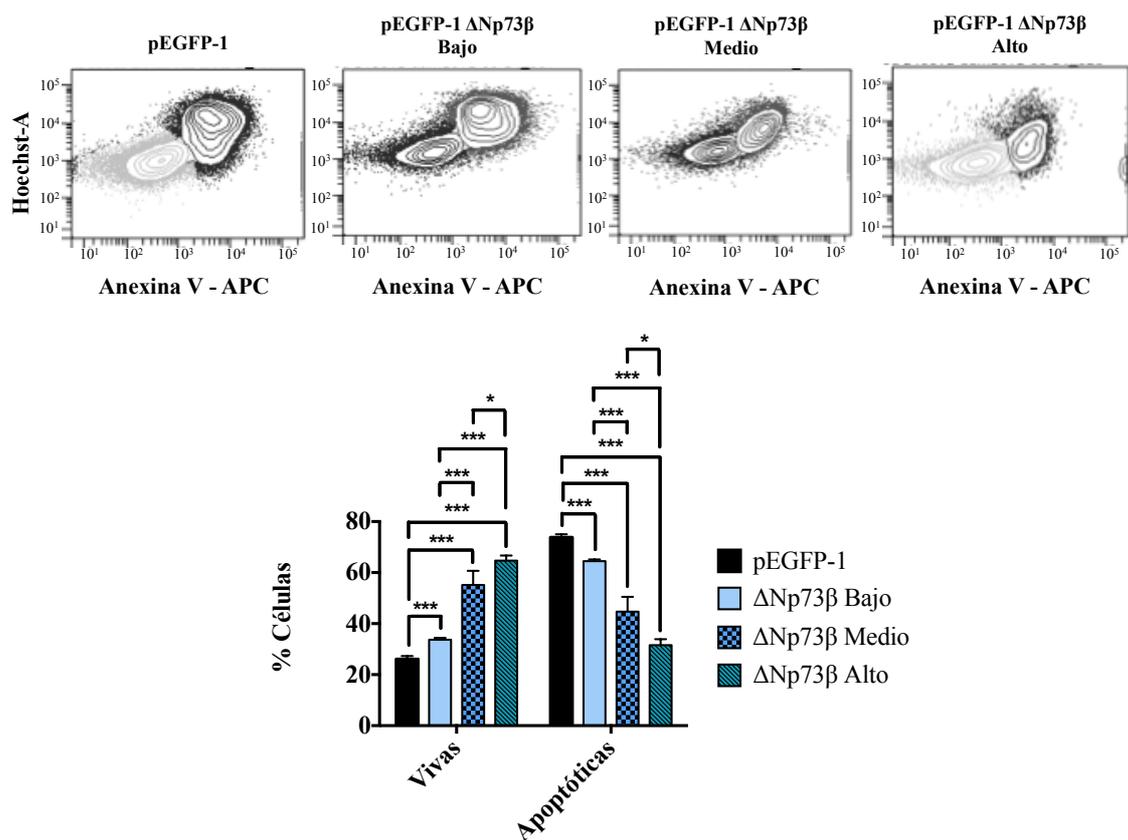


Figura 17. La inducción de resistencia por $\Delta Np73$ es directamente proporcional a su expresión. Tras el tratamiento con oxaliplatino en las poblaciones de $\Delta Np73$ se evaluó la viabilidad celular mediante citometría de flujo. Los resultados representan 3 experimentos independientes (* $P < 0,05$; *** $P < 0,001$).

4.1.7 La isoforma $\Delta Np73$ incrementa la proliferación celular y la resistencia a quimioterápicos “in vivo”

Para confirmar los efectos funcionales de $\Delta Np73$ “in vivo” se inocularon subcutáneamente 1×10^6 células transfectadas establemente con $\Delta Np73\beta$ o con el vector vacío (*pEGFP-1*) en el flanco de 5 ratones atímicos y se realizó un seguimiento del tamaño tumoral. La implantación de los xenotransplantes tumorales derivados de células transfectadas con $\Delta Np73\beta$ se produjo una media de diez días antes que los xenotransplantes control. Además, la tasa de implantación de los xenotransplantes $\Delta Np73\beta$ era un 20% mayor que los derivados de las células transfectadas con el vector vacío. También la tasa de proliferación fue mayor que en los xenotransplantes control (Figura 18.A). Asimismo, estos tumores mostraban un mayor número de células positivas para el marcador de proliferación Ki67 que los controles ($P = 0,01$) (Figura 18).

Para evaluar si los xenotransplantes tumorales transfectados con $\Delta Np73\beta$ desarrollaban resistencia al tratamiento con oxaliplatino similar a los resultados obtenidos *in vitro*, una vez que el volumen tumoral alcanzaba un tamaño entre $400\text{--}600 \text{ mm}^3$ se administró a los animales un

tratamiento con 3mg/kg de oxaliplatino durante dos ciclos de 5 días cada uno, con un descanso entre ellos del mismo tiempo (Ta et al., 2009). Tras el primer ciclo de tratamiento no se observó un incremento del volumen tumoral en xenotrasplantes control comparado con los xenotrasplantes de células con sobreexpresión de $\Delta Np73\beta$ ($***P<0,001$) (Figura 18.B). Ante el incremento de la proliferación en el grupo con xenotrasplantes tumorales $\Delta Np73\beta$, y teniendo en cuenta los criterios de punto y final, no se pudo completar el segundo ciclo de tratamiento.

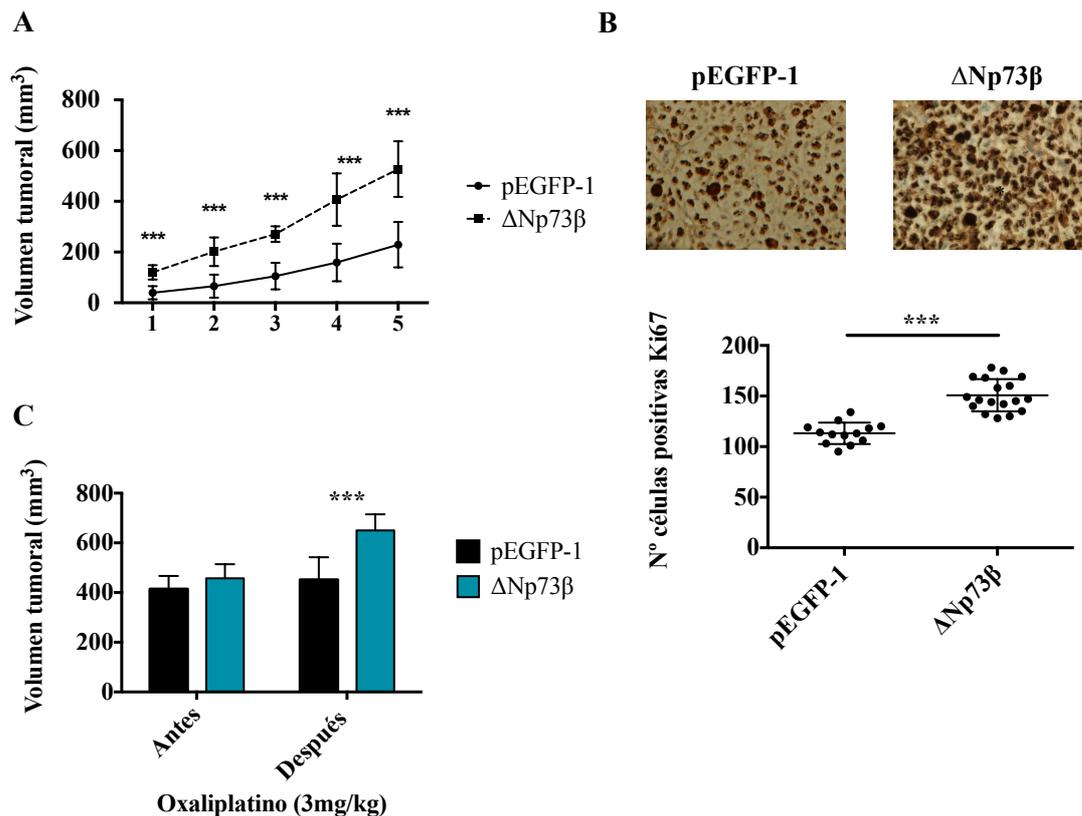


Figura 18. La sobre-expresión de $\Delta Np73$ incrementa la proliferación celular y confiere resistencia al tratamiento con oxaliplatino *in vivo*. (A) Análisis del crecimiento del xenotrasplante tumoral en los individuos sin tratamiento. (B) Inmunohistoquímica de Ki67 y su cuantificación (C) Análisis del crecimiento del xenotrasplante tumoral en los individuos con tratamiento de oxaliplatino. (n=4 ratones por grupo; Prueba *t* de Student ; * $P<0,05$ *** $P<0,001$).

4.1.8 $\Delta Np73$ activa la ruta de autofagia

Para evaluar si la ruta de autofagia es activada por $\Delta Np73\beta$ se llevaron a cabo diferentes aproximaciones. La conversión de la forma soluble de la proteína LC3 (LC3-I) a la forma lipídica asociada a la membrana del autofagosoma, LC3-II, es un marcador característico de la autofagia. Mediante inmunocitoquímica se observó que la cantidad de LC3-II era mayor en las células que sobreexpresan $\Delta Np73\beta$ ($P=0.02$) (Figura 19.A). El incremento en el número de autofagosomas se confirmó mediante la detección de LC3-I-II por inmunotransferencia. Además, el tratamiento con el inhibidor cloroquina, que produce la acumulación de los autofagosomas, incrementa la acumulación de LC3-I-II en células transfectadas con $\Delta Np73\beta$ (Figura 19.B,C).

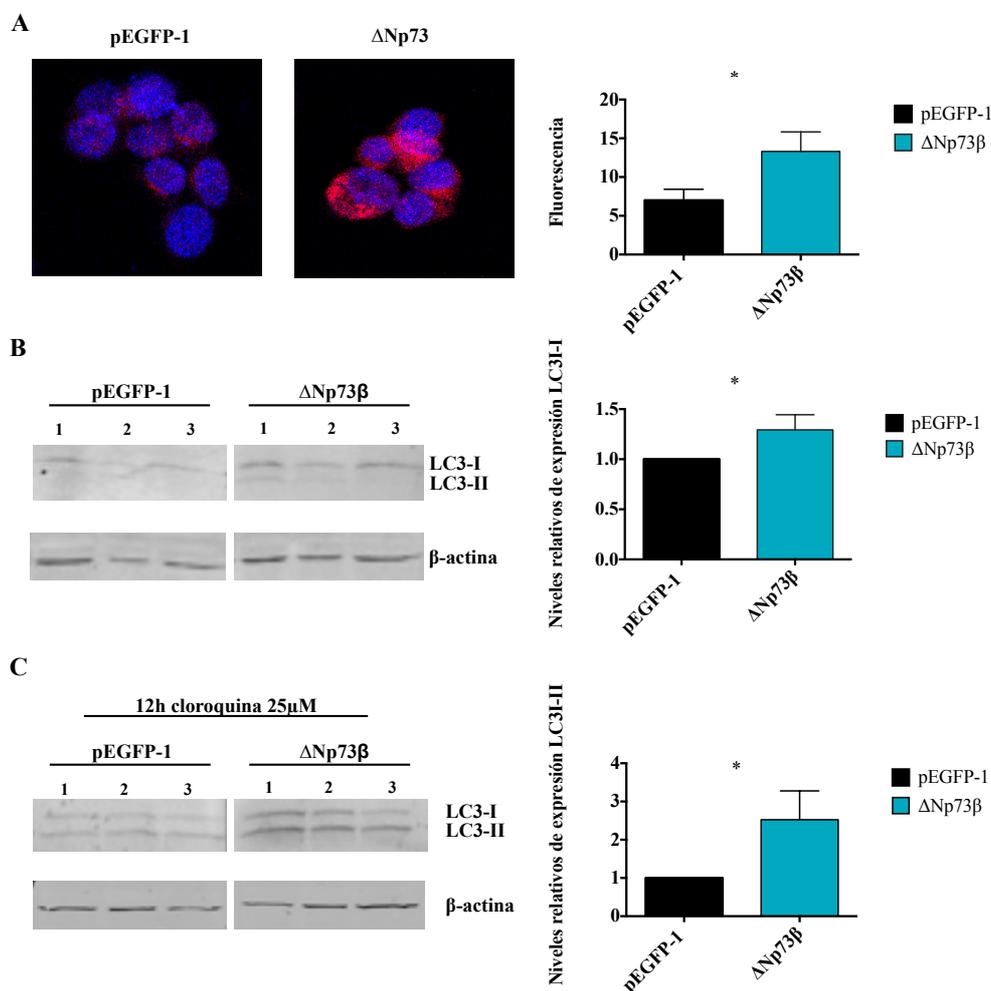


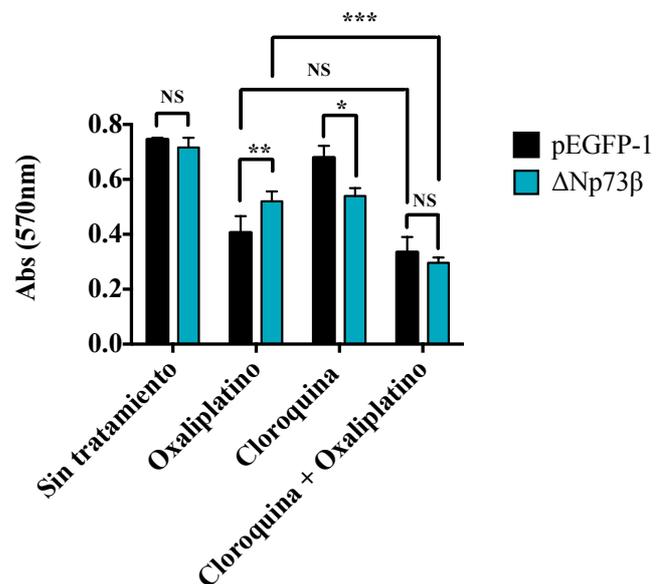
Figura 19. La sobre-expresión de $\Delta Np73$ incrementa el número de autofagosomas. En células que que sobre-expresan $\Delta Np73$ y su control (A) Inmunocitoquímica LC3-I-II, (B) Inmunotransferencia de LC3-I-II sin o (C) con tratamiento de cloroquina. Los resultados representan tres experimentos independientes (***) $P<0,001$.

4.1.9 La autofagia inducida por $\Delta Np73$ incrementa la resistencia al tratamiento con oxaliplatino en células de cáncer de colon.

Para examinar si la autofagia inducida por $\Delta Np73$ es la responsable de la resistencia al tratamiento con oxaliplatino se evaluó, mediante el ensayo MTT, la muerte celular de las células con sobre-expresión para $\Delta Np73\beta$ y las células control (*pEGFP-1*) incubadas con oxaliplatino y con el inhibidor de autofagia cloroquina. Las células con sobre-expresión de $\Delta Np73\beta$ presentan una mayor sensibilidad al oxaliplatino en presencia de cloroquina, igualando la inducción de muerte por oxaliplatino a las de las células controles (Figura 20).

Para confirmar la participación de $\Delta Np73$ en la inducción de autofagia que conduce a la resistencia de las células de cáncer de colon al tratamiento con oxaliplatino, se evaluó la muerte celular con los diferentes tratamientos cuando se interfería la expresión de $\Delta Np73$. Para ello, se evaluó la muerte celular de las células HCT116 transfectadas con un siRNA para $\Delta Np73$, o un siRNA control, mediante el ensayo MTT. La transfección con el siRNA específico para $\Delta Np73$ disminuyó la expresión del gen un 60% (Figura 21). Se observó una disminución de la tasa de proliferación en las células transfectadas con el siRNA para $\Delta Np73$, al compararlas con las células control (Figura 21). Tras los correspondientes tratamientos, se observó que la disminución de los niveles de $\Delta Np73$ sensibiliza a las células a los distintos tratamientos (Figura 21).

Figura 20. La inhibición de la ruta de autofagia incrementa la sensibilidad al tratamiento con oxaliplatino en las células que sobre-expresan $\Delta Np73$. Cuantificación de la viabilidad celular mediante el ensayo MTT en las líneas celulares con sobre-expresión $\Delta Np73$ y su control sin tratar y tras el tratamiento con $100\mu\text{M}$ de oxaliplatino, $25\mu\text{M}$ de cloroquina o la combinación de ambos, durante 36 horas. Los resultados representan tres experimentos independientes (NS, no significativo; * $P<0,05$; ** $P<0,01$; * $P<0,001$).**



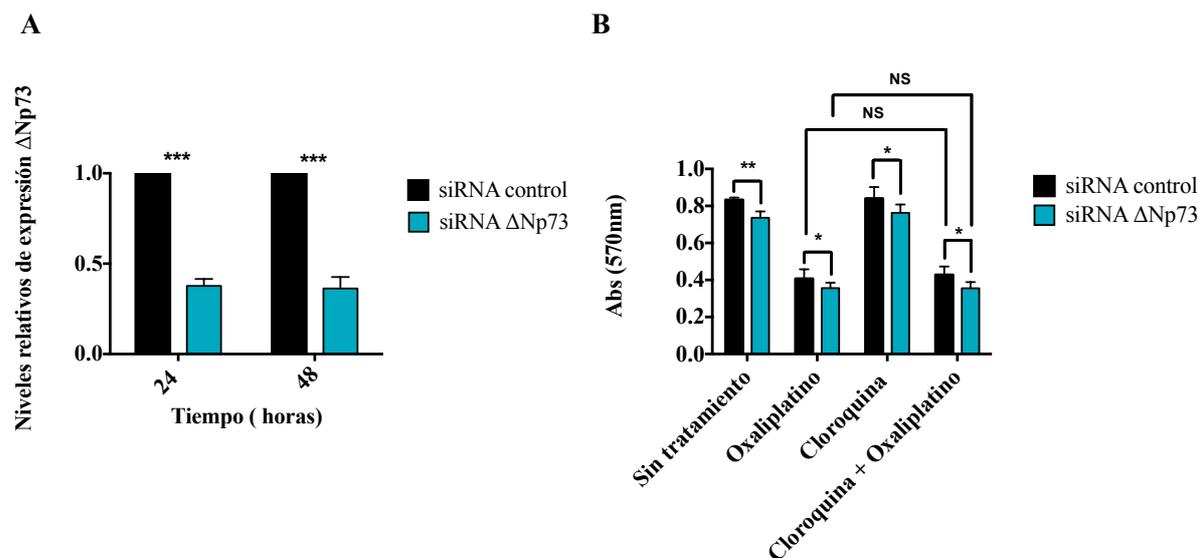


Figura 21. La autofagia inducida por $\Delta Np73$ protege contra la muerte celular inducida por oxaliplatino. (A) Niveles relativos de expresión de $\Delta Np73$ tras la transfección con el siRNA específico. (B) Cuantificación de la viabilidad celular mediante el ensayo MTT en las líneas celulares transfectadas con el siRNA específico para $\Delta Np73$ y su correspondiente control sin tratar y tras el tratamiento con $100\mu\text{M}$ de oxaliplatino, $25\mu\text{M}$ de cloroquina o la combinación de ambos, durante 36 horas. Los resultados representan tres experimentos independientes (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

4.1.10 La autofagia inducida por $\Delta Np73$ incrementa la resistencia al tratamiento con oxaliplatino “in vivo”

Para estudiar la implicación de $\Delta Np73$ en la vía de autofagia y su relación con la resistencia desarrollada a oxaliplatino, se inocularon 1×10^6 células transfectadas establemente con $\Delta Np73\beta$ o con el vector vacío (*pEGFP-1*) en el flanco de 5 ratones atímicos. Cuando el volumen tumoral alcanzó un tamaño de $400\text{--}600\text{ mm}^3$ se administraron a los animales cuatro tipos de tratamientos: (i) oxaliplatino (3mg/kg), (ii) cloroquina (20 mg/kg), (iii) vehículo y oxaliplatino (3mg/kg) y (iv) cloroquina (20 mg/kg) y oxaliplatino (3mg/kg). Como hemos especificado en ensayos con ratones anteriores, la alta tasa de proliferación de los tumores $\Delta Np73\beta$ impidió completar el segundo ciclo de tratamiento. Tras el primer ciclo de tratamiento se observó que solo el tratamiento combinado con oxaliplatino y cloroquina disminuía el volumen tumoral en los xenotrasplantes $\Delta Np73\beta$ comparado con los xenotrasplantes control ($P = \text{NS}$) (Figura 22).

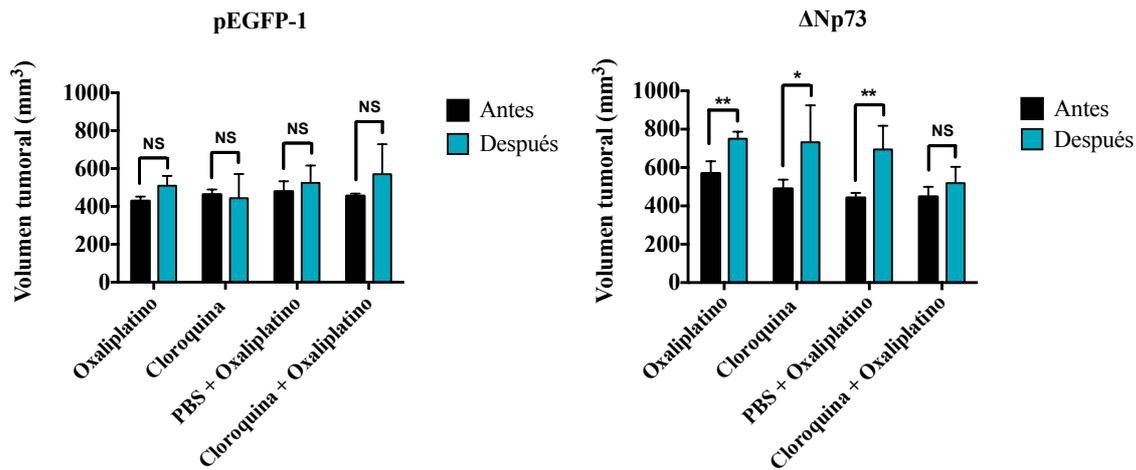


Figura 22. Efectos del tratamiento con oxaliplatino y cloroquina sobre los xenotransplantes tumorales con sobre-expresión para $\Delta Np73$ y sus controles. Análisis del crecimiento del xenotransplante tumoral en los individuos tratados con oxaliplatino (3mg/kg), cloroquina (XXmg/kg), PBS y oxaliplatino (3mg/kg) y cloroquina (XXmg/kg) y oxaliplatino (3mg/kg). (n=4 ratones por grupo; Prueba t de Student ; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

4.1.11 Los niveles de expresión de $\Delta Np73$ se correlacionan con la expresión de genes relacionados con el proceso autofágico en pacientes con cáncer de colon

Se examinaron los niveles de ARNm de $\Delta Np73$ y de un conjunto de genes clave en la activación de la vía de autofagia en muestras de tejido tumoral y en su correspondiente tejido normal de 165 pacientes diagnosticados con cáncer de colon. Los genes asociados con autofagia se detectaron sobre-expresados en un 20-40 % de las muestras tumorales y se correlacionaron directamente con los niveles de expresión de $\Delta Np73$ (Tabla VII).

	<i>ULK1</i>	<i>ULK2</i>	<i>ATG4C</i>	<i>ATG4D</i>	<i>Beclin1</i>
$\Delta Np73$	$P < 0.0001$	$P = 0,014$	$P < 0.0001$	$P = 0,014$	$P = 0,033$
	$r = 0.352$	$r = 0.217$	$r = 0.407$	$r = 0.203$	$r = 0.199$

P se calcula mediante el análisis de la varianza; r representa el coeficiente de Pearson NS, correlación estadísticamente no significativa

Tabla VIII. Correlaciones entre los niveles de expresión de $\Delta Np73$ y *ULK1*, *ULK2*, *ATG4C*, *ATG4D* Y *BECN1* en pacientes con cáncer de colon

4.1.12 *Los niveles de expresión de los genes relacionados con la vía de autofagia identifican subgrupos de pacientes con evoluciones diferente*

El periodo de seguimiento de la serie de 175 pacientes engloba el intervalo desde la cirugía hasta la última visita médica o el fallecimiento del paciente. El seguimiento medio de la serie ha sido de 60 meses (rango de seguimiento de entre 1 y 136 meses). Durante este periodo, se registraron 23.6 % de recaídas y un 50% de fallecimientos. La descripción del número de recaídas y de fallecimientos en las diferentes categorías para cada variable se detalla en la tabla VIII.

Variable	Categoría	Recurrencias (n = 41/175)	%	Exitus (n = 88/175)	%
Estadio	I	1/14	7	2/13	15.4
	II	19/94	20,2	37/87	42.5
	III	29/67	43,2	43/64	67.2
	IV	0	0	11/11	100
Invasión Vascular	No	23/130	17.7	57/126	45.2
	Sí	26/45	57	36/49	73.4
Diferenciación del tumor	Bien	12/79	15.7	29/75	38.6
	Moderado	29/89	32.6	57/92	61.9
	Poco	7/7	100	7/8	87.5
Afectación ganglionar	No	20/108	18.5	40/100	40
	Sí	28/67	41.8	54/75	72
Expresión <i>ULK1</i>	Bajo	25/85	27	50/90	55.5
	Alto	30/90	33.3	45/85	52.9
Expresión <i>ULK2</i>	Bajo	20/88	22.7	43/95	45,2
	Alto	24/87	27.5	42/80	52.5
Expresión <i>ATG4C</i>	Bajo	31/90	34.4	43/88	48.8
	Alto	25/85	29.4	44/87	54
Expresión <i>ATG4D</i>	Bajo	28/110	25.45	46/87	52.8
	Alto	38/65	58.46	46/88	52.2
Expresión <i>BECN1</i>	Bajo	21/88	23.8	44/88	50
	Alto	21/87	24.1	44/87	50.5

Tabla IX. Número de recaídas y muertes en las diferentes categorías para cada variable.

Supervivencia libre de enfermedad (SLE)

Los pacientes se agruparon en bicentiles según la media de los niveles de expresión para los genes *ULK1*, *ULK2*, *ATG4C*, *ATG4D* y *BECN1*. No se encontraron diferencias entre los grupos, así que se realizó una nueva división en terciles según se presentaban niveles de expresión bajos, medios o altos para cada uno de los genes de estudio. No se encontró ninguna asociación estadística para ninguno de los genes de estudio. Sin embargo, la gráfica de *Kaplan-Meier* mostraba que los grupos con niveles bajos y medios de expresión de *ATG4D* tenían un comportamiento similar (Figura 23). Así, estos pacientes fueron agrupados y los análisis posteriores se llevaron a cabo con solo dos categorías: niveles de expresión de *ATG4D* bajos y altos. Cuando analizamos la SLE en estos dos grupos se encontró una tendencia entre la asociación de niveles altos de *ATG4D* en el tumor con una menor supervivencia libre de enfermedad ($P=0.06$) (Figura 23) siendo la tasa de SLE a los 5 años de 87,3% (95% IC, 78.5-96.41%) y del 83,75% (95% IC, 63,79-104,7) para los pacientes con baja y alta expresión respectivamente.

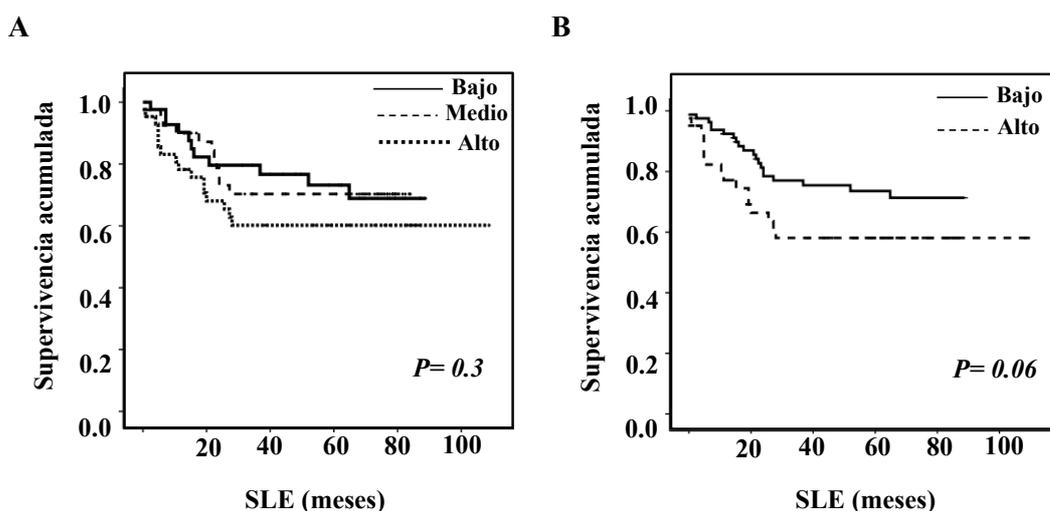


Figura 23. Niveles altos de expresión de *ATG4D* disminuyen la supervivencia libre de enfermedad de los pacientes con CCR. Curvas de *Kaplan-Meier* y valores de *P*. A) Expresión de *ATG4D* distribuida en terciles según niveles bajos, medios y altos. B) Expresión de *ATG4D* distribuida en dos grupos: niveles de expresión bajos (nueva variable combinando los niveles bajos y medios) y niveles altos.

Supervivencia global (SG)

Para determinar la influencia de los niveles de expresión de *ULK1*, *ULK2*, *ATG4C*, *ATG4D* y *BECN1* sobre la SG se llevaron a cabo los análisis de *Kaplan-Meier* y *Cox univariante*. No se encontraron asociaciones estadísticas para ninguno de los genes de estudio.

4.2 Implicación de las isoformas $\Delta TAp73$ en comunicación intercelular

4.2.1 Identificación y caracterización de exosomas

Los exosomas se aislaron del medio de cultivo derivado de la línea celular HCT116 transfectada transitoriamente con una construcción de $\Delta Np73\beta$ y su respectivo control. Validamos la identidad de los exosomas por microscopia confocal, microscopia electronica de transmission y la presencia de marcadores de exosomas CD63 y CD9 (Peinado et al., 2012) (Figura 24.A,B). Adicionalmente, se cuantificó la distribución del número y del tamaño de los exosomas mediante el sistema de caracterización de nanopartículas LM10 (NanoSight) (Figura 24.C). No se observaron diferencias en el número de exosomas liberados (Figura 24.C).

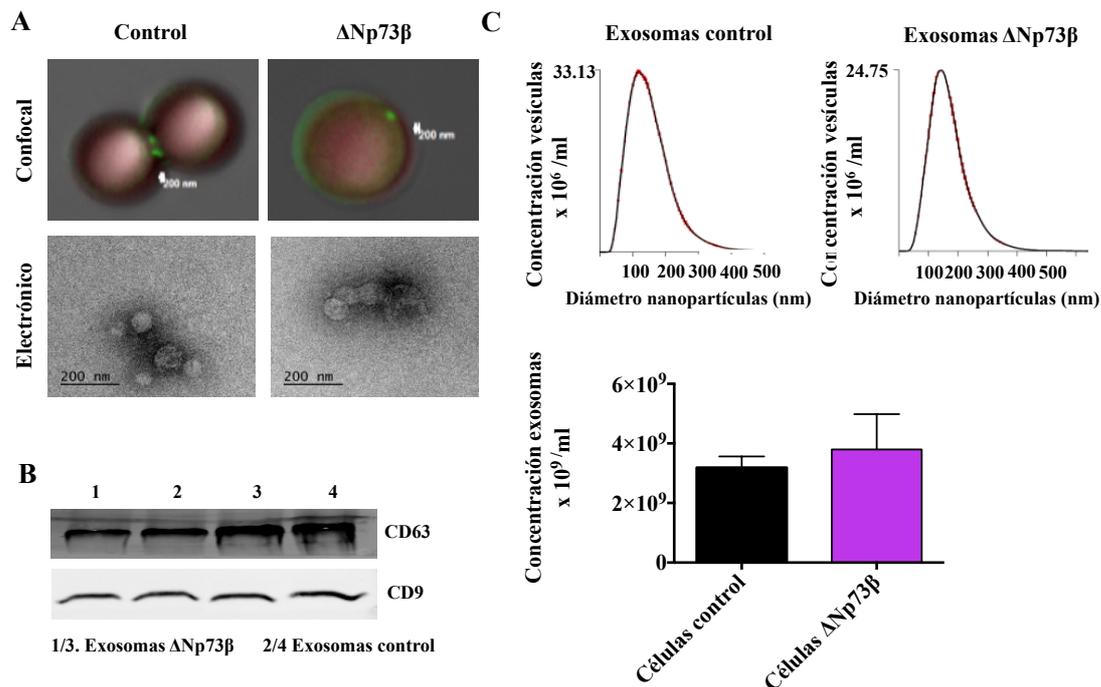
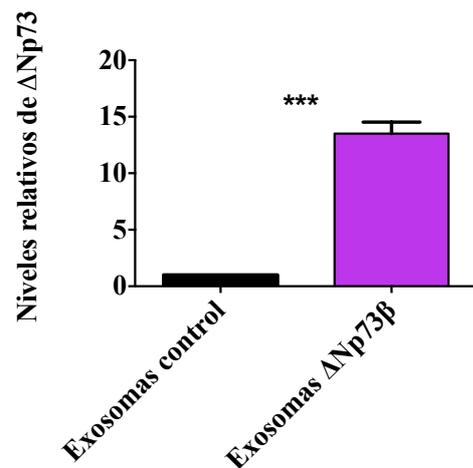


Figura 24. Análisis de la identidad de los exosomas. **A)** Imágenes representativas de exosomas por microscopia confocal y microscopia electrónica, **B)** inmunotransferencia de CD63 y CD9 en exosomas liberados por HCT116 transfectada transitoriamente con $\Delta Np73\beta$ y su respectivo control. **C)** Identificación del tamaño y cuantificación de los exosomas liberados por las células que sobreexpresan $\Delta Np73\beta$, mediante el sistema de caracterización de nanopartículas LM10 (NanoSight).

4.2.2 $\Delta Np73\beta$ se incorpora en los exosomas liberados por células tumorales

Para comprobar si los exosomas liberados por células tumorales incorporaban la isoforma $\Delta Np73\beta$, la línea celular de cáncer de colon HCT116 se transfectó transitoriamente con una construcción de $\Delta Np73\beta$, incrementando la expresión de su mensajero 200 veces con respecto a las células control, transfectadas transitoriamente con el vector vacío. Tras aislar los exosomas del medio de cultivo de ambas transfecciones se observó que aquellos que procedían de las células transfectadas con $\Delta Np73\beta$ contenían niveles más altos de su ARNm que las células control (Figura 25).

Figura 25. Análisis de los niveles de expresión de ARN mensajero por PCR cuantitativa a tiempo real en los exosomas liberados por las células transfectadas transitoriamente con $\Delta Np73\beta$ y su respectivo control.



Para confirmar la ausencia del vector en el interior de los exosomas se realizó una transformación de bacterias *E. Coli* con el contenido de estos (Figura 26).

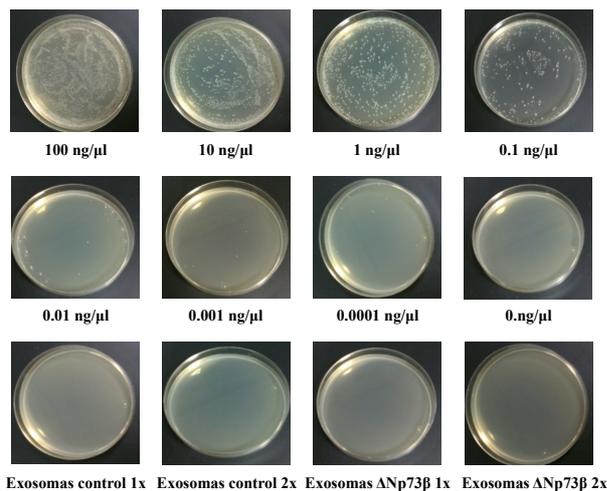
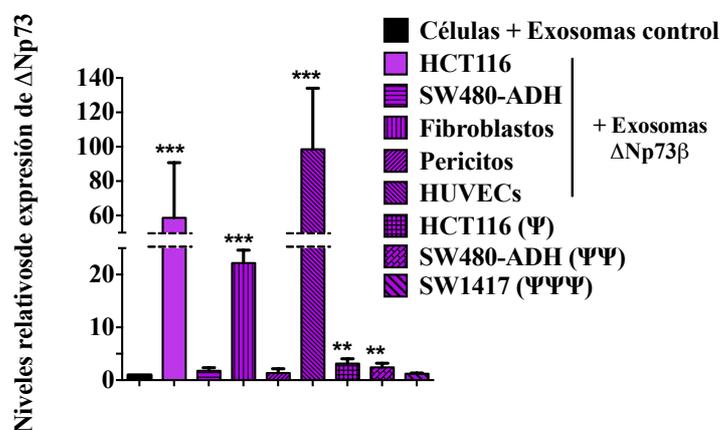


Figura 26. Transformación bacteriana para confirmar la ausencia del vector de expresión en los exosomas liberados. La transformación de *E. Coli* se realizó con el vector (diluido 1/10) o con el contenido de los exosomas derivados de células HCT116 transfectadas con $\Delta Np73\beta$ y su correspondiente vector vacío .

4.2.3 La transferencia del $\Delta Np73\beta$ exosomal es específica del tipo celular

Los exosomas empaquetan selectivamente ARNm particulares para ser transferidos a células receptoras específicas en diferentes contextos (Mittelbrunn et al., 2011; Montecalvo et al., 2012; Skog et al., 2008). Para confirmar la transferencia del mensajero de $\Delta Np73\beta$ a través de exosomas se realizaron incubaciones de diferentes líneas celulares con exosomas liberados de las células HCT116 transfectadas con $\Delta Np73\beta$ o el vector vacío. En una primera aproximación, incubamos dos líneas de cáncer de colon, HCT116 y SW480-ADH, con ambos tipos de exosomas durante 72 horas. La incubación de las células HCT116 con exosomas $\Delta Np73\beta$ incrementó sus niveles de expresión en la célula receptora 52 veces con respecto a las mismas células incubadas con exosomas control ($P = 0.0001$) (Figura 27.A). En la línea celular SW480-ADH no se observaron cambios (Figura 27.A). Con el fin de evaluar la generalización del proceso, se testó el papel de otras líneas celulares de cáncer de colon, SW1417 transfectada transitoriamente y la línea HCT116 transfectada establemente, como donadoras de exosomas enriquecidos en $\Delta Np73\beta$ (Figura 27.A). El tráfico de exosomas se confirmó mediante el marcaje con PKH67 (Figura 27.B).

A



B

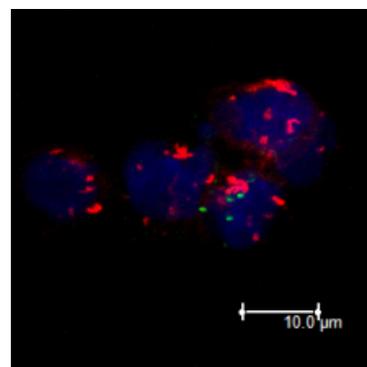


Figura 27. La transferencia de $\Delta Np73\beta$ es específica del tipo celular. A) Análisis de la expresión de ARNm de $\Delta Np73\beta$ por PCR cuantitativa a tiempo real en líneas celulares incubadas con exosomas liberados por la línea HCT116 transfectada de forma transitoria o estable con $\Delta Np73\beta$ y su correspondiente vector vacío. Se muestra la media \pm DS de 4 experimentos independientes (** $p < 0.01$). B) Tráfico e incorporación de exosomas en las células HCT116; se utilizó E-cadherina para el marcaje de la membrana celular (rojo) y PKH67 para marcar los exosomas (verde).

Adicionalmente, se evaluó si la transferencia del $\Delta Np73\beta$ contenido en exosomas podría incorporarse en otros tipos celulares relacionados con el microambiente tumoral. Tanto en los fibroblastos BJ como en las células endoteliales HUVECs se observó un incremento de la expresión de $\Delta Np73\beta$ de 22 y 98 veces respectivamente, tras 72 horas de incubación ($P=0.0001$), mientras que en pericitos no se encontraron diferencias (Figura 27.A).

4.2.4 $\Delta Np73\beta$ exosomal regula la proliferación celular y confiere resistencia a drogas en las células receptoras

En la primera parte de este trabajo hemos descrito que niveles altos de expresión de $\Delta Np73\beta$ están asociados con un incremento en la tasa de proliferación y de la sensibilidad celular a drogas quimioterápicas como el oxaliplatino. Para confirmar la funcionalidad “*in vitro*” del mensajero de $\Delta Np73\beta$ incorporado en exosomas se realizaron ensayos de proliferación y de resistencia a drogas en las células receptoras. Mediante el ensayo de proliferación celular MTT se observó que las células HCT116 y los fibroblastos BJ incubados con exosomas $\Delta Np73\beta$ incrementaban su tasa de proliferación en mayor medida que las mismas incubadas con exosomas control (Figura 28).

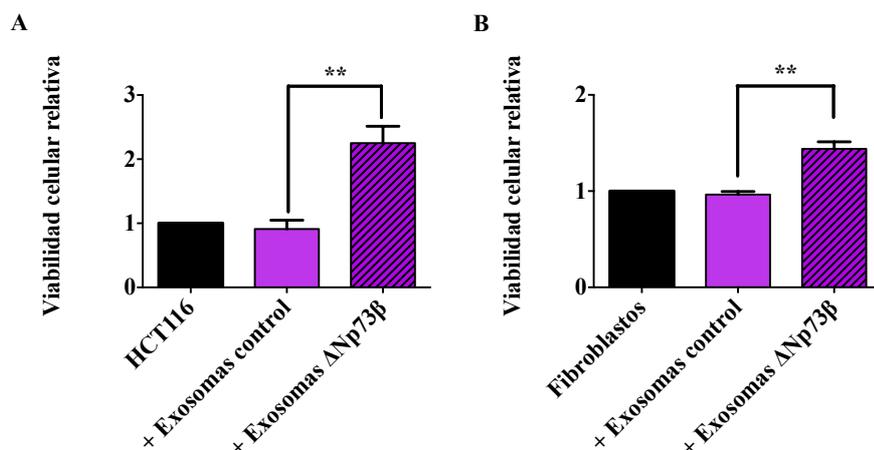


Figura 28. La transferencia del $\Delta Np73\beta$ exosomal incrementa la proliferación en las células receptoras de cáncer de colon (A) y en los fibroblastos (B). El tratamiento con los exosomas derivados de líneas transfectadas con el vector vacío se utilizó como control. Representación de cuatro experimentos independientes (** $P < 0.01$).

Adicionalmente, se comprobó que las células HCT116 pre-tratadas con exosomas $\Delta Np73\beta$ durante 72 horas mostraban un incremento en la tasa de supervivencia después de la exposición a oxaliplatino. (Figura 29). No se observaron diferencias en los experimentos de angiogénesis realizados en células HUVEC pre-tratadas con exosomas $\Delta Np73\beta$ y control (Figura

30). Estos resultados apoyan la funcionalidad “*in vitro*” de la isoforma $\Delta Np73\beta$ empaquetada en los exosomas.

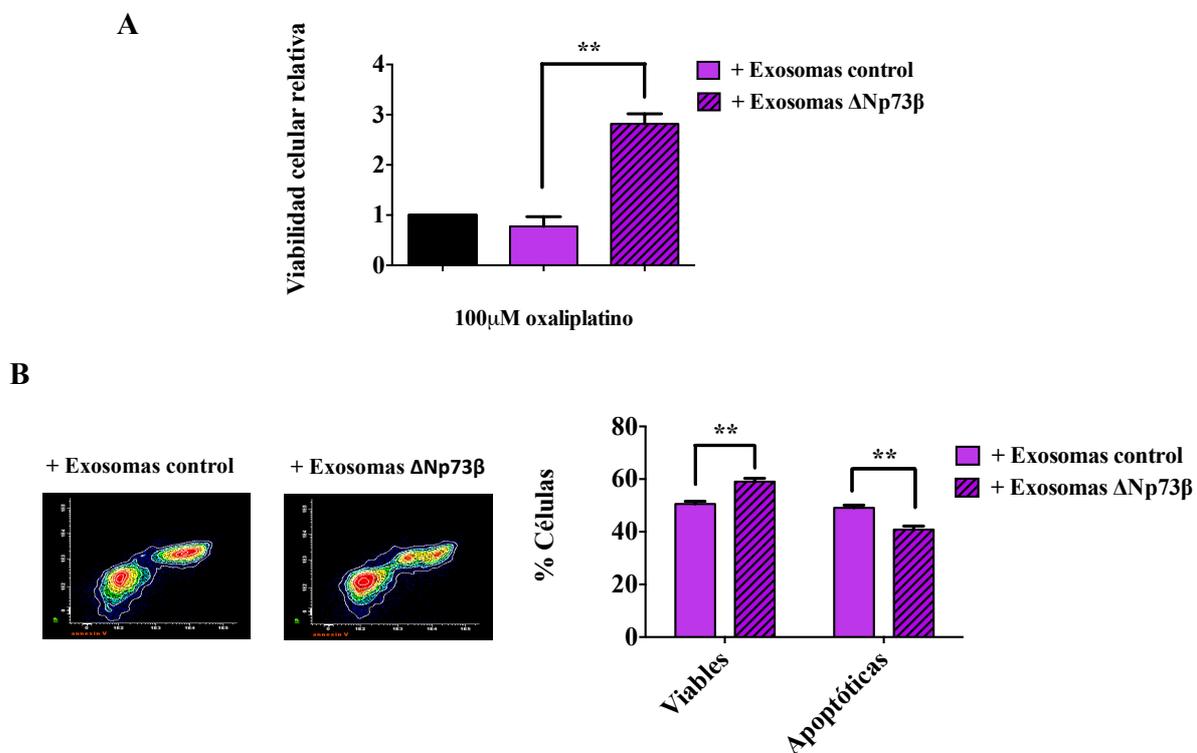


Figura 29. La transferencia de $\Delta Np73\beta$ exosomal incrementa la resistencia a drogas en las células receptoras. Experimentos de resistencia a drogas analizados por MTT (A) y citometría de flujo (B). El tratamiento con los exosomas derivados de líneas transfectadas con el vector vacío se utilizó como control. Representación de cuatro experimentos independientes (** $p < 0.01$).

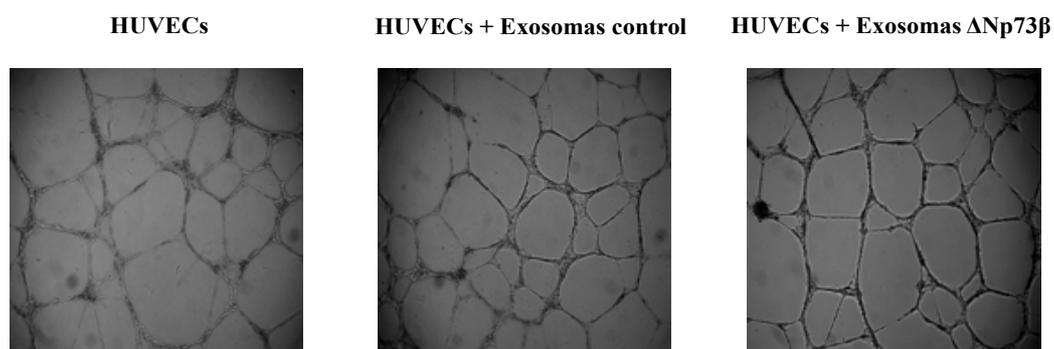


Figura 30. Ensayo de formación de vasos con células HUVECs después de los tratamientos con exosomas $\Delta Np73\beta$ o exosomas control. Representación de cuatro experimentos independientes.

4.2.5 *La transferencia de $\Delta Np73\beta$ exosomal en xenotransplantes tumorales regula su crecimiento in vivo*

Para confirmar la funcionalidad “*in vivo*” de $\Delta Np73\beta$ exosomal se inocularon subcutáneamente 1×10^6 células HCT116-*pEGFP-1- $\Delta Np73\beta$* o HCT116-*pEGFP-1* en el flanco de 5 ratones atímicos y se evaluaron los niveles de $\Delta Np73\beta$ en los exosomas del plasma de los dos grupos de individuos. Los ratones con xenotransplantes tumorales derivados de células transfectadas con $\Delta Np73\beta$ presentaban niveles de expresión de esta isoforma en sus exosomas más altos que los del propio tumor y más altos que los de los ratones controles ($P=0.062$)(Figura 31.A). Para evaluar si $\Delta Np73\beta$ contenido en los exosomas puede modificar el comportamiento del tumor receptor confiriéndole potencial oncogénico *in vivo*, 20 μ g de exosomas liberados por las células HCT116 transfectadas con $\Delta Np73\beta$ o de HCT116 control se inyectaron por la vena de la cola 3 veces por semana, inmediatamente después de la inoculación subcutánea de las células HCT116 en el flanco. Durante y al final del tratamiento, se observó que el tamaño tumoral en los ratones tratados con exosomas $\Delta Np73\beta$ era mayor que en el grupo control ($P = 0.09$ and $P = 0.05$, respectivamente)(Figura 31.B). Además, estos tumores mostraban un mayor número de células positivas para el marcador de proliferación Ki67 que los controles ($P = 0.04$)(Figura 31.C).

Además, los ratones tratados con exosomas $\Delta Np73\beta$ presentaban niveles de expresión de esta isoforma más altos tanto en el tumor como en los exosomas aislados del plasma de estos ratones, con respecto al grupo control ($P = 0.029$)(Figura 32).

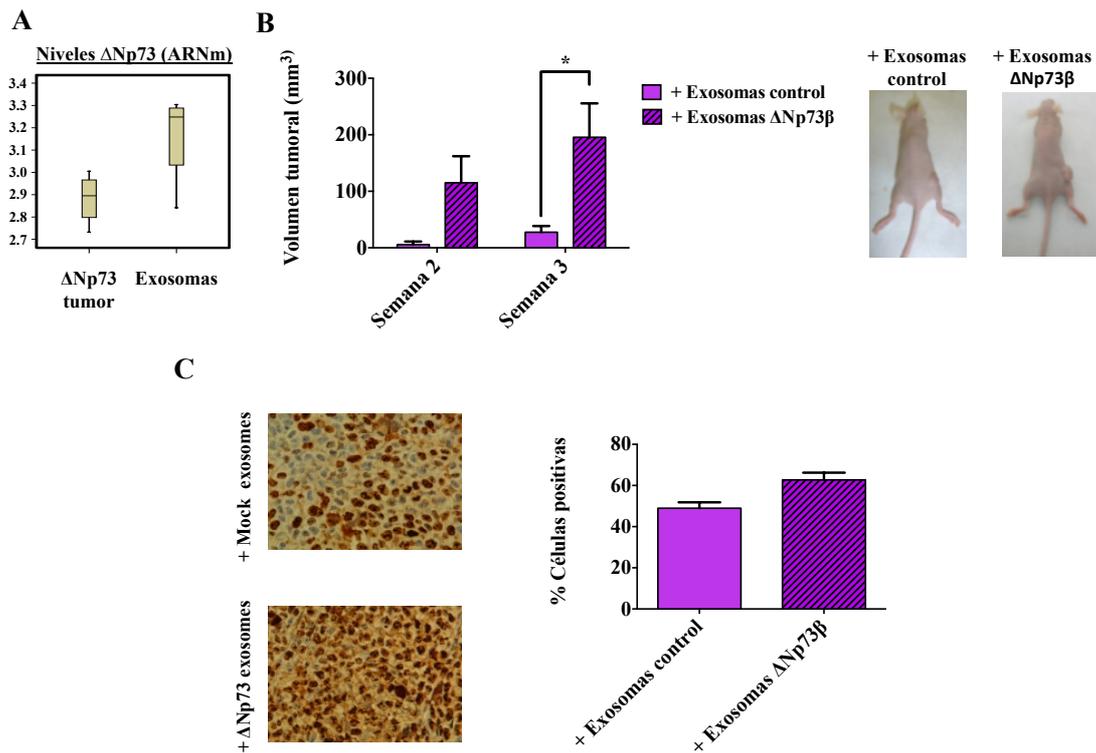


Figura 31. La transferencia del $\Delta Np73\beta$ exosomal confiere potencial oncogénico en los xenotransplantes tumorales. A) Los niveles de expresión de $\Delta Np73$ en el tumor y en los exosomas después del tratamiento con exosomas. B) Análisis y cuantificación del crecimiento tumoral durante el tratamiento con los exosomas que contienen $\Delta Np73\beta$ y los exosomas control. C) Inmunohistoquímica Ki67 en los xenotransplantes tumorales después del tratamiento.

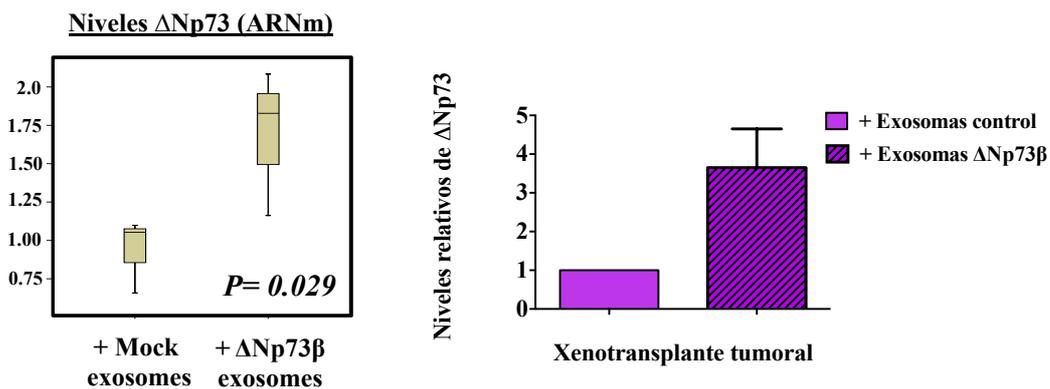
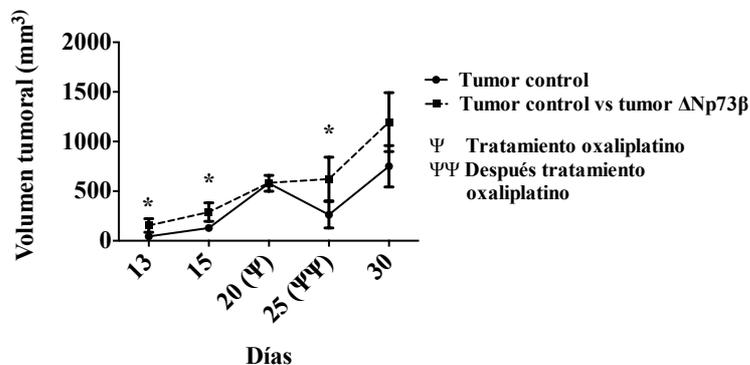


Figura 32. Niveles de expresión de $\Delta Np73$ en exosomas y en el tumor ($n = 4$ ratones por grupo, Prueba t de Student $*P = 0.01$)

Para evaluar si la agresividad de un tumor puede modificar el comportamiento y la progresión de otro tumor más indolente, se inocularon subcutáneamente 1×10^6 células HCT116 con sobre-expresión estable de $\Delta Np73\beta$ en el flanco izquierdo y 1×10^6 células control (*pEGFP-I*) en el flanco opuesto de 5 ratones atímicos. Se utilizó como control un grupo de 5 ratones inoculados con 1×10^6 células control en un único flanco. 13 y 15 días después de la inoculación, los xenotransplantes tumorales derivados de células control en ratones que tenían un tumor derivado de las células *HCT116-pEGFP-I- $\Delta Np73\beta$* contralateral presentaban un tamaño tumoral mayor que los tumores control (Figura 33.A). Estas diferencias en el tamaño tumoral se perdieron 20 días después de la inoculación celular, momento en el que se comenzó el tratamiento con oxaliplatino. Tras el primer ciclo con oxaliplatino (5 días de tratamiento con oxaliplatino 3mg/kg)(Ta et al., 2009), se encontró que los tumores derivados de células control en ratones con un tumor con sobre-expresión de $\Delta Np73\beta$ contralateral no respondían al tratamiento, mientras que los ratones control presentaban una disminución del tamaño tumoral (Figura 33.A). Aunque durante el periodo de descanso en el tratamiento todos los xenotransplantes tumorales crecían, las diferencias en tamaño se mantenían. Adicionalmente, los ratones con tumores $\Delta Np73\beta$ y *pEGFP-I* en flancos opuestos presentaban en sus exosomas niveles de expresión de $\Delta Np73$ más altos que en los ratones control (Figura 33.B).

A



B

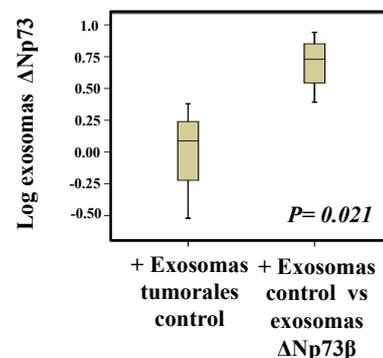


Figura 33. Análisis del crecimiento tumoral de los xenotransplantes tumorales con un tumor contralateral que sobreexpresa $\Delta Np73$. Los ratones con un solo tumor control en uno de los flancos se utilizaron como control.

4.2.6 $\Delta Np73$ está contenido en los exosomas derivados de pacientes con cáncer de colon

Se examinaron los niveles de ARNm de $\Delta Np73$ en el tejido tumoral y en su correspondiente tejido normal de 69 pacientes diagnosticados con cáncer de colon. Aproximadamente un 30% de los casos de cáncer de colon presentaban sobreexpresión de al menos dos veces $\Delta Np73$ confirmando nuestros resultados previos. Además, se encontró una tendencia entre la asociación de niveles altos de $\Delta Np73$ en el tumor con estadios más avanzados de la enfermedad ($P=0.07$) y con una menor supervivencia libre de enfermedad ($P=0.1$) (Figura 34).

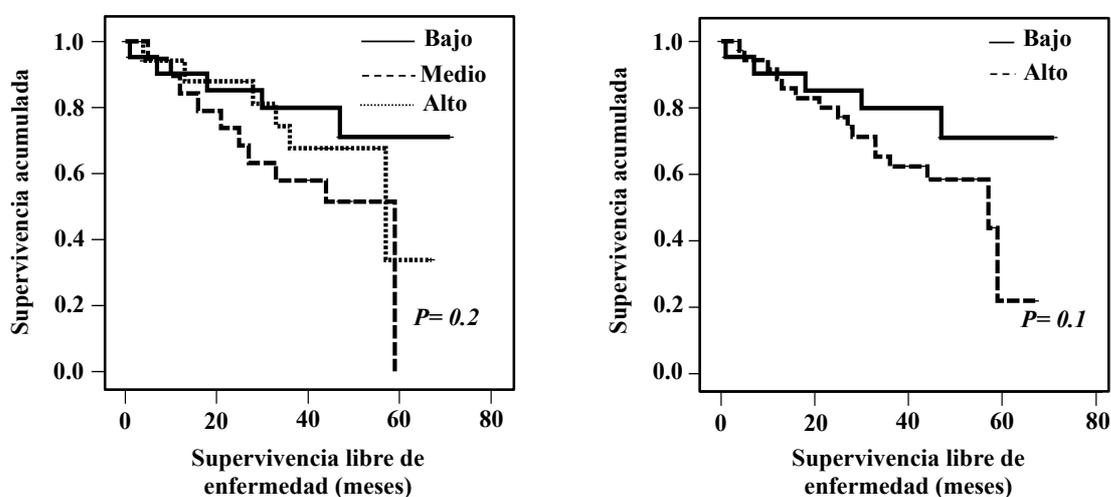


Figura 34. Efecto de los niveles de $\Delta Np73$ sobre la supervivencia global, curvas de *Kaplan-Meier* y valores *P*. Los niveles de expresión se distribuyeron en niveles bajos, medios y altos (izquierda) y en dos grupos: niveles de expresión bajos (nueva variable combinando los niveles bajos y medios) y altos.

Para continuar con el estudio, se aislaron los exosomas de los 69 pacientes de cáncer de colon y de 12 individuos sanos utilizados como control. Los exosomas se identificaron por microscopía electrónica (Figura 35.A), sistema *NanoSight* (Figura 35.B) y mediante la evaluación de los niveles de las proteínas flotilina y CD9 (Silva et al., 2012). Tras el análisis de los resultados se observó que los niveles de $\Delta Np73$ en exosomas de pacientes de cáncer de colon eran estadísticamente más altos que en los controles sanos ($P < 0.001$; media geométrica en los pacientes = 69.96 vs media geométrica en los controles sanos = 29.40; test de *Kruskal-Wallis*)(Figura 36.C). Además, se encontró que los niveles relativos de $\Delta Np73$ en exosomas de pacientes eran más altos que en los tejidos ($P < 0.001$)(Figura 35.D). Notablemente, no se encontró ninguna correlación entre los niveles de $\Delta Np73$ en los tumores y en los exosomas de los pacientes. Tras cuantificar el número de exosomas en el plasma de los pacientes mediante la

expresión de Ber-EP-4, la actividad acetilcolinesterasa y la concentración de proteína total en exosomas (Silva et al., 2012) se observó una correlación negativa entre los niveles de expresión de $\Delta Np73$ en el tejido tumoral y los niveles de los tres parámetros utilizados ($P=0.03$, $r=-0.3$; $P=0.007$, $r=-0.35$; $P=0.04$, $r=-0.3$; respectivamente)(Figura 35.E).

Para confirmar que los exosomas derivados del plasma de los pacientes pueden transferir el $\Delta Np73$ contenido, se incubaron las células HCT116 con exosomas con niveles bajos/moderados o altos de $\Delta Np73$. Las células receptoras incrementaron los niveles de ARN mensajero de $\Delta Np73$ 4,1 y 5,1 veces respectivamente, comparadas con la incubación con exosomas derivados de individuos sanos ($P < 0.001$ y $P < 0.001$, respectivamente) (Figura 36).

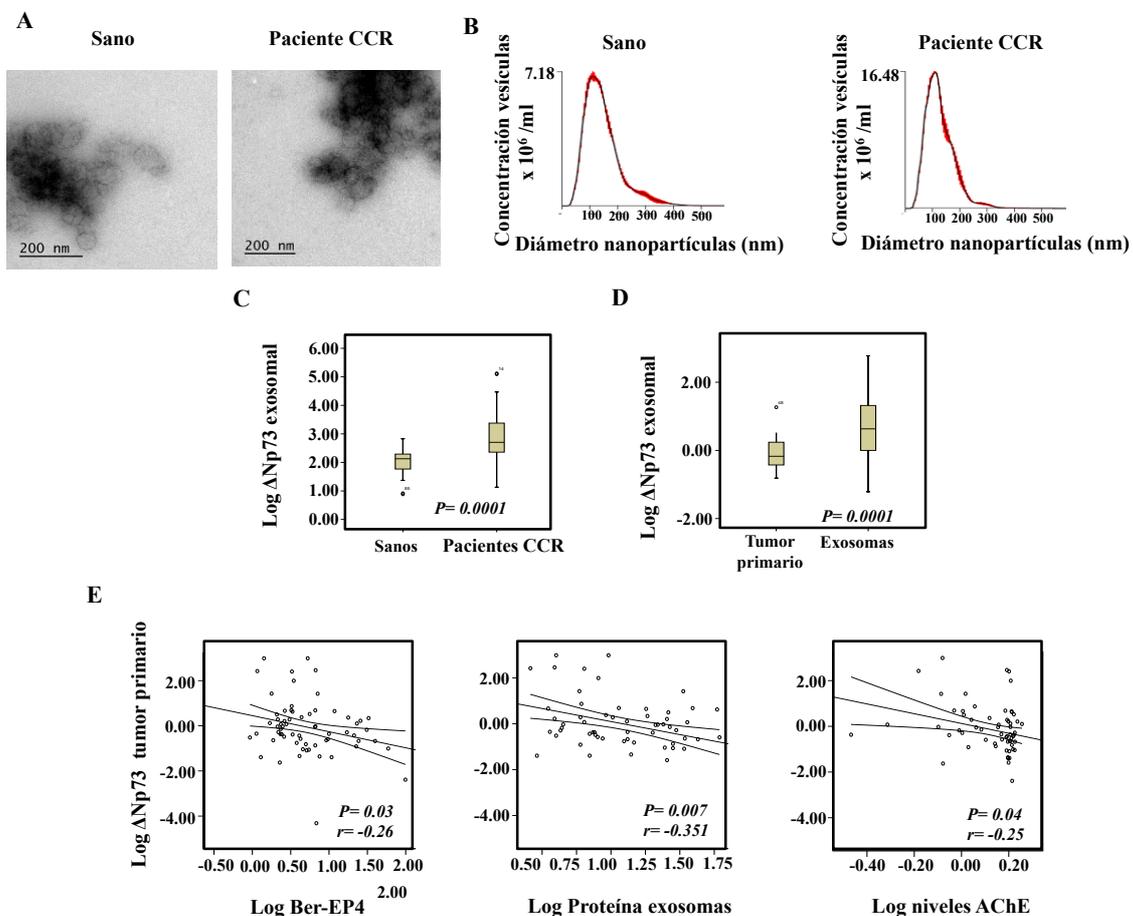


Figura 35. Análisis de los niveles de $\Delta Np73$ en los exosomas derivados de pacientes con cáncer de colon. La identidad de los exosomas se determinó por microscopía electrónica (A) y por el sistema NanoSight (B). Análisis estadístico de los niveles relativos de ARNm de $\Delta Np73$ en los exosomas circulantes en el plasma de los pacientes con cáncer de colon y de individuos sanos (C). Los niveles relativos de expresión de $\Delta Np73$ fueron evaluados tanto en los exosomas como en los tumores primarios (D) (Prueba *U Mann-Whitney*). Correlaciones entre los niveles de ARNm de $\Delta Np73$ en el tumor primario y la cantidad de exosomas presentes medidos por Ber-EP4, niveles de proteína y la

actividad acilcolinesterasa (E) (El valor *P* se calculó mediante el análisis de la varianza; *r* es el coeficiente de *Pearson*).

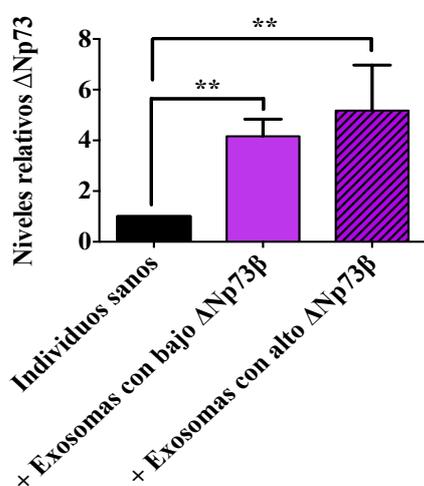


Figura 36. Análisis por PCR cuantitativa a tiempo real de los niveles de expresión de $\Delta Np73$ en la línea celular HCT116 tras ser incubada con exosomas derivados de individuos sanos y pacientes con cáncer de colon con niveles bajos o altos del gen (Prueba t de *Student*)

4.2.7 Valor pronóstico de $\Delta Np73$ exosomal

Se examinaron los niveles de ARNm de $\Delta Np73$ contenido en los exosomas del plasma de 69 pacientes diagnosticados con cáncer de colon. El seguimiento medio de la serie ha sido de 19 meses (rango de seguimiento 1-72 meses). Durante este periodo el 24% de los pacientes sufrieron una recaída mientras que el 16 % falleció. La descripción del número de recaídas y de fallecimientos en las diferentes categorías para cada variable se detalla en la tabla IX.

Variable	Categoría	Recurrencias (n = 24/69)	%	Exitus (n =15 /69)	%
Estadio	I	1/5	1.5	0/5	0
	II	6/30	8.7	4/30	5.8
	III	13/27	19.0	7/27	10.1
	IV	4/7	5.8	5/7	7.2
Invasión Vascular	No	11/45	15.9	7/45	10.1
	Sí	13/24	18.8	8/24	11.6
Diferenciación del tumor	Bien	2/9	2.9	0/9	0
	Moderado	14/48	2.0	7/48	10.1
	Poco	8/12	11.6	8/12	11.6
Afectación ganglionar	No	9/38	13.0	7/38	10.1
	Sí	15/31	2.2	8/31	11.6
Expresión $\Delta Np73$ exosomal	Bajo	6/24	8.6	3/23	4.3
	Alto	18/45	2.6	12/46	17.4

Tabla X. Número de recaídas y muertes en las diferentes categorías para cada variable

Hemos observado que los pacientes con niveles de $\Delta Np73$ exosomal más altos se asociaban con una mayor expresión de CEA en las muestras de plasma ($P=0.008$)(Figura 38.A).

Supervivencia libre de enfermedad (SLE)

Se realizaron los análisis de *Kaplan-Meier* y univariante para determinar la influencia de los niveles de expresión de $\Delta Np73$ exosomal en la SLE. Los pacientes se agruparon en terciles según niveles de expresión bajos, medios o altos de $\Delta Np73$. No se encontró ninguna asociación ($P=0.3$), pero la gráfica de *Kaplan-Meier* mostraba que los terciles con niveles medios y altos tenían un comportamiento similar (Figura 38.B). Así, estos pacientes fueron agrupados y los análisis posteriores se llevaron a cabo con sólo dos categorías: niveles bajos y altos de expresión de $\Delta Np73$. Cuando analizamos la SLE en estos dos grupos se encontró una tendencia ($P=0.07$); los pacientes con baja expresión presentaban una SLE a los 5 años del 57% (95% IC, 51-60%), mientras que los pacientes con alta expresión presentaban un 49% (Figura 38.B)

Supervivencia Global (SG)

Se realizaron los análisis de *Kaplan-Meier* y univariante para determinar la influencia de los niveles de expresión $\Delta Np73$ exosomal sobre la SG. De nuevo los pacientes se agruparon en terciles según niveles de expresión bajos, medios o altos de $\Delta Np73$. No se encontró ninguna asociación ($P=0.3$), pero la gráfica de *Kaplan-Meier* mostraba que los terciles con niveles medios y altos tenían un comportamiento similar (Figura 38.C). Así, estos pacientes fueron agrupados y los análisis posteriores se llevaron a cabo con sólo dos categorías: niveles bajos y altos de expresión de $\Delta Np73$. Cuando analizamos la SLE en estos dos grupos se encontró una tendencia ($P=0.1$); los pacientes con baja expresión presentaban una SLE a los 5 años del 59% (95% IC, 53-65%), mientras que los pacientes con alta expresión presentaban un 55% (95% IC, 50-60%) (Figura 38.C).

No se encontró ninguna asociación entre la SLE o la SG y la concentración de proteína exosomal .

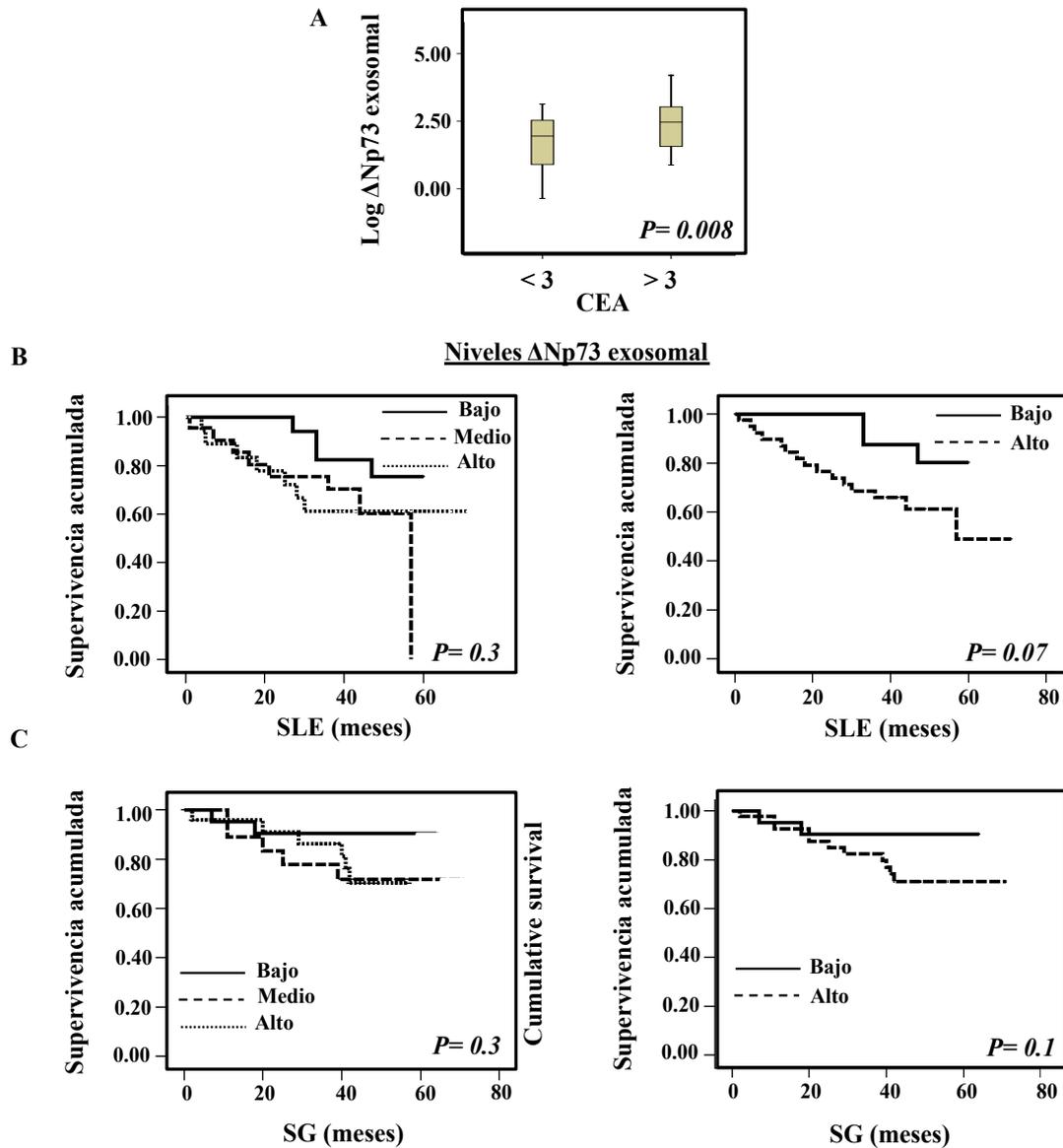


Figura 37. Asociación entre los niveles de $\Delta Np73$ y el pronóstico de los pacientes con cáncer de colon (A) Correlación entre los niveles de ARNm de $\Delta Np73$ en exosomas y CEA (P valor se calculó mediante el análisis de la varianza; r es el coeficiente de *Pearson*). La influencia de los niveles de $\Delta Np73$ exosomal sobre la supervivencia libre de enfermedad (B) y la supervivencia global (C). Curvas de *Kaplan-Meier* y valores de P . Los niveles de expresión de $\Delta Np73$ en exosomas se distribuyeron en terciles (izquierda) y en dos grupos según niveles de expresión bajos (nueva variable que combina los niveles bajos y medios) y altos (derecha).

5 DISCUSIÓN

5.1 Implicación de las isoformas de *TP73* en procesos oncogénicos

Son varios los trabajos publicados hasta la actualidad que muestran una asociación entre la sobre-expresión de isoformas específicas de *TP73* con parámetros clínico-patológicos de los tumores clásicamente relacionados con un peor pronóstico (Domínguez et al., 2006b). Sin embargo, el impacto de esta alteración en la supervivencia de los pacientes ha sido abordada únicamente en una minoría de ellos (Soldevilla et al., 2013). Los análisis realizados en muestras de pacientes diagnosticados con diversos tipos de tumores han mostrado la co-expresión tanto de las variantes supresoras tumorales (*TAp73*) como de aquellas a las que se les confiere un potencial oncogénico (Δ *TAp73*), aunque parece que la sobre-expresión de las variantes Δ *TAp73*, y específicamente Δ *Np73*, es la responsable de las cortas supervivencias en neuroblastoma (Casciano et al., 2002), meduloblastoma (Zitterbart et al., 2007), tumores pulmonares (Uramoto et al., 2004), hepatocelulares (Müller et al., 2005) de ovario (Concin et al., 2005), de mama (Domínguez et al., 2006b) y de células escamosas cervicales (Liu et al., 2006). En otros tipos de cáncer aunque es patente la implicación de esta isoforma en el desarrollo tumoral, no se presentan datos de seguimiento de los pacientes en las series analizadas. Sólo dos trabajos describen la asociación entre la sobre-expresión de la variante Δ *Ex2/3p73* y un peor pronóstico de pacientes diagnosticados con cáncer de mama (Domínguez et al., 2006b) y gliomas (Wager et al., 2006). En cáncer colorrectal sólo dos trabajos previos han evaluado el posible valor de las alteraciones en los niveles de expresión de *TP73* como marcador pronóstico independiente. En estos, los autores han analizado los niveles totales de expresión de *TP73*, utilizando cebadores que no discriminan entre las distintas variantes, no considerando así qué isoformas específicas están asociadas con los pronósticos más desfavorables (Sun, 2002; Toumi et al., 2010). Dada la generación de múltiples variantes de *TP73* con funciones opuestas durante el contexto tumoral, y aunque sus niveles generales podrían ser utilizados como un parámetro clínico, probablemente sería más aconsejable centrarse en aquellas variantes que confieren características ventajosas a las células tumorales durante el proceso tumorigénico, debido a que potencialmente predecirán el pronóstico de los pacientes de una manera más ajustada. En nuestra primera serie de pacientes diagnosticados con CCR hemos determinado que tanto Δ *Np73* como Δ *Ex2/3p73* podrían predecir la SG, asociándose la sobre-expresión de ambas isoformas con supervivencias más cortas, aunque sólo el estadio patológico aparece como un predictor independiente en el análisis multivariante. Así, nuestros primeros resultados apuntan que las variantes Δ *Np73* y Δ *Ex2/3p73* podrían ser las responsables en cáncer colorectal de las propiedades oncogénicas atribuidas anteriormente a *TP73*. Es importante tener en cuenta que un alto porcentaje de las muestras tumorales de los individuos de nuestra serie presentan altos niveles de expresión tanto de las formas *TAp73* como de las Δ *TAp73*. Sin embargo, el hecho de que, a nivel de proteína, la estabilidad de las formas Δ *TAp73* sea mayor inclinaría el ratio *TAp73*/ Δ *TAp73* a favor de las últimas, facilitando sus actividades pro-tumorales. Además, la presencia de las variantes

ΔTAp73, incluso a niveles bajos, suprimiría la actividad transcripcional de *TAp73*, y por tanto, sus actividades supresoras tumorales (Grob et al., 2001; Stiewe et al., 2002). En este sentido, el uso de compuestos que incrementen la estabilidad de *TAp73* o regulen negativamente a las variantes *ΔTAp73*, como netrin-1, Vitamina D, algunos componentes del vino tinto u otros (Achour et al., 2013; Díaz et al., 2010; Onoda et al., 2011; Shamma et al., 2006; Sharif et al., 2010; Tiwary et al., 2011; Wong et al., 2011) podría ser una forma interesante de disminuir la oncogenicidad del ambiente tumoral.

La asociación que encontramos entre los niveles altos de expresión de las isoformas *ΔTAp73* con un peor pronóstico de los pacientes podría deberse a la regulación por parte de estas de una serie de genes diana implicados en procesos de resistencia, invasividad y otros procesos tumorigénicos. Algunos genes relacionados con la pérdida de sensibilidad a los tratamientos quimioterápicos como *ABCB1*, *HMGB1* y *CASPI*, entre otros, se han descrito como dianas transcripcionales de *TP73*. Concretamente, algunos estudios apoyan la regulación positiva de la expresión de *ABCB1* y *HMGB1* por las variantes *ΔTAp73* (Johnson et al., 2005; Uramoto et al., 2003; Vilgelm et al., 2008b) mientras que serían las isoformas *TAp73* las encargadas de transactivar a *CASPI* (Jain et al., 2005). Estos estudios previos apoyan los resultados obtenidos en la primera parte de este trabajo en la que observamos que existe una correlación directa estadísticamente significativa entre la expresión de *ΔEx2p73*, *ΔEx2/3p73* y *ΔNp73* y los niveles de *HMGB1 in vitro* y en los pacientes. En el mismo sentido, encontramos una tendencia entre los niveles de expresión de estas isoformas y *ABCB1*. Estos resultados apoyan la posible regulación *in vivo* de *HMGB1* y *ABCB1* por las isoformas *ΔTAp73* en carcinoma de colon. Probablemente, en una serie con un mayor número de individuos las correlaciones encontradas alcanzarían una mayor potencia estadística. Por otro lado, y aunque *CASPI* también se ha descrito *in vitro* como diana de *TAp73* (Jain et al., 2005), no hemos encontrado correlaciones estadísticamente significativas en nuestra serie de pacientes. Es posible, como hemos comentado anteriormente, que en el contexto tumoral del paciente la sobre-expresión de las formas oncogénicas junto con las supresoras, se traduzca en un inhibición de la actividad transcripcional de estas últimas por las primeras.

Adicionalmente, nuestros resultados muestran que la sobre-expresión tanto de *ABCB1* como *HMGB1* se asocia con supervivencias más cortas de los pacientes con cáncer de colon. Mediante el análisis multivariante, en el que se incluyen los parámetros clínico-patológicos de los tumores y los niveles de expresión de las isoformas de *TP73*, *HMGB1*, *ABCB1* y *CASPI* hemos observado que, junto con estadio tumoral, *HMGB1* y *ABCB1* son indicadores potentes e independientes de SG. Estos datos ponen de manifiesto la importancia de la identificación de dianas específicas de las isoformas *ΔTAp73*, responsables de sus funciones oncogénicas y que, además, podrían predecir el pronóstico de los pacientes mejor que ellas mismas, pudiendo utilizarse como marcadores pronóstico en la práctica clínica. Hasta la fecha, poco se sabía sobre

la relevancia clínica de *ABCBI* y *HMGB1* en la supervivencia de los pacientes con cáncer colorrectal, aunque algunos estudios centrados en otros tipos tumorales se ha descrito la asociación entre su elevada expresión y supervivencias más cortas de los pacientes (Sinicrope et al., 1994; D. Wu et al., 2008; Yao et al., 2010, p. 1).

Aunque hay varios trabajos que describen las etapas del proceso tumoral donde las isoformas de *TP73* podrían estar implicadas, muchos de los datos publicados no son concluyentes o no han sido corroborados por otros grupos. En este contexto, nuestros datos muestran por primera vez una relación directa entre la sobre-expresión de $\Delta Np73$ y un aumento de la tasa proliferativa de las células tumorales. Además, los resultados de este trabajo corroboran los datos obtenidos por otros grupos en otros tipos tumorales en los que una menor sensibilidad a los tratamientos quimioterápicos está asociada a niveles altos de expresión de $\Delta Np73$. El hecho de que la tasa de proliferación y la resistencia al tratamiento con oxaliplatino sea mayor en las células de cáncer de colon que expresan ectópicamente $\Delta Np73$, siendo el incremento de ambos fenómenos directamente proporcional a los niveles de expresión de esta isoforma, refuerza nuestra hipótesis sobre el potencial oncogénico de $\Delta Np73$ y su implicación en etapas concretas del proceso tumoral. A pesar de los resultados opuestos de algunos grupos en los que la sobre-expresión de $\Delta Np73$ no se traducía en un incremento de la proliferación celular (Marabese et al., 2005) y de la controversia que ha surgido a partir de los últimos trabajos que describen a *TAp73* como un regulador central del metabolismo celular e importante inductor de proliferación celular, incluso en presencia de $\Delta Np73$ y de formas mutantes de P53 (Amelio et al., 2013; Du et al., 2013; Jiang et al., 2013b; Velletri et al., 2013), tanto los datos *in vitro* como los obtenidos en nuestros experimentos en ratones muestran un claro incremento en la tasa de crecimiento en células o xenotransplantes tumorales que sobre-expresan $\Delta Np73$. Algunos autores apuntan que el papel de supresor u oncogénico de *TAp73* es dependiente del tipo y contexto celular y que en el caso de osteosarcoma (La Sala et al., 2003; Park et al., 2004), su sobre-expresión puede estar relacionada con funciones pro-tumorigénicas. Además, dada la controversia surgida a partir de los últimos trabajos que describen a *TAp73* como un regulador central del metabolismo e importante inductor de proliferación celular (Amelio et al., 2013; Rabinowitz and White, 2010; Velletri et al., 2013,) incluso en presencia de $\Delta Np73$ y de formas mutantes de P53, no podemos descartar que en un determinado contexto tumoral la activación por las formas *TAp73* de rutas metabólicas específicas confiera ventajas a las células tumorales que, junto con las actividades oncogénicas de $\Delta Np73$, puedan resultar en un tumor más agresivo. Por otro lado, el desarrollo de resistencia al oxaliplatino en las células de cáncer de colon con expresión ectópica de $\Delta Np73$ descrita en nuestros resultados *in vitro* e *in vivo* apoyan los datos descritos en otros trabajos realizados en otros tipos tumorales y con el uso de otras drogas en los que la presencia de altos niveles de $\Delta Np73$ se asocian con procesos de resistencia a los quimioterápicos convencionales (Concin et al., 2005; Schuster et al., 2010; Thangasamy et

al., 2010). Aún así un estudio reciente muestra resultados opuestos, en los que la expresión de $\Delta Np73$ no afecta a la sensibilidad de las células tratadas con cisplatino (Löf et al., 2012). Esta controversia pudiera deberse a que la implicación de $\Delta Np73$ en la respuesta al tratamiento sea específica de algunos platinos. Existen datos contradictorios en cuanto a la modificación de los niveles endógenos de las isoformas de $TP73$ tras la exposición a oxaliplatino. Así, algunos trabajos describen la sobre-expresión de las isoformas $TAp73$ como consecuencia del tratamiento con oxaliplatino, respuesta potencialmente supresora tumoral que podría asociarse al daño genómico inducido (Herreros-Villanueva et al., 2010), sin embargo otros estudios no observan esta alteración en la expresión (Koivusalo et al., 2002; Wakasugi et al., 2007). En nuestro caso, no hemos detectado modificaciones en los niveles de las isoformas de $TP73$ como consecuencia del tratamiento citotóxico. Es posible que en aquellas células que previamente cuentan con una alta expresión de $\Delta Np73$ y, por tanto resistentes al tratamiento con el oxaliplatino, sean seleccionadas gradualmente, dando lugar a un fenotipo tumoral resistente.

El auge en el conocimiento de la ruta de autofagia y su papel dual durante el proceso tumoral la sitúa como un posible contribuyente al fenotipo maligno, y más específicamente, como un mecanismo de resistencia a los tratamientos convencionales contra el cáncer, aunque poco se sabe sobre los genes que desencadenan esta respuesta.

El hecho que nosotros describimos en este trabajo en el que la sobre-expresión de la isoforma $\Delta Np73$ promueve fenómenos de quimio-resistencia, junto con los datos descritos por distintos autores en los que las variantes $TAp73$ podrían regular la vía de autofagia mediante la modulación de algunos genes diana de la ruta mTOR (Rosenbluth et al., 2008) o de algunos genes clave el desarrollo de la ruta (Kenzelmann Broz et al., 2013) sitúan al proceso de autofagia como una vía atractiva en la que centrar nuestros esfuerzos. Así, los resultados que hemos obtenido indican que el aumento de la autofagia en las células con sobre-expresión de $\Delta Np73$ podría ser responsable, al menos en parte, del fenotipo resistente al oxaliplatino promovido por la misma. Este dato se ve reforzado por los resultados que muestran que la inhibición de la ruta autofágica con cloroquina en células que sobre-expresan $\Delta Np73$ sensibilizan a estas al tratamiento con oxaliplatino *in vitro* y en los animales de experimentación sujetos de estudio. La activación del sistema inmune y la acumulación de P53 produciendo parada del ciclo celular desencadenada por la cloroquina (Kimura et al., 2013) podría explicar la disminución de la viabilidad celular detectada después del tratamiento. El hecho de que no obtengamos este efecto en los xenotransplantes tumorales derivados de las células con sobre-expresión para $\Delta Np73$ revela la agresividad de este fenotipo tumoral.

En los pacientes con cáncer colorrectal encontramos una correlación directa estadísticamente significativa entre la expresión de $\Delta Np73$ y los niveles de $ULK1$, $ULK2$, $ATG4C$, $ATG4D$ y $BECN1$, dato que nos hace proponer a estos genes relacionados con el

proceso de autofagia como potenciales dianas de la isoforma $\Delta Np73$ *in vivo*. Estos resultados apoyan igualmente su posible participación en la inducción de la vía ante un determinado contexto fisiológico, como lo es la sobre-expresión de $\Delta Np73$ durante el desarrollo tumoral. De los genes de esta vía analizados ATG4D podría predecir el pronóstico de los pacientes con cáncer de colon. Hasta la fecha, ningún trabajo ha descrito la relevancia clínica de los genes *ULK1*, *ULK2*, *ATG4C* y *ATG4D*. Sin embargo, los estudios sobre la asociación entre los niveles de expresión de *BECN1* con el pronóstico de los pacientes con cáncer muestran datos controvertidos. Es posible que la implicación de estos genes de la ruta de autofagia en la supervivencia de los pacientes con cáncer dependa del tipo tumoral, en este sentido aunque nuestros datos apoyarían a *BECN1* como diana de $\Delta Np73$ en cáncer colorrectal no lo muestran como un marcador con posible valor pronóstico. Algunos estudios afirman que la progresión de las lesiones tumorales de colon está acompañada del incremento de los niveles en los marcadores de autofagia (Selvakumaran et al., 2013) al igual que ocurre con los niveles de $\Delta Np73$ (Domínguez et al., 2006b) lo que es acorde a los resultados que presentamos.

Podemos concluir que múltiples estudios apoyan el papel oncogénico de las isoformas $\Delta TAp73$ (Refs), aunque todavía se desconocen los mecanismos y dianas responsables de estas funciones. En la primera parte de este trabajo, se describe el impacto de la expresión de las diferentes isoformas de *TP73* en la supervivencia de los pacientes con cáncer de colon. Además, se describen genes diana de las isoformas $\Delta TAp73$ que podrían utilizarse como marcadores pronóstico. Concretamente, la sobre-expresión de *ABCBI* y *HMGB1* predice de manera robusta e independiente, junto con estadio tumoral, la supervivencia global de los pacientes diagnosticados con cáncer de colon. El incremento en la tasa proliferativa de las células que sobre-expresan la variante $\Delta Np73$ y su mayor resistencia a los tratamientos quimioterápicos podrían ser la causa de las supervivencias más cortas en los pacientes. Esta menor sensibilidad a los agentes genotóxicos de aquellos tumores que presentan niveles elevados de $\Delta Np73$ podría deberse, en parte, a la inducción por esta isoforma de la ruta de autofagia, aunque se abordarán en el futuro otras vías relacionadas con procesos de quimiorresistencia como posibles dianas de $\Delta Np73$ e igualmente responsables del fenotipo resistente.

5.2 Implicación de las isoformas $\Delta Np73$ en comunicación intercelular

En los últimos años los exosomas derivados de las células tumorales están emergiendo como mediadores sistémicos de la información oncogénica entre células a través de la transferencia horizontal de ARNm, microARN, ADN y proteínas durante el proceso tumoral (Peinado et al., 2012; Thakur et al., 2014; Zhuang et al., 2012) (Ref). Recientes estudios han descrito que el contenido exosomal es biológicamente activo en la célula receptora pudiendo alterar el destino final de ésta (Peinado et al., 2012; Taylor and Gerçel-Taylor, 2005; Valadi et al., 2007)(Ref). Por ello, la identificación de la carga molecular de los exosomas es esencial para determinar su función durante etapas específicas del proceso tumoral.

Algunos trabajos han sugerido que la carga genética exosomal no es un simple reflejo del contenido de la célula de origen, si no que el contenido de ARNs específicos es selectivamente empaquetado en los exosomas (Baj-Krzyworzeka et al., 2006; Koga et al., 2005; Mittelbrunn and Sánchez-Madrid, 2012; Montecalvo et al., 2012)(Refs), indicando la existencia de mecanismos específicos, y todavía desconocidos, que controlan la liberación de una carga concreta. En la segunda parte de este trabajo mostramos resultados que apoyan esta hipótesis. Por un lado, hemos observado que, a pesar de que no existen diferencias en el número de exosomas liberados, aquellos que derivaban de las células que sobre-expresan $\Delta Np73$ contienen niveles más altos de su ARNm que las células control. Asimismo, los exosomas derivados del plasma de donantes sanos contienen niveles de $\Delta Np73$ más bajos que aquellos obtenidos de los pacientes con cáncer de colon. Ambas aproximaciones sugieren que aquellas células que presentan niveles de expresión de $\Delta Np73$ más altos podrían empaquetar una mayor cantidad de su ARNm en sus exosomas. Sin embargo, el hecho de que los niveles relativos de $\Delta Np73$ en los tejidos tumorales sean más bajos que en los exosomas derivados de ese individuo, sugiere que el $\Delta Np73$ exosomal no es un reflejo directo del contenido de la célula de origen. Así, a pesar de los altos niveles de $\Delta Np73$ que puedan existir en células o tejidos de origen, los resultados parecen apuntar a la existencia de un mecanismo de enriquecimiento de $\Delta Np73$ en los exosomas liberados por las células tumorales. Sin embargo, todavía no ha sido descrito ningún proceso para $\Delta Np73$ u otros ARNm.

Es llamativa la correlación inversa que hemos observado entre la cantidad de exosomas liberados en los pacientes con cáncer de colon (cuantificados por la expresión de Ber-EP4, la actividad acetilcolinesterasa y la concentración de proteína exosomal) y la cantidad de $\Delta Np73$ en el tejido. Dados los resultados, claramente son necesarios experimentos adicionales para evaluar si $\Delta Np73$ está implicada en el mecanismo de liberación de exosomas *in vivo*.

Aunque los resultados obtenidos del estudio del ratón nulo específico para $\Delta Np73$ apoyan el papel oncogénico de esta isoforma, dado que son animales más susceptibles al desarrollo de tumores (Wilhelm et al., 2010), pocos estudios lo relacionan con etapas o procesos

específicos durante la tumorigénesis. Los resultados obtenidos en la segunda parte de este trabajo describen una nueva posible implicación de $\Delta Np73$ durante el proceso tumoral, siendo específicamente empaquetado en los exosomas derivados de las células tumorales e incorporado selectivamente por diferentes células del ambiente tumoral, epiteliales, endoteliales y fibroblastos, donde es funcionalmente activo y capaz de ejecutar sus funciones oncogénicas, tales como conferir un incremento en la tasa de proliferación celular y la pérdida de sensibilidad a drogas quimioterapéuticas como el oxaliplatino, propiedades descritas en la primera parte de este trabajo. La transferencia de información genética que regule procesos de proliferación y supervivencia a clones tumorales que no han adquirido estas capacidades, puede suponer una clara ventaja para la progresión tumoral. Asimismo, la adquisición de información por parte de los fibroblastos asociados al tumor (del inglés *Cancer Associated Fibroblast*, CAF) incrementando su proliferación y resistencia, podría directamente beneficiar a la proliferación tumoral, la invasión y la metástasis (Xing et al., 2010). Así, el aumento del potencial proliferativo de los fibroblastos podría desencadenar la activación de vías de señalización implicadas en la ganancia de propiedades de los CAF (Pruitt et al., 2012). Es incuestionable, que la descripción por la comunidad científica de funciones nuevas, específicas y oncogénicas para $\Delta Np73\beta$ nos ayudará a aclarar su función cuando es empaquetado y liberado al ambiente tumoral, así como su posible explotación en la práctica clínica.

Los experimentos realizados en ratones también apoyan la funcionalidad de $\Delta Np73\beta$ en las células receptoras, adquiriendo un mayor volumen tumoral aquellos individuos tratados con exosomas enriquecidos en nuestra isoforma de estudio. Además, nuestra aproximación *in vivo* sugiere la existencia de fenómenos “*instigador*” similar al descrito por Weinberg (McAllister et al., 2008). Weinberg describe que el crecimiento de un tumor indolente puede verse dirigido a nivel sistémico por factores endocrinos liberados por un segundo tumor más agresivo. En el modelo presentado en este trabajo, un tumor agresivo que sobre-expresa $\Delta Np73\beta$ induce un comportamiento similar en un tumor más indolente presumiblemente a través de la liberación de exosomas ricos en $\Delta Np73$, ya que al final del experimento el tumor inicialmente más indolente presenta niveles más altos de $\Delta Np73\beta$ que los inicialmente observados. En este contexto, los exosomas enriquecidos en $\Delta Np73$ podrían producir alteraciones en la médula ósea (Peinado et al., 2012) o afectar al tumor directamente, aunque los mecanismos de acción no han sido abordados en el presente estudio.

La detección de $\Delta Np73$ en exosomas derivados de pacientes con cáncer de colon, junto con los resultados que muestran que sus niveles de expresión predicen la supervivencia mejor que los niveles de $\Delta Np73\beta$ en el tejido tumoral, hacen prometedor su posible uso como un marcador pronóstico, aunque nuestros datos deben tomarse como preliminares debido al pequeño tamaño de nuestra serie de pacientes. En este sentido, es llamativo que los niveles del

antígeno carcinoembrionario (CEA), un marcador clásico de pronóstico y diagnóstico de los pacientes con cáncer de colon, esté asociado con los niveles de $\Delta Np73$ exosomal. Aunque nuestros datos deben tomarse como preliminares debido al pequeño tamaño de nuestra serie de pacientes, observamos una tendencia entre los niveles de $\Delta Np73$ exosomal y la supervivencia libre de enfermedad o global de los pacientes ($P=0.07$ y $P=0.1$, respectivamente), lo cual destaca el potente uso de los niveles de $\Delta Np73$ exosomal como marcador pronóstico. Incluso si el valor pronóstico de los niveles de $\Delta Np73$ en el tejido tumoral y en los exosomas fuera similar, la obtención de la muestra de análisis mediante una extracción de sangre rutinaria facilitaría, en gran medida, el traslado a la práctica clínica. A diferencia de otros trabajos (Peinado et al., 2012), el uso de la concentración de proteína exosomal como predictor del pronóstico de los pacientes no ha resultado positivo. Probablemente, esta asociación es específica del tipo tumoral. A pesar de lo prometedor de nuestros resultados, es estrictamente necesaria la ampliación de los estudios en series más largas e independientes.

La comunicación intercelular mediante el contenido de los exosomas parece ser una vía esencial para la progresión tumoral (Peinado et al., 2012; Zhuang et al., 2012). En la segunda parte de este trabajo, mostramos resultados que apoyan el empaquetamiento selectivo de $\Delta Np73\beta$ en exosomas derivados de células tumorales de cáncer de colon, así como su funcionalidad en las células receptoras epiteliales y del microambiente tumoral. Es importante destacar, que el análisis de los niveles de $\Delta Np73\beta$ en exosomas con fines pronósticos podría ser llevado a cabo mediante la obtención de una muestra de sangre por un método no invasivo, con las ventajas que este hecho conlleva con respecto a los algunos métodos de la práctica clínica actual.

6 CONCLUSIONES

1. La sobre-expresión de $\Delta Ex2/3p73$ y $\Delta Np73$ en pacientes con cáncer de colon se asocia con supervivencias globales de los enfermos más cortas, aunque solo el estadio tumoral se mantiene como factor independiente en el análisis multivariante.
2. En pacientes diagnosticados con cáncer colorrectal existe una correlación directa estadísticamente significativa entre la expresión de las isoformas oncogénicas de *TP73* y los niveles de *HMGB1*. También hemos observado una tendencia en el mismo sentido entre estas variantes y *ABCB1*. Este hecho apoya la posible regulación positiva de *HMGB1* y *ABCB1*, genes asociados a procesos de quimio-resistencia, por las isoformas $\Delta TAp73$ *in vivo*.
3. La sobre-expresión de *HMGB1* y *ABCB1* se asocia con supervivencias globales más cortas de los pacientes, además de revelarse como factores predictivos potentes e independientes, junto con estadio tumoral, en el análisis multivariante. De esta manera, estas dianas de las isoformas oncogénicas de *TP73* nos informan sobre el comportamiento de la enfermedad y la evolución de los pacientes de una manera más robusta que las distintas variantes de *TP73*.
4. La sobre-expresión de $\Delta Np73$ en distintas líneas celulares derivadas de tumores humanos de colon y en xenotransplantes de animales de experimentación se asocia a un incremento en la proliferación celular y en la resistencia a oxaliplatino y podría justificar las supervivencias más cortas observadas en los pacientes que presentan sobre-expresión de la misma.
5. $\Delta Np73$ activa la cascada autofágica. Además, La inhibición de esta ruta de la autofagia en líneas celulares de cáncer de colon y en ratones con xenotransplantes tumorales con sobre-expresión de $\Delta Np73$ recupera la sensibilidad al tratamiento con oxaliplatino, y podría justificar, al menos en parte, la resistencia a los tratamientos quimioterápicos desencadenada por los altos niveles de expresión de esta isoforma.
6. En pacientes diagnosticados con cáncer colorrectal existe una correlación directa estadísticamente significativa entre la expresión de $\Delta Np73$ y los niveles de *ULK1*, *ULK2*, *ATG4C*, *ATG4D* y *BECN1*. Este hecho apoya la posible regulación positiva de los genes asociados con autofagia por $\Delta Np73$ *in vivo*. *ATG4D* podría resultar de utilidad como marcador pronóstico.

7. Los exosomas derivados de células tumorales con sobre-expresión de $\Delta Np73$ están enriquecidos en su ARNm. Éste puede ser transferido a células epiteliales y del microambiente tumoral de forma dependiente del tipo celular.
8. El $\Delta Np73$ contenido en exosomas modula la proliferación celular de las células receptoras y les confiere resistencia a quimioterápicos. Los experimentos en ratones corroboran la funcionalidad del $\Delta Np73$ exosomal y apoyan su papel como un posible mediador de un fenómeno tipo “*instigador*”.
9. $\Delta Np73$ es detectado en los exosomas derivados de pacientes con cáncer de colon en niveles más altos que en los controles sanos. Los niveles relativos de $\Delta Np73$ en los exosomas son más altos que en el tejido tumoral del que provienen, lo que sugiere que el contenido exosomal no es un simple reflejo del contenido de las células del que proceden. La cantidad de exosomas liberados está inversamente correlacionado con el contenido de $\Delta Np73$ en el tejido tumoral.
10. El $\Delta Np73$ contenido en los exosomas puede ser un potencial indicador de evolución clínica ya que sus niveles de expresión están asociados con la supervivencia de los pacientes.

7 BIBLIOGRAFÍA

Abassi, Y.A., Xi, B., Zhang, W., Ye, P., Kirstein, S.L., Gaylord, M.R., Feinstein, S.C., Wang, X., Xu, X., 2009. Kinetic cell-based morphological screening: prediction of mechanism of compound action and off-target effects. *Chem. Biol.* 16, 712–723. doi:10.1016/j.chembiol.2009.05.011

Abusamra, A.J., Zhong, Z., Zheng, X., Li, M., Ichim, T.E., Chin, J.L., Min, W.-P., 2005. Tumor exosomes expressing Fas ligand mediate CD8⁺ T-cell apoptosis. *Blood Cells. Mol. Dis.* 35, 169–173. doi:10.1016/j.bcmed.2005.07.001

Achour, M., Mousli, M., Alhosin, M., Ibrahim, A., Peluso, J., Muller, C.D., Schini-Kerth, V.B., Hamiche, A., Dhe-Paganon, S., Bronner, C., 2013. Epigallocatechin-3-gallate up-regulates tumor suppressor gene expression via a reactive oxygen species-dependent down-regulation of UHRF1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 430, 208–212. doi:10.1016/j.bbrc.2012.11.087

Admyre, C., Grunewald, J., Thyberg, J., Gripenbäck, S., Tornling, G., Eklund, A., Scheynius, A., Gabrielsson, S., 2003. Exosomes with major histocompatibility complex class II and costimulatory molecules are present in human BAL fluid. *Eur. Respir. J.* 22, 578–583.

Admyre, C., Johansson, S.M., Qazi, K.R., Filén, J.-J., Lahesmaa, R., Norman, M., Neve, E.P.A., Scheynius, A., Gabrielsson, S., 2007. Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 179, 1969–1978.

Agami, R., Blandino, G., Oren, M., Shaul, Y., 1999. Interaction of c-Abl and p73alpha and their collaboration to induce apoptosis. *Nature* 399, 809–813. doi:10.1038/21697

Agostini, M., Tucci, P., Killick, R., Candi, E., Sayan, B.S., Rivetti di Val Cervo, P., Nicotera, P., McKeon, F., Knight, R.A., Mak, T.W., Melino, G., 2011. Neuronal differentiation by TAp73 is mediated by microRNA-34a regulation of synaptic protein targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 21093–21098. doi:10.1073/pnas.1112061109

Akers, J.C., Gonda, D., Kim, R., Carter, B.S., Chen, C.C., 2013. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J. Neurooncol.* 113, 1–11. doi:10.1007/s11060-013-1084-8

Al-Nedawi, K., Meehan, B., Rak, J., 2009. Microvesicles: messengers and mediators of tumor progression. *Cell Cycle Georget. Tex* 8, 2014–2018.

Alexandrova, E.M., Talos, F., Moll, U.M., 2013. p73 is dispensable for commitment to neural stem cell fate, but is essential for neural stem cell maintenance and for blocking premature differentiation. *Cell Death Differ.* 20, 368. doi:10.1038/cdd.2012.134

Alla, V., Kowtharapu, B.S., Engelmann, D., Emmrich, S., Schmitz, U., Steder, M., Pützer, B.M., 2012. E2F1 confers anticancer drug resistance by targeting ABC transporter family members and Bcl-2 via the p73/DNp73-miR-205 circuitry. *Cell Cycle Georget. Tex* 11, 3067–3078. doi:10.4161/cc.21476

Allocati, N., Di Ilio, C., De Laurenzi, V., 2012. p63/p73 in the control of cell cycle and cell death. *Exp. Cell Res.* 318, 1285–1290. doi:10.1016/j.yexcr.2012.01.023

Ambudkar, S.V., Kimchi-Sarfaty, C., Sauna, Z.E., Gottesman, M.M., 2003. P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene* 22, 7468–7485. doi:10.1038/sj.onc.1206948

Amelio, I., Markert, E.K., Rufini, A., Antonov, A.V., Sayan, B.S., Tucci, P., Agostini, M., Mineo, T.C., Levine, A.J., Melino, G., 2013. p73 regulates serine biosynthesis in cancer. *Oncogene*. doi:10.1038/onc.2013.456

Aoki, I., Higuchi, M., Gotoh, Y., 2012. NEDDylation controls the target specificity of E2F1 and apoptosis induction. *Oncogene*. doi:10.1038/onc.2012.428

Baj-Krzyworzeka, M., Szatanek, R., Weglarczyk, K., Baran, J., Urbanowicz, B., Brański, P., Ratajczak, M.Z., Zembala, M., 2006. Tumour-derived microvesicles carry several surface determinants and mRNA of tumour cells and transfer some of these determinants to monocytes. *Cancer Immunol. Immunother. CII* 55, 808–818. doi:10.1007/s00262-005-0075-9

Beach, A., Zhang, H.-G., Ratajczak, M.Z., Kakar, S.S., 2014. Exosomes: an overview of biogenesis, composition and role in ovarian cancer. *J. Ovarian Res.* 7, 14. doi:10.1186/1757-2215-7-14

Becker, K., Pancoska, P., Concin, N., Vanden Heuvel, K., Slade, N., Fischer, M., Chalas, E., Moll, U.M., 2006. Patterns of p73 N-terminal isoform expression and p53 status have prognostic value in gynecological cancers. *Int. J. Oncol.* 29, 889–902.

Beckham, C.J., Olsen, J., Yin, P.-N., Wu, C.-H., Ting, H.-J., Hagen, F.K., Scosyrev, E., Messing, E.M., Lee, Y.-F., 2014. Bladder Cancer Exosomes Contain EDIL-3/Del1 and Facilitate Cancer Progression. *J. Urol.* doi:10.1016/j.juro.2014.02.035

Bell, H.S., Dufes, C., O’Prey, J., Crighton, D., Bergamaschi, D., Lu, X., Schätzlein, A.G., Vousden, K.H., Ryan, K.M., 2007. A p53-derived apoptotic peptide derepresses p73 to cause tumor regression in vivo. *J. Clin. Invest.* 117, 1008–1018. doi:10.1172/JCI28920

Bell, H.S., Ryan, K.M., 2008. iASPP inhibition: increased options in targeting the p53 family for cancer therapy. *Cancer Res.* 68, 4959–4962. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0182

Bellingham, S.A., Coleman, B.M., Hill, A.F., 2012. Small RNA deep sequencing reveals a distinct miRNA signature released in exosomes from prion-infected neuronal cells. *Nucleic Acids Res.* 40, 10937–10949. doi:10.1093/nar/gks832

Belloni, L., Moretti, F., Merlo, P., Damalas, A., Costanzo, A., Blandino, G., Levrero, M., 2006. DNp73alpha protects myogenic cells from apoptosis. *Oncogene* 25, 3606–3612. doi:10.1038/sj.onc.1209321

Bergamaschi, D., Gasco, M., Hiller, L., Sullivan, A., Syed, N., Trigiante, G., Yulug, I., Merlano, M., Numico, G., Comino, A., Attard, M., Reelfs, O., Gusterson, B., Bell, A.K., Heath, V., Tavassoli, M., Farrell, P.J., Smith, P., Lu, X., Crook, T., 2003. p53 polymorphism influences response in cancer chemotherapy via modulation of p73-dependent apoptosis. *Cancer Cell* 3, 387–402.

Bourdon, J.-C., Fernandes, K., Murray-Zmijewski, F., Liu, G., Diot, A., Xirodimas, D.P.,

- Saville, M.K., Lane, D.P., 2005. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev.* 19, 2122–2137. doi:10.1101/gad.1339905
- Brosh, R., Rotter, V., 2009. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat. Rev. Cancer* 9, 701–713. doi:10.1038/nrc2693
- Buhlmann, S., Pützer, B.M., 2008. DNp73 a matter of cancer: mechanisms and clinical implications. *Biochim. Biophys. Acta* 1785, 207–216. doi:10.1016/j.bbcan.2008.01.002
- Caby, M.-P., Lankar, D., Vincendeau-Scherrer, C., Raposo, G., Bonnerot, C., 2005. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int. Immunol.* 17, 879–887. doi:10.1093/intimm/dxh267
- Cai, Y., Qiu, S., Gao, X., Gu, S.-Z., Liu, Z.-J., 2012. iASPP inhibits p53-independent apoptosis by inhibiting transcriptional activity of p63/p73 on promoters of proapoptotic genes. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 17, 777–783. doi:10.1007/s10495-012-0728-z
- Candi, E., Agostini, M., Melino, G., Bernassola, F., 2014. How the TP53 Family Proteins TP63 and TP73 Contribute to Tumorigenesis: Regulators and Effectors. *Hum. Mutat.* doi:10.1002/humu.22523
- Casciano, I., Mazzocco, K., Boni, L., Pagnan, G., Banelli, B., Allemanni, G., Ponzoni, M., Tonini, G.P., Romani, M., 2002. Expression of DeltaNp73 is a molecular marker for adverse outcome in neuroblastoma patients. *Cell Death Differ.* 9, 246–251. doi:10.1038/sj.cdd.4400993
- Chaput, N., Théry, C., 2011. Exosomes: immune properties and potential clinical implementations. *Semin. Immunopathol.* 33, 419–440. doi:10.1007/s00281-010-0233-9
- Chavez-Muñoz, C., Morse, J., Kilani, R., Ghahary, A., 2008. Primary human keratinocytes externalize stratifin protein via exosomes. *J. Cell. Biochem.* 104, 2165–2173. doi:10.1002/jcb.21774
- Cheng, H.Y., Zhang, Y.N., Wu, Q.L., Sun, X.M., Sun, J.R., Huang, X., 2012. Expression of beclin 1, an autophagy-related protein, in human cervical carcinoma and its clinical significance. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 33, 15–20.
- Coates, P.J., 2006. Regulating p73 isoforms in human tumours. *J. Pathol.* 210, 385–389. doi:10.1002/path.2080
- Collins, K., Jacks, T., Pavletich, N.P., 1997. The cell cycle and cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 2776–2778.
- Concin, N., Becker, K., Slade, N., Erster, S., Mueller-Holzner, E., Ulmer, H., Daxenbichler, G., Zeimet, A., Zeillinger, R., Marth, C., Moll, U.M., 2004. Transdominant DeltaTAp73 isoforms are frequently up-regulated in ovarian cancer. Evidence for their role as epigenetic p53 inhibitors in vivo. *Cancer Res.* 64, 2449–2460.
- Concin, N., Hofstetter, G., Berger, A., Gehmacher, A., Reimer, D., Watrowski, R., Tong, D., Schuster, E., Hefler, L., Heim, K., Mueller-Holzner, E., Marth, C., Moll, U.M., Zeimet, A.G., Zeillinger, R., 2005. Clinical relevance of dominant-negative p73 isoforms for responsiveness

to chemotherapy and survival in ovarian cancer: evidence for a crucial p53-p73 cross-talk in vivo. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 11, 8372–8383. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-0899

Conde-Vancells, J., Rodriguez-Suarez, E., Gonzalez, E., Berisa, A., Gil, D., Embade, N., Valle, M., Luka, Z., Elortza, F., Wagner, C., Lu, S.C., Mato, J.M., Falcon-Perez, M., 2010. Candidate biomarkers in exosome-like vesicles purified from rat and mouse urine samples. *Proteomics Clin. Appl.* 4, 416–425. doi:10.1002/prca.200900103

Coutandin, D., Löhr, F., Niesen, F.H., Ikeya, T., Weber, T.A., Schäfer, B., Zielonka, E.M., Bullock, A.N., Yang, A., Güntert, P., Knapp, S., McKeon, F., Ou, H.D., Dötsch, V., 2009. Conformational stability and activity of p73 require a second helix in the tetramerization domain. *Cell Death Differ.* 16, 1582–1589. doi:10.1038/cdd.2009.139

Davison, T.S., Vagner, C., Kaghad, M., Ayed, A., Caput, D., Arrowsmith, C.H., 1999. p73 and p63 are homotetramers capable of weak heterotypic interactions with each other but not with p53. *J. Biol. Chem.* 274, 18709–18714.

De Gassart, A., Geminard, C., Fevrier, B., Raposo, G., Vidal, M., 2003. Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood* 102, 4336–4344. doi:10.1182/blood-2003-03-0871

De Laurenzi, V., Costanzo, A., Barcaroli, D., Terrinoni, A., Falco, M., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Levrero, M., Melino, G., 1998. Two new p73 splice variants, gamma and delta, with different transcriptional activity. *J. Exp. Med.* 188, 1763–1768.

De Laurenzi, V., Raschellá, G., Barcaroli, D., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Ranalli, M., Catani, M.V., Tanno, B., Costanzo, A., Levrero, M., Melino, G., 2000. Induction of neuronal differentiation by p73 in a neuroblastoma cell line. *J. Biol. Chem.* 275, 15226–15231.

De Laurenzi, V.D., Catani, M.V., Terrinoni, A., Corazzari, M., Melino, G., Costanzo, A., Levrero, M., Knight, R.A., 1999. Additional complexity in p73: induction by mitogens in lymphoid cells and identification of two new splicing variants epsilon and zeta. *Cell Death Differ.* 6, 389–390. doi:10.1038/sj.cdd.4400521

Degenhardt, K., Mathew, R., Beaudoin, B., Bray, K., Anderson, D., Chen, G., Mukherjee, C., Shi, Y., Gélinas, C., Fan, Y., Nelson, D.A., Jin, S., White, E., 2006. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell* 10, 51–64. doi:10.1016/j.ccr.2006.06.001

Degryse, B., Bonaldi, T., Scaffidi, P., Müller, S., Resnati, M., Sanvito, F., Arrighi, G., Bianchi, M.E., 2001. The high mobility group (HMG) boxes of the nuclear protein HMG1 induce chemotaxis and cytoskeleton reorganization in rat smooth muscle cells. *J. Cell Biol.* 152, 1197–1206.

Denes, A., Lopez-Castejon, G., Brough, D., 2012. Caspase-1: is IL-1 just the tip of the ICEberg? *Cell Death Dis.* 3, e338. doi:10.1038/cddis.2012.86

Di, C., Yang, L., Zhang, H., Ma, X., Zhang, X., Sun, C., Li, H., Xu, S., An, L., Li, X., Bai, Z.,

2013. Mechanisms, function and clinical applications of DNp73. *Cell Cycle* 12, 1861–1867. doi:10.4161/cc.24967

Di, C.-X., Yang, L.-N., Zhang, H., An, L.-Z., Zhang, X., Ma, X.-F., Sun, C., Wang, X.-H., Yang, R., Wu, Z.-H., Si, J., 2013. Effects of carbon-ion beam or X-ray irradiation on anti-apoptosis Δ Np73 expression in HeLa cells. *Gene* 515, 208–213. doi:10.1016/j.gene.2012.11.040

Di Nardo, A., Wertz, M.H., Kwiatkowski, E., Tsai, P.T., Leech, J.D., Greene-Colozzi, E., Goto, J., Dilsiz, P., Talos, D.M., Clish, C.B., Kwiatkowski, D.J., Sahin, M., 2014. Neuronal Tsc1/2 complex controls autophagy through AMPK-dependent regulation of ULK1. *Hum. Mol. Genet.* doi:10.1093/hmg/ddu101

Díaz, R., González-Sancho, J.M., Soldevilla, B., Silva, J., García, J.M., García, V., Peña, C., Herrera, M., Gómez, I., Bonilla, F., Domínguez, G., 2010. Differential regulation of TP73 isoforms by $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D3 and survivin in human colon and breast carcinomas. *Genes. Chromosomes Cancer* 49, 1135–1142. doi:10.1002/gcc.20821

Díaz, R., Peña, C., Silva, J., Lorenzo, Y., García, V., García, J.M., Sánchez, A., Espinosa, P., Yuste, R., Bonilla, F., Domínguez, G., 2008. p73 Isoforms affect VEGF, VEGF165b and PEDF expression in human colorectal tumors: VEGF165b downregulation as a marker of poor prognosis. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 123, 1060–1067. doi:10.1002/ijc.23619

Domínguez, G., García, J.M., Peña, C., Silva, J., García, V., Martínez, L., Maximiano, C., Gómez, M.E., Rivera, J.A., García-Andrade, C., Bonilla, F., 2006a. Δ TAp73 Upregulation Correlates With Poor Prognosis in Human Tumors: Putative In Vivo Network Involving p73 Isoforms, p53, and E2F-1. *J. Clin. Oncol.* 24, 805–815. doi:10.1200/JCO.2005.02.2350

Domínguez, G., García, J.M., Peña, C., Silva, J., García, V., Martínez, L., Maximiano, C., Gómez, M.E., Rivera, J.A., García-Andrade, C., Bonilla, F., 2006b. DeltaTAp73 upregulation correlates with poor prognosis in human tumors: putative in vivo network involving p73 isoforms, p53, and E2F-1. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 24, 805–815. doi:10.1200/JCO.2005.02.2350

Domínguez, G., Peña, C., Silva, J., García, J.M., García, V., Rodríguez, R., Cantos, B., Citores, M.J., España, P., Bonilla, F., 2006. The presence of an intronic deletion in p73 and high levels of ZEB1 alter the TAp73/DeltaTAp73 ratio in colorectal carcinomas. *J. Pathol.* 210, 390–397. doi:10.1002/path.2066

Donehower, L.A., Harvey, M., Slagle, B.L., McArthur, M.J., Montgomery, C.A., Jr, Butel, J.S., Bradley, A., 1992. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356, 215–221. doi:10.1038/356215a0

Du, W., Jiang, P., Mancuso, A., Stonestrom, A., Brewer, M.D., Minn, A.J., Mak, T.W., Wu, M., Yang, X., 2013. TAp73 enhances the pentose phosphate pathway and supports cell proliferation. *Nat. Cell Biol.* 15, 991–1000. doi:10.1038/ncb2789

Dulloo, I., Gopalan, G., Melino, G., Sabapathy, K., 2010. The antiapoptotic DeltaNp73 is

degraded in a c-Jun-dependent manner upon genotoxic stress through the antizyme-mediated pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 4902–4907. doi:10.1073/pnas.0906782107

EL Andaloussi, S., Mäger, I., Breakefield, X.O., Wood, M.J.A., 2013. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 347–357. doi:10.1038/nrd3978

Entchev, E.V., González-Gaitán, M.A., 2002. Morphogen gradient formation and vesicular trafficking. *Traffic Cph. Den.* 3, 98–109.

Errafiy, R., Aguado, C., Ghislat, G., Esteve, J.M., Gil, A., Loutfi, M., Knecht, E., 2013. PTEN increases autophagy and inhibits the ubiquitin-proteasome pathway in glioma cells independently of its lipid phosphatase activity. *PloS One* 8, e83318. doi:10.1371/journal.pone.0083318

Escrevente, C., Keller, S., Altevogt, P., Costa, J., 2011. Interaction and uptake of exosomes by ovarian cancer cells. *BMC Cancer* 11, 108. doi:10.1186/1471-2407-11-108

Farhang Ghahremani, M., Goossens, S., Haigh, J.J., 2013. The p53 family and VEGF regulation. *Cell Cycle* 12, 1331–1332. doi:10.4161/cc.24579

Faridoni-Laurens, L., Bosq, J., Janot, F., Vayssade, M., Le Bihan, M.L., Kaghad, M., Caput, D., Bénard, J., Ahomadegbe, J.C., 2001. P73 expression in basal layers of head and neck squamous epithelium: a role in differentiation and carcinogenesis in concert with p53 and p63? *Oncogene* 20, 5302–5312. doi:10.1038/sj.onc.1204687

Faridoni-Laurens, L., Tourpin, S., Alsafadi, S., Barrois, M., Temam, S., Janot, F., Koscielny, S., Bosq, J., Bénard, J., Ahomadegbe, J.-C., 2008. Involvement of N-terminally truncated variants of p73, deltaTAp73, in head and neck squamous cell cancer: a comparison with p53 mutations. *Cell Cycle Georget. Tex* 7, 1587–1596.

Feng, D., Zhao, W.-L., Ye, Y.-Y., Bai, X.-C., Liu, R.-Q., Chang, L.-F., Zhou, Q., Sui, S.-F., 2010. Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic Cph. Den.* 11, 675–687. doi:10.1111/j.1600-0854.2010.01041.x

Ferru, A., Denis, S., Guilhot, J., Gibelin, H., Tourani, J.M., Kraimps, J.L., Larsen, C.J., Karayan-Tapon, L., 2006. Expression of TAp73 and DeltaNp73 isoform transcripts in thyroid tumours. *Eur. J. Surg. Oncol. J. Eur. Soc. Surg. Oncol. Br. Assoc. Surg. Oncol.* 32, 228–230. doi:10.1016/j.ejso.2005.09.014

Fevrier, B., Vilette, D., Archer, F., Loew, D., Faigle, W., Vidal, M., Laude, H., Raposo, G., 2004. Cells release prions in association with exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 9683–9688. doi:10.1073/pnas.0308413101

Fontemaggi, G., Gurtner, A., Strano, S., Higashi, Y., Sacchi, A., Piaggio, G., Blandino, G., 2001. The transcriptional repressor ZEB regulates p73 expression at the crossroad between proliferation and differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 21, 8461–8470. doi:10.1128/MCB.21.24.8461-8470.2001

Fuchs, C.S., Giovannucci, E.L., Colditz, G.A., Hunter, D.J., Speizer, F.E., Willett, W.C., 1994. A prospective study of family history and the risk of colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 331, 1669–1674. doi:10.1056/NEJM199412223312501

Gaiddon, C., Lokshin, M., Ahn, J., Zhang, T., Prives, C., 2001. A subset of tumor-derived mutant forms of p53 down-regulate p63 and p73 through a direct interaction with the p53 core domain. *Mol. Cell. Biol.* 21, 1874–1887. doi:10.1128/MCB.21.5.1874-1887.2001

Geng, J., Klionsky, D.J., 2008. The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. “Protein modifications: beyond the usual suspects” review series. *EMBO Rep.* 9, 859–864. doi:10.1038/embor.2008.163

Gibbins, D.J., Ciaudo, C., Erhardt, M., Voinnet, O., 2009. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat. Cell Biol.* 11, 1143–1149. doi:10.1038/ncb1929

Gonzalez-Cano, L., Herreros-Villanueva, M., Fernandez-Alonso, R., Ayuso-Sacido, A., Meyer, G., Garcia-Verdugo, J.M., Silva, A., Marques, M.M., Marin, M.C., 2010. p73 deficiency results in impaired self renewal and premature neuronal differentiation of mouse neural progenitors independently of p53. *Cell Death Dis.* 1, e109. doi:10.1038/cddis.2010.87

Gonzalez-Cano, L., Hillje, A.-L., Fuertes-Alvarez, S., Marques, M.M., Blanch, A., Ian, R.W., Irwin, M.S., Schwamborn, J.C., Marín, M.C., 2013. Regulatory feedback loop between TP73 and TRIM32. *Cell Death Dis.* 4, e704. doi:10.1038/cddis.2013.224

González-Polo, R.-A., Boya, P., Pauleau, A.-L., Jalil, A., Larochette, N., Souquère, S., Eskelinen, E.-L., Pierron, G., Saftig, P., Kroemer, G., 2005. The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death. *J. Cell Sci.* 118, 3091–3102. doi:10.1242/jcs.02447

Graner, M.W., Alzate, O., Dechkovskaia, A.M., Keene, J.D., Sampson, J.H., Mitchell, D.A., Bigner, D.D., 2009. Proteomic and immunologic analyses of brain tumor exosomes. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 23, 1541–1557. doi:10.1096/fj.08-122184

Grob, T.J., Novak, U., Maise, C., Barcaroli, D., Lüthi, A.U., Pirnia, F., Hügli, B., Graber, H.U., De Laurenzi, V., Fey, M.F., Melino, G., Tobler, A., 2001. Human delta Np73 regulates a dominant negative feedback loop for TAp73 and p53. *Cell Death Differ.* 8, 1213–1223. doi:10.1038/sj.cdd.4400962

Gruber, S.B., Petersen, G.M., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., 1999. Cancer, crash sites, and the new genetics of neoplasia. *Gastroenterology* 116, 210–212.

Guo, G.-F., Jiang, W.-Q., Zhang, B., Cai, Y.-C., Xu, R.-H., Chen, X.-X., Wang, F., Xia, L.-P., 2011. Autophagy-related proteins Beclin-1 and LC3 predict cetuximab efficacy in advanced colorectal cancer. *World J. Gastroenterol. WJG* 17, 4779–4786. doi:10.3748/wjg.v17.i43.4779

Gupta, S., Radha, V., Furukawa, Y., Swarup, G., 2001. Direct transcriptional activation of human caspase-1 by tumor suppressor p53. *J. Biol. Chem.* 276, 10585–10588.

doi:10.1074/jbc.C100025200

Hannafon, B.N., Ding, W.-Q., 2013. Intercellular Communication by Exosome-Derived microRNAs in Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 14240–14269. doi:10.3390/ijms140714240

He, Q., Liang, C.H., Lippard, S.J., 2000. Steroid hormones induce HMG1 overexpression and sensitize breast cancer cells to cisplatin and carboplatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 5768–5772. doi:10.1073/pnas.100108697

Hegmans, J.P.J.J., Bard, M.P.L., Hemmes, A., Luider, T.M., Kleijmeer, M.J., Prins, J.-B., Zitvogel, L., Burgers, S.A., Hoogsteden, H.C., Lambrecht, B.N., 2004. Proteomic analysis of exosomes secreted by human mesothelioma cells. *Am. J. Pathol.* 164, 1807–1815. doi:10.1016/S0002-9440(10)63739-X

Herreros-Villanueva, M., Muñoz, P., García-Girón, C., Cavia-Saiz, M., del Corral, M.J.C., 2010. TAp73 is one of the genes responsible for the lack of response to chemotherapy depending on B-Raf mutational status. *J. Transl. Med.* 8, 15. doi:10.1186/1479-5876-8-15

<http://www.cancer.gov>, n.d.

<http://www.seom.org>, n.d.

<http://p53.free.fr/>), n.d.

Huang, L., Wang, S., Li, S.-S., Yang, X.-M., 2013. Prognostic significance of Beclin-1 expression in laryngeal squamous cell carcinoma. *Pathol. Oncol. Res. POR* 19, 771–777. doi:10.1007/s12253-013-9642-0

Irwin, M., Marin, M.C., Phillips, A.C., Seelan, R.S., Smith, D.I., Liu, W., Flores, E.R., Tsai, K.Y., Jacks, T., Vousden, K.H., Kaelin, W.G., Jr, 2000. Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis. *Nature* 407, 645–648. doi:10.1038/35036614

Ishimoto, O., Kawahara, C., Enjo, K., Obinata, M., Nukiwa, T., Ikawa, S., 2002. Possible oncogenic potential of DeltaNp73: a newly identified isoform of human p73. *Cancer Res.* 62, 636–641.

Izquierdo-Useros, N., Puertas, M.C., Borràs, F.E., Blanco, J., Martinez-Picado, J., 2011. Exosomes and retroviruses: the chicken or the egg? *Cell. Microbiol.* 13, 10–17. doi:10.1111/j.1462-5822.2010.01542.x

Jacobs, W.B., Kaplan, D.R., Miller, F.D., 2006. The p53 family in nervous system development and disease. *J. Neurochem.* 97, 1571–1584. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03980.x

Jain, N., Gupta, S., Sudhakar, C., Radha, V., Swarup, G., 2005. Role of p73 in regulating human caspase-1 gene transcription induced by interferon- γ and cisplatin. *J. Biol. Chem.* 280, 36664–36673. doi:10.1074/jbc.M413261200

Jarry, A., Vallette, G., Cassagnau, E., Moreau, A., Bou-Hanna, C., Lemarre, P., Letessier, E., Le Neel, J.C., Galmiche, J.P., Laboisse, C.L., 1999. Interleukin 1 and interleukin 1beta converting enzyme (caspase 1) expression in the human colonic epithelial barrier. Caspase 1 downregulation in colon cancer. *Gut* 45, 246–251.

Jaspersen, K.W., Tuohy, T.M., Neklason, D.W., Burt, R.W., 2010. Hereditary and Familial Colon Cancer. *Gastroenterology* 138, 2044–2058. doi:10.1053/j.gastro.2010.01.054

Jiang, P., Du, W., Yang, X., 2013a. p53 and regulation of tumor metabolism. *J. Carcinog.* 12, 21. doi:10.4103/1477-3163.122760

Jiang, P., Du, W., Yang, X., 2013b. A critical role of glucose-6-phosphate dehydrogenase in TAp73-mediated cell proliferation. *Cell Cycle Georget. Tex* 12, 3720–3726. doi:10.4161/cc.27267

Joerger, A.C., Rajagopalan, S., Natan, E., Veprintsev, D.B., Robinson, C.V., Fersht, A.R., 2009. Structural evolution of p53, p63, and p73: implication for heterotetramer formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 17705–17710. doi:10.1073/pnas.0905867106

Johnson, R.A., Shepard, E.M., Scotto, K.W., 2005. Differential regulation of MDR1 transcription by the p53 family members. Role of the DNA binding domain. *J. Biol. Chem.* 280, 13213–13219. doi:10.1074/jbc.M414646200

Johnstone, R.M., Adam, M., Hammond, J.R., Orr, L., Turbide, C., 1987. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J. Biol. Chem.* 262, 9412–9420.

Jost, C.A., Marin, M.C., Kaelin, W.G., Jr, 1997. p73 is a simian [correction of human] p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature* 389, 191–194. doi:10.1038/38298

Kaghad, M., Bonnet, H., Yang, A., Creancier, L., Biscan, J.C., Valent, A., Minty, A., Chalon, P., Lelias, J.M., Dumont, X., Ferrara, P., McKeon, F., Caput, D., 1997. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* 90, 809–819.

Kamada, Y., Funakoshi, T., Shintani, T., Nagano, K., Ohsumi, M., Ohsumi, Y., 2000. Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J. Cell Biol.* 150, 1507–1513.

Kenzelmann Broz, D., Spano Mello, S., Biegging, K.T., Jiang, D., Dusek, R.L., Brady, C.A., Sidow, A., Attardi, L.D., 2013. Global genomic profiling reveals an extensive p53-regulated autophagy program contributing to key p53 responses. *Genes Dev.* 27, 1016–1031. doi:10.1101/gad.212282.112

Kesimer, M., Scull, M., Brighton, B., DeMaria, G., Burns, K., O’Neal, W., Pickles, R.J., Sheehan, J.K., 2009. Characterization of exosome-like vesicles released from human tracheobronchial ciliated epithelium: a possible role in innate defense. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 23, 1858–1868. doi:10.1096/fj.08-119131

Killick, R., Niklison-Chirou, M., Tomasini, R., Bano, D., Rufini, A., Grespi, F., Velletri, T., Tucci, P., Sayan, B.S., Conforti, F., Gallagher, E., Nicotera, P., Mak, T.W., Melino, G., Knight, R.A., Agostini, M., 2011. p73: a multifunctional protein in neurobiology. *Mol. Neurobiol.* 43, 139–146. doi:10.1007/s12035-011-8172-6

- Kimura, T., Takabatake, Y., Takahashi, A., Isaka, Y., 2013. Chloroquine in Cancer Therapy: A Double-Edged Sword of Autophagy. *Cancer Res.* 73, 3–7. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-2464
- Kinzler, K.W., Nilbert, M.C., Vogelstein, B., Bryan, T.M., Levy, D.B., Smith, K.J., Preisinger, A.C., Hamilton, S.R., Hedge, P., Markham, A., 1991. Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers. *Science* 251, 1366–1370.
- Kirschner, L.S., Greenberger, L.M., Hsu, S.I., Yang, C.P., Cohen, D., Piekarz, R.L., Castillo, G., Han, E.K., Yu, L.J., Horwitz, S.B., 1992. Biochemical and genetic characterization of the multidrug resistance phenotype in murine macrophage-like J774.2 cells. *Biochem. Pharmacol.* 43, 77–87.
- Klionsky, D.J., 2007. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 931–937. doi:10.1038/nrm2245
- Knudson, A.G., Jr, 1971. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 68, 820–823.
- Koga, K., Matsumoto, K., Akiyoshi, T., Kubo, M., Yamanaka, N., Tasaki, A., Nakashima, H., Nakamura, M., Kuroki, S., Tanaka, M., Katano, M., 2005. Purification, characterization and biological significance of tumor-derived exosomes. *Anticancer Res.* 25, 3703–3707.
- Kogure, T., Lin, W.-L., Yan, I.K., Braconi, C., Patel, T., 2011. Intercellular nanovesicle-mediated microRNA transfer: a mechanism of environmental modulation of hepatocellular cancer cell growth. *Hepatology* 54, 1237–1248. doi:10.1002/hep.24504
- Koivusalo, R., Krausz, E., Ruotsalainen, P., Helenius, H., Hietanen, S., 2002. Chemoradiation of cervical cancer cells: targeting human papillomavirus E6 and p53 leads to either augmented or attenuated apoptosis depending on the platinum carrier ligand. *Cancer Res.* 62, 7364–7371.
- Kontaki, H., Talianidis, I., 2010. Lysine methylation regulates E2F1-induced cell death. *Mol. Cell* 39, 152–160. doi:10.1016/j.molcel.2010.06.006
- Kravets, F.G., Lee, J., Singh, B., Trocchia, A., Pentylala, S.N., Khan, S.A., 2000. Prostatomes: current concepts. *The Prostate* 43, 169–174.
- Kubo, N., Okoshi, R., Nakashima, K., Shimozaoto, O., Nakagawara, A., Ozaki, T., 2010. MDM2 promotes the proteasomal degradation of p73 through the interaction with Itch in HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 403, 405–411. doi:10.1016/j.bbrc.2010.11.043
- Kuida, K., Lippke, J.A., Ku, G., Harding, M.W., Livingston, D.J., Su, M.S., Flavell, R.A., 1995. Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 267, 2000–2003.
- Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhisa, T., Mizushima, N., 2004. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 432, 1032–1036. doi:10.1038/nature03029
- La Sala, D., Macaluso, M., Trimarchi, C., Giordano, A., Cinti, C., 2003. Triggering of p73-

dependent apoptosis in osteosarcoma is under the control of E2Fs-pRb2/p130 complexes. *Oncogene* 22, 3518–3529. doi:10.1038/sj.onc.1206487

Lai, R.C., Arslan, F., Lee, M.M., Sze, N.S.K., Choo, A., Chen, T.S., Salto-Tellez, M., Timmers, L., Lee, C.N., El Oakley, R.M., Pasterkamp, G., de Kleijn, D.P.V., Lim, S.K., 2010. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res.* 4, 214–222. doi:10.1016/j.scr.2009.12.003

Laulagnier, K., Motta, C., Hamdi, S., Roy, S., Fauvelle, F., Pageaux, J.-F., Kobayashi, T., Salles, J.-P., Perret, B., Bonnerot, C., Record, M., 2004. Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization. *Biochem. J.* 380, 161–171. doi:10.1042/BJ20031594

Lee, A.F., Ho, D.K., Zanassi, P., Walsh, G.S., Kaplan, D.R., Miller, F.D., 2004. Evidence that DeltaNp73 promotes neuronal survival by p53-dependent and p53-independent mechanisms. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 9174–9184. doi:10.1523/JNEUROSCI.1588-04.2004

Lehnert, M., 1996. Clinical multidrug resistance in cancer: a multifactorial problem. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 32A, 912–920.

Leupin, N., Lüthi, A., Novak, U., Grob, T.J., Hügli, B., Graber, H., Fey, M.F., Tobler, A., 2004. P73 status in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk. Lymphoma* 45, 1205–1207.

Levine, B., Klionsky, D.J., 2004. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev. Cell* 6, 463–477.

Levine, B., Kroemer, G., 2008. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132, 27–42. doi:10.1016/j.cell.2007.12.018

Leverro, M., De Laurenzi, V., Costanzo, A., Gong, J., Wang, J.Y., Melino, G., 2000. The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 10), 1661–1670.

Li, P., Allen, H., Banerjee, S., Franklin, S., Herzog, L., Johnston, C., McDowell, J., Paskind, M., Rodman, L., Salfeld, J., 1995. Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock. *Cell* 80, 401–411.

Li, X.-B., Zhang, Z.-R., Schluesener, H.J., Xu, S.-Q., 2006. Role of exosomes in immune regulation. *J. Cell. Mol. Med.* 10, 364–375.

Li, Y., Prives, C., 2007. Are interactions with p63 and p73 involved in mutant p53 gain of oncogenic function? *Oncogene* 26, 2220–2225. doi:10.1038/sj.onc.1210311

Liang, X.H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H., Levine, B., 1999. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 402, 672–676. doi:10.1038/45257

Lin, Y., Cheng, Z., Yang, Z., Zheng, J., Lin, T., 2012. DNp73 improves generation efficiency of human induced pluripotent stem cells. *BMC Cell Biol.* 13, 9. doi:10.1186/1471-2121-13-9

Lin, Y.-L., Sengupta, S., Gurdziel, K., Bell, G.W., Jacks, T., Flores, E.R., 2009. p63 and p73

- Transcriptionally Regulate Genes Involved in DNA Repair. *PLoS Genet.* 5. doi:10.1371/journal.pgen.1000680
- Liu, G., Zhong, Q., Ye, Y., Wang, H., Hu, L., Qin, Z., Zeng, M., Zeng, B., 2013. Expression of beclin 1 in bladder cancer and its clinical significance. *Int. J. Biol. Markers* 28, 56–62. doi:10.5301/JBM.2012.9769
- Liu, S.S., Chan, K.Y.-K., Cheung, A.N.-Y., Liao, X.-Y., Leung, T.-W., Ngan, H.Y.-S., 2006. Expression of deltaNp73 and TAp73alpha independently associated with radiosensitivities and prognoses in cervical squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 12, 3922–3927. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-2573
- Logotheti, S., Michalopoulos, I., Sideridou, M., Daskalos, A., Kossida, S., Spandidos, D.A., Field, J.K., Vojtesek, B., Liloglou, T., Gorgoulis, V., Zoumpourlis, V., 2010. Sp1 binds to the external promoter of the p73 gene and induces the expression of TAp73gamma in lung cancer. *FEBS J.* 277, 3014–3027. doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07710.x
- Lööf, J., Pfeifer, D., Ding, Z., Sun, X.-F., Zhang, H., 2012. Effects of Δ Np73 β on cisplatin treatment in colon cancer cells. *Mol. Carcinog.* 51, 628–635. doi:10.1002/mc.20835
- Lorin, S., Hamai, A., Mehrpour, M., Codogno, P., 2013. Autophagy regulation and its role in cancer. *Semin. Cancer Biol.* 23, 361–379. doi:10.1016/j.semcancer.2013.06.007
- Lu, S.-Z., Harrison-Findik, D.D., 2013. Autophagy and cancer. *World J. Biol. Chem.* 4, 64–70. doi:10.4331/wjbc.v4.i3.64
- Lum, J.J., Bauer, D.E., Kong, M., Harris, M.H., Li, C., Lindsten, T., Thompson, C.B., 2005. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* 120, 237–248. doi:10.1016/j.cell.2004.11.046
- Maddika, S., Ande, S.R., Panigrahi, S., Paranjothy, T., Weglarczyk, K., Zuse, A., Eshraghi, M., Manda, K.D., Wiechec, E., Los, M., 2007. Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* 10, 13–29. doi:10.1016/j.drug.2007.01.003
- Maddocks, O.D.K., Berkers, C.R., Mason, S.M., Zheng, L., Blyth, K., Gottlieb, E., Vousden, K.H., 2013. Serine starvation induces stress and p53-dependent metabolic remodelling in cancer cells. *Nature* 493, 542–546. doi:10.1038/nature11743
- Maddocks, O.D.K., Vousden, K.H., 2011. Metabolic regulation by p53. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 89, 237–245. doi:10.1007/s00109-011-0735-5
- Mantovani, F., Piazza, S., Gostissa, M., Strano, S., Zacchi, P., Mantovani, R., Blandino, G., Del Sal, G., 2004. Pin1 links the activities of c-Abl and p300 in regulating p73 function. *Mol. Cell* 14, 625–636. doi:10.1016/j.molcel.2004.05.007
- Marabese, M., Marchini, S., Sabatino, M.A., Polato, F., Vikhanskaya, F., Marrazzo, E., Riccardi, E., Scanziani, E., Brogini, M., 2005. Effects of inducible overexpression of DNp73alpha on cancer cell growth and response to treatment in vitro and in vivo. *Cell Death*

Differ. 12, 805–814. doi:10.1038/sj.cdd.4401622

Marimpietri, D., Petretto, A., Raffaghello, L., Pezzolo, A., Gagliani, C., Tacchetti, C., Mauri, P., Melioli, G., Pistoia, V., 2013. Proteome profiling of neuroblastoma-derived exosomes reveal the expression of proteins potentially involved in tumor progression. *PloS One* 8, e75054. doi:10.1371/journal.pone.0075054

Markowitz, S.D., Bertagnolli, M.M., 2009. Molecular Origins of Cancer. *N. Engl. J. Med.* 361, 2449–2460. doi:10.1056/NEJMra0804588

Mathivanan, S., Ji, H., Simpson, R.J., 2010. Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. *J. Proteomics* 73, 1907–1920. doi:10.1016/j.jprot.2010.06.006

McAllister, S.S., Gifford, A.M., Greiner, A.L., Kelleher, S.P., Saelzler, M.P., Ince, T.A., Reinhardt, F., Harris, L.N., Hylander, B.L., Repasky, E.A., Weinberg, R.A., 2008. Systemic endocrine instigation of indolent tumor growth requires osteopontin. *Cell* 133, 994–1005. doi:10.1016/j.cell.2008.04.045

Meek, D.W., 2009. Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? *Nat. Rev. Cancer* 9, 714–723. doi:10.1038/nrc2716

Meier, M., den Boer, M.L., Meijerink, J.P.P., Broekhuis, M.J.C., Passier, M.M.C.J., van Wering, E.R., Janka-Schaub, G.E., Pieters, R., 2006. Differential expression of p73 isoforms in relation to drug resistance in childhood T-lineage acute lymphoblastic leukaemia. *Leuk. Off. J. Leuk. Soc. Am. Leuk. Res. Fund UK* 20, 1377–1384. doi:10.1038/sj.leu.2404288

Meley, D., Bauvy, C., Houben-Weerts, J.H.P.M., Dubbelhuis, P.F., Helmond, M.T.J., Codogno, P., Meijer, A.J., 2006. AMP-activated protein kinase and the regulation of autophagic proteolysis. *J. Biol. Chem.* 281, 34870–34879. doi:10.1074/jbc.M605488200

Merlo, P., Fulco, M., Costanzo, A., Mangiacasale, R., Strano, S., Blandino, G., Taya, Y., Lavia, P., Levrero, M., 2005. A role of p73 in mitotic exit. *J. Biol. Chem.* 280, 30354–30360. doi:10.1074/jbc.M500635200

Mitchell, P.J., Welton, J., Staffurth, J., Court, J., Mason, M.D., Tabi, Z., Clayton, A., 2009. Can urinary exosomes act as treatment response markers in prostate cancer? *J. Transl. Med.* 7, 4. doi:10.1186/1479-5876-7-4

Mittelbrunn, M., Gutiérrez-Vázquez, C., Villarroya-Beltri, C., González, S., Sánchez-Cabo, F., González, M.Á., Bernad, A., Sánchez-Madrid, F., 2011. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat. Commun.* 2, 282. doi:10.1038/ncomms1285

Mittelbrunn, M., Sánchez-Madrid, F., 2012. Intercellular communication: diverse structures for exchange of genetic information. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 328–335. doi:10.1038/nrm3335

Mizushima, N., Klionsky, D.J., 2007. Protein turnover via autophagy: implications for metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 27, 19–40. doi:10.1146/annurev.nutr.27.061406.093749

Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., 2004. In vivo analysis

of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol. Biol. Cell* 15, 1101–1111. doi:10.1091/mbc.E03-09-0704

Moll, U.M., Slade, N., 2004. p63 and p73: roles in development and tumor formation. *Mol. Cancer Res. MCR* 2, 371–386.

Montecalvo, A., Larregina, A.T., Shufesky, W.J., Stolz, D.B., Sullivan, M.L.G., Karlsson, J.M., Baty, C.J., Gibson, G.A., Erdos, G., Wang, Z., Milosevic, J., Tkacheva, O.A., Divito, S.J., Jordan, R., Lyons-Weiler, J., Watkins, S.C., Morelli, A.E., 2012. Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood* 119, 756–766. doi:10.1182/blood-2011-02-338004

Morelli, A.E., Larregina, A.T., Shufesky, W.J., Sullivan, M.L.G., Stolz, D.B., Papworth, G.D., Zahorchak, A.F., Logar, A.J., Wang, Z., Watkins, S.C., Falo, L.D., Jr, Thomson, A.W., 2004. Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood* 104, 3257–3266. doi:10.1182/blood-2004-03-0824

Morselli, E., Galluzzi, L., Kepp, O., Vicencio, J.-M., Criollo, A., Maiuri, M.C., Kroemer, G., 2009. Anti- and pro-tumor functions of autophagy. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 1524–1532. doi:10.1016/j.bbamcr.2009.01.006

Mortimore, G.E., Pösö, A.R., 1988. Amino acid control of intracellular protein degradation. *Methods Enzymol.* 166, 461–476.

Müller, M., Schilling, T., Sayan, A.E., Kairat, A., Lorenz, K., Schulze-Bergkamen, H., Oren, M., Koch, A., Tannapfel, A., Stremmel, W., Melino, G., Krammer, P.H., 2005. TAp73/Delta Np73 influences apoptotic response, chemosensitivity and prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cell Death Differ.* 12, 1564–1577. doi:10.1038/sj.cdd.4401774

Müller, M., Schleithoff, E.S., Stremmel, W., Melino, G., Krammer, P.H., Schilling, T., 2006. One, two, three--p53, p63, p73 and chemosensitivity. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* 9, 288–306. doi:10.1016/j.drup.2007.01.001

Muñoz, A., 2004. *Cáncer: genes y nuevas terapias*. Editorial Hélice.

Napoli, M., Flores, E.R., 2013. The family that eats together stays together: new p53 family transcriptional targets in autophagy. *Genes Dev.* 27, 971–974. doi:10.1101/gad.219147.113

Nazarenko, I., Rana, S., Baumann, A., McAlear, J., Hellwig, A., Trendelenburg, M., Lochnit, G., Preissner, K.T., Zöller, M., 2010. Cell surface tetraspanin Tspan8 contributes to molecular pathways of exosome-induced endothelial cell activation. *Cancer Res.* 70, 1668–1678. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2470

Niemantsverdriet, M., Nagle, P., Chiu, R.K., Langendijk, J.A., Kampinga, H.H., Coppes, R.P., 2012. Δ Np73 enhances promoter activity of TGF- β induced genes. *PLoS One* 7, e50815. doi:10.1371/journal.pone.0050815

Nilsson, J., Skog, J., Nordstrand, A., Baranov, V., Mincheva-Nilsson, L., Breakefield, X.O., Widmark, A., 2009. Prostate cancer-derived urine exosomes: a novel approach to biomarkers

for prostate cancer. *Br. J. Cancer* 100, 1603–1607. doi:10.1038/sj.bjc.6605058

Nolte-'t Hoen, E.N.M., Buschow, S.I., Anderton, S.M., Stoorvogel, W., Wauben, M.H.M., 2009. Activated T cells recruit exosomes secreted by dendritic cells via LFA-1. *Blood* 113, 1977–1981. doi:10.1182/blood-2008-08-174094

Novellino, L., Rossi, R.L., Bonino, F., Cavallone, D., Abrignani, S., Pagani, M., Brunetto, M.R., 2012. Circulating hepatitis B surface antigen particles carry hepatocellular microRNAs. *PloS One* 7, e31952. doi:10.1371/journal.pone.0031952

Nyman, U., Vlachos, P., Cascante, A., Hermanson, O., Zhivotovsky, B., Joseph, B., 2009. Protein kinase C-dependent phosphorylation regulates the cell cycle-inhibitory function of the p73 carboxy terminus transactivation domain. *Mol. Cell. Biol.* 29, 1814–1825. doi:10.1128/MCB.00585-08

Oberst, A., Rossi, M., Salomoni, P., Pandolfi, P.P., Oren, M., Melino, G., Bernassola, F., 2005. Regulation of the p73 protein stability and degradation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331, 707–712. doi:10.1016/j.bbrc.2005.03.158

Ogawa, Y., Miura, Y., Harazono, A., Kanai-Azuma, M., Akimoto, Y., Kawakami, H., Yamaguchi, T., Toda, T., Endo, T., Tsubuki, M., Yanoshita, R., 2011. Proteomic analysis of two types of exosomes in human whole saliva. *Biol. Pharm. Bull.* 34, 13–23.

Ohshima, K., Inoue, K., Fujiwara, A., Hatakeyama, K., Kanto, K., Watanabe, Y., Muramatsu, K., Fukuda, Y., Ogura, S., Yamaguchi, K., Mochizuki, T., 2010. Let-7 microRNA family is selectively secreted into the extracellular environment via exosomes in a metastatic gastric cancer cell line. *PloS One* 5, e13247. doi:10.1371/journal.pone.0013247

Onoda, C., Kuribayashi, K., Nirasawa, S., Tsuji, N., Tanaka, M., Kobayashi, D., Watanabe, N., 2011. (-)-Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis in gastric cancer cell lines by down-regulating survivin expression. *Int. J. Oncol.* 38, 1403–1408. doi:10.3892/ijo.2011.951

Ott, S., Geiser, T., 2012. [Epidemiology of lung tumors]. *Ther. Umsch. Rev. Thérapeutique* 69, 381–388. doi:10.1024/0040-5930/a000303

Palanisamy, V., Sharma, S., Deshpande, A., Zhou, H., Gimzewski, J., Wong, D.T., 2010. Nanostructural and transcriptomic analyses of human saliva derived exosomes. *PloS One* 5, e8577. doi:10.1371/journal.pone.0008577

Pan, B.T., Teng, K., Wu, C., Adam, M., Johnstone, R.M., 1985. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J. Cell Biol.* 101, 942–948.

Papoutsaki, M., Lanza, M., Marinari, B., Nisticò, S., Moretti, F., Levrero, M., Chimenti, S., Costanzo, A., 2004. The p73 Gene Is an Anti-Tumoral Target of the RAR β/γ -Selective Retinoid Tazarotene. *J. Invest. Dermatol.* 123, 1162–1168. doi:10.1111/j.0022-202X.2004.23498.x

Park, H.-R., Kim, Y.-W., Park, J.-H., Maeng, Y.-H., Nojima, T., Hashimoto, H., Park, Y.-K., 2004. Low expression of p63 and p73 in osteosarcoma. *Tumori* 90, 239–243.

- Parolini, I., Federici, C., Raggi, C., Lugini, L., Palleschi, S., De Milito, A., Coscia, C., Iessi, E., Logozzi, M., Molinari, A., Colone, M., Tatti, M., Sargiacomo, M., Fais, S., 2009. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *J. Biol. Chem.* 284, 34211–34222. doi:10.1074/jbc.M109.041152
- Patel, S., George, R., Autore, F., Fraternali, F., Ladbury, J.E., Nikolova, P.V., 2008. Molecular interactions of ASPP1 and ASPP2 with the p53 protein family and the apoptotic promoters PUMA and Bax. *Nucleic Acids Res.* 36, 5139–5151. doi:10.1093/nar/gkn490
- Pediconi, N., Guerrieri, F., Vossio, S., Bruno, T., Belloni, L., Schinzari, V., Scisciani, C., Fanciulli, M., Levrero, M., 2009. hSirT1-dependent regulation of the PCAF-E2F1-p73 apoptotic pathway in response to DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* 29, 1989–1998. doi:10.1128/MCB.00552-08
- Pegtel, D.M., Cosmopoulos, K., Thorley-Lawson, D.A., van Eijndhoven, M.A.J., Hopmans, E.S., Lindenberg, J.L., de Gruijl, T.D., Würdinger, T., Middeldorp, J.M., 2010. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 6328–6333. doi:10.1073/pnas.0914843107
- Peinado, H., Alečković, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., Hergueta-Redondo, M., Williams, C., García-Santos, G., Ghajar, C., Nitadori-Hoshino, A., Hoffman, C., Badal, K., Garcia, B.A., Callahan, M.K., Yuan, J., Martins, V.R., Skog, J., Kaplan, R.N., Brady, M.S., Wolchok, J.D., Chapman, P.B., Kang, Y., Bromberg, J., Lyden, D., 2012. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat. Med.* 18, 883–891. doi:10.1038/nm.2753
- Petrenko, O., Zaika, A., Moll, U.M., 2003. deltaNp73 facilitates cell immortalization and cooperates with oncogenic Ras in cellular transformation in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 23, 5540–5555.
- Pipaon, C., Real, P.J., Fernandez-Luna, J.L., 2005. Defective binding of transcriptional repressor ZEB via DNA methylation contributes to increased constitutive levels of p73 in Fanconi anemia cells. *FEBS Lett.* 579, 4610–4614. doi:10.1016/j.febslet.2005.07.026
- Porto-Carreiro, I., Février, B., Paquet, S., Vilette, D., Raposo, G., 2005. Prions and exosomes: from PrPc trafficking to PrPsc propagation. *Blood Cells. Mol. Dis.* 35, 143–148. doi:10.1016/j.bcmd.2005.06.013
- Potolicchio, I., Carven, G.J., Xu, X., Stipp, C., Riese, R.J., Stern, L.J., Santambrogio, L., 2005. Proteomic analysis of microglia-derived exosomes: metabolic role of the aminopeptidase CD13 in neuropeptide catabolism. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 175, 2237–2243.
- Pozniak, C.D., Radinovic, S., Yang, A., McKeon, F., Kaplan, D.R., Miller, F.D., 2000. An anti-apoptotic role for the p53 family member, p73, during developmental neuron death. *Science* 289, 304–306.
- Properzi, F., Logozzi, M., Fais, S., 2013. Exosomes: the future of biomarkers in medicine.

Biomark. Med. 7, 769–778. doi:10.2217/bmm.13.63

Pruitt, F.L., He, Y., Franco, O.E., Jiang, M., Cates, J.M., Hayward, S.W., 2012. Cathepsin D acts as an essential mediator to promote malignancy of benign prostatic epithelium. *The Prostate*. doi:10.1002/pros.22589

Puig, P., Capodiceci, P., Drobnjak, M., Verbel, D., Prives, C., Cordon-Cardo, C., Di Como, C.J., 2003. p73 Expression in human normal and tumor tissues: loss of p73alpha expression is associated with tumor progression in bladder cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 9, 5642–5651.

Qu, X., Yu, J., Bhagat, G., Furuya, N., Hibshoosh, H., Troxel, A., Rosen, J., Eskelinen, E.-L., Mizushima, N., Ohsumi, Y., Cattoretti, G., Levine, B., 2003. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J. Clin. Invest.* 112, 1809–1820. doi:10.1172/JCI20039

Rabinowits, G., Gerçel-Taylor, C., Day, J.M., Taylor, D.D., Kloecker, G.H., 2009. Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer. *Clin. Lung Cancer* 10, 42–46. doi:10.3816/CLC.2009.n.006

Rabinowitz, J.D., White, E., 2010. Autophagy and metabolism. *Science* 330, 1344–1348. doi:10.1126/science.1193497

Rajendran, L., Honsho, M., Zahn, T.R., Keller, P., Geiger, K.D., Verkade, P., Simons, K., 2006. Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 11172–11177. doi:10.1073/pnas.0603838103

Raposo, G., Stoorvogel, W., 2013. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* 200, 373–383. doi:10.1083/jcb.201211138

Ravikumar, B., Berger, Z., Vacher, C., O'Kane, C.J., Rubinsztein, D.C., 2006. Rapamycin pretreatment protects against apoptosis. *Hum. Mol. Genet.* 15, 1209–1216. doi:10.1093/hmg/ddl036

Remke, M., Hielscher, T., Northcott, P.A., Witt, H., Ryzhova, M., Wittmann, A., Benner, A., von Deimling, A., Scheurlen, W., Perry, A., Croul, S., Kulozik, A.E., Lichter, P., Taylor, M.D., Pfister, S.M., Korshunov, A., 2011. Adult medulloblastoma comprises three major molecular variants. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 29, 2717–2723. doi:10.1200/JCO.2011.34.9373

Rizzo, M.G., Giombini, E., Diverio, D., Vignetti, M., Sacchi, A., Testa, U., Lo-Coco, F., Blandino, G., 2004. Analysis of p73 expression pattern in acute myeloid leukemias: lack of DeltaN-p73 expression is a frequent feature of acute promyelocytic leukemia. *Leuk. Off. J. Leuk. Soc. Am. Leuk. Res. Fund UK* 18, 1804–1809. doi:10.1038/sj.leu.2403483

Robinson, R.A., Lu, X., Jones, E.Y., Siebold, C., 2008. Biochemical and structural studies of ASPP proteins reveal differential binding to p53, p63, and p73. *Struct. Lond. Engl.* 1993 16, 259–268. doi:10.1016/j.str.2007.11.012

Rodríguez, M., Silva, J., López-Alfonso, A., López-Muñiz, M.B., Peña, C., Domínguez, G., García, J.M., López-González, A., Méndez, M., Provencio, M., García, V., Bonilla, F., 2014. Different exosome cargo from plasma/bronchoalveolar lavage in non-small-cell lung cancer. *Genes. Chromosomes Cancer*. doi:10.1002/gcc.22181

Romani, M., Scaruffi, P., Casciano, I., Mazzocco, K., Lo Cunsolo, C., Cavazzana, A., Gambini, C., Boni, L., De Bernardi, B., Tonini, G.P., 1999. Stage-independent expression and genetic analysis of tp73 in neuroblastoma. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 84, 365–369.

Rosenbluth, J.M., Mays, D.J., Pino, M.F., Tang, L.J., Pietenpol, J.A., 2008. A Gene Signature-Based Approach Identifies mTOR as a Regulator of p73. *Mol. Cell. Biol.* 28, 5951–5964. doi:10.1128/MCB.00305-08

Rossi, M., De Laurenzi, V., Munarriz, E., Green, D.R., Liu, Y.-C., Vousden, K.H., Cesareni, G., Melino, G., 2005. The ubiquitin-protein ligase Itch regulates p73 stability. *EMBO J.* 24, 836–848. doi:10.1038/sj.emboj.7600444

Sadallah, S., Eken, C., Schifferli, J.A., 2011. Ectosomes as modulators of inflammation and immunity. *Clin. Exp. Immunol.* 163, 26–32. doi:10.1111/j.1365-2249.2010.04271.x

Sanchez-Prieto, R., Sanchez-Arevalo, V.J., Servitja, J.-M., Gutkind, J.S., 2002. Regulation of p73 by c-Abl through the p38 MAP kinase pathway. *Oncogene* 21, 974–979. doi:10.1038/sj.onc.1205134

Savina, A., Vidal, M., Colombo, M.I., 2002. The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11. *J. Cell Sci.* 115, 2505–2515.

Sayan, B.S., Yang, A.L., Conforti, F., Tucci, P., Piro, M.C., Browne, G.J., Agostini, M., Bernardini, S., Knight, R.A., Mak, T.W., Melino, G., 2010. Differential control of TAp73 and DeltaNp73 protein stability by the ring finger ubiquitin ligase PIR2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 12877–12882. doi:10.1073/pnas.0911828107

Schmale, H., Bamberger, C., 1997. A novel protein with strong homology to the tumor suppressor p53. *Oncogene* 15, 1363–1367. doi:10.1038/sj.onc.1201500

Schuster, A., Schilling, T., De Laurenzi, V., Koch, A.F., Seitz, S., Staib, F., Teufel, A., Thorgeirsson, S.S., Galle, P., Melino, G., Stremmel, W., Krammer, P.H., Müller, M., 2010. ΔNp73β is oncogenic in hepatocellular carcinoma by blocking apoptosis signaling via death receptors and mitochondria. *Cell Cycle Georget. Tex* 9, 2629–2639. doi:10.4161/cc.9.13.12110

Scian, M.J., Carchman, E.H., Mohanraj, L., Stagliano, K.E.R., Anderson, M.A.E., Deb, D., Crane, B.M., Kiyono, T., Windle, B., Deb, S.P., Deb, S., 2008. Wild-type p53 and p73 negatively regulate expression of proliferation related genes. *Oncogene* 27, 2583–2593. doi:10.1038/sj.onc.1210898

Seelan, R.S., Irwin, M., van der Stoop, P., Qian, C., Kaelin, W.G., Jr, Liu, W., 2002. The human p73 promoter: characterization and identification of functional E2F binding sites. *Neoplasia N. Y. N* 4, 195–203. doi:10.1038/sj/neo/7900237

Segura, E., Amigorena, S., Théry, C., 2005. Mature dendritic cells secrete exosomes with strong ability to induce antigen-specific effector immune responses. *Blood Cells. Mol. Dis.* 35, 89–93. doi:10.1016/j.bcmd.2005.05.003

Segura, E., Guérin, C., Hogg, N., Amigorena, S., Théry, C., 2007. CD8⁺ dendritic cells use LFA-1 to capture MHC-peptide complexes from exosomes in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 179, 1489–1496.

Selvakumaran, M., Amaravadi, R.K., Vasilevskaya, I.A., O'Dwyer, P.J., 2013. Autophagy inhibition sensitizes colon cancer cells to antiangiogenic and cytotoxic therapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 19, 2995–3007. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-1542

Shammas, M.A., Neri, P., Koley, H., Batchu, R.B., Bertheau, R.C., Munshi, V., Prabhala, R., Fulciniti, M., Tai, Y.T., Treon, S.P., Goyal, R.K., Anderson, K.C., Munshi, N.C., 2006. Specific killing of multiple myeloma cells by (-)-epigallocatechin-3-gallate extracted from green tea: biologic activity and therapeutic implications. *Blood* 108, 2804–2810. doi:10.1182/blood-2006-05-022814

Sharif, T., Auger, C., Alhosin, M., Ebel, C., Achour, M., Etienne-Selloum, N., Fuhrmann, G., Bronner, C., Schini-Kerth, V.B., 2010. Red wine polyphenols cause growth inhibition and apoptosis in acute lymphoblastic leukaemia cells by inducing a redox-sensitive up-regulation of p73 and down-regulation of UHRF1. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 46, 983–994. doi:10.1016/j.ejca.2009.12.029

Sharpe, C.R., Siemiatycki, J., Rachet, B., 2002a. Effects of alcohol consumption on the risk of colorectal cancer among men by anatomical subsite (Canada). *Cancer Causes Control CCC* 13, 483–491.

Sharpe, C.R., Siemiatycki, J.A., Rachet, B.P., 2002b. The effects of smoking on the risk of colorectal cancer. *Dis. Colon Rectum* 45, 1041–1050.

Sherr, C.J., Weber, J.D., 2000. The ARF/p53 pathway. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10, 94–99.

Shinbo, J., Ozaki, T., Nakagawa, T., Watanabe, K., Nakamura, Y., Yamazaki, M., Moriya, H., Nakagawara, A., Sakiyama, S., 2002. p73-dependent expression of DAN during cisplatin-induced cell death and osteoblast differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 295, 501–507.

Silva, J., Garcia, V., Rodriguez, M., Compte, M., Cisneros, E., Veguillas, P., Garcia, J.M., Dominguez, G., Campos-Martin, Y., Cuevas, J., Peña, C., Herrera, M., Diaz, R., Mohammed, N., Bonilla, F., 2012. Analysis of exosome release and its prognostic value in human colorectal cancer. *Genes. Chromosomes Cancer* 51, 409–418.

Simões-Wüst, A.P., Sigrist, B., Belyanskaya, L., Hopkins Donaldson, S., Stahel, R.A., Zangemeister-Wittke, U., 2005. DeltaNp73 antisense activates PUMA and induces apoptosis in neuroblastoma cells. *J. Neurooncol.* 72, 29–34. doi:10.1007/s11060-004-3118-8

Simons, M., Raposo, G., 2009. Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication.

Curr. Opin. Cell Biol. 21, 575–581. doi:10.1016/j.ceb.2009.03.007

Simonsen, A., Tooze, S.A., 2009. Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes. *J. Cell Biol.* 186, 773–782. doi:10.1083/jcb.200907014

Sinicrope, F.A., Hart, J., Brasitus, T.A., Michelassi, F., Lee, J.J., Safa, A.R., 1994. Relationship of P-glycoprotein and carcinoembryonic antigen expression in human colon carcinoma to local invasion, DNA ploidy, and disease relapse. *Cancer* 74, 2908–2917.

Skog, J., Würdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D.H., Gainche, L., Sena-Esteves, M., Curry, W.T., Jr, Carter, B.S., Krichevsky, A.M., Breakefield, X.O., 2008. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat. Cell Biol.* 10, 1470–1476. doi:10.1038/ncb1800

Soldevilla, B., Millán, C.S., Bonilla, F., Domínguez, G., 2013. The TP73 complex network: ready for clinical translation in cancer? *Genes. Chromosomes Cancer* 52, 989–1006. doi:10.1002/gcc.22095

Spirio, L., Olschwang, S., Groden, J., Robertson, M., Samowitz, W., Joslyn, G., Gelbert, L., Thliveris, A., Carlson, M., Otterud, B., 1993. Alleles of the APC gene: an attenuated form of familial polyposis. *Cell* 75, 951–957.

Steder, M., Alla, V., Meier, C., Spitschak, A., Pahnke, J., Fürst, K., Kowtharapu, B.S., Engelmann, D., Petigk, J., Egberts, F., Schäd-Trcka, S.G., Gross, G., Nettelbeck, D.M., Niemetz, A., Pützer, B.M., 2013. DNp73 exerts function in metastasis initiation by disconnecting the inhibitory role of EPLIN on IGF1R-AKT/STAT3 signaling. *Cancer Cell* 24, 512–527. doi:10.1016/j.ccr.2013.08.023

Stiewe, T., Pützer, B.M., 2000. Role of the p53-homologue p73 in E2F1-induced apoptosis. *Nat. Genet.* 26, 464–469. doi:10.1038/82617

Stiewe, T., Theseling, C.C., Pützer, B.M., 2002. Transactivation-deficient Delta TA-p73 inhibits p53 by direct competition for DNA binding: implications for tumorigenesis. *J. Biol. Chem.* 277, 14177–14185. doi:10.1074/jbc.M200480200

Stiewe, T., Tuve, S., Peter, M., Tannapfel, A., Elmaagacli, A.H., Pützer, B.M., 2004. Quantitative TP73 transcript analysis in hepatocellular carcinomas. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 10, 626–633.

Stros, M., Ozaki, T., Bacikova, A., Kageyama, H., Nakagawara, A., 2002. HMGB1 and HMGB2 cell-specifically down-regulate the p53- and p73-dependent sequence-specific transactivation from the human Bax gene promoter. *J. Biol. Chem.* 277, 7157–7164. doi:10.1074/jbc.M110233200

Sui, X., Chen, R., Wang, Z., Huang, Z., Kong, N., Zhang, M., Han, W., Lou, F., Yang, J., Zhang, Q., Wang, X., He, C., Pan, H., 2013. Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. *Cell Death Dis.* 4, e838. doi:10.1038/cddis.2013.350

- Sullivan, A., Lu, X., 2007. ASPP: a new family of oncogenes and tumour suppressor genes. *Br. J. Cancer* 96, 196–200. doi:10.1038/sj.bjc.6603525
- Sun, X.-F., 2002. p73 overexpression is a prognostic factor in patients with colorectal adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 8, 165–170.
- Ta, L.E., Low, P.A., Windebank, A.J., 2009. Mice with cisplatin and oxaliplatin-induced painful neuropathy develop distinct early responses to thermal stimuli. *Mol. Pain* 5, 9. doi:10.1186/1744-8069-5-9
- Takahashi, H., Ichimiya, S., Nimura, Y., Watanabe, M., Furusato, M., Wakui, S., Yatani, R., Aizawa, S., Nakagawara, A., 1998. Mutation, allelotyping, and transcription analyses of the p73 gene in prostatic carcinoma. *Cancer Res.* 58, 2076–2077.
- Tasdemir, E., Maiuri, M.C., Orhon, I., Kepp, O., Morselli, E., Criollo, A., Kroemer, G., 2008. p53 represses autophagy in a cell cycle-dependent fashion. *Cell Cycle Georget. Tex* 7, 3006–3011.
- Taylor, D.D., Gerçel-Taylor, C., 2005. Tumour-derived exosomes and their role in cancer-associated T-cell signalling defects. *Br. J. Cancer* 92, 305–311. doi:10.1038/sj.bjc.6602316
- Thakur, B.K., Zhang, H., Becker, A., Matei, I., Huang, Y., Costa-Silva, B., Zheng, Y., Hoshino, A., Brazier, H., Xiang, J., Williams, C., Rodriguez-Barrueco, R., Silva, J.M., Zhang, W., Hearn, S., Elemento, O., Paknejad, N., Manova-Todorova, K., Welte, K., Bromberg, J., Peinado, H., Lyden, D., 2014. Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell Res.* doi:10.1038/cr.2014.44
- Thangasamy, T., Sittadjody, S., Mitchell, G.C., Mendoza, E.E., Radhakrishnan, V.M., Limesand, K.H., Burd, R., 2010. Quercetin abrogates chemoresistance in melanoma cells by modulating deltaNp73. *BMC Cancer* 10, 282. doi:10.1186/1471-2407-10-282
- Thomas, J.O., Travers, A.A., 2001. HMG1 and 2, and related “architectural” DNA-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* 26, 167–174.
- Tiwary, R., Yu, W., Sanders, B.G., Kline, K., 2011. α -TEA cooperates with chemotherapeutic agents to induce apoptosis of p53 mutant, triple-negative human breast cancer cells via activating p73. *Breast Cancer Res. BCR* 13, R1. doi:10.1186/bcr2801
- Toh, W.H., Siddique, M.M., Boominathan, L., Lin, K.W., Sabapathy, K., 2004. c-Jun regulates the stability and activity of the p53 homologue, p73. *J. Biol. Chem.* 279, 44713–44722. doi:10.1074/jbc.M407672200
- Tomasini, R., Tsuchihara, K., Tsuda, C., Lau, S.K., Wilhelm, M., Ruffini, A., Tsao, M., Iovanna, J.L., Jurisicova, A., Melino, G., Mak, T.W., 2009. TAp73 regulates the spindle assembly checkpoint by modulating BubR1 activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 797–802. doi:10.1073/pnas.0812096106
- Tomasini, R., Tsuchihara, K., Wilhelm, M., Fujitani, M., Ruffini, A., Cheung, C.C., Khan, F., Itie-Youten, A., Wakeham, A., Tsao, M.-S., Iovanna, J.L., Squire, J., Jurisica, I., Kaplan, D.,

- Melino, G., Jurisicova, A., Mak, T.W., 2008. TAp73 knockout shows genomic instability with infertility and tumor suppressor functions. *Genes Dev.* 22, 2677–2691. doi:10.1101/gad.1695308
- Tomlinson, V., Gudmundsdottir, K., Luong, P., Leung, K.-Y., Knebel, A., Basu, S., 2010. JNK phosphorylates Yes-associated protein (YAP) to regulate apoptosis. *Cell Death Dis.* 1, e29. doi:10.1038/cddis.2010.7
- Toumi, A.A., El Hadj, O.E.A., Ben Mahmoud, L.K., Ben Hmida, A.E.M., Chaar, I., Gharbi, L., Mzabi, S., Bouraoui, S., 2010. The prognostic value of p73 overexpression in colorectal carcinoma: a clinicopathologic, immunohistochemical, and statistical study of 204 patients. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. AIMM Off. Publ. Soc. Appl. Immunohistochem.* 18, 128–136. doi:10.1097/PAI.0b013e3181bcb2da
- Trink, B., Okami, K., Wu, L., Sriuranpong, V., Jen, J., Sidransky, D., 1998. A new human p53 homologue. *Nat. Med.* 4, 747–748.
- Tsai, K.K.C., Yuan, Z.-M., 2003. c-Abl stabilizes p73 by a phosphorylation-augmented interaction. *Cancer Res.* 63, 3418–3424.
- Turiák, L., Misják, P., Szabó, T.G., Aradi, B., Pálóczi, K., Ozohanics, O., Drahos, L., Kittel, A., Falus, A., Buzás, E.I., Vékey, K., 2011. Proteomic characterization of thymocyte-derived microvesicles and apoptotic bodies in BALB/c mice. *J. Proteomics* 74, 2025–2033. doi:10.1016/j.jprot.2011.05.023
- Tuve, S., Wagner, S.N., Schitteck, B., Pützer, B.M., 2004. Alterations of DeltaTA-p 73 splice transcripts during melanoma development and progression. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 108, 162–166. doi:10.1002/ijc.11552
- Uramoto, H., Izumi, H., Nagatani, G., Ohmori, H., Nagasue, N., Ise, T., Yoshida, T., Yasumoto, K., Kohno, K., 2003. Physical interaction of tumour suppressor p53/p73 with CCAAT-binding transcription factor 2 (CTF2) and differential regulation of human high-mobility group 1 (HMG1) gene expression. *Biochem. J.* 371, 301–310. doi:10.1042/BJ20021646
- Uramoto, H., Sugio, K., Oyama, T., Nakata, S., Ono, K., Morita, M., Funa, K., Yasumoto, K., 2004. Expression of deltaNp73 predicts poor prognosis in lung cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 10, 6905–6911. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0290
- Urist, M., Tanaka, T., Poyurovsky, M.V., Prives, C., 2004. p73 induction after DNA damage is regulated by checkpoint kinases Chk1 and Chk2. *Genes Dev.* 18, 3041–3054. doi:10.1101/gad.1221004
- Vader, P., Breakefield, X.O., Wood, M.J.A., 2014. Extracellular vesicles: emerging targets for cancer therapy. *Trends Mol. Med.* doi:10.1016/j.molmed.2014.03.002
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J.J., Lötvall, J.O., 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* 9, 654–659. doi:10.1038/ncb1596

Vallhov, H., Gutzeit, C., Johansson, S.M., Nagy, N., Paul, M., Li, Q., Friend, S., George, T.C., Klein, E., Scheynius, A., Gabrielsson, S., 2011. Exosomes containing glycoprotein 350 released by EBV-transformed B cells selectively target B cells through CD21 and block EBV infection in vitro. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 186, 73–82. doi:10.4049/jimmunol.1001145

Van Niel, G., Raposo, G., Candalh, C., Boussac, M., Hershberg, R., Cerf-Bensussan, N., Heyman, M., 2001. Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. *Gastroenterology* 121, 337–349.

Velletri, T., Romeo, F., Tucci, P., Peschiaroli, A., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Niklison-Chirou, M.V., Amelio, I., Knight, R.A., Mak, T.W., Melino, G., Agostini, M., 2013. GLS2 is transcriptionally regulated by p73 and contributes to neuronal differentiation. *Cell Cycle Georget. Tex* 12, 3564–3573. doi:10.4161/cc.26771

Vera, J., Schmitz, U., Lai, X., Engelmann, D., Khan, F.M., Wolkenhauer, O., Putzer, B.M., 2013. Kinetic Modeling-Based Detection of Genetic Signatures that Provide Chemoresistance via the E2F1-p73/DNp73-miR-205 Network. *Cancer Res.* doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-4095

Vernole, P., Neale, M.H., Barcaroli, D., Munarriz, E., Knight, R.A., Tomasini, R., Mak, T.W., Melino, G., De Laurenzi, V., 2009. TAp73alpha binds the kinetochore proteins Bub1 and Bub3 resulting in polyploidy. *Cell Cycle Georget. Tex* 8, 421–429.

Viaud, S., Théry, C., Ploix, S., Tursz, T., Lapierre, V., Lantz, O., Zitvogel, L., Chaput, N., 2010. Dendritic cell-derived exosomes for cancer immunotherapy: what's next? *Cancer Res.* 70, 1281–1285. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3276

Vidal, M., Mangeat, P., Hoekstra, D., 1997. Aggregation reroutes molecules from a recycling to a vesicle-mediated secretion pathway during reticulocyte maturation. *J. Cell Sci.* 110 (Pt 16), 1867–1877.

Vidal, M., Sainte-Marie, J., Philippot, J.R., Bienvenue, A., 1989. Asymmetric distribution of phospholipids in the membrane of vesicles released during in vitro maturation of guinea pig reticulocytes: evidence precluding a role for “aminophospholipid translocase”. *J. Cell. Physiol.* 140, 455–462. doi:10.1002/jcp.1041400308

Vilgelm, A., Wei, J.X., Piauelo, M.B., Washington, M.K., Prassolov, V., El-Rifai, W., Zaika, A., 2008a. DeltaNp73alpha regulates MDR1 expression by inhibiting p53 function. *Oncogene* 27, 2170–2176. doi:10.1038/sj.onc.1210862

Vilgelm, A., Wei, J.X., Piauelo, M.B., Washington, M.K., Prassolov, V., El-Rifai, W., Zaika, A., 2008b. DeltaNp73alpha regulates MDR1 expression by inhibiting p53 function. *Oncogene* 27, 2170–2176. doi:10.1038/sj.onc.1210862

Vilgelm, A.E., Hong, S.-M., Washington, M.K., Wei, J., Chen, H., El-Rifai, W., Zaika, A., 2010. Characterization of Δ Np73 expression and regulation in gastric and esophageal tumors. *Oncogene* 29, 5861–5868. doi:10.1038/onc.2010.319

Vogelstein, B., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Kern, S.E., Preisinger, A.C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A.M., Bos, J.L., 1988. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N. Engl. J. Med.* 319, 525–532. doi:10.1056/NEJM198809013190901

Vogelstein, B., Lane, D., Levine, A.J., 2000. Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307–310. doi:10.1038/35042675

Vossio, S., Palescandolo, E., Pediconi, N., Moretti, F., Balsano, C., Levrero, M., Costanzo, A., 2002. DN-p73 is activated after DNA damage in a p53-dependent manner to regulate p53-induced cell cycle arrest. *Oncogene* 21, 3796–3803. doi:10.1038/sj.onc.1205465

Wager, M., Guilhot, J., Blanc, J.-L., Ferrand, S., Milin, S., Bataille, B., Lapierre, F., Denis, S., Chantereau, T., Larsen, C.-J., Karayan-Tapon, L., 2006. Prognostic value of increase in transcript levels of Tp73 DeltaEx2-3 isoforms in low-grade glioma patients. *Br. J. Cancer* 95, 1062–1069. doi:10.1038/sj.bjc.6603410

Wakasugi, T., Izumi, H., Uchiumi, T., Suzuki, H., Arao, T., Nishio, K., Kohno, K., 2007. ZNF143 interacts with p73 and is involved in cisplatin resistance through the transcriptional regulation of DNA repair genes. *Oncogene* 26, 5194–5203. doi:10.1038/sj.onc.1210326

Wang, J.Y., 2000. Regulation of cell death by the Abl tyrosine kinase. *Oncogene* 19, 5643–5650. doi:10.1038/sj.onc.1203878

Wang, Y., He, X., Yu, Q., Eng, C., 2013. Androgen receptor-induced tumor suppressor, KLLN, inhibits breast cancer growth and transcriptionally activates p53/p73-mediated apoptosis in breast carcinomas. *Hum. Mol. Genet.* doi:10.1093/hmg/ddt077

Wei, J., Zaika, E., Zaika, A., 2011. p53 Family: Role of Protein Isoforms in Human Cancer. *J. Nucleic Acids* 2012, e687359. doi:10.1155/2012/687359

WHO | World Health Organization [WWW Document], n.d. WHO. URL <http://www.who.int/en/> (accessed 5.3.14).

Wilhelm, M.T., Rufini, A., Wetzel, M.K., Tsuchihara, K., Inoue, S., Tomasini, R., Itie-Youten, A., Wakeham, A., Arsenian-Henriksson, M., Melino, G., Kaplan, D.R., Miller, F.D., Mak, T.W., 2010. Isoform-specific p73 knockout mice reveal a novel role for delta Np73 in the DNA damage response pathway. *Genes Dev.* 24, 549–560. doi:10.1101/gad.1873910

Winawer, S.J., St John, J., Bond, J., Hardcastle, J.D., Kronborg, O., Flehinger, B., Schottenfeld, D., Blinov, N.N., 1990. Screening of average-risk individuals for colorectal cancer. WHO Collaborating Centre for the Prevention of Colorectal Cancer. *Bull. World Health Organ.* 68, 505–513.

Winter, R.N., Kramer, A., Borkowski, A., Kyprianou, N., 2001. Loss of caspase-1 and caspase-3 protein expression in human prostate cancer. *Cancer Res.* 61, 1227–1232.

Wolfers, J., Lozier, A., Raposo, G., Regnault, A., Théry, C., Masurier, C., Flament, C., Pouzieux, S., Faure, F., Tursz, T., Angevin, E., Amigorena, S., Zitvogel, L., 2001. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat.*

Med. 7, 297–303. doi:10.1038/85438

Wong, S.W., Tiong, K.H., Kong, W.Y., Yue, Y.C., Chua, C.H., Lim, J.Y., Lee, C.Y., Quah, S.I., Fow, C., Chung, C., So, I., Tan, B.S., Choo, H.L., Rosli, R., Cheong, S.-K., Leong, C.-O., 2011. Rapamycin synergizes cisplatin sensitivity in basal-like breast cancer cells through up-regulation of p73. *Breast Cancer Res. Treat.* 128, 301–313. doi:10.1007/s10549-010-1055-0

Wu, D., Ding, Y., Wang, S., Zhang, Q., Liu, L., 2008. Increased expression of high mobility group box 1 (HMGB1) is associated with progression and poor prognosis in human nasopharyngeal carcinoma. *J. Pathol.* 216, 167–175. doi:10.1002/path.2391

Wu, S., Murai, S., Kataoka, K., Miyagishi, M., 2008. Yin Yang 1 induces transcriptional activity of p73 through cooperation with E2F1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 365, 75–81. doi:10.1016/j.bbrc.2007.10.145

Wubbolts, R., Leckie, R.S., Veenhuizen, P.T.M., Schwarzmann, G., Möbius, W., Hoernschemeyer, J., Slot, J.-W., Geuze, H.J., Stoorvogel, W., 2003. Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. *J. Biol. Chem.* 278, 10963–10972. doi:10.1074/jbc.M207550200

Wurdinger, T., Gatsen, N.N., Balaj, L., Kaur, B., Breakefield, X.O., Pegtel, D.M., 2012. Extracellular vesicles and their convergence with viral pathways. *Adv. Virol.* 2012, 767694. doi:10.1155/2012/767694

www.aecc.es, n.d.

www.cne.isciii.es, n.d.

Xing, F., Saidou, J., Watabe, K., 2010. Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 15, 166–179.

Yang, A., Kaghad, M., Wang, Y., Gillett, E., Fleming, M.D., Dötsch, V., Andrews, N.C., Caput, D., McKeon, F., 1998. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol. Cell* 2, 305–316.

Yang, A., Walker, N., Bronson, R., Kaghad, M., Oosterwegel, M., Bonnin, J., Vagner, C., Bonnet, H., Dikkes, P., Sharpe, A., McKeon, F., Caput, D., 2000. p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature* 404, 99–103. doi:10.1038/35003607

Yang, C., Robbins, P.D., 2011. The Roles of Tumor-Derived Exosomes in Cancer Pathogenesis. *Clin. Dev. Immunol.* 2011. doi:10.1155/2011/842849

Yao, X., Zhao, G., Yang, H., Hong, X., Bie, L., Liu, G., 2010. Overexpression of high-mobility group box 1 correlates with tumor progression and poor prognosis in human colorectal carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 136, 677–684. doi:10.1007/s00432-009-0706-1

Yorimitsu, T., Klionsky, D.J., 2005. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ.* 12 Suppl 2, 1542–1552. doi:10.1038/sj.cdd.4401765

Yu, Q., 2006. Restoring p53-mediated apoptosis in cancer cells: new opportunities for cancer

therapy. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* 9, 19–25. doi:10.1016/j.drup.2006.03.001

Zaika, A., Irwin, M., Sansome, C., Moll, U.M., 2001. Oncogenes induce and activate endogenous p73 protein. *J. Biol. Chem.* 276, 11310–11316. doi:10.1074/jbc.M005737200

Zaika, A.I., Slade, N., Erster, S.H., Sansome, C., Joseph, T.W., Pearl, M., Chalas, E., Moll, U.M., 2002. Δ Np73, A Dominant-Negative Inhibitor of Wild-type p53 and TAp73, Is Up-regulated in Human Tumors. *J. Exp. Med.* 196, 765–780. doi:10.1084/jem.20020179

Zhang, H.-G., Liu, C., Su, K., Su, K., Yu, S., Zhang, L., Zhang, S., Wang, J., Cao, X., Grizzle, W., Kimberly, R.P., 2006. A membrane form of TNF- α presented by exosomes delays T cell activation-induced cell death. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 176, 7385–7393.

Zhang, X.-D., Qi, L., Wu, J.-C., Qin, Z.-H., 2013. DRAM1 regulates autophagy flux through lysosomes. *PloS One* 8, e63245. doi:10.1371/journal.pone.0063245

Zhang, Y., Yan, W., Jung, Y.S., Chen, X., 2012. Mammary Epithelial Cell Polarity Is Regulated Differentially by p73 Isoforms via Epithelial-to-mesenchymal Transition. *J. Biol. Chem.* 287, 17746–17753. doi:10.1074/jbc.M112.358143

Zhang, Y., Yan, W., Jung, Y.S., Chen, X., 2013. PUMA Cooperates with p21 to Regulate Mammary Epithelial Morphogenesis and Epithelial-To-Mesenchymal Transition. *PLoS ONE* 8. doi:10.1371/journal.pone.0066464

Zhu, J., Jiang, J., Zhou, W., Chen, X., 1998. The potential tumor suppressor p73 differentially regulates cellular p53 target genes. *Cancer Res.* 58, 5061–5065.

Zhuang, G., Wu, X., Jiang, Z., Kasman, I., Yao, J., Guan, Y., Oeh, J., Modrusan, Z., Bais, C., Sampath, D., Ferrara, N., 2012. Tumour-secreted miR-9 promotes endothelial cell migration and angiogenesis by activating the JAK-STAT pathway. *EMBO J.* 31, 3513–3523. doi:10.1038/emboj.2012.183

Zitterbart, K., Zavrelova, I., Kadlecova, J., Spesna, R., Kratochvilova, A., Pavelka, Z., Sterba, J., 2007. p73 expression in medulloblastoma: TAp73/ Δ Np73 transcript detection and possible association of p73 α / Δ Np73 immunoreactivity with survival. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 114, 641–650. doi:10.1007/s00401-007-0298-2

Zorić, A., Horvat, A., Slade, N., 2013. Differential effects of diverse p53 isoforms on TAp73 transcriptional activity and apoptosis. *Carcinogenesis* 34, 522–529. doi:10.1093/carcin/bgs370

8 ANEXO I

Gran parte del trabajo presentado en esta tesis doctoral se haya descrito en los siguientes artículos:

1. **Beatriz Soldevilla**, Raquel Díaz, Javier Silva, Concepción Muñoz, Vanesa García, José M García, Cristina Peña, Mercedes Herrera, Marta Rodríguez, Irene Gómez, Nagat Mohamed, Félix Bonilla and Gemma Domínguez. “Prognostic impact of Δ TAp73 isoforms levels and their target genes in colon cancer patients” Clin Cancer Res. 2011 Sep 15; 17(18):6029-39.
2. **Beatriz Soldevilla**, Marta Rodríguez, Coral San Millán, Vanesa García, Rodrigo Fernández-Periañez, Beatriz Gil- Calderón, Paloma Martín, Arantxa García-Grande, Javier Silva, Félix Bonilla and Gemma Domínguez. “Tumor-derived exosomes are enriched in Δ Np73, promote oncogenic potential to acceptor cells and correlate with patients survival” Hum Mol Genet 2014 Jan 15;23(2):467-78.

Durante este periodo de formación, el doctorando ha participado en las siguientes contribuciones científicas:

1. **Beatriz Soldevilla**, Coral San Millán, Félix Bonilla and Gemma Domínguez. “The TP73 complex network: ready for clinical translation in cancer?” Genes Chromosomes Cancer. 2013 Nov;52(11):989-1006.
2. Raquel Díaz, José M.González-Sancho, **Beatriz Soldevilla**, Javier Silva, José M García, Cristina Peña, Mercedes Herrera, Irene García, Félix Bonilla and Gemma Domínguez. “Differential regulation of p73 isoforms by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 in a survivin-dependent manner in human colon and breast carcinomas” Genes Chromosomes Cancer. 2010 Dec; 49(12):1135-42. Índice de Impacto: 3.925
3. Rodriguez RM1, Huidobro C, Urdinguio RG, Mangas C, Soldevilla B, Domínguez G, Bonilla F, Fernandez AF, Fraga MF. “Aberrant epigenetic regulation of bromodomain BRD4 in human colon cáncer” J Mol Med (Berl). 2012 May;90(5):587-95. Índice de impacto: 5,2
4. Urdinguio RG, Fernandez AF, Moncada-Pazos A, Huidobro C, Rodriguez RM, Ferrero C, Martinez-Cambor P, Obaya AJ, Bernal T, Parra-Blanco A, Rodrigo L, Santacana M, Matias-Guiu X, **Soldevilla B**, Domínguez G, Bonilla F, Cal S, Lopez-Otin C, Fraga MF. “Immune dependent and independent anti-tumor activity of GM-CSF aberrantly expressed by mouse and human colorectal tumors” Cancer Res. 2013 Jan 1;73(1):395-405.
5. Mercedes Herrera, Alberto Herrera, Gemma Dominguez, Javier Silva, Vanesa García, Jose M García, Irene Gómez, **Beatriz Soldevilla**, Concepción Muñoz, Mariano

- Provencio, Yolanda Campos-Martín, Antonio García de Herreros, Ignacio Casal, Félix Bonilla, Cristina Peña. “Cancer-Associated Fibroblast and M2 Macrophage markers together predict outcome in Colorectal Cancer patients” Cancer Sci. 2013 Apr;104(4):437-44.
6. Carmen Herrero, **Beatriz Soldevilla**, Belén Perez, Inmaculada Blanco, Mercedes Herrera, Félix Bonilla, Fernando Granado and Gemma Domínguez. “Modulation of DNA-induced damage and repair capacity in humans after dietary intervention with lutein enriched fermented milk” PLoS One. 2013 Sep 11;8(9):e74135.
 7. **Beatriz Soldevilla**, Raquel Díaz, Coral San Millán, Rocío Urduñigo, Mario Fraga, Félix Bonilla, Gemma Domínguez. “Survivin induces epigenetic changes in the p73 promoter modifying its transcription” BMC Cancer (ENVIADO)
 8. Coral San Millán, **Beatriz Soldevilla**, Paloma Martín, Beatriz Gil-Calderón, Marta Compte, Belén Pérez-Sacristán, Irene Blanco-Navarro, Jesús Romero, Fernando Granado, Félix Bonilla, Gemma Domínguez. “β-cryptoxanthin enhances the anti-tumoral activity of oxaliplatin through ΔNp73 negative regulation in colon cancer” Journal of Clinical Oncology (ENVIADO)
 9. **PATENTE: “Compuestos para el tratamiento del cáncer”** Universidad Autónoma de Madrid, Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda. Gemma Domínguez, Coral San Millán, **Beatriz Soldevilla**, Félix Bonilla. España. Solicitud patente **nºP201331376**. 30/10/2013.

9 ANEXO II

