

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
Programa de Doctorado de Biociencias Moleculares

**Identificación de
dianas efectoras
de $\Delta Np73$ asociadas a
angiogénesis y linfangiogénesis**

**Valor diagnóstico
y pronóstico en
vesículas extracelulares
en pacientes con
 $\Delta Np73$ **cáncer colorrectal****

Javier Rodríguez Cobos
Madrid, 2022

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

IDENTIFICACIÓN DE DIANAS EFECTORAS DE $\Delta Np73$ ASOCIADAS A
ANGIOGÉNESIS Y LINFANGIOGÉNESIS. VALOR DIAGNÓSTICO Y
PRONÓSTICO EN VESÍCULAS EXTRACELULARES EN PACIENTES
CON CÁNCER COLORRECTAL.

Tesis doctoral presentada por:

Javier Rodríguez Cobos,

Graduado en Biología

Bajo la dirección de:

Dra. Gemma Domínguez Muñoz

Dra. Nuria Rodríguez Salas

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS ALBERTO SOLS (CSIC-UAM)

Madrid, 2022

La **Dra. Gemma Domínguez Muñoz**, Profesora titular del Departamento de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, y la **Dra. Nuria Rodríguez Salas**, Profesora asociada al Departamento de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid y facultativa especialista de área (FEA) del Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario La Paz,

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado "**IDENTIFICACIÓN DE DIANAS EFECTORAS DE Δ n μ 73 ASOCIADAS A ANGIOGÉNESIS Y LINFANGIOGÉNESIS. VALOR DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO EN VESÍCULAS EXTRACELULARES EN PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL**", que presenta **JAVIER RODRÍGUEZ COBOS** para la obtención del título de doctor por la Universidad Autónoma de Madrid, ha sido realizado bajo su dirección en el Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols (CSIC-UAM) y 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 Madrid a 08 de julio de 2022.

Dra. Gemma Domínguez Muñoz

Dra. Nuria Rodríguez Salas

Directora de tesis

Directora de tesis

Esta tesis doctoral se ha llevado a cabo en el Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols (CSIC-UAM), dentro del departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, bajo la codirección de la Dra. Gemma Domínguez Muñoz y la Dra. Nuria Rodríguez Salas.

Parte de la metodología experimental se realizó en colaboración con el grupo de investigación liderado por el Dr. Rodrigo Barderas Manchado, de la Unidad Funcional de Investigación en Enfermedades Crónicas del Instituto de Salud Carlos III, y con el Dr. Héctor Peinado, del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO). También hemos colaborado con investigadores clínicos, la Dra. María Jesús Fernández Aceñero del Hospital Gregorio Marañón, la Dra. Carmen Poves del Hospital Clínico San Carlos, la Dra. Isabel Prieto Nieto del Hospital Universitario La Paz y el personal del Biobanco de IdiPAZ.

La financiación económica que ha permitido llevar a cabo este trabajo ha sido proporcionada por la Consejería de Educación, Juventud y Deporte de la Comunidad de Madrid y el Fondo Social Europeo bajo el Programa Operativo de Empleo Juvenil y la Iniciativa de Empleo Juvenil (YEI), la Cátedra en Medicina de Innovación ROCHE-UAM y los proyectos PI15/00246 y PI18/00473 del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) cofinanciados con fondos FEDER.



Los programas informáticos, las bases de datos y las fuentes de información utilizadas en esta tesis doctoral han sido versiones gratuitas y públicas. Las figuras descriptivas de esta memoria han sido "creadas con BioRender.com" para su uso académico. El diseño y creación de la cubierta (portada y contraportada) ha sido posible gracias a "Egido Pablos. Comunicación Gráfica" (egidopablos@gmail.com).

AGRADECIMIENTOS

En este pequeño espacio libre y personal que se me ofrece, aprovecho a escribir que a pesar de lo escabroso del camino he conseguido llegar al final de este capítulo.

Hace ya más de 5 años que abandoné mi ciudad de origen, Salamanca, para continuar mi formación con la realización de una tesis doctoral en la capital. Aunque dejé todo atrás para buscar esa oportunidad con decisión firme y valor, el primer año fue infructuoso y marcado por una "supervivencia" asfixiante. Por suerte no empecé solo, Ana fue como un pilar que nos mantuvo a flote. Fue mucho tiempo y la balanza siempre estuvo del lado bueno, te deseo lo mejor. A su vez, las cosas del destino me juntaron con *Rash*, bendita locura que me acogió como a un familiar con fe ciega.

Tras ese año de sombras persistentes, es definitivamente en 2018 cuando empiezo este camino de verdad en el Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols (IIB) al permitirme Gemma Domínguez unirme a su grupo de investigación. A pesar de haber sido un camino manchado por las adversidades y continuos obstáculos que nos han sucedido durante el mismo, gracias a la lucha constante y la perseverancia de ambos, hemos logrado completar esta tesis doctoral. Dejando a un lado toda la enseñanza y experiencia transmitida por su parte, y no por ello menos importante, quiero remarcar su calidez, apoyo y comprensión humana, que fue en primer lugar lo que me llevó a entrar en su laboratorio. Además, he disfrutado y aprendido con los compañeros que han pasado durante estos años por el laboratorio como Adrián (*my best canarian boy*), Patricia, Dani, David, Jorge, Valeria, Lucia y Lidia.

Este agradecimiento se extiende a mi codirectora Nuria Rodríguez, encantadora y gran profesional, que sin ella no habría sido posible continuar con el trabajo empezado ni adentrarme en el ámbito clínico-traslacional. Aprovecho también a valorar enormemente a Rodrigo Barderas y su grupo por el trabajo en colaboración, enseñanza y apoyo para concluir esta tesis. En esta línea, también quiero agradecer a Alberto Muñoz y los integrantes de su laboratorio, Chus, Toño, Asun, David, Pilar, Gemma y José, por permitirme trabajar, ampliar mis conocimientos y capacidad laboral compartiendo este último año con ellos.

Por supuesto, mi paso por este centro de investigación me ha rodeado de buenos compañeros de trabajo, como el maravilloso personal de los servicios o las chicas de Valverde y otros laboratorios, pero también me ha dado amigos fantásticos. Empezaré por Pilar, que me ha brindado innumerables momentos de risas, cariño, cuidado, noches de *free fire, urban hiking* y, además, sorprendentes (y algunas dudosas) recetas culinarias. Junto a ella, han estado Alberto, Carla, Celia, María, Diana, Ana, Rosa, Carlos, Ángela, Alba y Julia, compartiendo tardes

AGRADECIMIENTOS

de cervezas y cervezas (*El Montoya*, un oasis en el desierto), fiestas diversas turnándonos el top 3 de ir "*lacasito*", nuestros "pinitos" como *runners*, días de piscina y playa, inexplicables planes con el fin de comer cocido, reuniones como asociación improvisada y permanente de quejas y desahogos, juegos de mesa (y sin ella) o historias de fantasía mejores que la realidad. De manera especial, agradezco a Rosa por todo lo que no soy capaz de expresar con palabras, pero me hace sentir y aporta a mi vida.

No me puedo permitir (ni quiero) pasar por alto a la gente que ha estado en la distancia. El grupito farma-biólogos, Cris, Juan, Ana, Alicia y yo, hemos tenido la suerte de seguir reuniéndonos anualmente. En mi Salamanca natal, han permanecido mis buenos amigos José, Pablo y Luismi, siendo el primero el mayor instigador que haya existido para subir cumbres, recorrer rutas exageradamente largas y el culpable de meterme en *ultra speed hiking*, pero sobre todo aquí ha habido mucho "cloro", muchas tardes y centros de culto como *el Pani*, *el Moderno*, *el Astaroth*, *el Bender*, *el Ciao*, *el Potemkin* y más y más. No me olvido de Juli y los momentos de "celebrasao", ni de Leo, que es el culpable de que quisiera hacer una tesis doctoral. Tampoco podía faltar la mención a mi familia, mi pequeño sobrino y otras personas que forman mi entorno.

Por último, y dejando para el final lo más importante, mi honor me obliga a dedicar esta tesis doctoral a mis padres, que siempre se han sacrificado y luchado extraordinariamente por sus hijos. Lo habéis hecho muy bien.

- *Viaje antes que Destino* -

RESUMEN/SUMMARY

El cáncer colorrectal es el tumor con mayor incidencia en la población general de nuestro país y el segundo en mortalidad. La detección de este tipo de cáncer en etapas tempranas podría mejorar la supervivencia y pronóstico del paciente, sin embargo, las técnicas de cribado poblacional actuales presentan limitaciones en este propósito. En el origen del cáncer colorrectal tiene lugar la desactivación de diversos genes clave para las células y/o la activación de oncogenes por distintos eventos genéticos y epigenéticos. En este contexto tumoral, se ha demostrado que la isoforma oncogénica $\Delta Np73$ está implicada en el proceso de carcinogénesis y progresión tumoral, además de asociarse a peor pronóstico en los pacientes con cáncer colorrectal.

En esta tesis doctoral nos hemos centrado en estudiar e identificar las posibles dianas efectoras de la isoforma $\Delta Np73$ y en qué procesos o actividades protumorales están implicadas. Para ello hemos llevado a cabo ensayos proteómicos basados en microarrays de anticuerpos y marcaje metabólico con isótopos estables junto con ensayos funcionales *in vitro* de ganancia y pérdida de función. Hemos identificado en el secretoma de células tumorales de cáncer colorrectal diversas proteínas desreguladas implicadas en adhesión celular, migración e invasión, metabolismo, unión y reparación del ADN, angiogénesis y linfangiogénesis. Aquí, validamos la implicación de BDNF y EMAP-II como mediadores del papel de $\Delta Np73$ en angiogénesis y linfangiogénesis. Además, comprobamos que la desregulación de estos dos mediadores es independiente del estatus de p53. Asimismo, hemos mostrado que BDNF es un excelente candidato a biomarcador de diagnóstico precoz dada su presencia diferencial en el plasma sanguíneo de individuos con lesiones premalignas y pacientes con cáncer colorrectal.

Por otro lado, hemos explorado el papel de las isoformas $\Delta Np73$, TAp73 y $\Delta 133p53$ como biomarcadores de diagnóstico y pronóstico en biopsia líquida. Con este fin, se ha analizado el contenido de ARN mensajero de dichas isoformas en vesículas extracelulares de individuos sanos, con lesiones premalignas y pacientes con cáncer colorrectal. Hemos observado que las isoformas TAp73 no se empaquetan en vesículas extracelulares. Además, hemos encontrado que el contenido de $\Delta Np73$ y $\Delta 133p53$ en vesículas extracelulares del plasma sanguíneo presenta potencial como biomarcador de diagnóstico precoz y pronóstico, respectivamente.

Colorectal cancer is the tumor type with the highest incidence and the second in terms of mortality in our country. Consequently, detecting colorectal cancer at an early stage is crucial to improve patient survival and prognosis, but current population screening techniques have limitations for this purpose. In the colorectal cancer development, different genetic and epigenetic events establish the deactivation of key genes and the activation of oncogenes. In this sense, the oncogenic isoform $\Delta Np73$ has been involved in the process of carcinogenesis and tumor progression. Additionally, it is associated with a worse prognosis in patients with colorectal cancer.

In this doctoral thesis, we have studied and identified the possible effectors of $\Delta Np73$ and in which protumoral activities they could be involved. For this, we have performed proteomic assays such as antibody microarrays and *Stable Isotopic Labeling with Amino acids* (SILAC) and *in vitro* functional assays for gain and loss of function. Therefore, we have identified several dysregulated proteins involved in cell adhesion, migration and invasion, metabolism, DNA binding and repair, angiogenesis and lymphangiogenesis. Here, we have validated the implication of BDNF and EMAP-II as mediators of the role of $\Delta Np73$ in angiogenesis and lymphangiogenesis, showing that they could be putative effectors of this isoform and that their deregulation is independent of p53 status. Likewise, we have shown that protein levels of BDNF in blood plasma have great potential as an early diagnostic biomarker in colorectal cancer.

On the other hand, we have explored the role of p53 family isoforms ($\Delta Np73$, TAp73 y $\Delta 133p53$) in diagnosis and prognosis in liquid biopsy. In this work, we have analyzed the content of mRNA of these isoforms in extracellular vesicles from healthy individuals, with premalignant lesions and patients with colorectal cancer. We have observed that the TAp73 isoforms are not packaged in extracellular vesicles. Besides, we have found the contents of $\Delta Np73$ and $\Delta 133p53$ in extracellular vesicles have potential as a biomarker for early diagnosis and prognosis, respectively.

TABLA DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS	1
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABLAS	13
ABREVIATURAS	17
1. INTRODUCCIÓN	25
1.1 CÁNCER	27
1.1.1 Angiogénesis/linfangiogénesis	28
1.1.1.1 BDNF	29
1.1.1.2 EMAP-II	30
1.2. CÁNCER COLORRECTAL	30
1.2.1 Incidencia y mortalidad	30
1.2.2 Carcinogénesis colorrectal	31
1.2.3 Diagnóstico del cáncer colorrectal	33
1.2.3.1 Técnicas de cribado poblacional	33
1.2.3.2 Biopsia líquida y biomarcadores	34
1.2.3.3 Vesículas extracelulares	35
1.3. FAMILIA p53	37
1.4. GEN <i>TP53</i>	38
1.4.1 Las isoformas de p53	39
1.4.2 Implicación de p53 en cáncer	40
1.5. GEN <i>TP73</i>	42
1.5.1 Las isoformas de p73	42
1.5.2 Actividades oncogénicas de las variantes Δ TAp73	43
1.5.3 Implicación clínica de Δ Np73	45

1.6 CONSIDERACIONES FINALES	46
2. OBJETIVOS	47
3. MATERIALES Y MÉTODOS	51
3.1 ESTUDIOS CON LÍNEAS CELULARES HUMANAS	53
3.1.1 Líneas celulares empleadas	53
3.1.2 Cultivo y mantenimiento de las líneas celulares	53
3.2 ESTABLECIMIENTO DE LA SOBREENPRESIÓN ESTABLE DE $\Delta Np73$ EN CÉLULAS HCT116 y HCT116 TP53 (-/-)	54
3.2.1 Transfección de ADN	54
3.2.2 Selección celular	54
3.3 ANÁLISIS PROTEÓMICO DEL SECRETOMA POR MICROARRAYS DE ANTICUERPOS	55
3.3.1 Obtención de los medios condicionados	56
3.3.2 Incubación del secretoma en el microarray	56
3.4 ANÁLISIS PROTEÓMICO MEDIANTE MARCAJE METABÓLICO CON ISÓTOPOS ESTABLES DE AMINOÁCIDOS EN CULTIVO CELULAR (SILAC)	57
3.4.1 Marcaje metabólico	57
3.4.2 Espectrometría de masas	59
3.5 ESTUDIO Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LOS RESULTADOS PROTEÓMICOS	60
3.6 LISIS CELULAR Y EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS	61
3.7 PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS CON METANOL Y CLOROFORMO	61
3.8 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO DE TRIPTÓFANO (Trp)	61
3.9 ANÁLISIS Y DETECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE ESTUDIO	62
3.9.1 Western blot	62
3.9.2 Dot-blot	62

3.10 ANÁLISIS DEL CONTENIDO PROTEICO MEDIANTE ELISA	63
3.11 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA Y DE ARN MENSAJERO	64
3.11.1 Extracción de ARN	64
3.11.2 Síntesis de ADN complementario mediante retro-transcripción	64
3.11.3 PCR semicuantitativa	65
3.11.4 PCR cuantitativa (qPCR)	65
3.12 TRATAMIENTO DE MUESTRAS DE ARN CON ADNAsas	67
3.13 EVALUACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR	67
3.13.1 Obtención del medio condicionado de HCT116- Δ Np73 para ensayos funcionales	67
3.13.2 Ensayo de proliferación celular	68
3.14. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE INVASIÓN CELULAR	68
3.14.1 Marcaje fluorescente de las células	68
3.14.2 Ensayo Transwell	69
3.15 ENSAYO DE TUBULOGÉNESIS O FORMACIÓN DE VASOS	69
3.16 ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DE BDNF Y EMAP-II EN EL ENSAYO DE TUBULOGÉNESIS	70
3.16.1 Silenciamiento transitorio por ARNs de interferencia	70
3.16.2 Ensayo de tubulogénesis	71
3.17 MUESTRAS HUMANAS	71
3.17.1 Muestras humanas usadas en el primer bloque de la tesis	72
3.17.2 Muestras humanas usadas en el segundo bloque de la tesis	72
3.18 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE VESÍCULAS EXTRACELULARES	74
3.19 CUANTIFICACIÓN DE VESÍCULAS EXTRACELULARES MEDIANTE ANÁLISIS DE SEGUIMIENTO DE NANOPARTÍCULAS	74
3.20 ESTUDIO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	75

TABLA DE CONTENIDOS

3.20.1 Resultados de los ELISAs en muestras humanas	75
3.20.2 Curvas ROC y área bajo la curva (AUC)	75
3.20.3 Análisis de supervivencia	75
4. RESULTADOS	77
4.1 IDENTIFICACIÓN Y VALIDACIÓN DE LAS DIANAS EFECTORAS DE ΔNp73 EN EL CÁNCER COLORRECTAL	79
4.1.1 Identificación de citoquinas y otras proteínas de secreción desreguladas en el secretoma de HCT116 por la sobreexpresión de Δ Np73	79
4.1.1.1 Validación de la sobreexpresión estable de Δ Np73	79
4.1.1.2 Identificación de las proteínas desreguladas por microarray de anticuerpos	80
4.1.2 Estudio del efecto de la sobreexpresión de Δ Np73 en el secretoma de HCT116 mediante marcaje metabólico de isótopos estables	82
4.1.3 Evaluación y análisis bioinformático de las funciones biológicas y rutas celulares de las proteínas desreguladas por Δ Np73	85
4.1.3.1 Confirmación bioinformática de la secreción de las proteínas	85
4.1.3.2 Funciones biológicas de las proteínas desreguladas	86
4.1.4 Validación de las proteínas desreguladas por Δ Np73	88
4.1.5 Implicación de Δ Np73 y sus efectores en los procesos de vasculogénesis y linfangiogénesis	93
4.1.6 Análisis de VEGFC, VEGFR3, BDNF Y EMAP-II como biomarcadores en sangre para el cáncer colorrectal	97
4.2 PAPEL DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO DE LAS ISOFORMAS DE LA FAMILIA p53 EN VESÍCULAS EXTRACELULARES EN PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL	101
4.2.1 Evaluación del contenido de Δ Np73, TAp73 Y Δ 133p53 en vesículas extracelulares	101
4.2.2 Potencial de Δ Np73 Y Δ 133p53 como biomarcadores clínicos frente a CEA	103
4.2.3 Correlación de Δ Np73 Y Δ 133p53 en vesículas extracelulares con el estadio tumoral, la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global	105

4.2.4 Correlación entre la seroreactividad de los miembros de la familia de p53 y su contenido en vesículas extracelulares	108
5. DISCUSIÓN	109
5.1 IDENTIFICACIÓN Y VALIDACIÓN DE LAS DIANAS EFECTORAS DE ΔNp73 EN EL CÁNCER COLORRECTAL	112
5.1.1 Moduladores de migración, invasión y metástasis	112
5.1.2 Mediadores de la supervivencia celular	113
5.1.3 Posibles moduladores en el metabolismo tumoral	115
5.1.4 Posibles efectores de Δ Np73 en su papel asociado a la angiogénesis y linfangiogénesis	115
5.1.5 Evaluación de los potenciales efectores de Δ Np73 como biomarcadores para el cáncer colorrectal	119
5.2 PAPEL EN DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO DE LAS ISOFORMAS DE LA FAMILIA P53 EN VESÍCULAS EXTRACELULARES	121
5.2.1 Empaquetamiento en vesículas extracelulares de las isoformas de la familia p53	121
5.2.2 Potencial como biomarcadores de diagnóstico y pronóstico	122
6. CONCLUSIONES	125
BIBLIOGRAFÍA	129
ANEXO	149
Artículo 1	153
Artículo 2	175

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Capacidades clave o <i>Hallmarks</i> del cáncer.	28
Figura 2. Progresión de la secuencia pólipo-adenocarcinoma.	32
Figura 3. Representación esquemática de los principales dominios estructurales de los miembros de la familia p53.	38
Figura 4. Representación estructural del gen <i>TP53</i> y de la generación de las diferentes isoformas.	39
Figura 5. Representación estructural del gen <i>TP73</i> y de la generación de las diferentes isoformas.	43
Figura 6. Selección celular por citometría de flujo mediante el marcador GFP.	55
Figura 7. Flujo de trabajo para el análisis del secretoma por marcaje metabólico SILAC.	58
Figura 8. Confirmación de los niveles de expresión de Δ Np73 en la línea celular HCT116- Δ Np73.	80
Figura 9. Resultado del microarray de anticuerpos al estudiar el secretoma alterado de la línea HCT116- Δ Np73.	80
Figura 10. Espectrometría de masas del secretoma alterado por la isoforma oncogénica Δ Np73.	82
Figura 11. Mapa de interacciones existentes entre las proteínas desreguladas.	87
Figura 12. Comprobación de la desregulación a nivel de ARN de las proteínas alteradas por Δ Np73.	88
Figura 13. Validación de la desregulación de las proteínas asociadas a angiogénesis y linfangiogénesis.	89
Figura 14. Análisis de la relación entre el contenido proteico de BDNF y EMAP-II y los niveles de expresión de Δ Np73.	90
Figura 15. Confirmación de la desregulación de BDNF y EMAP-II a través de Δ Np73.	91
Figura 16. Validación del papel de p53 en la desregulación del secretoma por la sobreexpresión de Δ Np73.	92
Figura 17. Efecto del secretoma alterado por Δ Np73 de la línea HCT116 en el cultivo de células HUVEC y HLEC.	93
Figura 18. Efecto del secretoma alterado por Δ Np73 de la línea HCT116 en el ensayo de tubulogénesis de HUVEC y HLEC .	94

Figura 19. Efecto del silenciamiento transitorio de BDNF en el ensayo de tubulogénesis de HUVEC y HLEC.	95
Figura 20. Efecto del silenciamiento transitorio de EMAP-II en el ensayo de tubulogénesis de HUVEC y HLEC.	96
Figura 21. Evaluación de los niveles de BDNF, EMAP-II, VEGFR3 y VEGFC en plasma sanguíneo.	97
Figura 22. Estudio del potencial como biomarcador en plasma sanguíneo de BDNF y EMAP-II.	99
Figura 23. Análisis de seguimiento de nanopartículas (NAT) de las vesículas extracelulares aisladas del plasma sanguíneo.	102
Figura 24. Comparación de los niveles de Δ Np73 y Δ 133p53 en las vesículas extracelulares de los grupos de estudio.	102
Figura 25. Evaluación del potencial como biomarcador diagnóstico en biopsia líquida del contenido de Δ Np73 en vesículas extracelulares.	103
Figura 26. Evaluación del potencial como biomarcador diagnóstico en biopsia líquida del contenido de Δ 133p53 en vesículas extracelulares.	104
Figura 27. Evaluación del potencial como biomarcador diagnóstico en sangre de los niveles de CEA.	105
Figura 28. Comparación de los niveles de Δ Np73 en vesículas extracelulares de los pacientes con cáncer colorrectal clasificados según el estadio tumoral.	106
Figura 29. Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier de los pacientes con CCR según los niveles de Δ Np73 y Δ 133p53 en vesículas extracelulares.	107
Figura 30. Modelo propuesto del papel protumoral de Δ Np73 a través de BDNF y el eje VEGC-EMAP-II-VEGFR3.	118

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Lista de anticuerpos primarios y secundarios usados en la inmunodetección de las proteínas de estudio.	63
Tabla 2. Secuencias de los cebadores directo y reverso para los genes analizados mediante PCR semicuantitativa.	65
Tabla 3. Secuencias de los cebadores directo y reverso para los genes analizados mediante PCR cuantitativa (qPCR).	66
Tabla 4. Datos clínicos de interés de los individuos incluidos en el estudio de análisis del plasma sanguíneo por ELISA.	72
Tabla 5. Datos clínicos de interés de los individuos incluidos en el estudio de análisis del contenido en vesículas extracelulares.	73
Tabla 6. Proteínas desreguladas por la sobreexpresión de Δ Np73 en el secretoma de la línea celular de cáncer de colon HCT116.	81
Tabla 7. Proteínas desreguladas por la sobreexpresión de Δ Np73 en el secretoma de la línea celular de cáncer de colon HCT116 mediante marcaje SILAC y espectrometría de masas.	83
Tabla 8. Correlación entre la seroreactividad de p53, p73, Δ Np73 α y Δ Np73 β en plasma sanguíneo y los niveles de Δ 133p53 y Δ Np73 en vesículas extracelulares.	108

ABREVIATURAS

ACN: Acetonitrilo

AIMP1: Del inglés *Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifuncional protein 1*

APEX1: ADN endonucleasa

AR: Anfiregulina

AST: Aspartato aminotransferasa

ATCC: Del inglés *American Type Culture Collection*

ATP5F1: Subunidad B de la ATP sintasa mitocondrial

AUC: Del inglés *Area under the curve*

BDNF: Del inglés *Brain-derived neurotrophic factor*

CALR: Calreticulina variante

CAPZB: Subunidad β de CAPZ

CCR: Cáncer colorrectal

CDH3: Cadherina 3

CEA: Antígeno carcinoembrionario

CID: Disociación inducida por colisión

CIMP: Del inglés *CgP island methylator phenotype*

CIN: Del inglés *Chromosomal Instability*

CMS: Del inglés *Consensus Molecular Subtypes*

CNIO: Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas

COL6A1: Cadena alfa-1 del colágeno tipo IV

COPS8: Subunidad 8 del complejo del signalosoma COP9

CRABP2: Proteína 2 de unión al ácido retinoico celular

CTCs: Células tumorales circulantes

ctDNA: ADN tumoral circulante

CXCR4: Receptor tipo 4 de la quimiocina C-X-C

ABREVIATURAS

DAVID: Del inglés *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*

DBD: Dominio de unión a ADN

DCP: Dundee Cell Products

DMEM: Del inglés *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

dNTPs: Deoxinucleotidos trifosfatos

DSC3: Desmocolina 3

DSG2: Desmogleina 2

ECGS: Del inglés *Endothelial Cell Growth Supplement*

ECM: Del inglés *Endothelial Cell Medium*

EIF3I: Subunidad I del factor de iniciación traduccional eucariótico 3

EMAP-II: Del inglés *Endothelial monocyte-activating polypeptide-II*

FDA: Del inglés *U.S. Food and Drug Administration*

FGF23: Factor de crecimiento de fibroblasto 23

FIT: Del inglés *Fecal Immunochemical test*

FOBT: Del inglés *Fecal occult blood test*

FZD6: Frizzled 6

GFP: Del inglés *Green Fluorescent Protein*

GFR: Del inglés *Growth Factor Reduced*

GLO1: Lactoilglutación liasa

GPR126: Receptor 126 acoplado a proteína G

GRN: Progranulina

HLEC: Del inglés *Human Lymphatic Endothelial Cells*

HPLC: Del inglés *High Performance Liquid Chromatography*

HUVEC: Del inglés *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*

IC: Intervalo de confianza

IdISCC: Instituto de Investigación Sanitaria Hospital Clínico San Carlos

IL17RD: Receptor D de la interleucina 17

IL1-Rrp2: Receptor 2 de tipo interleucina 1

IL20: Interleucina 20

IRES: Del inglés *Internal Ribosome Entry Site*

JPS: Del inglés *Juvenile polyposis syndrome*

LAMC2: Subunidad de la laminina gamma-2

LCN1: Lipocalina 1

LDHB: Lactato deshidrogenasa B

LGALS1: Galectina 1

LGALS3BP: Proteína de unión a galectina 3

lncRNA: Del inglés *Long non-coding RNA*

LRRFIP1: Del inglés *Leucine-rich repeat Flightless-interacting protein 1*

LT: Longitud total

LTS: Longitud total de segmentos

LTSM: Longitud total de segmentos maestros

MARCKSL1: Proteína MARCKS tipo 1

miRNA: Micro ARN

MMP20: Metaloproteinasa de matriz 20

MMR: Del inglés *DNA Mismatch repair*

MSI: Del inglés *Microsatellite Instability*

MSN: Moesina

MTT: Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

MUC18: Glucoproteína de superficie celular MUC18

n: Número de muestras

ABREVIATURAS

NA: No alcanzado

NAV: Número de anillos vasculares

NS: Número de segmentos

NSM: Número de segmentos maestros

NTA: Nanoparticle Tracking analysis

NU: Número de uniones

NUM: Número de uniones maestras

OD: Dominio de oligomerización

P/S: Penicilina/Estreptomicina

pb: Pares de bases

PDCD6IP: Proteína 6 de interacción en muerte celular programada

PET: Tereftalato de polietileno

PFAS: Fosforibosilformilglicinamida sintetasa

PTPRF: Receptor tipo tirosina fosfatasa F

PVDF: Fluoruro de polivinilideno

PVR: Receptor del poliovirus

PYGL: Glucógeno fosforilasa (forma hepática)

qPCR: PCR cuantitativa

QSOX1: Sulfhidrilo oxidasa 1

RBM3: Proteína 3 de unión a ARN

RE: Elemento de respuesta

ROC: Del inglés *Receiver Operating Characteristic*

RPA1: Proteína de replicación A1

S1PR1: Receptor 1 de la esfingosina-1-fosfato

SAM: Del inglés *Sterile alpha motif*

SG: Supervivencia general

siAIMP1: ARN de interferencia frente a AIMP1

siBDNF: ARN de interferencia frente a BDNF

siControl: ARN de interferencia control

SILAC: Del inglés *Stable Isotopic Labeling with Amino acids in Cell culture*

SLE: Supervivencia libre de enfermedad

SRI: Sorcina

SSP: Pólipo sésil serrado

TAD: Dominio de transactivación

TFA: Ácido trifluoroacético

TID: Dominio inhibidor de transactivación

TIMP2: Inhibidor 2 de la metalopeptidasa TIMP

TLN1: Talina 1

TNM: Tumor-nodo-metastasis

Trk β : Del inglés *Tropomyosin (or Tyrosine) receptor kinase beta*

Trp: Triptófano

TUBB4B: Tubulina 4B Clase IVb

u.a.: Unidades arbitrarias

VDAC1: Canal 1 de aniones dependiente de voltaje

VEs: Vesículas extracelulares

VEGF: Del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*

VEGFR: Del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*

WDR1: Proteína 1 de repetición WD

INTRODUCCIÓN

1.1 CÁNCER

El cáncer es uno de los mayores problemas de salud pública mundial. En el año 2020, las muertes por esta enfermedad ascendieron a casi 10 millones de personas en todo el mundo (1). En nuestro país, actualmente es la segunda causa de mortalidad, ocasionando más de 113 mil muertes en 2020 (1). La estimación de nuevos casos diagnosticados se incrementa año tras año, alcanzando más de 280 mil casos para 2022 (2). Estos casos están repartidos principalmente en edades superiores a los 45 años debido a la naturaleza del cáncer y al aumento de la esperanza de vida.

El cáncer abarca un amplio grupo de enfermedades muy heterogéneas y caracterizadas por la presencia de células que acumulan secuencial y progresivamente alteraciones genéticas y epigenéticas, que les confieren unas propiedades y/o capacidades clave para la proliferación, supervivencia y diseminación. Estas capacidades han sido descritas por Hanahan y Weinberg (3) y son la adquisición de una replicación celular descontrolada, supervivencia celular, la inactivación de genes supresores de tumor, la inmortalización replicativa, la inducción de la angiogénesis, la capacidad de invasión y migración, el metabolismo celular alterado y la evasión del sistema inmune (Figura 1). Pueden surgir en distintos tiempos de la enfermedad en función del tipo de tumor. El origen o adquisición de las mismas puede residir en la inestabilidad genómica, entre otras alteraciones, permitiendo el establecimiento de mutaciones en genes clave para estos procesos, o por el establecimiento de un ambiente inflamatorio, mediado por células del sistema inmune que liberan diversas moléculas bioactivas, como factores de crecimiento, de supervivencia o pro-angiogénicos, que promueven la progresión tumoral (3).

Recientemente, han propuesto nuevas capacidades como la alteración de la plasticidad fenotípica celular y la contribución de las células senescentes del microambiente tumoral. Asimismo, la reprogramación epigenética sin mutaciones y la interacción con el microbioma colaborarían a la adquisición de estas capacidades en el cáncer (4) (Figura 1).

Aunque todas estas características son clave, algunas de ellas son esenciales para la progresión del tumor y su diseminación por el organismo en las etapas más avanzadas de la enfermedad, como la angiogénesis y linfangiogénesis. En esta tesis doctoral nos centraremos en estudiar éstas en nuestra línea de investigación.

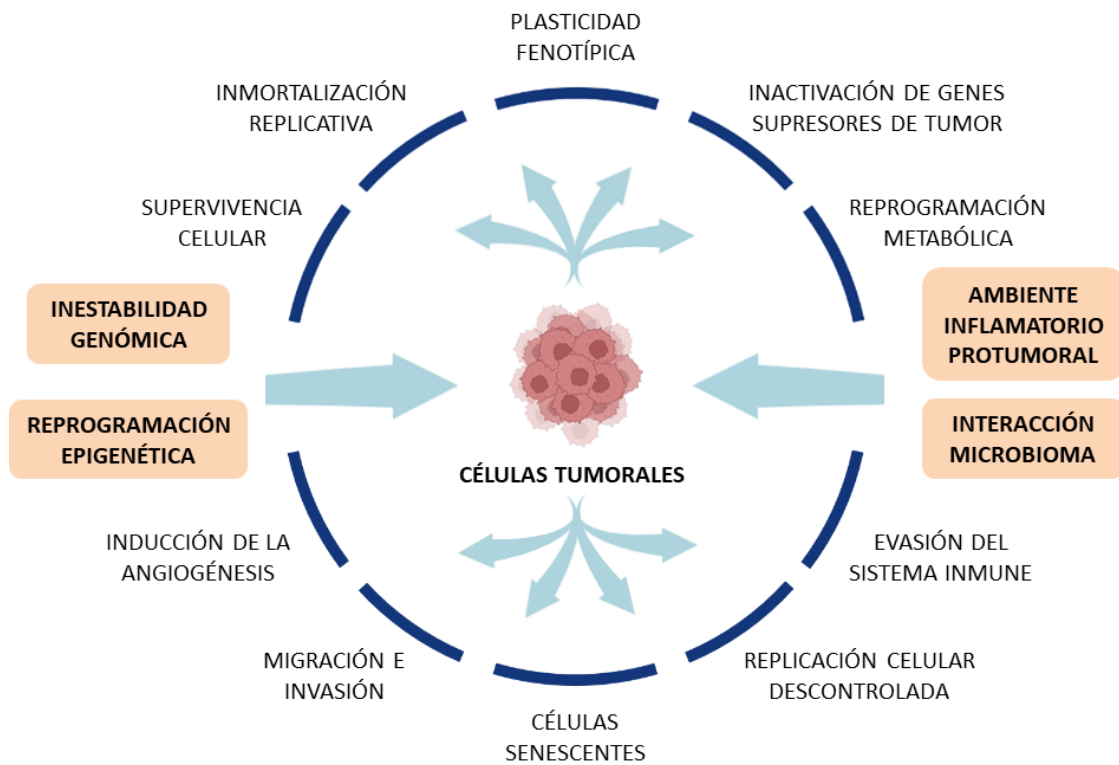


Figura 1. Capacidades clave o Hallmarks del cáncer. Basado en el modelo de Hanahan y Weinberg (3, 4). Debido principalmente a la inestabilidad genómica, la reprogramación epigenética, un ambiente inflamatorio protumoral y la interacción con el microbioma, las células tumorales pueden presentar o adquirir las capacidades indicadas, que les permite y favorece su proliferación, supervivencia y diseminación en el organismo.

1.1.1 Angiogénesis/linfangiogénesis

La angiogénesis y la linfangiogénesis son los procesos biológicos en los que se genera nueva vasculatura sanguínea y linfática a partir de los vasos ya existentes. Estos procesos están limitados en los tejidos adultos pero en determinadas situaciones se reactivan, como en el cáncer. Ambos procesos van a proporcionar el oxígeno y los nutrientes necesarios para mantener el crecimiento y la progresión del tumor, siendo además claves en la metástasis tumoral, ya que la diseminación de las células tumorales puede tener lugar principalmente a través de los vasos sanguíneos y linfáticos.

Durante los mismos, las células endoteliales y linfáticas van a ser estimuladas por diversas moléculas bioactivas que darán lugar al inicio de un proceso denominado "sprouting", en el que algunas células cambian de fenotipo y comienzan a migrar y proliferar hacia la zona de origen del estímulo. Las células que cambian para iniciar el proceso de migración se denominan "punta" y las adyacentes empiezan a proliferar para seguir a las células "punta" y mantener la integridad estructural y funcional del vaso (5, 6).

Las moléculas que regulan favorablemente estos procesos son factores pro-angiogénicos y prolinfáticos liberados principalmente por las células tumorales. En el proceso de carcinogénesis, uno de los principales inductores de la expresión y liberación de estos factores de crecimiento es la hipoxia generada en las células tumorales más alejadas de los vasos sanguíneos, ya que el tumor no puede continuar su progresión sin el suministro de nutrientes y oxígeno (7). Sumado a esto, las células tumorales también reclutan células del sistema inmune, entre otras, para formar un microambiente tumoral en el que se secretan diversas moléculas activas y factores que contribuyen a la neovascularización tumoral. En el caso de la linfangiogénesis ocurre un mecanismo similar, las células tumorales y del sistema inmune del microambiente tumoral van a liberar factores de crecimiento para iniciar la formación de nuevos vasos linfáticos a partir de los ya existentes e inducir el agrandamiento de éstos, dentro y alrededor del tumor.

A pesar de que ambos procesos comparten muchas similitudes, presentan diferencias fisiológicas y moleculares. Por ejemplo, en angiogénesis, los factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF, del inglés Vascular endothelial growth factor) -A, -B, -F y -E y su unión a sus correspondientes receptores son los reguladores clave, aunque VEGF-A y los receptores VEGFR1 y VEGFR2 son los más implicados. En cambio, los factores de crecimiento VEGF-C y VEGF-D, con su unión al receptor VEGFR3, son los principales iniciadores de la linfangiogénesis tumoral (5). Aún así, todos estos factores y sus receptores tienen cierto grado de implicación en ambos procesos (8). Además de esta familia de factores de crecimiento, en el cáncer hay otras moléculas muy diversas que pueden intervenir en la regulación de la angiogénesis y/o linfangiogénesis, como es el caso de BDNF (del inglés, Brain-derived neurotrophic factor) y EMAP-II (del inglés, Endothelial monocyte-activating polypeptide II).

1.1.1.1 BDNF

BDNF es una neurotrofina implicada inicialmente en el crecimiento, diferenciación y supervivencia de las células nerviosas. Se une como ligando a su receptor TrkB (del inglés, Tyrosine receptor kinase B) y activa distintas rutas de señalización (9). En cáncer, se ha asociado con la progresión a metástasis, en la transición epitelio-mesénquima, en migración e invasión, en quimiorresistencia, en angiogénesis y linfangiogénesis (10). En este último caso, BDNF puede inducir la expresión de VEGF-A y VEGF-C (11, 12) a través de su unión con su receptor, pudiendo promover angiogénesis, linfangiogénesis, progresión tumoral y metástasis a nódulos linfáticos (13).

1.1.1.2 EMAP-II

EMAP-II es una citoquina que se origina de la escisión proteolítica de su precursor AIMP1 (del inglés, Aminoacyl-tRNA synthetase complex-interacting multifunctional protein 1) y puede actuar como inhibidor de la angiogénesis por distintos mecanismos (14). Esta proteína puede interactuar directamente con los receptores VEGFR1 y VEGFR2 (15), compitiendo por la unión de los factores VEGF con éstos y en consecuencia inhibir las correspondientes rutas de señalización, pudiendo así suprimir el crecimiento tumoral mediante la inducción de la apoptosis y la inhibición de la proliferación de las células endoteliales y la formación de nuevos vasos (16, 17).

1.2. CÁNCER COLORRECTAL

1.2.1 Incidencia y mortalidad

El cáncer colorrectal (CCR), en el cual se centra esta tesis doctoral, tiene una gran relevancia en la salud de la población de nuestro país. Según la Red Española de Registros de Cáncer (2), la estimación para el 2022 sitúa el CCR como el cáncer con mayor incidencia en el conjunto de la población española (incluyendo ambos sexos) y, teniendo en cuenta el sexo por separado, es el segundo cáncer con mayor incidencia tanto en hombres como en mujeres, detrás del cáncer de próstata y de mama, respectivamente. Cabe destacar que la estimación de nuevos casos tiende a incrementarse año tras año.

El CCR está situado como el segundo tipo de cáncer que más muertes causa en el mundo (1). En este aspecto, el principal factor que determina la supervivencia de esta enfermedad es el estadio en el que se diagnostica. Actualmente, el estadio se determina mediante la octava edición del sistema de clasificación tumor-nodo-metástasis (TNM) (18). Según las características del tumor (tamaño, afectación ganglionar y metástasis a distancia), el cáncer se separa en diversas categorías que se agrupan en los estadios I, II, III y IV. Así, la supervivencia a los 5 años de los pacientes diagnosticados en el estadio más avanzado (IV), donde el tumor se ha expandido a otros órganos, es alrededor del 14,2% frente al 92% y 72% en pacientes con tumores localizados (I y II) y regionales (III), respectivamente (19-21).

1.2.2 Carcinogénesis colorrectal

Como en otros tipos tumorales, el origen del cáncer colorrectal reside en la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas, que van a provocar una serie de cambios moleculares, y por tanto histopatológicos, en el epitelio normal del colon y recto. El 10% del total de casos de CCR se puede clasificar en hereditarios, en los que las alteraciones genéticas son inherentes, es decir, se heredan de los progenitores o existe una predisposición a adquirirlas o desarrollar este proceso tumoral. El resto de casos son esporádicos, cuando estas alteraciones son inducidas por factores externos.

Para entender cómo se forma y desarrolla un tumor colorrectal hay que conocer el sustrato celular de partida. El epitelio del colon y el recto presenta invaginaciones con forma tubular y función glandular, denominadas criptas colónicas, que contienen células indiferenciadas y troncales con capacidad replicativa para dar lugar a los distintos tipos celulares que componen el epitelio y renovarlo periódicamente. Cuando las alteraciones genéticas que adquieren estas células aportan ventajas metabólicas y/o proliferativas, tiene lugar una primera etapa de hiperproliferación, la cual formará un pólipo de carácter benigno. Los pólipos son agregaciones de células epiteliales con características aberrantes, se localizan en la mucosa intestinal y crecen hacia el lumen. Estas lesiones se consideran premalignas.

Los dos tipos principales de pólipos con riesgo de progresar a cáncer colorrectal son los adenomas y los pólipos sésiles serrados (SSPs), que incluyen pólipos hiperplásicos, adenomas sésiles serrados, adenomas serrados tradicionales y pólipos mixtos (22, 23). Los pólipos pueden continuar aumentando en tamaño y acumulando alteraciones genéticas que les conferirán capacidades malignas, pudiendo progresar a adenomas de bajo y alto grado de displasia, a adenocarcinomas y finalmente, adquirir el potencial de metástasis a otros órganos (24) (Figura 2).

Los diversos eventos genéticos que dan origen a estas lesiones premalignas, al igual que la secuencia de su aparición y acumulación, varían también según el tipo de pólipo. Los adenomas presentan mayoritariamente inestabilidad cromosómica (CIN, del inglés Chromosomal Instability) y/o inestabilidad de las regiones microsatélite del ADN (MSI, del inglés Microsatellite Instability) (25). La inestabilidad cromosómica consiste en la existencia de cambios en el número de alelos de los genes causados principalmente por fallos en la segregación cromosómica, acortamiento de los telómeros, reparación disfuncional del ADN y pérdida de la heterocigosidad de genes supresores de tumor. Así, la mutación del gen *APC* suele ser el primer evento genético (24).

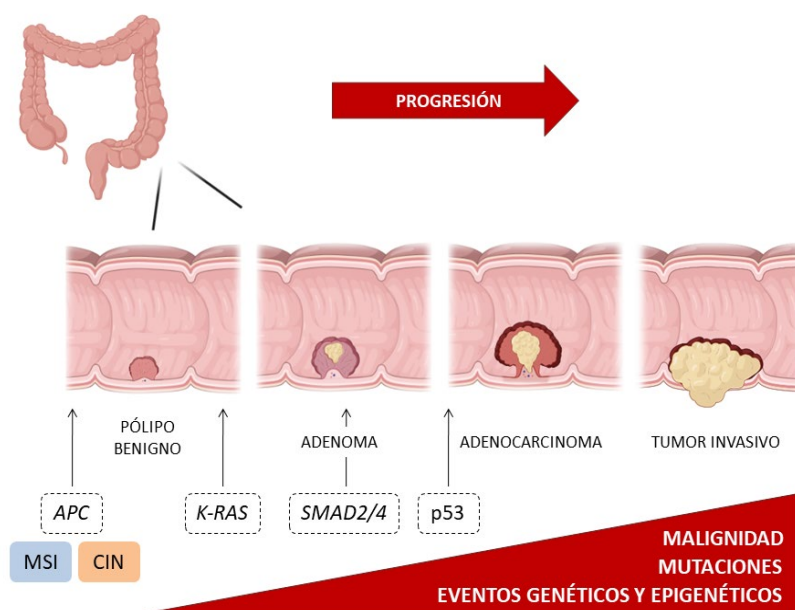


Figura 2. Progresión de la secuencia pólipo-adenocarcinoma. Basado en el modelo de carcinogénesis del cáncer colorrectal de Fearon (24). El establecimiento de la inestabilidad cromosómica (CIN), la inestabilidad de microsatélites (MSI) y/o de mutaciones en genes clave, como *APC*, inicia un proceso de hiperproliferación en las células troncales del epitelio colorrectal, dando lugar a una lesión premaligna denominada pólipo. La acumulación de estos eventos permite el crecimiento y avance del pólipo a un adenoma y con la desregulación de ciertos genes, como *TP53*, éste adquiere malignidad y progresa a un adenocarcinoma, que invadirá tejidos adyacentes y se diseminará a otros órganos.

A continuación, se produce la activación anormal de la vía de señalización de Wnt y, por tanto, de los genes regulados por ésta. También es frecuente la mutación en *KRAS* en adenomas avanzados y posteriormente en el gen *TP53*, asociado con la adquisición de malignidad y desarrollo tumoral (26). Por otro lado, la MSI consiste en la acumulación de errores en las regiones microsatélite debido a mutaciones en los genes de reparación del ADN o a la disfunción de los mismos. Estas células aberrantes no van a reparar el ADN y pueden mantener las mutaciones y adquirir nuevas. Una de las principales causas de la MSI es la inactivación por hipermetilación del promotor del gen *MLH1*, una enzima de reparación del sistema de reparación por apareamiento erróneo (mismatch repair, MMR). El estado celular de la MSI propicia la adquisición de múltiples mutaciones en genes involucrados en proliferación, ciclo celular, apoptosis y reparación del ADN (25), como mutaciones en los genes *APC* y *BRAF*.

Los SSPs siguen un modelo de eventos genéticos diferente a los adenomas en su desarrollo, aunque pueden compartir algunos de ellos. La alteración genética más común en estas lesiones premalignas es la mutación en *BRAF* y después suele progresar con el establecimiento de MSI o adquiriendo mutaciones en el gen *TP53*, lo que desencadenaría procesos oncogénicos. Además, en ambos casos, se acompaña comúnmente por un proceso anormal de

hipermetilación de la región promotora de genes, cuyo proceso se denomina en inglés CIMP (CgP island methylator phenotype). De hecho, *BRAF* mutado promueve este proceso de hipermetilación, afectando tanto a genes supresores de tumor como enzimas de reparación del ADN (24, 27).

Éstas son solo algunas de las alteraciones descritas con mayor frecuencia para este tipo tumoral, pero se han identificado varias decenas más que son clave en el desarrollo del cáncer colorrectal. Con el fin de trasladar estos hallazgos al tratamiento de los pacientes, se ha trabajado en una nueva estratificación o clasificación de los casos de CCR denominado CMS (del inglés, Consensus Molecular Subtypes) en base a las alteraciones que presentan y su comportamiento clínico. Esta clasificación surge del análisis bioinformático y exhaustivo de los perfiles de expresión génica de una cohorte de más de 4000 de pacientes en estadios del I al IV. Según los perfiles de mutaciones, de alteraciones epigenéticas, de expresión molecular y de comportamiento clínico se han identificado 4 subtipos o fenotipos de CCR: inmune, canónico, metabólico y mesenquimal (28).

1.2.3 Diagnóstico del cáncer colorrectal

La mayoría de los casos de CCR son diagnosticados al presentar signos o síntomas, los cuales aparecen en fases avanzadas de la enfermedad, cuando la recuperación y supervivencia del paciente es inferior al 15% (19-21). La progresión de una lesión premaligna a adenocarcinoma en pacientes con CCR de origen esporádico se ha establecido en un periodo de tiempo comprendido entre 5 y 10 años (29). Este marco de tiempo ofrece la oportunidad de detectar el desarrollo de esta enfermedad en una etapa temprana para así reducir la incidencia y la mortalidad.

Sin embargo, las lesiones premalignas no suelen presentar sintomatología. Por ello, son muy importantes las técnicas de cribado en la población.

1.2.3.1 Técnicas de cribado poblacional

Dentro de los programas de detección, las pruebas preferentes de primera línea en Europa son el Test de Sangre Oculta en Heces (FOBT, del inglés Fecal Occult Blood Test), el Test Inmunoquímico Fecal (FIT, del inglés Fecal Immunochemical Test), la colonoscopia y la sigmoidoscopia (30).

Debido a que es una técnica no invasiva, de bajo coste y de fácil adherencia (aceptación en la población), la FOBT es la técnica preferente. Esta técnica se basa en la detección de la actividad peroxidasa del grupo hemo de la hemoglobina liberada por el sangrado de las lesiones precancerosas y los adenocarcinomas. Sin embargo, la detección de la hemoglobina no es específica del CCR, además de no ser capaz de detectar pólipos no sangrantes. Los FITs utilizan anticuerpos específicos para la hemoglobina humana, presentando como ventaja frente al FOBT un aumento de la sensibilidad. Sin embargo, sigue manteniendo las principales desventajas de no detectar etapas tempranas de la enfermedad y no ser específico del CCR.

Cuando un individuo obtiene un resultado positivo en estas pruebas, se somete a métodos endoscópicos. La colonoscopia y la sigmoidoscopia consisten en la exploración y visualización de la cavidad intestinal. La colonoscopia es la prueba de referencia o "gold standard" para el diagnóstico del CCR. Esta técnica tiene la capacidad de examinar todo el colon y localizar lesiones premalignas o adenocarcinomas, además de poder llevar a cabo su biopsia y/o extirpación *in situ*, permitiendo así la posibilidad de diagnóstico a la vez que de tratamiento (31). La detección de estas lesiones de carácter tumoral en su etapa temprana reduce drásticamente la incidencia del CCR (32) y su mortalidad (33). Pese a ello, esta prueba es invasiva, requiere una preparación previa por parte del individuo, se necesita sedación y hay riesgo de posible perforación y sangrado, lo que hace que no tenga buena adherencia en la población. En cambio, la sigmoidoscopia no necesita tanta preparación y no requiere sedación, pero solo permite la examinación del recto y el colon sigmoide.

Las limitaciones de estas técnicas ponen de manifiesto la importancia del desarrollo de pruebas diagnósticas que sean mínimamente invasivas, tengan un coste bajo y puedan ser implementadas fácilmente en los programas de cribado de la población.

1.2.3.2 Biopsia líquida y biomarcadores

En los últimos años, una parte de la investigación del CCR se ha centrado en la identificación de marcadores moleculares específicos en biopsia líquida para las distintas fases de la enfermedad. La biopsia líquida proporciona una técnica mínimamente invasiva y de fácil extracción, que consiste en la identificación de elementos o componentes derivados de las células tumorales liberados en los fluidos biológicos del individuo, principalmente el plasma sanguíneo.

Entre los marcadores que se están investigando se encuentran los ARN no codificantes de cadena larga (lncRNAs, del inglés long non-coding RNA), los micro-ARNs (miRNAs, del inglés Micro-RNAs), el ADN circulante tumoral (ctDNA, del inglés Circulating Tumoral DNA), las células tumorales circulantes (CTCs, del inglés Circulating Tumor Cells) y el contenido de las vesículas extracelulares (VEs).

Algunos de los avances en este campo se han trasladado con distinto éxito al paciente. La FDA (U.S. Food and Drug Administration) ha aprobado para su uso en clínica la prueba CellSearch System^(R) (34) basada en la detección de CTCs en sangre y el test EpiProColon (Epigenomics AG) (35) basado en la detección de ctDNA. No obstante, la detección de CTCs presenta la desventaja de su reducida presencia en etapas tempranas de la enfermedad y el test EpiProColon no es eficiente para discriminar lesiones premalignas o adenomas (36). La FDA también ha aprobado una prueba que mezcla el análisis de alteraciones genéticas y epigenéticas con la presencia de hemoglobina humana en heces, denominado ColoGuard^(R), pero la baja especificidad, el coste y la necesidad de manejar grandes cantidades de las muestras en fresco complica su uso como prueba de referencia (37). Por otro lado, los miRNAs ganan interés por sus resultados prometedores. El análisis en sangre de la firma oncomiR-1 (38) y otra firma de 6 miRNAs (39) han demostrado ser capaces de discriminar pacientes con CCR y adenomas. Aún así, se sigue investigando el fluido biológico ideal, el método de detección y la firma de miRNAs con mejor resultado para su implementación en programas de cribado.

Actualmente, el marcador molecular en sangre más usado en clínica es el antígeno carcinoembrionario (CEA, del inglés Carcinoembryonic Antigen). Se usa como factor predictivo de respuesta al tratamiento y en el seguimiento de los pacientes operados para detectar recaídas tempranas, pero su eficacia y que no es específico de esta enfermedad hacen que sea inadecuado para implementarlo en programas de cribado poblacional (40, 41). La necesidad de identificar nuevos marcadores moleculares para suplir las desventajas de los actuales convierte a las VEs en un foco interesante de estudio.

1.2.3.3 Vesículas extracelulares

Las VEs son vesículas compuestas por una membrana de doble capa que son liberadas por múltiples tipos de células, tanto normales como cancerosas. Engloban principalmente a los exosomas, los cuerpos apoptóticos y las microvesículas, cada tipo con un origen intracelular diferente.

Los exosomas tienen un tamaño comprendido entre 30-150 nm y tienen origen endocítico, un endosoma de la ruta endocítica empieza a sufrir invaginaciones, reteniendo las moléculas del citosol y formando vesículas intraluminales, lo que da lugar a un cuerpo multivesicular. Éste, posteriormente, se fusionará con la membrana plasmática de la célula y liberará al exterior los, ahora denominados, exosomas (42). Ante la heterogeneidad, la falta de consenso en la terminología y la dificultad metodológica de aislar específicamente las vesículas de origen endocítico de las derivadas de la membrana plasmática, se suele usar de modo generalista el término vesículas extracelulares.

Las VEs contienen en su interior, y en membrana, gran variedad de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos de distintos tipos, como ADN, ARN, ARN mensajero, lncRNAs, micro-ARNs y ARN circulares (43-45). Este contenido va a ser específico de la célula en que se forman y será reflejo de la situación fisiológica de la misma. Así, las VEs pueden actuar como agentes de comunicación intercelular, transfiriendo biomoléculas y señales que pueden influenciar o dirigir las funciones de las células receptoras, tanto en situaciones fisiológicas normales como en patológicas. De esta manera, las células tumorales pueden alterar e inducir, sobre otras células cancerosas y del estroma, procesos de carácter protumoral, como favorecer la adquisición de un fenotipo con mayor malignidad, inducir el crecimiento celular, promover la angiogénesis (46, 47), la migración y la invasión o facilitar la formación del nicho premetastásico (48).

Las moléculas específicamente empaquetadas en VEs por las células que conforman los adenomas y los adenocarcinomas podrían ser usadas como marcadores para detectar la enfermedad en sus diferentes etapas. Además, su presencia en casi todos los fluidos corporales apoya su investigación como un prometedor avance en el desarrollo de una prueba diagnóstica precoz, no invasiva y eficaz para el CCR. En la actualidad, ya se han identificado diversos lncRNAs y miRNAs desregulados en VEs de plasma/suero sanguíneo de pacientes con CCR como candidatos a marcadores de diagnóstico (38, 49). El lncRNA GAS5 demostró el mayor valor diagnóstico en VEs de suero. A su vez, la combinación del análisis de los miARNs let-7b-3p, miR-139-3p y miR-145-3p en VEs de plasma mostró uno de los mayores valores predictivos del CCR (38, 49).

Sin embargo, aunque los resultados son prometedores en estudios de plasma y suero sanguíneo, aún es necesario identificar una firma de marcadores en VEs que pueda implementarse como herramienta de diagnóstico precoz en toda la población.

1.3. FAMILIA p53

La proteína p53, codificada por el gen *TP53*, fue descubierta por primera vez como una proteína de interacción con el antígeno T del virus SV40 en el año 1979. Desde entonces, se ha estudiado extensamente su papel en el desarrollo del cáncer, ya que esta proteína regula el destino de las células frente al estrés celular y el daño en el ADN mediante la parada del ciclo celular, la activación del proceso de apoptosis y la reparación del ADN (50, 51). De hecho, este gen presenta mutaciones en más de la mitad de todos los cánceres humanos, siendo el gen mutado con mayor frecuencia (50). Cuando se pierde la actividad de p53, las células pueden adquirir características tumorales, por lo que *TP53* se considera un gen supresor de tumor. Casi dos décadas después, se descubrieron las proteínas p73 y p63 como homólogas de p53 por su similitud en estructura y función (52). Son estas características las que llevan a agrupar los genes *TP53*, *TP63* y *TP73* en la denominada familia p53.

Los 3 genes codifican proteínas que se caracterizan por presentar una secuencia y arquitectura estructural muy similar (53), con al menos un dominio de transactivación (TAD), un dominio central de unión a ADN (DBD) y el dominio de oligomerización (OD). Los dominios TAD son capaces de activar la transcripción de genes. El dominio DBD reconoce y se une específicamente a regiones consenso de ADN de doble cadena, denominados elementos de respuesta (RE), de genes diana para regular su actividad transcripcional. El dominio OD está muy conservado entre los 3 miembros y mediante la interacción entre ellos pueden formar heterodímeros, permitiendo y/o modificando su actividad.

Esta homología estructural y, sobre todo, la secuencia del dominio DBD altamente conservada (50, 54) entre los diferentes miembros de la familia permiten que p63 y p73 puedan transactivar muchos de los genes de respuesta de la ruta de p53, actuando como genes supresores de tumor, además de activar otros genes exclusivos.



Figura 3. Representación esquemática de los principales dominios estructurales de los miembros de la familia p53. Se muestra el porcentaje de secuencia conservada respecto a p53 de los dominios de transactivación (TAD), de unión a ADN (DBD) y de oligomerización (OD). Las isoformas completas de p63 y p73 también presentan un dominio SAM (del inglés, sterile-alpha motif) y un dominio inhibidor de transactivación (TID).

Otra característica clave de esta familia es la síntesis de diferentes variantes proteicas debido a la presencia de múltiples promotores y del procesamiento alternativo en el extremo amino (N-terminal) y en el extremo carboxilo (C-terminal). El uso de los promotores alternativos o de la existencia de IRES (del inglés, internal ribosome entry site) genera isoformas truncadas en el extremo N-terminal, que son más cortas y pueden perder los dominios TAD y/o parte del dominio DBD. El procesamiento alternativo en el extremo C-terminal también va a producir variantes acortadas en dicho extremo y estas variaciones pueden darse, a su vez, en todas las isoformas truncadas en el extremo N-terminal. De esta manera, la cantidad de variantes proteicas para cada gen es muy amplia. Las isoformas que presentan el/los dominio/s TAD reciben la nomenclatura de variantes TA (TAp63 y TAp73) y, al igual que p53, pueden inducir la muerte celular por apoptosis y la parada del ciclo celular (55). Por otro lado, las variantes truncadas en el extremo N-terminal que no conservan el dominio TAD se denominan isoformas Δ (Delta) y presentan funciones generalmente pro-oncogénicas.

1.4. GEN TP53

p53 actúa como factor de transcripción en respuesta a diferentes estímulos y señales formando unidades tetraméricas. En un estado basal normal, los niveles de p53 se mantienen bajos. Cuando la célula sufre algún tipo de estrés o daño que altera el ciclo celular o la

integridad del ADN, se induce la expresión de p53 y, por lo general, monómeros idénticos se combinan formando dos dímeros para unirse a los elementos de respuestas (RE) de los genes diana. Esta unión va a regular la actividad transcripcional de esos genes, que están implicados en reparación del ADN, diferenciación, senescencia, parada del ciclo celular y apoptosis. Por ello, cuando las células sufren daño directo en el ADN, aberraciones cromosómicas, acortamiento de telómeros, hipoxia o activación de oncogenes, que transformarían esas células en cancerosas, se genera un estado de estrés celular con el que se activa p53 para impedir la proliferación o inducir la muerte de estas células (56). Sumado a este papel principal, también se ha demostrado que p53 puede intervenir en otras funciones como el metabolismo celular, la autofagia, la invasión y motilidad celular, la angiogénesis o el envejecimiento, entre otras (51).

1.4.1 Las isoformas de p53

El gen *TP53* contiene 13 exones con 2 promotores, el canónico (P1) situado en el exón 1 y el alternativo (P2) situado en el intrón 4. La proteína p53 consta de dos dominios de transactivación (TAD1 y TAD2), el dominio DBD, el dominio OD y el dominio Carboxilo-terminal. De este gen se pueden sintetizar hasta 12 isoformas (Figura 4).

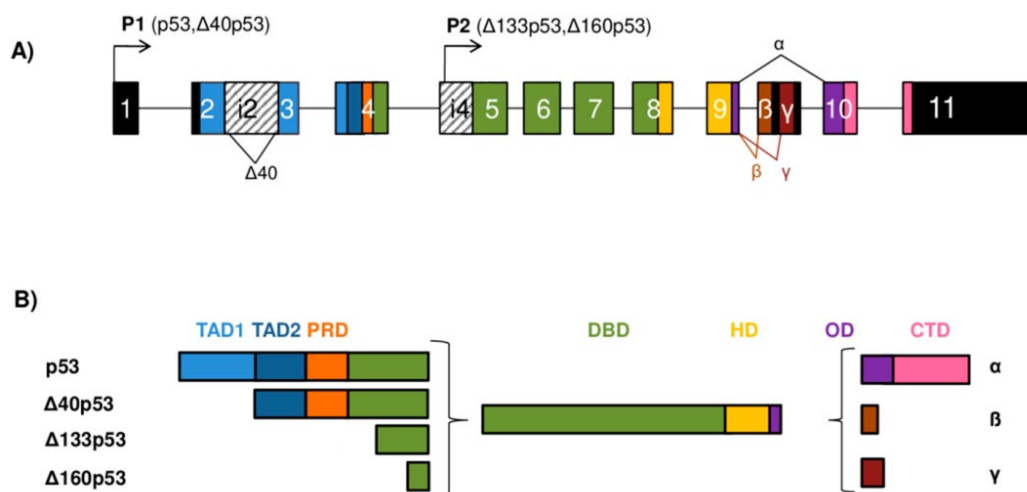


Figura 4. Representación estructural del gen *TP53* y de la generación de las diferentes isoformas. Esquema adaptado de Horvat et al, 2021 (57). A) La estructura del gen *TP53* presenta 11 exones y 2 alternativos (9β y 9γ). Los recuadros negros representan secuencias no codificantes. Las diversas isoformas se transcriben a partir de 2 promotores diferentes (P1 y P2), obteniéndose p53 y Δ40p53 del P1 y Δ133p53 y Δ160p53 del P2. B) La estructura modular de p53 está constituida por los dominios transactivación 1 y 2 (TAD1 y -2), el dominio PRD (del inglés, Proline-rich domain), el dominio de unión a ADN (DBD), el dominio HD (del inglés, Hinge domain), el dominio de oligomerización (OD) y el extremo carboxilo terminal (CTD). Todas las isoformas se pueden procesar alternativamente en el carboxilo terminal.

Desde el promotor P1 se genera el transcrito de ARNm que se traduce en las isoformas p53 o en $\Delta 40p53$. Esta última, se origina por la traducción del transcrito $\Delta 40p53$ o cuando el transcrito de p53 conserva el intrón 2 y se sintetiza la proteína desde un IRES, que permitirá la traducción desde el codón 40. Desde el promotor P2 se van a generar los transcritos de $\Delta 133p53$ y de $\Delta 160p53$ empezando por los codones 133 y 160, respectivamente. El procesamiento alternativo que sufre el exón 9 va a dar lugar a las variantes α , β y γ de cada isoforma, siendo la variante α la que contiene todos los exones y conserva el dominio de oligomerización (58, 59). Por ello, la proteína canónica es p53 α (o "full-length") y el resto de isoformas sufren algún tipo de acortamiento por el extremo N-terminal o C-terminal.

1.4.2 Implicación de p53 en cáncer

Entre los diversos estudios que se realizaron para demostrar que p53 es un supresor de tumores, los modelos animales fueron cruciales. Dadas sus funciones, se esperaba que el modelo de ratón knockout para *TP53* (-/-) no fuera viable, sin embargo no afectó al desarrollo del animal aunque los ratones desarrollaron rápidamente tumores espontáneos. De hecho, el 74% de los ratones desarrollaron tumores a los 6 meses y, todos (100%), presentaron tumores o fallecieron a los 10 meses de vida a raíz de esta delección. Por otro lado, el modelo de ratón heterocigótico (+/-) no presenta ningún fenotipo tumoral antes de los 9 meses de vida, pero el 50% de los ratones desarrollaron tumores a los 18 meses (60).

Aún así, la delección del gen *TP53* en tumores es poco frecuente. En cambio, su inactivación por mutaciones puntuales es el defecto génico más común observándose en alrededor del 50% de todos los tipos de cánceres humanos (50), incluido el cáncer colorrectal (61). La gran mayoría de estas mutaciones tienen lugar en el dominio DBD, siendo la principal causa de su inactivación (62). Suelen producirse mutaciones de cambio en un solo nucleótido, lo que puede derivar en cambios conformacionales de la proteína alterando la actividad de p53. En consecuencia, estas proteínas mutantes pueden presentar una afinidad y/o unión a los genes diana modificadas impidiendo que lleven a cabo la función normal de p53, pudiendo generar un efecto negativo dominante al anular la actividad de las proteínas funcionales. Además, estos cambios pueden desencadenar la activación específica y fortuita de algunos genes, generando una ventaja celular y selectiva, y otorgar a estas células con mutaciones en *TP53* una ganancia de función.

Asimismo, las distintas isoformas truncadas ($\Delta 40p53$, $\Delta 133p53$ y $\Delta 160p53$) pueden interactuar con p53 α para que desempeñe su función eficientemente según el ambiente celular y las señales recibidas, pero también pueden interferir en su actividad (59). Por ello, su desregulación tiene un papel importante. Un ejemplo de ello es la existencia de diferentes tipos de cáncer con una frecuencia de mutación baja en p53 pero con un perfil de expresión alterado para las distintas isoformas.

Dentro de las isoformas truncadas de p53, $\Delta 133p53$ ha atraído el interés científico durante los últimos años. La proteína carece de los dos dominios TAD y una parte del dominio DBD, cuyo efecto en la actividad de p53 puede ser drástico. Aunque el dominio DBD truncado carece de algún aminoácido clave para la unión al ADN, sigue conservando otros, por lo que no se ha descartado que pueda unirse a elementos RE de algunos genes. Además, $\Delta 133p53$ puede formar dímeros y tetrámeros con distintas isoformas de p53 que porten el dominio OD. De esta manera, $\Delta 133p53$ puede llevar a cabo un efecto negativo dominante sobre p53 (63) y/o activar transcripcionalmente algunos genes específicos. Diversos estudios han demostrado que puede actuar como un factor de supervivencia al inducir la reparación del ADN (64), inhibir la apoptosis inducida por p53 (65, 66) y la senescencia celular (67), inducir quimiorresistencia (68), promover la capacidad invasiva a través de la transición epitelio-mesénquima (69) y la angiogénesis para la progresión tumoral (70). Estas actividades pueden convertir $\Delta 133p53$ en un oncogen, siendo clave su desregulación en la progresión tumoral. Acorde a esto, los niveles de $\Delta 133p53$ se han detectado elevados en diferentes tumores como en pulmón, mama, colon y recto, próstata, melanoma y carcinoma esofágico. Dicha sobreexpresión también se ha correlacionado con el establecimiento de un microambiente inmunosupresivo (71, 72). Además, los valores elevados de esta variante se asocian con tasas de supervivencia reducidas (73).

En concreto, en el CCR la isoforma $\Delta 133p53$ se ha detectado elevada en tejido tumoral comparado con el tejido sano (67), lo que apoya su papel en la progresión tumoral de este tipo de cáncer. De hecho, los casos de CCR con niveles elevados de ARNm de $\Delta 133p53$ progresan de manera más agresiva y se asocian con menor supervivencia libre de enfermedad (74). Siguiendo en esta línea, su sobreexpresión en tejido tumoral se asoció con mayor riesgo de recidivas en los pacientes (65). No obstante, el valor pronóstico y diagnóstico de $\Delta 133p53$ ha sido poco explorado. En este sentido sería interesante estudiar los niveles $\Delta 133p53$ para determinar si tiene potencial para predecir la respuesta a diferentes tratamientos o la evolución de la enfermedad.

1.5. GEN *TP73*

TP73 fue el primer homólogo descrito de *TP53* en 1997 (75) y aparte de su papel como gen supresor de tumor, *TP73* está implicado también en otras funciones como el desarrollo neurológico y la diferenciación celular (54). De hecho, la delección completa de *TP73* generó un modelo animal en ratón que presentó graves problemas en el sistema nervioso y baja supervivencia por la alta muerte neuronal (76). Asimismo, la delección concreta de las variantes de p73 que cumplen funciones supresoras de tumor dio lugar a un modelo animal con aparición espontánea de tumores y defectos neurológicos (77). No obstante, a diferencia de *TP53*, las mutaciones descritas en el gen *TP73* en cáncer son raras, aunque si se ha observado la sobreexpresión del mismo en diferentes tumores.

1.5.1 Las isoformas de p73

El gen *TP73* está compuesto por 14 exones, con un promotor canónico P1 situado en el exón 1 y el promotor alternativo P2 situado en el exón 3'. Al contrario de p53, el extremo C-terminal de p73 contiene un dominio SAM (del inglés, sterile alpha motif), que podría unir ARN, y un dominio inhibidor de transactivación (TID), que interacciona con los dominios TAD modulando la actividad de éstos. Al igual que los otros dos miembros de la familia, *TP53* y *TP63*, este homólogo da lugar a la síntesis de múltiples isoformas.

Las distintas variantes proteicas se van a agrupar en TAp73 y Δ TAp73. En el primer grupo, se engloban las isoformas generadas en el promotor P1, que no han sufrido ninguna modificación en el extremo N-terminal y que, por tanto, conservan los dominios TAD. Dentro del grupo Δ TAp73, se encuentran las variantes Δ Ex2p73, Δ Ex2/3p73, Δ Np73 y Δ N'p73. Éstas son variantes que sufren algún tipo de procesamiento en el extremo N-terminal. Δ Ex2p73 y Δ Ex2/3p73 son isoformas generadas desde el promotor P1 que, respectivamente, carecen del exón 2 y el exón 2 y 3. La variante Δ Np73 se genera desde el promotor P2 e incluye el exón 3'. En cambio, el transcrito de Δ N'p73 se genera desde el promotor P1 y conserva parte del exón 3', pero la traducción de esta variante comienza en el exón 3' de su transcrito, resultando en una proteína que no se distingue de Δ Np73. Además de estas modificaciones en el extremo N-terminal, cada isoforma (TAp73, Δ Ex2p73, Δ Ex2/3p73, Δ Np73 y Δ N'p73) puede ser modificada por procesamiento alternativo en el extremo C-terminal, dando lugar a las variantes (α , β , γ , δ , ϵ , ζ y η) (57).

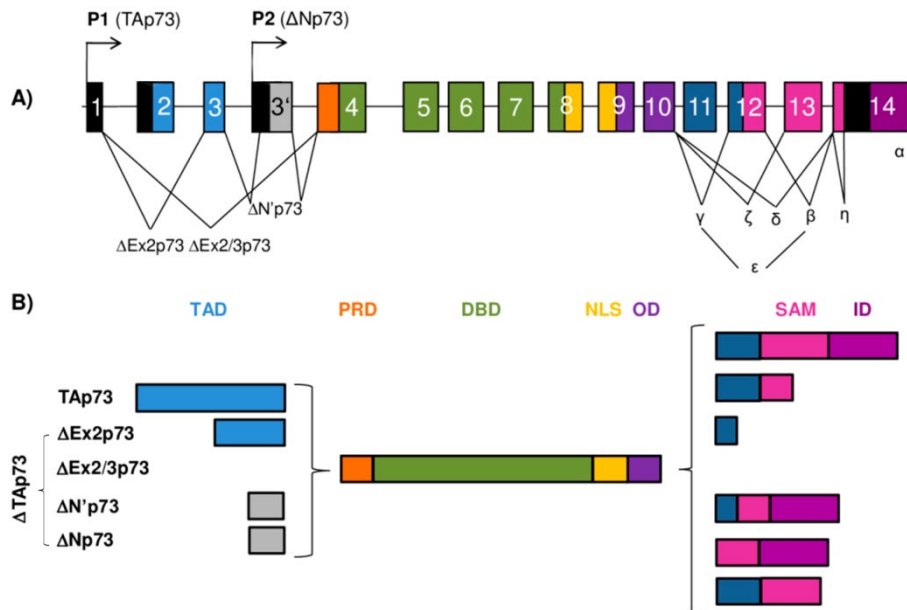


Figura 5. Representación estructural del gen *TP73* y de la generación de las diferentes isoformas. Esquema adaptado de Horvat et al, 2021 (57). A) La estructura del gen *TP73* presenta 14 exones y un exón alternativo 3'. Los recuadros negros representan secuencias no codificantes. Las diversas isoformas se transcriben a partir de 2 promotores diferentes (P1 y P2), obteniéndose las isoformas TAp73 del P1 y ΔNp73 del P2. El procesamiento alternativo del transcrito del P1 puede dar lugar a las isoformas ΔEx2p73, ΔEx2/3p73 y ΔN'p73, que junto con ΔNp73 constituyen el grupo ΔTAp73. Las isoformas TAp73 y ΔTAp73 pueden procesarse alternativamente en el extremo carboxilo terminal dando lugar a las variantes (α, β, γ, δ, ε, ζ, y η). B) La estructura modular de TAp73 está constituida por el dominio transactivación (TAD), el dominio PRD (del inglés, Proline-rich domain), el dominio de unión a ADN (DBD), una señal de localización nuclear (NLS), el dominio SAM (del inglés, Sterile alpha motif) y el dominio inhibidor de transactivación (ID).

En general, las proteínas TAp73 presentan actividad supresora de tumores induciendo la parada del ciclo celular, reparación del ADN y la apoptosis (78), aunque también intervienen en la homeostasis neuronal o el metabolismo (57). Para llevar a cabo estas actividades, su regulación sigue, en muchos casos, el mismo mecanismo que p53. Los niveles basales de p73 se mantienen bajos mediante su degradación por proteosoma y, ante determinadas señales, TAp73 deja de marcarse para su degradación, se estabiliza y se acumula para responder a los estímulos de estrés celular. Así, se pone en marcha la transactivación de diversos genes, dianas de p53 y otros que son exclusivos de p73, que desencadenarán las actividades supresoras de tumor (57).

1.5.2 Actividades oncogénicas de las variantes ΔTAp73

Las diferencias funcionales entre isoformas residen en que las variantes ΔTAp73 carecen de los dominios de TAD y no pueden llevar a cabo las actividades de p73, similares a p53, pero además pueden llevar a cabo actividades oncogénicas.

Éstas tienen lugar principalmente porque las isoformas Δ TAp73 actúan como competidores directos en los sitios de unión a ADN y forman hetero-dímeros y -tetrámeros con variantes de p53 y TAp73 (79-81). De esta manera, impiden la actividad de dichas proteínas y ejercen un efecto negativo dominante, favoreciendo la proliferación celular y evitando la apoptosis. Por tanto, la desregulación del ratio TAp73/ Δ TAp73 a favor de éstas últimas es clave para que en la célula se desempeñen actividades oncogénicas que ayuden al establecimiento y/o progresión del tumor.

Los mecanismos por los que se establece esta desregulación entre las isoformas de p73 no están completamente descritos. Como la presencia de mutaciones en el gen *TP73* es muy infrecuente en los tumores, una regulación transcripcional alterada puede ser una de las principales causas. En este sentido, la metilación variable del gen puede dar lugar a la sobreexpresión de las variantes con propiedades oncogénicas y al silenciamiento del promotor de las isoformas TAp73. Se ha demostrado que en leucemias linfoblásticas y linfomas de Burkitt el promotor P1 está silenciado por hipermetilación. Por otro lado, la sobreexpresión de Δ Np73 por la hipometilación del promotor P2 es una característica común en determinados tumores como el carcinoma de célula escamosa (52). De hecho, el caso de la isoforma Δ Np73 es interesante porque tiene una vida media más larga que las isoformas TAp73 y puede llegar a tener una presencia predominante incluso con niveles bajos de sobreexpresión.

Sumado a este efecto negativo dominante, las variantes Δ TAp73 también pueden otorgar una ganancia de función, como por ejemplo Δ Np73, que se ha descrito que puede transactivar su propio conjunto de genes (82). De hecho, las isoformas Δ TAp73 pueden formar complejos ternarios con otras proteínas para activar la expresión de genes que por sí mismas no podrían. En este sentido, se ha descrito que su unión con las proteínas Smad2/3 y Smad4 les permite transactivar genes de la ruta de señalización de TFG- β , los cuales están asociados con procesos de carcinogénesis (83). En la línea de favorecer la progresión tumoral, aparte de interferir con p53 y TAp73, las variantes Δ TAp73 también inhiben la actividad del supresor de tumor Rb (retinoblastoma) al inducir su fosforilación (84). Pueden favorecer la capacidad de migración e invasión de las células tumorales al inhibir la regulación de TAp73 (85). Además de inhibir la apoptosis mediada por p53, se ha demostrado que Δ Np73 induce quimiorresistencia (86). Esta isoforma puede regular positivamente la expresión de canales de membrana, como algunos miembros de la familia ABCB, en tumores de cáncer de mama, incrementando la capacidad de expulsión de citotóxicos de las células y, por tanto, reduciendo su quimiosensibilidad (87).

Asimismo, uno de los procesos clave en el cáncer es la nueva formación de vasos sanguíneos y p73 está implicado en su regulación. $\Delta Np73$ cumple un papel protumoral induciendo la angiogénesis. Su sobreexpresión anula la represión que ejerce TAp73 sobre genes pro-angiogénicos (88), permitiendo su transactivación. En condiciones de hipoxia, como en el ambiente tumoral, $\Delta Np73$ puede ser estabilizado por HIF1- α (89), un elemento clave en este contexto, lo que da lugar a la transactivación de VEGF-A y otros genes pro-angiogénicos. De hecho, en pacientes con cáncer de mama que presentan niveles altos de $\Delta Np73$ se observó el enriquecimiento en la expresión de genes asociados a rutas de señalización de angiogénesis e hipoxia (87). Además, en líneas celulares de cáncer de mama se ha comprobado que el silenciamiento de $\Delta Np73$ provoca la reducción de los niveles proteicos de HIF1- α , mientras que su sobreexpresión genera el incremento de HIF1- α . Al mismo tiempo, se demostró *in vivo* que la pérdida de $\Delta Np73$ reduce el crecimiento tumoral y los niveles proteicos de HIF1- α . Por tanto, parece que existe un bucle regulatorio positivo entre los dos, desencadenando actividades protumorales a través de HIF1- α , como angiogénesis, proliferación, supervivencia y/o metástasis (90). $\Delta Np73$ también puede formar complejos con otras proteínas para inducir la expresión de genes que promoverán la activación de las células endoteliales, mejorando la supervivencia y la proliferación celular tumoral (91).

1.5.3 Implicación clínica de $\Delta Np73$

En contra de lo esperado para un gen supresor de tumor, los niveles de p73 totales se han observado elevados en tumores de neuroblastoma, glioma, ependimoma, mama, pulmón, colon, estómago, hígado, ovario, vejiga y colangiocarcinoma (92). Sin embargo, son pocos los estudios en los que se evaluaron los niveles de las distintas isoformas de p73. Muchos de estos tumores pueden presentar sobreexpresión simultánea de variantes $\Delta TAp73$ y TAp73 o de alguna isoforma concreta de manera individual, como es el caso de la variante $\Delta N'p73$, que está sobreexpresada en el 95% de los casos estudiados de cáncer de ovario (93). Por otro lado, $\Delta Ex2/3p73$ se ha observado sobreexpresada en tumores de cáncer de mama o de CCR. En cambio, $\Delta Np73$ destaca por su sobreexpresión en tumores muy diversos como carcinoma hepatocelular, esofágico y gástrico, de célula escamosa, cáncer de pulmón, de mama, de próstata, meduloblastoma, neuroblastoma, leucemia mieloide aguda y cáncer colorrectal. Dicha sobreexpresión se correlaciona con diversos parámetros clínicos, como supervivencias total y libre de enfermedad reducidas, el estadio del tumor, resistencia al tratamiento o la peor evolución del paciente (94).

En concreto, la sobreexpresión de $\Delta Np73$ en tumores de CCR se asocia con los estadios avanzados (86), con supervivencia total y libre de enfermedad reducida (94) y con invasión vascular. $\Delta Np73$ también se asocia con recidiva en cáncer rectal (57). Por el momento no se han evaluado los niveles de $\Delta Np73$ en adenomas de colon, lo cual es importante para determinar la implicación de esta isoforma en la etapa premaligna. En este mismo contexto, se ha demostrado que las células empaquetan específicamente ARNm de $\Delta Np73$ en vesículas extracelulares, siendo mayor su contenido empaquetado con la sobreexpresión de dicha isoforma (95). Además, los resultados mostraron una tendencia en la que se correlaciona los niveles elevados con peor supervivencia libre de enfermedad (SLE) y supervivencia general (SG).

Todas estas evidencias indican que la isoforma $\Delta Np73$ cumple un papel importante en la carcinogénesis colorrectal y sería interesante evaluar su capacidad como biomarcador soluble.

1.6 CONSIDERACIONES FINALES

Aunque se ha avanzado mucho en el conocimiento sobre $\Delta Np73$ en el contexto tumoral, todavía quedan aspectos clave por describir como los moduladores y efectores de $\Delta Np73$ a nivel transcriptómico y proteómico. En este sentido, las células tumorales secretan proteínas y fragmentos de éstas al microambiente tumoral, por lo que el estudio de las proteínas secretadas puede mostrar información muy relevante sobre cómo lleva a cabo $\Delta Np73$ sus funciones oncogénicas, que moléculas están implicadas e identificar posibles biomarcadores de la enfermedad.

Por otro lado, uno de los mayores retos en la lucha contra el cáncer colorrectal es mejorar la supervivencia y evolución del paciente. Ya que la supervivencia disminuye drásticamente en función del estadio de la enfermedad, es crucial diagnosticarlo en etapas tempranas. Aquí, el análisis de biomarcadores en biopsia líquida se convierte en un avance muy prometedor y las vesículas extracelulares, y su contenido específico de la célula de origen, son una fuente de estudio muy valiosa. Por ello, presentadas las evidencias de $\Delta Np73$ y $\Delta 133p53$, tiene gran interés explorar su valor como biomarcadores de diagnóstico precoz y pronóstico en biopsia líquida en el cáncer colorrectal.

OBJETIVOS

Esta tesis doctoral se ha centrado en el estudio de la alteración del secretoma de las células tumorales de cáncer colorrectal por la sobreexpresión de la isoforma $\Delta Np73$. Nuestra hipótesis es que el análisis de dicha secreción diferencial de proteínas alterada por $\Delta Np73$, permitiría identificar y validar las distintas proteínas que actúan como efectores o mediadores de las actividades protumorales en las que está implicada esta isoforma oncogénica, como la angiogénesis. Asimismo, ante las limitaciones actuales en el sistema de cribado del CCR, se ha explorado el análisis de esas dianas efectoras o las isoformas de la familia p53 en biopsia líquida. Con ello, los objetivos de este trabajo se han dividido en dos objetivos principales:

OBJETIVO 1: IDENTIFICACIÓN Y VALIDACIÓN DE LAS DIANAS EFECTORAS DE $\Delta Np73$ EN EL CÁNCER COLORRECTAL

- Identificación de las proteínas desreguladas en el secretoma por la sobreexpresión de $\Delta Np73$.
- Identificación de los principales procesos desregulados por $\Delta Np73$ en la progresión del cáncer colorrectal.
- Validación y estudio de las posibles dianas efectoras de $\Delta Np73$ en angiogénesis y linfangiogénesis.
- Evaluación del potencial como biomarcador diagnóstico de las posibles dianas efectoras de $\Delta Np73$.

OBJETIVO 2: PAPEL DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO DE LAS ISOFORMAS DE LA FAMILIA p53 EN VESÍCULAS EXTRACELULARES EN PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL

- Análisis del contenido de ARN mensajero de TAp73, $\Delta Np73$ y $\Delta 133p53$ empaquetado en vesículas extracelulares de individuos sanos, con lesiones premalignas y pacientes con cáncer colorrectal.
- Estudio de la correlación entre el contenido de estas isoformas en vesículas extracelulares con los diferentes parámetros clínico-patológicos de los grupos de estudio.
- Evaluación del potencial diagnóstico precoz y pronóstico de estas isoformas en vesículas extracelulares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para cumplir con los objetivos propuestos en los dos bloques de esta tesis doctoral, hemos llevado a cabo diversos estudios proteómicos acompañados de análisis bioinformáticos en colaboración con el Dr. Rodrigo Barderas y la Dra. María Garranzo Asensio en el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Majadahonda. Posteriormente, hemos realizado validaciones con técnicas de biología molecular, ensayos funcionales *in vitro* de ganancia y pérdida de función, manejo y procesamiento de muestras humanas y estudios para determinar el valor diagnóstico y pronóstico de nuestros candidatos a biomarcadores en biopsia líquida.

3.1 ESTUDIOS CON LÍNEAS CELULARES HUMANAS

3.1.1 Líneas celulares empleadas

Para realizar los ensayos *in vitro* que hemos propuesto en este trabajo con el objetivo de estudiar el papel de $\Delta Np73$ en el CCR se han utilizado las líneas celulares humanas de cáncer de colon HCT116, adquirida de *American Type Culture Collection* (ATCC), y HCT116 TP53 (-/-), nulas para el gen p53, de *Horizon Discovery Ltd*. Adicionalmente a éstas, hemos utilizado las líneas celulares primarias humanas HUVEC (del inglés, Human Umbilical Vein Endothelial Cells) y HLEC (del inglés, Human Lymphatic Endothelial Cells), obtenidas de *Innoprot*, para los ensayos relacionados con el estudio de angiogénesis y linfangiogénesis.

3.1.2 Cultivo y mantenimiento de las líneas celulares

Las células HCT116 se han crecido en medio de cultivo DMEM (del inglés, Dulbecco's modified Eagle's medium; Corning) suplementado con un 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (FBS, Corning), 2mM de L-glutamina (Gibco), 1% de solución penicilina/estreptomicina (P/S, Corning) y anfotericina B (0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Corning). En contrapartida, las células HCT116 TP53 (-/-) se han cultivado en medio RPMI 1640 con 2 mM de L-glutamina y suplementado con 10% de FBS inactivado por calor y 1% de solución P/S, tal como indica la casa comercial que ha generado la línea celular.

Las células HUVEC y HLEC se han crecido en medio de cultivo ECM (del inglés, Endothelial Cell Medium; Innoprot) suplementado con 5% de FBS inactivado por calor, 1% del suplemento de crecimiento endotelial (ECGS, del inglés Endothelial Cell Growth Supplement; Innoprot) y 1% de solución P/S.

Para el crecimiento y expansión celular de HLEC, las placas de cultivo se recubrieron con fibronectina (Innoprot) siguiendo las indicaciones del fabricante. Los experimentos *in vitro* con las células HUVEC y HLEC se realizaron en los pases de cultivo del 2 al 6.

3.2 ESTABLECIMIENTO DE LA SOBREENPRESIÓN ESTABLE DE Δ Np73 EN CÉLULAS HCT116 y HCT116 TP53 (-/-)

Para el estudio de los efectos de la sobreexpresión estable de la isoforma oncogénica Δ Np73, se transfectaron las construcciones pEF1 α -IRES-GFP, como vector vacío (\emptyset) o control negativo, o pEF1 α -IRES- Δ Np73 β -GFP, como vector de Δ Np73 β (Δ Np73), en las líneas celulares de cáncer de colon HCT116 y HCT116 TP53 (-/-). Estas construcciones fueron cedidas amablemente por la Dra. Carmen Marín (Universidad de León).

3.2.1 Transfección de ADN

La transfección se realizó con *LipofectamineTM 2000 Transfection Reagent* (Thermo Fisher Scientific) y medio *Opti-MEM^(R) I (1X) + GlutaMAXTM-I* (Gibco). Para optimizar la eficiencia de asimilación del plásmido, se sembraron 400.000 células de HCT116 o HCT116 TP53 (-/-) en pocillos de placas de cultivo *Multiwell 6* (Falcon) con medio suplementado sin antibióticos hasta que alcanzaron la confluencia celular del 80%. Siguiendo las indicaciones del proveedor, se usaron 4 μ g de ADN de las construcciones \emptyset o Δ Np73 y 10 μ L de *LipofectamineTM 2000* por cada pocillo, mezclados en medio *Opti-MEM^(R) I (1X) + GlutaMAXTM-I*. Tras 5 horas de incubación a 37°C, se substituyó el medio por nuevo suplementado con antibióticos.

3.2.2 Selección celular

Después de 8-10 días en cultivo, se procedió a la selección de las células que habían captado y asimilado el plásmido por citometría de flujo (sorting celular) usando GFP (proteína verde fluorescente) como marcador, ya que está presente en las construcciones del plásmido. Se recuperaron las células que presentaron niveles de GFP superiores a la línea original no transfectada [HCT116 o HCT116 TP53 (-/-)] (Figura 6) y se mantuvieron en cultivo durante 3-5 pases para repetir el proceso de selección celular.

Después de este proceso se obtuvieron las líneas celulares HCT116- Δ Np73 y HCT116 TP53 (-/-)- Δ Np73, que asimilaron el plásmido establemente y presentaron sobreexpresión de Δ Np73 β . Las líneas transfectadas establemente siguiendo el mismo procedimiento con el vector vacío, HCT116-Mock y HCT116 TP53 (-/-)-Mock, se usaron como control para los consiguientes ensayos. La sobreexpresión estable se validó analizando los niveles de ARN mensajero de Δ Np73 mediante PCR cuantitativa (qPCR). Además, durante el proceso de selección celular de la línea HCT116, se aislaron 3 poblaciones celulares con diferentes niveles de expresión de Δ Np73, obteniendo las líneas HCT116 con niveles bajos (Δ Np73-L), medios (Δ Np73-M) y altos (Δ Np73-H) de expresión de esta isoforma.

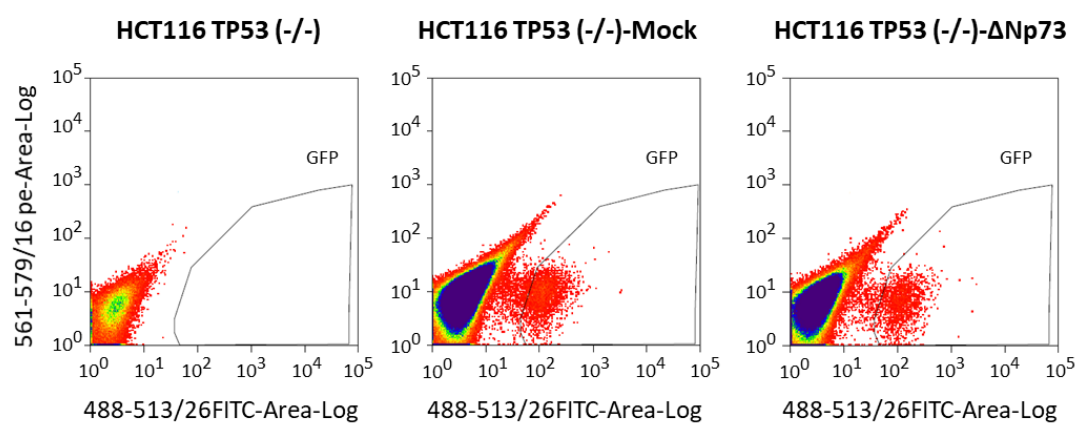


Figura 6. Selección celular por citometría de flujo mediante el marcador GFP. Ejemplo de una separación selectiva de las líneas HCT116 TP53 (-/-), HCT116 TP53 (-/-)-Mock y HCT116 TP53 (-/-)- Δ Np73. Se muestran los resultados de una muestra inicial de 200.000 a 500.000 células. La zona enmarcada es la región seleccionada para recuperar las células de interés. Instrumento usado: Citómetro de flujo Moflo Astrios Sorter (Beckman Coulter).

3.3 ANÁLISIS PROTEÓMICO DEL SECRETOMA POR MICROARRAYS DE ANTICUERPOS

Como primera aproximación en el análisis de las proteínas cuya secreción se vio alterada por la sobreexpresión de Δ Np73, se ha usado el kit de microarray de anticuerpos "L-series Human Antibody Array 493 (#AAH-BLM-2A-2, RayBiotech Inc). Éste es un microarray semicuantitativo que permite la detección de múltiples citoquinas, quimiocinas, proteasas, receptores solubles y moléculas de adhesión solubles por duplicado. Las proteínas a detectar se conjugan directamente con biotina, por lo que no es necesario anticuerpo secundario y se evitan posibles interacciones inespecíficas. Además, consta de 2 subarrays permitiendo el estudio del secretoma de las líneas HCT116-Mock y HCT116- Δ Np73 en un mismo microarray.

3.3.1 Obtención de los medios condicionados

Para este estudio se usaron dos replicados biológicos diferentes del medio condicionado de las líneas celulares HCT116-Mock y HCT116- Δ Np73. Para obtenerlos, se sembraron, por duplicado, células de ambas líneas para que alcanzasen confluencia a las 24 horas. A este tiempo, se retiró el medio de cultivo, se lavaron las células con PBS 1x y se añadió medio de cultivo DMEM suplementado sin suero para su incubación durante 1 hora. Después, se retiró el medio, se lavaron las células de nuevo con PBS 1x y se añadió medio de cultivo sin suero para recogerlo a las 48 horas. Transcurrido ese tiempo, el medio condicionado se recogió y se eliminaron los restos celulares mediante centrifugación. Además, confirmamos el buen estado del cultivo celular midiendo la viabilidad celular, siendo superior al 95%.

De esta misma manera se procedió para obtener los medios condicionados de las líneas HCT116 y HCT116 TP53 (-/-) transfectadas para evaluar y validar el contenido de determinadas proteínas por inmunodetección (ver apartado 3.9).

3.3.2 Incubación del secretoma en el microarray

El primer paso en el procedimiento es el marcaje con biotina de las proteínas del medio condicionado, por lo que una vez obtenidos éstos se cuantificó la cantidad de proteína por el método del triptófano (Trp), detallado más adelante (apartado 3.8). A continuación, se incubaron 30 μ g con la solución de marcaje durante 30 minutos con agitación suave y a temperatura ambiente. Esta reacción se paró con 3 μ L de la solución de parada y se lavaron las muestras para retirar el exceso de biotina. A la vez, los subarrays se bloquearon durante 1 hora con solución de bloqueo y se retiró ésta a término. Se cuantificó la proteína marcada con biotina y se incubaron 3,3 μ g en 400 μ L de solución de bloqueo en cada subarray durante la noche a 4°C y con agitación suave. Cada réplica biológica se midió en un microarray distinto usando un subarray para cada condición (HCT116-Mock y HCT116- Δ Np73). Pasado el tiempo, se realizaron lavados y se incubó la matriz con estreptavidina-Cy3 durante 2 horas a temperatura ambiente y con agitación suave para la detección de las proteínas unidas a los anticuerpos. Cumplido este tiempo, los subarrays se lavaron y se secaron por centrifugación. Todos los reactivos usados procedieron del kit comercial.

Los microarrays se escanearon con el instrumento *GenePix 4000B* (Axon) a una longitud de onda de 532 nm. Las imágenes y el procesamiento de los datos se llevó a cabo con el programa "*GenePix Pro 7.1 scanarray software*". Con éste, se normalizó y cuantificó la señal de cada punto de unión o "spot" del microarray gracias a la plantilla "guía" que viene en el kit comercial. Se estableció que los ratios HCT116- Δ Np73/HCT116-Mock $\geq 1,4$ y $\leq 0,67$ determinan la secreción alterada de esas proteínas.

3.4 ANÁLISIS PROTEÓMICO MEDIANTE MARCAJE METABÓLICO CON ISÓTOPOS ESTABLES DE AMINOÁCIDOS EN CULTIVO CELULAR (SILAC)

El marcaje metabólico SILAC (del inglés, Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture) permite estudiar de manera más exhaustiva la diferencia en la secreción de proteínas por la sobreexpresión Δ Np73. En colaboración con el grupo del Dr. Rodrigo Barderas pudimos llevar a cabo el ensayo y hacer uso del servicio de espectrometría de masas del Instituto de Salud Carlos III, además de realizar el correspondiente análisis bioinformático.

3.4.1 Marcaje metabólico

Las líneas celulares HCT116- Δ Np73 y HCT116-Mock se crecieron en medio de cultivo suplementado con los aminoácidos L-lisina y L-arginina de isótopo ligero [$^{12}\text{C}_6$] o de isótopo pesado [$^{13}\text{C}_6$], que se obtuvieron de *Dundee Cell Products* (DCP). Este procedimiento se realizó en dos modalidades, marcaje directo y marcaje reverso, para evitar que el posterior análisis se vea afectado por un sesgo en el proceso de marcaje. Así, cada línea celular se creció en presencia de los isótopos ligeros y de los isótopos pesados por separado (Figura 7). Esta suplementación se mantuvo al menos durante 8 replicaciones para conseguir una incorporación igual o mayor al 98% de los aminoácidos de isótopo pesado. Una vez cumplido esto, y al igual que para el estudio con el microarray de anticuerpos, se sembraron ambas líneas celulares para que alcanzasen confluencia a las 24 horas. Se incubaron durante 1 hora con medio de cultivo sin suero, se lavó para retirar restos y posteriormente se añadió el medio de cultivo sin suero durante 48 horas.

El contenido en proteína de los medios condicionados se precipitó con soluciones de metanol y cloroformo (ver apartado 3.7) y se cuantificó por el método de Trp. Posteriormente, se mezclaron 25 µg de la proteína total recuperada del medio condicionado con L-arginina/L-lisina [$^{12}\text{C}_6$] de HCT116-Mock con la misma cantidad de proteína procedente del medio condicionado con L-arginina/L-lisina [$^{13}\text{C}_6$] de HCT116- ΔNp73 . Esta combinación conforma el experimento directo y la combinación opuesta el experimento reverso (Figura 7).

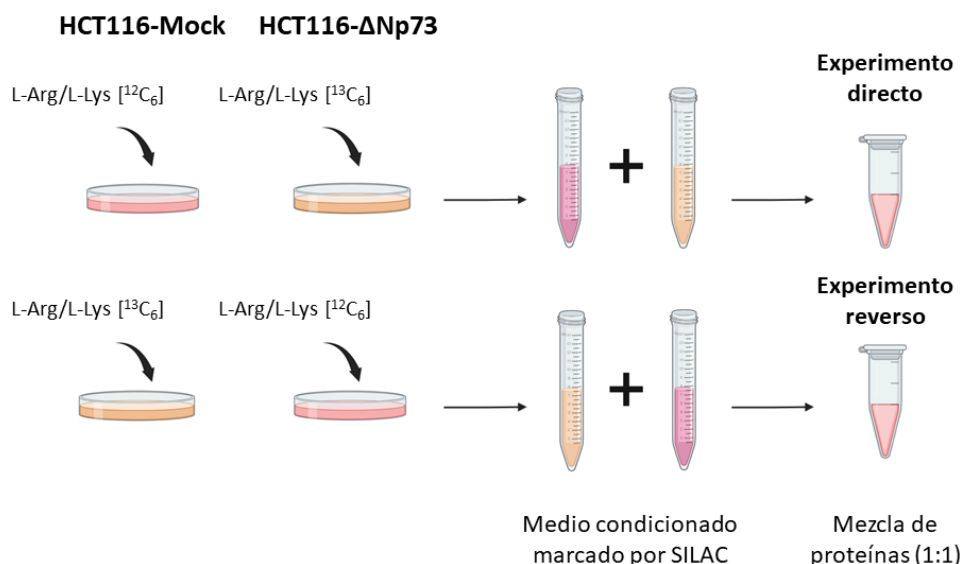


Figura 7. Flujo de trabajo para el análisis del secretoma por marcaje metabólico SILAC. Procedimiento para llevar a cabo los experimentos directo y reverso analizados por espectrometría de masas.

El contenido de proteína se cargó en un gel SDS-PAGE al 15% para su separación. A continuación, el gel se tiñó con el kit de tinción *Colloidal Blue* (Invitrogen) y los carriles, que contienen las proteínas marcadas del experimento directo y reverso, se cortaron en 10 trozos. Después se destiñeron con bicarbonato amónico a una concentración de 50 mM y luego con acetonitrilo (ACN) al 50%. Estas bandas se deshidrataron con ACN y se secaron para incubarlas durante la noche a 30°C con tripsina a una concentración de 12,5 ng/µL en bicarbonato amónico 50 mM. Esta incubación permite un mayor acceso a las proteínas. Por último, los péptidos fueron separados y extraídos a 37°C con ACN al 100% y luego con ácido trifluoroacético (TFA) al 0,5%.

3.4.2 Espectrometría de masas

Para el análisis de espectrometría de masas, los péptidos fueron secados y lavados de impurezas y sales mediante un Ziptip con resina C18 (Millipore) y columnas de filtración. Tras el paso de los péptidos por la resina, son reconstituidos en 5 μ L de ácido fórmico al 0,1% y ACN al 2%. Éstos se pasaron posteriormente por una pre-columna *C18-A1 ASY-column* (Thermo Fisher Scientific), para limpiar la solución de los péptidos, y se eluyeron en una columna *Biosphere C18* (NanoSeparations), que permite la separación de los péptidos según su hidrofobicidad, separándose primero los péptidos más hidrofílicos. A continuación, los péptidos se separaron individualmente en el instrumento *nanoEasy HPLC* (Proxeon) acoplado a una fuente de iones *nanoelectrospray* (Proxeon) con un flujo de 300 nL/minuto. Tras lo cual, los péptidos sufrieron un proceso de disociación inducida por colisión (CID) en el espectrómetro de masas *LTQ-Orbitrap Velos* (Thermo Fisher Scientific) en la configuración positiva de iones.

Los parámetros en este procedimiento fueron: El espectro completo (m/z 400-1200) se definió con un valor de 1.000.000 a resolución de 60.000 y m/z de 400. Se seleccionaron los 15 iones más intensos para su fragmentación aplicando un valor de 10.000 y una energía de colisión normalizada del 35%. Se cribaron los péptidos por el estado de la carga iónica precursora y por la selección precursora monoisotópica. Se rechazaron los iones cargados individualmente y los estados de carga sin asignar. Se permitió la exclusión dinámica con repeticiones de 1 y una duración de 30 segundos. De esta manera, se obtiene información sobre la carga y la masa.

Los datos obtenidos se compararon con la base de datos *Human Swiss Prot* (SwissProt_57.15.fasta) usando el motor de búsqueda *MASCOT search engine* (versión 2.3, Matrix Science) y el software *Proteome discoverer* (versión 1.4.1.14, Thermo Fisher Scientific) para contrastar nuestros resultados y asociar los péptidos analizados con las proteínas de las que forman parte. Los criterios de búsqueda fueron un máximo de dos cortes perdidos, la carbamidometilación de cisteínas como modificación fija, y la oxidación de metionina, acetilación del extremo N-terminal y la presencia de L-arginina/L-lisina [$^{13}\text{C}_6$] como modificaciones variables. La tolerancia de la masa precursora y fragmentada se fijó a 10 ppm y 0,8 Da, respectivamente.

Los péptidos identificados los validamos con el algoritmo *Percolator* aplicando un valor de restricción $q=0,01$, para que el 99% de los datos obtenidos sean fiables. La cuantificación relativa de estos péptidos se realizó con el programa *Proteome discoverer*. Con éste, para cada experimento (directo y reverso), se determinaron las áreas del cromatograma de los iones

extraídos y se obtuvo la relación entre los mismos péptidos con isótopos pesados y ligeros, ya que existe una diferencia de 6 Da entre ellos. Después, teniendo en cuenta todos los péptidos cuantificados que pertenecen a una determinada proteína y la relación antes mencionada, se usó la mediana de las diferencias entre el isótopo pesado y ligero para determinar el ratio diferencial de HCT116- Δ Np73/HCT116-Mock. Las proteínas solo se consideraron para su cuantificación si se identificó al menos un péptido de las mismas tanto en el experimento directo como en el reverso y además, no presentaban una variabilidad $\geq 20\%$ entre ellos. Los datos del ratio diferencial de las proteínas se normalizaron al quitar el 5% de los valores más extremos, considerados estadísticamente "outliers", y se centraron al valor de 1. Los valores de umbral por el que hemos considerado una desregulación significativa se determinó usando un test de permutación, el cual los fijó en los valores $\geq 1,5$ y $\leq 0,67$.

La conversión metabólica de arginina en prolina puede llegar a afectar a la hora de cuantificar con exactitud en algunos tipos celulares, por lo que se analizó la conversión arginina-prolina en las células HCT116-Mock y HCT116- Δ Np73. Se detectó menos de 1% de péptidos con prolina marcada con el isótopo pesado, por lo que descartamos la posibilidad de interferencia en nuestros análisis.

3.5 ESTUDIO Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LOS RESULTADOS PROTEÓMICOS

El conjunto de datos a nivel proteómico que hemos obtenido se ha contrastado con diversas bases de datos y herramientas bioinformáticas para extraer información exhaustiva.

Hemos estudiado la actividad biológica y las funciones de las proteínas cuantificadas en ambos ensayos proteómicos y si existe un enriquecimiento concreto de las fracciones subcelulares usando la versión 6.8 de la base de datos *DAVID* (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery). Usamos la base de datos *STRING* (versión 10.5) para identificar los grupos biológicos o "clusters" de nuestras proteínas cuantificadas que interactúan entre sí y participan en el mismo proceso celular y/o función biológica. *STRING* indica las interacciones conocidas y predichas de tipo directas o físicas e indirectas o funcionales entre las proteínas. Para este análisis se usó la herramienta de agrupamiento *MCL clustering enrichment 2* con un valor de confianza por defecto de 0,4. También hemos usado la base de datos *Exocarta* para identificar cuáles de nuestras proteínas desreguladas han sido descritas previamente en exosomas y su posible asociación con este método de secreción de proteínas.

3.6 LISIS CELULAR Y EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

Para extraer el contenido proteico de nuestros cultivos celulares, se usó la solución comercial RIPA de Sigma-Aldrich añadiendo inhibidores de proteasas y fosfatasa en una relación 1:100. Para ello, las células se lavaron adecuadamente con PBS para retirar restos de contaminantes y se lisaron añadiendo la solución RIPA directamente en la placa de cultivo o en el pellet celular de las muestras. Después, se centrifugó el lisado para precipitar los componentes no proteicos y quedarse con el sobrenadante con las proteínas.

3.7 PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS CON METANOL Y CLOROFORMO

Para precipitar las proteínas de nuestras muestras, usando 100 μ L como volumen de partida, se añadió una relación 1:4 de metanol y se agitó en vortex. Se añadió una relación 1:1 de cloroformo y se agitó en vortex de nuevo. Después se añadió una relación 1:3 de agua ultra pura (Milli-Q) y se volvió a agitar. Posteriormente se centrifugó la mezcla durante 2 minutos a 12.000 g para separar las fases, quedando la fase acuosa arriba para retirarla. Tras esto, se añadió una relación 1:4 de metanol respecto al volumen de partida y se agitó en vortex. Por último se centrifugó durante 3 minutos a 12.000 g y retiró el metanol, permaneciendo el pellet de proteínas en el fondo. Los restos se secaron con vacío mediante un instrumento Speed-Vac.

3.8 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO DE TRIPTÓFANO (Trp)

Hemos utilizado el método de Trp para determinar la concentración de proteína en nuestras muestras. Consiste en el cálculo de la cantidad de triptófano presente en una muestra. Para ello se desnaturalizan las proteínas con una solución de urea a concentración 8 M y Tris a 100 mM con pH = 8,5. Posteriormente se mide la fluorescencia de la muestra a una longitud de onda de 350 nm tras su excitación a 295 nm. Por último, se calcula la concentración de la muestra mediante el uso de una recta patrón de Trp y aplicando el factor de corrección del Trp.

3.9 ANÁLISIS Y DETECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE ESTUDIO

Para estudiar la presencia y diferencia en los niveles de determinadas proteínas en nuestras muestras se han usado dos tipos de técnica para su inmunodetección.

3.9.1 Western blot

Esta técnica se usó para validar los resultados obtenidos mediante el microarray y el marcaje SILAC respecto a las proteínas diferencialmente desreguladas por $\Delta Np73$. Las proteínas a analizar se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) con concentración variable en el gel separador y constante al 4% en el gel concentrante. De cada muestra se cargó de 10 a 25 μg de proteína procedente del extracto celular. Las proteínas fueron diluidas en tampón de carga (Tris-HCl 50 a 50 mM, 10% de glicerol, 0,01% de azul de bromofenol, 0,1% de SDS y β -mercaptoetanol al 0,5%) y calentadas a 95°C previamente durante 15 minutos. Una vez terminado el proceso, las proteínas separadas en los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa por transferencia húmeda. Posteriormente las membranas se bloquearon con albúmina de suero bovino (BSA) al 3% en PBS con 0,1% de Tween (PBST) durante 1 hora y luego se incubaron durante la noche con los anticuerpos primarios de estudio. Finalizado el tiempo las membranas se lavaron exhaustivamente con PBST y se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo secundario correspondiente, para volver a lavarlas minuciosamente y proceder a la visualización de las proteínas.

3.9.2 Dot-blot

La validación de las diferencias observadas en las proteínas de interés en el secretoma entre las distintas líneas celulares se realizó con esta técnica. En este caso, la proteína se añade directamente en las membranas de nitrocelulosa. Se colocaron 10 μL del secretoma de las líneas celulares en la membrana estando situada sobre un soporte de 96 pocillos de Bio-Rad conectado a una bomba de vacío para asegurar la absorción de las proteínas a la membrana. Una vez completado este paso, se bloqueó la membrana y se incubó con los correspondientes anticuerpos, tal como se ha descrito en el apartado anterior.

Para la visualización de las proteínas en las membranas del western blot y del dot-blot, se usaron los reactivos de revelado *ECL Western Blotting Substrate* (Thermo Fisher Scientific) y *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* (Thermo Fisher Scientific), respectivamente. Las bandas de proteína obtenidas se cuantificaron por densitometría con el programa *Quantity One software* de BioRad para los resultados de dot-blot y el software del equipo *Odissey Infrared Imaging System* para los resultados del western blot. La proteína β -actina en western blot y la tinción con rojo ponceau en dot-blot se usaron como control de carga. Todos los anticuerpos usados están listados en la Tabla 1.

Tabla 1. Lista de anticuerpos primarios y secundarios usados en la inmunodetección de las proteínas de estudio.

Anticuerpos primarios				
Proteína	Técnica	Dilución usada	Proveedor	Referencia
BDNF	Dot-blot / ELISA / Western blot	1:80	RayBiotech	ELH-BDNF
EMAP-II	Dot-blot / ELISA / Western blot	1:100	ElabScience	E-EL-H0204
VEGFR-3	ELISA	1:80	RayBiotech	ELH-VEGFR3
VEGF-C	ELISA	1:80	RayBiotech	ELH-VEGFC
B-actina	Western blot	1:1000	Abcam	Ab8227

Anticuerpos secundarios			
Proteína	Técnica	Dilución usada	Proveedor
HRP-anti-ratón IgG	Western-blot	1:2500	Sigma-Aldrich
HRP-anti-conejo IgG	Western-blot	1:2500	Sigma-Aldrich
HRP-estreptavidina	Dot-blot / ELISA	1:200	RayBiotech
HRP-estreptavidina	ELISA	1:100	Elabscience

3.10 ANÁLISIS DEL CONTENIDO PROTEICO MEDIANTE ELISA

Estudiamos y cuantificamos los niveles de nuestros candidatos a biomarcadores mediante kits de ELISA en muestras de medio condicionado, extracto celular y plasma sanguíneo humano (apartado 3.17). Los kits de ELISA usados para VEGFC, VEGFR3 y BDNF fueron adquiridos de RayBiotech y el de EMAP-II en Elabscience. El procedimiento para medir estos biomarcadores se realizó siguiendo las indicaciones del proveedor y las concentraciones recomendadas para su optimización.

3.11 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA Y DE ARN MENSAJERO

En este trabajo se ha analizado los niveles de expresión génica y/o el contenido de ARN mensajero de distintos tipos de muestras, por lo que se ha procedido acorde a las mismas con diferentes procedimientos.

3.11.1 Extracción de ARN

La extracción de ARN de cultivos celulares se realizó mediante el uso de *TRIZOL™ Reagent* (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del proveedor. Con él se lisaron las células, se separó el ARN del ADN y las proteínas añadiendo cloroformo, se precipitó el ARN con isopropanol y se eliminaron las impurezas con etanol al 75%, para posteriormente resuspender el ARN en agua libre de RNasas.

El ARN de tejidos incluidos en parafina fue aislado con el kit *miRNeasy FFPE extraction* (QIAGEN) siguiendo el protocolo comercial. Se escogieron dos cortes histológicos de 5µm de cada muestra y se procedió a su desparafinación con la solución de desparafinación (#19093, QIAGEN). Posteriormente, se siguió el protocolo con los reactivos del kit.

El ARN contenido en las vesículas extracelulares purificadas (ver apartado 3.18) se extrajo con el kit *SeraMir™ Exosome RNA Amplification* (System Biosciences, SBI) de acuerdo a las indicaciones del proveedor. Las vesículas extracelulares resuspendidas en PBS 1x fueron lisadas con el reactivo de lisis y por medio de columnas de filtración se purificó el ARN total. Se usó el mismo volumen de VEs en PBS 1x para extraer el ARN total con el objetivo de facilitar la normalización de los resultados.

3.11.2 Síntesis de ADN complementario mediante retro-transcripción

Para los subsecuentes análisis con el ARN extraído se determinó la concentración del mismo mediante un espectrofotómetro *Nanodrop^(R) ND1000 UV-Vis* (Nanodrop Technologies) utilizando el eluyente de cada muestra como control. La conversión del ARN en su ADN complementario se realizó con los kits *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis* (ROCHE) para muestras procedentes de pacientes o el *NZY First Strand cDNA Synthesis* (Nzytech) para extractos de cultivo celular, siguiendo las instrucciones de cada casa comercial. La reacción se llevó a cabo añadiendo 400 ng de ARN por cada reacción.

3.11.3 PCR semicuantitativa

Este tipo de técnica se llevó a cabo para validar a nivel transcripcional la desregulación de las proteínas obtenidas en los ensayos de microarray de anticuerpos y el marcaje SILAC. Los análisis por PCR semi-cuantitativa se realizaron con cebadores específicos para los genes listados en la Tabla 2. La reacción de PCR se realizó con la enzima *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las indicaciones del proveedor. El programa de amplificación fue el siguiente: 3 minutos a 94°C; 30 o 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C y 1 minuto a 72°C, y 10 minutos finales a 72°C. La reacción de PCR se llevó a cabo con triplicado técnico. Los productos de la PCR a los ciclos 30 y 35 se separaron en un gel de agarosa al 2%, se tiñeron con *GelRed* (Biotium) y las bandas se cuantificaron por densitometría con el programa *Quantity One software* (BioRad). La normalización se llevó a cabo con GAPDH como control interno. El ratio diferencial $\Delta Np73/\text{Mock}$ final se calculó haciendo la media de los ratios a 30 y 35 ciclos.

Tabla 2. Secuencias de los cebadores directo y reverso para los genes analizados mediante PCR semicuantitativa.

Gen	Cebador directo (5'-3')	Cebador reverso (5'-3')	Amplicón (pb)
APEX1	CTGCTCTTGAATGTGGATGGG	TCCAGGCAGCTCCTGAAGTTCA	148
CRABP2	TTGAGGAGCAGACTGTGGATGG	GTTCTCTGGTCCACGAGGTCTT	126
CXCR4	CTCCTCTTTGTATCAGCTTCC	GGATGAGGACACTGCTGTAGAG	127
DDB1	CATTCCTCGCTCCATCCTGATG	CCTTCTACGGTCGCTCAACAG	128
DSC3	CACTTACTCGGAGTGGCACAGT	AGCTGGAGATCCTCTTCCCTCA	136
DSG2	AGGGAAGCACAGCATGACTCCT	CCTTCCGCAATGGCACATCAG	121
MARCKSL1	CAGGCTACAGAGCCATCCACTC	GCAGCTTAGAGATCACCCACCT	109
QSOX1	ACATGGCTGACCTGGAATCTGC	GCAGGAAGTTCTGGACTAAGGG	156
S1PR1	CGACTCGAGCTGCGGTTTC	GCTACTCCAGACGAACGCTA	135
WDR1	AGAAGGACCACCTGCTCAGTGT	ATGCACCGTCAGACACTGGATC	125
GAPDH	GTCTCCTGACTTCAACAGCG	ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA	131

Amplicón: tamaño del producto amplificado por los cebadores descritos. pb: pares de bases.

3.11.4 PCR cuantitativa (qPCR)

La PCR cuantitativa (qPCR) se realizó en un instrumento *LightCycler 2.0* (Roche Diagnostics) con el kit *LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I* (Roche Diagnostics). Cada reacción tuvo lugar en un volumen final de 20µL con 2µL de ADN complementario, 0,5 µM de cada cebador y el mix de reacción a 1x, que contiene la enzima polimerasa, el tampón de reacción, los dNTPs y SYBRGreen.

MATERIALES Y MÉTODOS

La reacción de qPCR consistió en un primer paso de desnaturalización a 95°C durante 10 minutos, 45 ciclos de amplificación (desnaturalización a 95°C durante 10 segundos; anillamiento a la temperatura correspondiente de los cebadores, y elongación a 72°C el tiempo adecuado en función del tamaño del amplicón (Tabla 3)), una fase de melting y un último paso de enfriamiento a 40°C durante 30 segundos. Los cebadores para los genes estudiados están en la tabla 3. La reacción se llevó a cabo en triplicado técnico por cada muestra.

Los resultados de qPCR en muestras de cultivos celulares y tejido fueron normalizados con los niveles de ARN mensajero del gen de referencia, SDHA, y relativizados a sus respectivos controles.

Los resultados de qPCR de los análisis en vesículas extracelulares fueron normalizados con la cantidad de VEs usadas para extraer el ARN del que procede cada resultado (valor de qPCR/número total de VEs). Después, esta relación se transformó a escala de logaritmo en base 10. La concentración de VEs de cada muestra fue obtenida mediante *Nanosight* (ver apartado 3.19).

Tabla 3. Secuencias de los cebadores directo y reverso para los genes analizados mediante PCR cuantitativa (qPCR).

Gen	Cebador directo (5'-3')	Cebador reverso (5'-3')	Amplicón (pb)
AIMP1 (EMAP-II)	GCAGGCAACTTTGAGGGAAGAG	TTAGCGTGCAGTGGAGTACCAG	153
BDNF	CATCCGAGGACAAGGTGGCTTG	GCCGAACCTTCTGGTCCTCATC	161
SDHA	CGACTCAGCATGCAGAAGTCAA	TCGAACGTCTTCAGGTGCTTTA	125
TP53 exón 2-4	GCAGTCAGATCCTAGCGTCG	CTGGCATTCTGGGAGCTTCA	191
TP53 exón 6-7	TTGCGTGTGGAGTATTTGGATG	TGTAGTGGATGGTGGTACAGTC	103
TP53 exón 8-9	GCGTGTGTTGTCCTGTCCTG	TGGTTTCTTCTTGGCTGGG	151
p21	CTCAGGGTCGAAAACGGCG	TGGAGAAGATCAGCCGGCG	72
p16	CCCAACGCACCGAATAGTTA	ACCAGCGTGTCCAGGAAG	173
ΔNp73	TCGGTGACCCCGCACGGCAC	GCGAGTGGGTGGGCACGCTG	135
Δ133p53	TGTCTCCTTCTTCTTCTACAG	ACCATCGCTATCTGAGCAGC	208
TAp73	GCACCACGTTTGAGCACCTCT	GCAGATTGAACTGGGCCATGA	168

Amplicón: tamaño del producto amplificado por los cebadores descritos. pb: pares de bases.

3.12 TRATAMIENTO DE MUESTRAS DE ARN CON ADNasas

Debido a las características del ARN mensajero de BDNF, los cebadores están situados en el mismo exón para su amplificación específica por qPCR. Para descartar la posible amplificación de ADN, las muestras fueron tratadas con *TURBO DNA-free™ kit* (Invitrogen).

Las muestras de ARN fueron diluidas, cuando era necesario, a una concentración inferior o igual de 200 ng/μL en un volumen de 50 μL para que la eficiencia de la enzima fuera óptima. A este volumen se le añadió 5 μL de *10X TURBO DNase™ buffer* y 1 μL de la enzima *TURBO DNase™* mezclándolo todo suavemente. Para llevar a cabo la reacción de la enzima, las muestras se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente, se añadió 5 μL del *DNase inactivation reagent* y se mezcló bien. A continuación se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos, agitando la muestra 2-3 veces para la correcta mezcla del agente inactivador. Por último, se centrifugaron las muestras a 10.000 g durante 90 segundos y se recogió el sobrenadante, el cual contiene el ARN descontaminado de ADN.

3.13 EVALUACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

El efecto del secretoma alterado por Δ Np73 sobre la capacidad de proliferación de las células primarias HUVEC y HLEC se evaluó mediante el uso del *MTT Cell Proliferation and Cytotoxicity Assay Kit* (Boster Biological Technology). El ensayo consiste en la cuantificación espectrofotométrica de la conversión metabólica por parte de las células del compuesto soluble MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) en cristales morados insolubles de formazán. Por tanto, a mayor cantidad de células, mayor es la cantidad de cristales formados.

3.13.1 Obtención del medio condicionado de HCT116- Δ Np73 para ensayos funcionales

Para generar el medio de cultivo de las células HUVEC y HLEC condicionado por la sobreexpresión de Δ Np73, se sembraron 6×10^5 células de las líneas celulares HCT116-Mock o HCT116- Δ Np73 en placas de 100 mm con DMEM suplementado. Al cabo de 6-8 horas, se cambió el medio DMEM por medio ECM suplementado.

Después de 72 horas y sin que las células lleguen a máxima confluencia, se recogió el medio condicionado. Estos medios se centrifugaron a 1.500 rpm durante 6 minutos para precipitar posibles restos celulares y se usaron para consecutivos ensayos *in vitro* (apartado 3.13, 3.14 y 3.15).

3.13.2 Ensayo de proliferación celular

Una vez obtenidos los medios condicionados, sembramos 2.000 células HUVEC o HLEC por pocillo en una placa de 96 pocillos con 5 réplicas por condición y a las 8 horas se cambió el medio por 100 μ L del medio condicionado de HCT116- Δ Np73 y HCT116-Mock, mezclado con medio fresco a una relación 75%-25%. Al término de los tiempos de crecimiento de interés en el estudio (24h-48h-72h), se añadió 10 μ L de *MTT labeling reagent* a cada pocillo y se incubó la placa multipocillo a 37°C durante 4 horas. Posteriormente, se retiró con cuidado el medio de los pocillos y se disolvieron los cristales de formazán con DMSO. Por último se incubaron durante 10 minutos a 37°C y se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de placas.

3.14. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE INVASIÓN CELULAR

La capacidad invasiva de las células HUVEC y HLEC se evaluó con un ensayo tipo Transwell o de cámara de Boyden, usando insertos de cultivo celular de membrana de tereftalato de polietileno (PET) de 6,5 mm de diámetro y poros de 8 μ m (Falcon).

3.14.1 Marcaje fluorescente de las células

Las distintas líneas celulares fueron tratadas con *CellTrackerTM Green CMFDA Dye* (Invitrogen). Esta sonda fluorescente atraviesa libremente las membranas celulares y es transformada en un producto impermeable, quedando retenido dentro de la célula. Al recibir una longitud de onda de 492 nm, emitirá señal a 517 nm y podemos cuantificar la cantidad de células que han migrado del inserto al pocillo de la placa atravesando la barrera del mismo.

Las líneas celulares HUVEC y HLEC se incubaron con la sonda fluorescente durante 20 minutos a 37°C en un medio de cultivo con 1% de FBS y agitación frecuente. Tras este tiempo, se precipitaron para retirar el medio y se lavaron con PBS 1x en dos ocasiones para limpiar el exceso de *CellTracker™ Green CMFDA Dye*. Posteriormente, se resuspendieron las células en su medio de cultivo correspondiente con 1% de FBS.

3.14.2 Ensayo Transwell

Para este ensayo de invasión, se añadió una capa fina de 30 μ L (15 μ g) de *Matrigel^(R) matrix growth factor reduced* (GFR) (CORNING) diluido 1/20 en los insertos de cultivo, donde se sembraron las células marcadas tras la gelificación del matrigel. En el caso de la línea celular HLEC, los pocillos inferiores de la placa se recubrieron con fibronectina diluida previamente para su correcta adhesión. En el pocillo inferior se añadió medio condicionado de HCT116- Δ Np73 o -Mock, mezclado con medio fresco a una relación 75%-25%, para que el secretoma alterado actúe como quimioatrayente.

Pasado el tiempo de estudio, se recuperó individualmente las células adheridas al pocillo, y del medio de cada réplica, que han traspasado el inserto. Las células se lavaron y resuspendieron en 100 μ L de PBS 1x, se colocan en una placa de 96 pocillos y, junto con una recta estándar, se midió la fluorescencia con un lector de placas multimodal (Synergy™, BioTek Instruments Inc). Los experimentos de invasión se realizaron con 6 réplicas por cada condición.

3.15 ENSAYO DE TUBULOGÉNESIS O FORMACIÓN DE VASOS

El efecto de la sobreexpresión de Δ Np73 en la capacidad de HUVEC y HLEC para formar vasos y estructuras similares a la red vascular lo hemos estudiado por el ensayo de tubulogénesis. Este ensayo se llevó a cabo en las placas multipocillo especiales *μ -slide angiogenesis* (Ibidi GMBH).

En cada pocillo se añadió 10 μ L (10 μ g/ μ L) de Matrigel GFR a la temperatura adecuada para su correcto manejo y gelificación uniforme. Tras una hora de incubación a 37°C, en cada réplica se sembraron 6.000 células de la línea HUVEC o HLEC con el medio condicionado por HCT116- Δ Np73 o -Mock (ver apartado 3.13.1). Estos medios condicionados se mezclaron con medio fresco a una relación 75%-25%. Las placas se incubaron a 37°C dentro de una "cámara de humedad" para evitar la evaporación del medio de cultivo.

En función de la línea celular, la incubación duró un periodo de tiempo entre 12 y 16 horas, el cual se determinó con la visualización de la adhesión celular y el establecimiento de estructuras similares a una red de vasos por medio del sistema de observación *in vivo* Cell Observer (Zeiss). Definido este tiempo para cada condición del experimento y a su término, las placas multipocillo se extrajeron del incubador y se tomó una imagen central de cada réplica en contraste de fases y con el objetivo 5x. Cada condición experimental se realizó con 5 réplicas. El análisis de las imágenes se realizó con la herramienta *Angiogenesis analyzer* del software ImageJ. Los parámetros evaluados con esta herramienta fueron: número de segmentos (NS), número de segmentos maestros (NSM), número de uniones (NU), número de uniones maestras (NUM), número de anillos vasculares (NAV), longitud total de la red vascular (LT), longitud total de segmentos (LTS) y longitud total de segmentos maestros (LTSM).

3.16 ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DE BDNF Y EMAP-II EN EL ENSAYO DE TUBULOGÉNESIS

3.16.1 Silenciamiento transitorio por ARNs de interferencia

Para el estudio del papel de BDNF y EMAP-II en angiogénesis y linfangiogénesis se realizó el silenciamiento transitorio del ARN mensajero mediante los siguientes ARNs de interferencia (siRNA): Negative Control siRNA (*SilencerTM Negative Control No.1 siRNA*, AM4611, Invitrogen), BDNF siRNA (*ON-TARGET Plus Human BDNF siRNA SMART Pool #L017626-00-0005*, Dharmacon) y AIMP1 siRNA (*MISSION^R esiRNA EHU075101*, Sigma-Aldrich). La transfección de estos siRNAs se llevó a cabo usando *jetPRIME[®]* (Polyplus-transfection S.A).

Con el objetivo de determinar las condiciones óptimas de interferencia del ARN mensajero de BDNF y EMAP-II, se probaron diferentes densidades celulares, concentraciones de siRNA, cantidades de agente transfectante y tiempos de transfección siguiendo las indicaciones del fabricante. La eficiencia del silenciamiento se analizó midiendo los niveles de expresión de las células transfectadas.

En base a las pruebas iniciales, se sembraron 25.000 células HCT116- Δ Np73 en pocillos de una placa *Multiwell 24* (Falcon) en un volumen de 500 μ L de medio DMEM suplementado y por triplicado para el siRNA de BDNF o de EMAP-II y el siRNA control. A las 8-12 horas, permitiendo su adhesión a la placa, se retiró el medio para cambiarlo por medio ECM suplementado, en el cual se realizó el silenciamiento. Se preparó la mezcla de transfección con 50 μ L de *jetPRIME[®]*

buffer, el volumen de ARN de interferencia para una concentración final de 50 nM y 1 μ L de *jetPRIME® reagent* por cada réplica. Esta mezcla se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y luego se añadió a las células. El tiempo de transfección con el que se consiguió el silenciamiento máximo fue 24 horas para BDNF y 48 horas para EMAP-II. Tras estos tiempos, se recogió los medios condicionados para consecutivos ensayos *in vitro* y las células se recuperaron para confirmar los niveles de expresión reducidos por qPCR.

3.16.2 Ensayo de tubulogénesis

Una vez obtenidos los medios condicionados tras el silenciamiento con el siRNA del control negativo, de BDNF y de EMAP-II se siguió el mismo procedimiento que en el apartado 3.15. La incubación duró un periodo de tiempo entre 16 y 22 horas en función de la línea celular y el medio condicionado. Se tomó una imagen central de cada réplica en contraste de fases y con el objetivo 5x. Cada condición experimental se realizó con 5 réplicas. Los parámetros evaluados fueron los mismos que en el apartado 3.15.

3.17 MUESTRAS HUMANAS

En esta tesis doctoral se han usado diversas muestras humanas de sangre y biopsias de tejido incluido en parafina, cuyo trabajo y estudio con ellas fue aprobado por el Comité Ético de Investigación del Hospital Clínico San Carlos (IdISCC) (14/254-E, 28 de agosto de 2014) y del Hospital Universitario La Paz (IdiPaz) (HULP-PI-2049, 5 de agosto de 2015). Todas las muestras se recogieron por nuestros colaboradores clínicos de estos centros con el correspondiente consentimiento informado.

Para este trabajo las muestras se obtuvieron y agruparon en 3 grupos de estudio:

- Grupo control o sano: Individuos que tras una colonoscopia han obtenido un resultado negativo para adenomas y CCR.
- Grupo premaligno: Individuos que tras la colonoscopia se detectaron adenomas de bajo o alto grado.
- Grupo o pacientes con CCR: Pacientes diagnosticados de CCR en diferentes estadios de la enfermedad.

De cada individuo incluido en el estudio se extrajeron 10 mL de sangre en tubos con EDTA. Se aisló el plasma sanguíneo mediante centrifugación a 1.500 rpm durante 15 minutos y, posteriormente, el plasma se almacenó a -80°C hasta su uso.

3.17.1 Muestras humanas usadas en el primer bloque de la tesis

Para la primera parte de esta tesis doctoral, se llevó a cabo la evaluación de los niveles de BDNF, EMAP-II, VEGFR3 y VEGFC mediante kit de ELISA para estudiar la capacidad de discriminar entre pacientes con CCR, individuos con lesiones premalignas y el grupo control. Para esto, se analizaron 60 muestras de plasma sanguíneo, perteneciendo 20 muestras a cada grupo de estudio (Tabla 4). También se pudo obtener, gracias al servicio del biobanco de IdISCC e IdiPaz, muestras de 17 de biopsias de adenoma y 6 de tumor primario pertenecientes a estos individuos, de las que se extrajo ARN para analizar los niveles Δ Np73 y evaluar la correlación entre sus niveles de ARNm con los niveles de proteína en plasma sanguíneo de estos candidatos. Esta correlación se determinó calculando el coeficiente de correlación de Pearson.

Tabla 4. Datos clínicos de interés de los individuos incluidos en el estudio de análisis del plasma sanguíneo por ELISA.

Parámetros	Grupo control	Grupo premaligno	Pacientes CCR
<i>n</i>	20	20	20
Sexo			
Hombres	6 (30%)	11 (55%)	11 (55%)
Mujeres	14 (70%)	9 (45%)	9 (45%)
Edad (años)			
Mediana, rango	61 (36-101)	59 (40-67)	72 (55-87)

n, número de individuos.

3.17.2 Muestras humanas usadas en el segundo bloque de la tesis

Por otro lado, para la segunda parte del trabajo, se estudiaron las diferencias del contenido de ARNm de TAp73, Δ Np73 y Δ 133p53 en VEs para evaluar su potencial como biomarcador de diagnóstico y pronóstico en biopsia líquida. Para ello, se usaron un total de 120 muestras de plasma sanguíneo, siendo 29 del grupo control, 49 del grupo premaligno y 42 del grupo de pacientes con CCR.

Asimismo, se recopilaron los datos clínicos disponibles (Tabla 5) de los individuos de este estudio para evaluar el comportamiento en el pronóstico de la enfermedad. De igual manera, para comparar los resultados de nuestros candidatos con el biomarcador actual en clínica, se logró obtener los niveles del marcador CEA en el plasma sanguíneo de 20 individuos del grupo control, 27 del grupo premaligno y 31 de los pacientes con CCR. Además, en un estudio previo (96) se analizó la seroreactividad a autoanticuerpos de p53, p73, $\Delta Np73\alpha$ y $\Delta Np73\beta$ en 15 muestras del grupo control, 19 del grupo premaligno y 9 de los pacientes con CCR. En consecuencia se evaluó la correlación entre esa respuesta humoral y los niveles de las isoformas estudiadas en VEs en esas muestras. Para estudiar esta correlación se usó la prueba de correlación de orden de rango de Spearman.

Tabla 5. Datos clínicos de interés de los individuos incluidos en el estudio de análisis del contenido en vesículas extracelulares.

Parámetros	Grupo control	Grupo premaligno	Pacientes CCR
n	29	49	42
Sexo			
Hombres	10 (34,48%)	24 (48,98%)	22 (52,38%)
Mujeres	19 (65,52%)	25 (51,02%)	20 (47,62%)
Edad (años)			
Mediana, rango	59 (42-79)	62 (31-81)	71 (49-89)
CEA (ng/mL)			
Mediana, rango	0,0 (0,0 - 81,9)	0,0 (0,0 - 135,2)	3,1 (0,5 - 94,9)
Estadio			
I			5 (11.905%)
II			9 (21.43%)
III			23 (54.76%)
IV			5 (11.905%)
Localización tumoral			
Colon derecho			14 (33.33%)
Colon izquierdo			17 (40.48%)
Recto			11 (26.19%)
SLE (n = 38)			
Mediana, IC			NA
SLE a 3 años(95%, IC)			75% (61 - 89)
SG			
Mediana, IC			NA
SG a 3 años (95%, IC)			69% (55 - 83)

n, número de individuos; SLE, supervivencia libre de enfermedad; SG, supervivencia global; NA, no alcanzada.

3.18 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE VESÍCULAS EXTRACELULARES

El aislamiento de las vesículas extracelulares del plasma sanguíneo se llevó a cabo por un protocolo de ultracentrifugación secuencial y filtrado. De cada paciente se usó un volumen de 3-5 mL de plasma sanguíneo para el procedimiento. Las muestras se diluyeron con PBS 1x a una relación 1:1 para reducir la viscosidad y densidad del plasma sanguíneo y se centrifugaron a 12.000 g durante 30 minutos. Así, se sedimentaron las microvesículas, con un tamaño superior a las vesículas de interés. Posteriormente, se recuperó el sobrenadante sin perturbar ni levantar el pellet y se filtró con un filtro de PVDF de 0,22 μm (Millipore) para descartar todas las vesículas o partículas con un tamaño superior a 200 nm. Las VEs restantes del sobrenadante se precipitaron con una ultracentrifugación a 100.000 g durante 70 minutos y después se resuspendieron en PBS 1x con el objetivo de retirar posibles impurezas y limpiarlas. Por último, se volvió a ultracentrifugar en las mismas condiciones y el pellet de VEs se resuspendió finalmente en 200 μL de PBS 1x para el subsecuente flujo de trabajo. Todas las ultracentrifugaciones se realizaron a 10°C con un rotor tipo 70.1 Ti de Beckman.

3.19 CUANTIFICACIÓN DE VESÍCULAS EXTRACELULARES MEDIANTE ANÁLISIS DE SEGUIMIENTO DE NANOPARTÍCULAS

Con el objetivo de normalizar y comparar los resultados obtenidos del análisis del ARNm contenido en las VEs se cuantificó la cantidad de éstas en las muestras procesadas (apartado 3.18) mediante el análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA, del inglés Nanoparticle Tracking Analysis). Este análisis se realizó en colaboración con el grupo del Dr. Héctor Peinado del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) usando el instrumento *Nanosight NS500* equipado con un laser a 405 nm (Malvern Panalytical Ltd). Para calibrar el aparato se usaron microesferas *Silica Microspheres* antes de hacer las mediciones. Las muestras se diluyeron 1/1000 en PBS 1x para obtener una concentración de partículas comprendida entre 10^8 y 10^9 partículas/mL. Se realizó 3 mediciones seguidas de 60 segundos por muestra y la media de éstas se usó para determinar la concentración. La temperatura de la unidad del laser se mantuvo controlada a 25°C. El software del *NanoSight NS500* recopiló la distribución del tamaño de las partículas entre un rango de 10 a 1000 nm y la concentración de partículas (partículas/mL). Con estos datos se calculó la cantidad de VEs (partículas) de la que se extrajo el ARN para los análisis por qPCR (apartado 3.11.1).

3.20 ESTUDIO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el manejo general de los datos de este trabajo y su estudio estadístico se evaluó en primer lugar si el conjunto de datos seguía una distribución normal mediante los test de D'Agostino-Pearson y Shapiro-Wilk. Al no cumplir esta premisa o haber un número de réplicas insuficiente, las diferencias significativas entre condiciones experimentales se estudió con los test de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney. Se consideraron valores estadísticos significativos cuando el p-valor fue inferior a 0,05 ($p < 0,05$). Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa *GraphPad Prism 6* o *SPSS* versión 24.

No obstante, se han tratado determinados ensayos y conjuntos de datos con procedimientos estadísticos concretos.

3.20.1 Resultados de los ELISAs en muestras humanas

Para el análisis del conjunto de estos datos, confirmando que seguían una distribución normal, se asumió que las varianzas entre los tres grupos de estudios eran distintas y se usó la prueba t de Student de una cola.

3.20.2 Curvas ROC y área bajo la curva (AUC)

La capacidad para discriminar entre los diferentes grupos de estudio de los candidatos como biomarcadores de este trabajo se evaluó creando las curvas ROC (del inglés, Receiver Operating Characteristic) y calculando el área bajo la curva.

Las curvas ROC y los datos de AUC, sensibilidad y especificidad máximas se obtuvieron con el programa R (versión 4.0.3, acceso: octubre de 2020) y los paquetes de R "ModelGood" y "Epi".

3.20.3 Análisis de supervivencia

La supervivencia libre de enfermedad (SLE) es la cantidad de tiempo desde que se realiza la cirugía al paciente hasta que se diagnostica la recidiva (o exitus), por lo que para este parámetro no se tiene en cuenta a pacientes en estadio IV. En cambio, la supervivencia global (SG) abarca el tiempo desde la cirugía hasta la última fecha de revisión o exitus del paciente.

Para determinar la SLE a 3 años se tuvo en cuenta la recurrencia de la enfermedad y la muerte de los pacientes con CCR localizado como eventos para el análisis. En el caso de la SG, se tuvo en cuenta el dato de muerte para todo el conjunto de pacientes con CCR. Para asociar los niveles de $\Delta Np73$ y $\Delta 133p53$ con la SLE y SG de los pacientes se crearon las curvas ROC y determinaron los valores umbral ("cut-off") óptimos mediante el índice de Youden. Así, se seleccionó los valores 0,76 y -0,86 de $\Delta Np73$ para SLE y SG, respectivamente. Para $\Delta 133p53$ se seleccionaron los valores 2,93 y 1,99 para SLE y SG, respectivamente. De esta manera se clasificaron los niveles de ARNm de $\Delta Np73$ y $\Delta 133p53$ en bajos o altos.

Para evaluar estadísticamente la asociación entre estos niveles y la SLE y SG se usó la prueba de Mantel-Cox (también conocida como log-rank test) y mediante los análisis de Kaplan-Meier se estimaron las medianas de SLE y SG. A continuación se usó el modelo de riesgos proporcionales de Cox para estimar el coeficiente de riesgo y los intervalos de confianza (IC) al 95%.

RESULTADOS

Para estudiar los objetivos del primer bloque de este trabajo, nos propusimos analizar el secretoma de la línea celular de cáncer de colon HCT116 con sobreexpresión estable de $\Delta Np73$ para identificar las proteínas desreguladas respecto a las mismas células transfectadas con el vector vacío. Con esta intención usamos microarrays de anticuerpos y espectrometría de masas como estudios proteómicos. Después, validamos las posibles dianas de esta isoforma oncogénica, centrándonos en aquellas implicadas en la promoción de angiogénesis y linfangiogénesis. Se llevaron a cabo distintos ensayos funcionales para evaluar si la participación de las dianas seleccionadas en estos procesos podría estar mediada por $\Delta Np73$. Finalmente, evaluamos si dichas dianas tienen potencial como biomarcador en el contexto del CCR.

4.1 IDENTIFICACIÓN Y VALIDACIÓN DE LAS DIANAS EFECTORAS DE $\Delta Np73$ EN EL CÁNCER COLORRECTAL

4.1.1 Identificación de citoquinas y otras proteínas de secreción desreguladas en el secretoma de HCT116 por la sobreexpresión de $\Delta Np73$

Como primera aproximación en el estudio del efecto de la sobreexpresión de $\Delta Np73$ en la secreción de proteínas de las células tumorales, procedimos a analizar el secretoma mediante un microarray de anticuerpos (serie L) de alta densidad. Este microarray contiene anticuerpos dirigidos a 493 proteínas que comprenden inmunomoduladores, citoquinas, quimiocinas, adipocinas, proteasas, factores pro-angiogénicos y de crecimiento. Este método es el más idóneo para su estudio por la sensibilidad del mismo, ya que estas proteínas, como las citoquinas, suelen estar poco concentradas en el medio condicionado para su análisis por otras técnicas.

4.1.1.1 Validación de la sobreexpresión estable de $\Delta Np73$

Antes de estudiar las diferencias en el secretoma, se cuantificaron los niveles de expresión de la isoforma oncogénica $\Delta Np73$ para validar la sobreexpresión de ésta en la línea transfectada, HCT116- $\Delta Np73$, en comparación a HCT116-Mock, ya que va a ser la base de todos los estudios de aquí en adelante. Mediante qPCR, obtuvimos que la línea HCT116- $\Delta Np73$ expresa esta isoforma alrededor de 280 veces más que la línea HCT116-Mock (Figura 8).

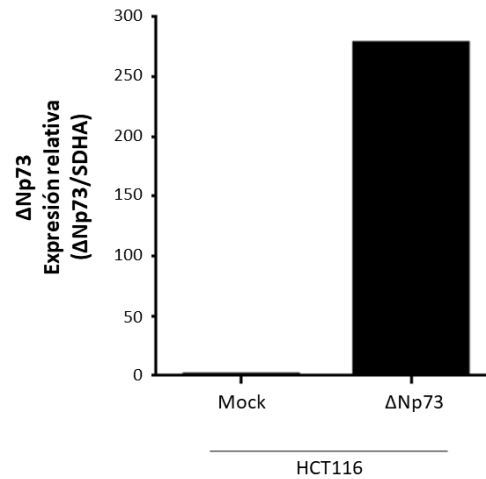


Figura 8. Confirmación de los niveles de expresión de ΔNp73 en la línea celular HCT116-ΔNp73. Los datos de qPCR se han normalizado usando SDHA como gen de referencia. Se muestra el ratio diferencial respecto a su control, la línea celular HCT116-Mock.

4.1.1.2 Identificación de las proteínas desreguladas por microarray de anticuerpos

Una vez cumplida esta premisa, para la detección de las proteínas desreguladas se usó el medio condicionado de dos réplicas biológicas diferentes de la línea celular HCT116-ΔNp73. Como control para comparar los resultados obtenidos se usó igualmente dos réplicas biológicas del secretoma de la línea HCT116-Mock (Figura 9).

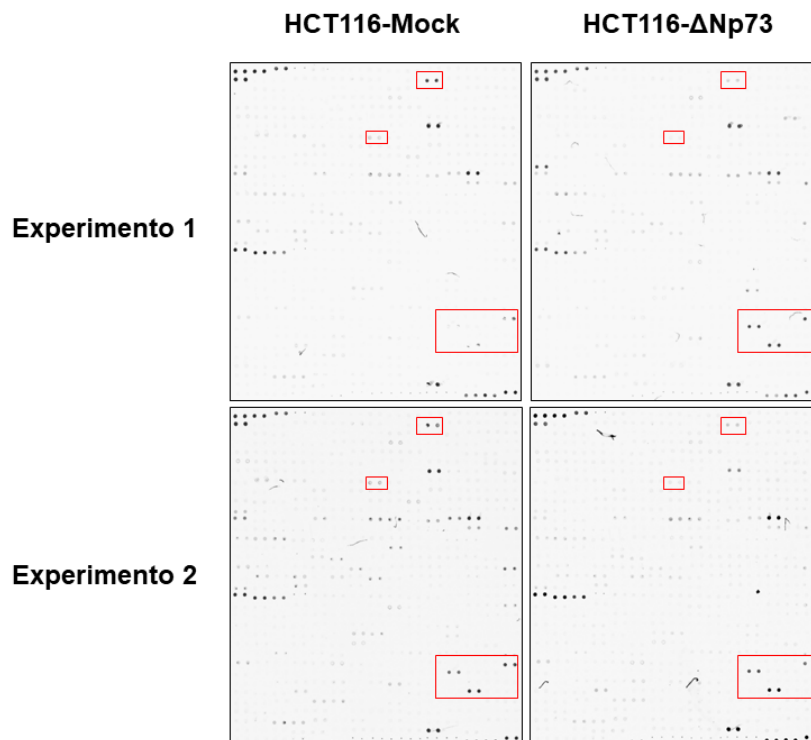


Figura 9. Resultado del microarray de anticuerpos al estudiar el secretoma alterado de la línea HCT116-ΔNp73. Se estudiaron dos muestras biológicas diferentes del medio condicionado de cada línea celular. Los recuadros en rojo muestran ejemplos de proteínas con una desregulación observable entre las condiciones experimentales.

De las proteínas que permite estudiar este microarray de anticuerpos, obtuvimos 14 de ellas con una expresión diferencial en ambas replicas biológicas (Tabla 6). Hemos considerado que existe una alteración significativa en la expresión de estas proteínas cuando el ratio entre el resultado de la línea HCT116- Δ Np73 y HCT116-Mock fue ≥ 1.4 o ≤ 0.67 . Las proteínas más sobreexpresadas fueron BDNF, Frizzled-6 y VEGFR-3 y las más reducidas fueron IL-1, RRP2, EDG-1, anfiregulina y EMAP-II. De estas, nos despertaron gran interés BDNF, VEGFR3 y EMAP-II por su papel en los procesos de angiogénesis y linfangiogénesis durante la progresión tumoral.

Tabla 6. Proteínas desreguladas por la sobreexpresión de Δ Np73 en el secretoma de la línea celular de cáncer de colon HCT116.

Proteína	Entrada UniProt	Ratio Δ Np73/Mock			Presencia extracelular	Presencia exosomas	
		Réplica 1	Réplica 2	Ratio medio			
Factor neurotrófico derivado de cerebro	BDNF	P23560	4,86	1,52	3,19	No	Si
Frizzled-6	FZD6	O60353	2,02	1,42	1,72	No	Si
Receptor 3 del factor de crecimiento vascular endotelial	VEGFR3	P35916	1,89	1,4	1,64	No	No
Receptor D de la interleucina 17	IL17RD	Q8NFM7	1,86	1,42	1,64	No	No
Metaloproteinasas de matriz 20	MMP20	O60882	1,69	1,44	1,56	Si	No
Interleucina 20	IL20	Q9NYY1	1,68	1,24	1,46	Si	No
Progranulina	GRN	P28799	1,51	1,33	1,42	Si	Si
Lipocalina 1	LCN1	P31025	1,45	1,37	1,41	Si	Si
Factor de crecimiento de fibroblasto 23	FGF23	Q9GZV9	0,63	0,69	0,66	Si	No
Receptor tipo 4 de la quimiocina C-X-C	CXCR4	P61073	0,61	0,56	0,59	No	Si
Polipéptido 2 activador de monocito endotelial	EMAP-II	Q12904	0,49	0,36	0,43	Si	Si
Receptor 1 de la esfingosina-1-fosfato (S1PR1)	EDG1	P21453	0,33	0,48	0,41	No	No
Anfiregulina	AR	P15514	0,37	0,37	0,37	Si	Si
Receptor 2 de tipo interleucina 1	IL1-Rrp2	Q9HB29	0,24	0,45	0,34	No	No

Dos replicados biológicos analizados con el kit de microarray de anticuerpos de alta densidad. Los ratios Δ Np73/Mock $\geq 1,4$ o $\leq 0,67$ determinaron las proteínas con una expresión diferencial. La presencia de estas proteínas en el espacio extracelular o en exosomas se ha determinado mediante las bases de datos *DAVID* y *Exocarta*, respectivamente.

4.1.2 Estudio del efecto de la sobreexpresión de $\Delta Np73$ en el secretoma de HCT116 mediante marcaje metabólico de isótopos estables

Por otro lado, hemos estudiado y cuantificado de manera más exhaustiva la desregulación por $\Delta Np73$ en el secretoma utilizando el marcaje metabólico SILAC y espectrometría de masas. Tras contrastar nuestros resultados del HPLC con la base de datos *Human Swiss Prot*, se identificaron 1606 proteínas en el experimento directo y 1338 en el experimento reverso, siendo 1893 proteínas distintas en total y habiendo 1051 proteínas comunes a ambos (Figura 10-A, izquierda). Posteriormente, se cuantificaron 1590 proteínas en total, siendo 793 comunes a ambos experimentos (Figura 10-A, derecha).

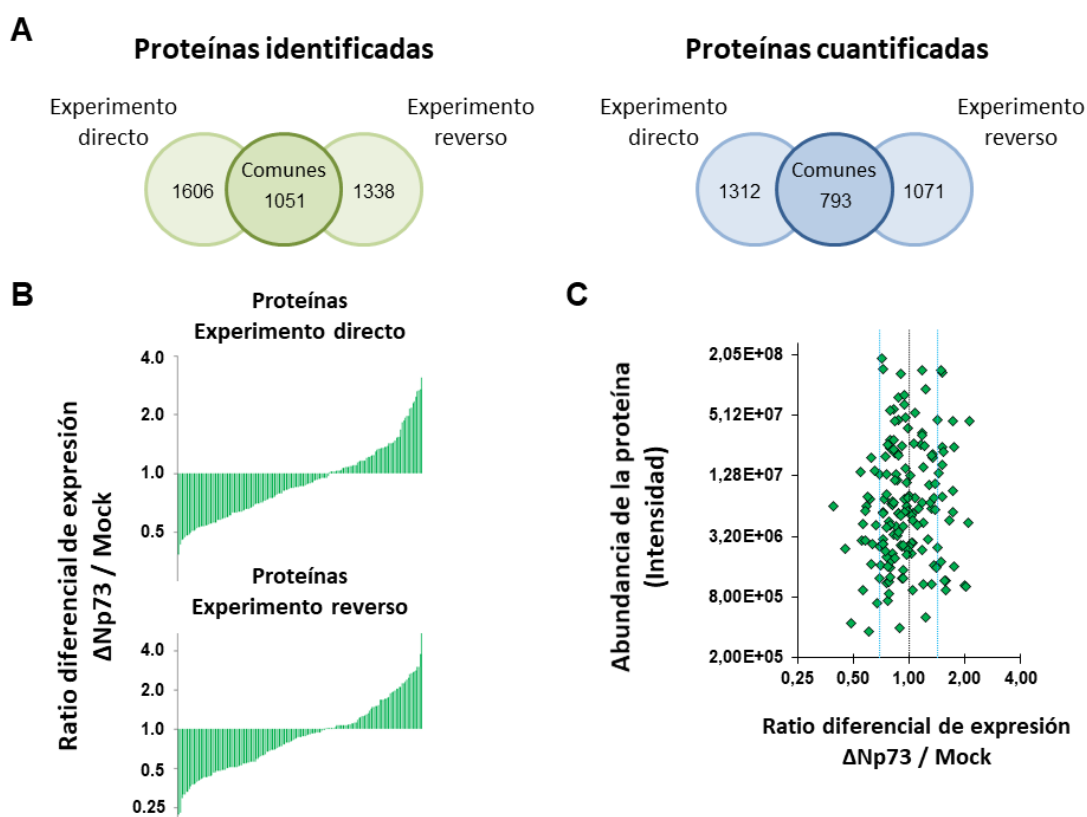


Figura 10. Espectrometría de masas del secretoma alterado por la isoforma oncogénica $\Delta Np73$. A) Esquema de las proteínas identificadas (izquierda) y cuantificadas (derecha) en los experimentos directo, reverso y comunes a ambos. B) Representación gráfica de las proteínas cuantificadas según su ratio diferencial $\Delta Np73/Mock$ y ordenadas de mayor reducción a mayor incremento. C) Representación gráfica de las proteínas cuantificadas en función de su abundancia y el ratio diferencial de expresión. La abundancia está representada por la intensidad de señal cuya unidad de medida son unidades arbitrarias (u.a.). Las líneas verticales azules marcan los umbrales que determinan que proteínas han presentado una desregulación significativa ($\geq 1,5$ o $\leq 0,67$).

No obstante, para obtener resultados más sólidos solo se tuvo en cuenta la cuantificación de las proteínas que presentaron al menos un péptido identificado tanto en el experimento directo como en el reverso y que no tuvieran una variabilidad $\geq 20\%$ entre ellos. Dada la cantidad de datos, se pudo usar un test de permutación que determinó que los umbrales por los que se considera una desregulación significativa en el secretoma de HCT116- Δ Np73 de nuestro estudio son un incremento $\geq 1,5$ o una reducción $\leq 0,67$.

Aplicando los umbrales obtenidos, se encontraron 37 proteínas desreguladas en el secretoma de HCT116- Δ Np73, de las cuales 19 de ellas estaban sobreexpresadas y 18 reducidas, respecto al secretoma de HCT116-Mock (Tabla 7 y Figura 10-C). Las proteínas que presentaron la mayor sobreexpresión fueron CALR, LDHB, COPS8, DSC3 y LAMC2. En contrapartida, TUBB4B, GPR126, QSOX1, RBM3 y MUC18 fueron las que presentaron una reducción más marcada.

Tabla 7. Proteínas desreguladas por la sobreexpresión de Δ Np73 en el secretoma de la línea celular de cáncer de colon HCT116 mediante marcaje SILAC y espectrometría de masas.

Proteína	Entrada UniProt	Secuencia detectada (%)	Péptidos únicos	Ratio medio Δ Np73/Mock	Presencia extracelular (DAVID)	Presencia Exocarta	
Calreticulina variante	CALR	Q53G71	20,44	6	3,19	Si	
Lactato deshidrogenasa B	LDHB	P07195	39,82	10	2,11	Exosomas	Si
Subunidad 8 del complejo signalosoma COP9	COPS8	Q99627	39,38	4	2,09	Exosomas	Si
Isoforma 3B de desmocolina 3	DSC3	Q14574	3,32	3	2,03		Si
Subunidad gamma 2 de la laminina	LAMC2	Q13753	7,74	7	2	Espacio extracelular	Si
Isoforma 2 de lactoilglutación liasa	GLO1	Q04760	34,32	6	1,76	Exosomas	Si
ADN endonucleasa	APEX1	G3V5Q1	23,97	5	1,74		Si
Moesina	MSN	P26038	28,25	10	1,72	Espacio extracelular y exosomas	Si
Sorcina	SRI	C9J0K6	14,84	2	1,72	Exosomas	Si
Proteína 1 de unión al daño del ADN	DDB1	Q16531	16,14	16	1,72	Espacio extracelular y exosomas	No

RESULTADOS

Glucógeno fosforilasa (forma hepática)	PYGL	P06737	22,51	14	1,64	Exosomas	Si
Fosforibosil-formilglicinamida sintetasa	PFAS	A8K8N7	3,29	3	1,58	Exosomas	Si
Proteína MARCKS tipo 1	MARCKSL1	P49006	14,36	2	1,57	Exosomas	Si
Aspartato aminotransferasa	AST	B3KUZ8	13,75	4	1,55		No
Desmogleina 2	DSG2	Q14126	16,82	13	1,53	Exosomas	Si
Subunidad B de la ATP sintasa mitocondrial	ATP5F1	Q5QNZ2	35,9	6	1,52	Exosomas	No
Proteína de unión a Galectina 3	LGALS3BP	Q08380	33,16	15	1,51	Espacio extracelular y exosomas	Si
Inhibidor 2 de la metalopeptidasa TIMP	TIMP2	24R8V7	26,26	5	1,51		Si
Canal 1 de aniones dependiente de voltaje	VDAC1	P21796	49,47	9	1,5	Exosomas	Si
Subunidad I del factor de iniciación traduccional eucariótico 3	EIF3I	Q13347	20	6	0,67	Exosomas	Si
Isoforma 2 de la cadherina 3	CDH3	P22223	12,63	6	0,66		Si
Subunidad β de CAPZ	CAPZB	B1AK87	38,08	4	0,66	Exosomas	Si
Proteína 6 de interacción de muerte celular programada	PDCD6IP	Q8WUM4	20,51	13	0,63	Exosomas	Si
Receptor tirosina fosfatasa F	PTPRF	P10586	9,22	13	0,63	Exosomas	Si
Galectina 1	LGALS1	P09382	42,22	5	0,62	Espacio extracelular y exosomas	Si
Proteína 2 de unión al ácido retinoico celular	CRABP2	P29373	61,59	7	0,61	Exosomas	Si
Proteína 1 de interacción con FLII de unión a LRR	LRRFIP1	Q32MZ4	5,05	3	0,61		Si

Cadena alfa-1 de colágeno tipo IV	COL6A1	87X0S5	16,28	12	0,59		Si
Receptor del poliovirus	PVR	B3KSS4	6,91	2	0,59		Si
Proteína 1 de repetición WD	WDR1	O75083	21,12	10	0,58	Exosomas	Si
Talina 1	TLN1	Q9Y490	9,88	16	0,58	Exosomas	Si
Proteína de replicación A1	RPA1	I3L4R8	21,41	5	0,56		Si
Tubulina 4B Clase IVb	TUBB4B	P68371	35,73	4	0,56	Exosomas	Si
Receptor 126 acoplado a proteína G	GPR126	Q86SQ4	3,6	3	0,55		No
Sulfhidrilo oxidasa 1	QSOX1	O00391	19,68	12	0,55	Espacio extracelular y exosomas	Si
Proteína 3 de unión a ARN	RBM3	P98179	27,39	3	0,49		Si
Glucoproteína de superficie celular MUC18	MCAM	B3KXZ9	16,95	6	0,45		No

Los ratios $\Delta Np73/Mock \geq 1,5$ o $\leq 0,67$ determinan las proteínas con una expresión diferencial. "Secuencia detectada (%)" indica el porcentaje de la secuencia de la proteína que representan los péptidos identificados durante el análisis. "Péptidos únicos" indica la cantidad de péptidos específicos y diferentes de la proteína que se ha cuantificado. La presencia de estas proteínas en el espacio extracelular o en exosomas se ha determinado mediante las bases de datos *DAVID* y *Exocarta*, respectivamente.

4.1.3 Evaluación y análisis bioinformático de las funciones biológicas y rutas celulares de las proteínas desreguladas por $\Delta Np73$

Teniendo en cuenta los resultados del microarray de anticuerpos para citoquinas y proteínas de secreción y la espectrometría de masas del marcaje SILAC, hemos encontrado la cantidad total de 51 proteínas desreguladas en el secretoma de la línea celular HCT116 a raíz de la sobreexpresión de $\Delta Np73$, de las cuales 27 proteínas aparecen reguladas positivamente y 24 proteínas negativamente (Tablas 6 y 7).

4.1.3.1 Confirmación bioinformática de la secreción de las proteínas

Al contrastar estos resultados con las bases de datos *Gene Ontology* y *DAVID*, hemos obtenido que 33 (64,7%) de las 51 proteínas desreguladas están presentes en vesículas extracelulares y en el espacio extracelular (Tablas 6 y 7), siendo 2 de las 5 fracciones celulares más enriquecidas

o representadas. A continuación, analizamos específicamente si estas proteínas podrían estar presentes en exosomas usando la base de datos *Exocarta*, que contiene los resultados de múltiples estudios proteómicos en exosomas. El resultado fue que 39 de nuestras proteínas se han detectado en exosomas previamente, las cuales están indicadas en las tablas 6 y 7. En total, 43 (84,3%) de las 51 proteínas se han detectado en exosomas o en el espacio extracelular, lo que valida la presencia de estas proteínas en el secretoma por la actividad y secreción de las propias células de nuestro estudio.

4.1.3.2 Funciones biológicas de las proteínas desreguladas

En consonancia con la literatura existente y apoyando el papel protumoral de Δ Np73, hemos encontrado proteínas desreguladas muy diversas asociadas con procesos celulares o capacidades clave para la progresión tumoral.

En nuestros análisis, el proceso celular más afectado por Δ Np73 ha sido la adhesión celular, ya que el 25% de las proteínas alteradas están implicadas en dicho proceso (moesina, calreticulina, sorcina, DSG2, DSC3, LAMC2, LGALS3BP, talina-1, CDH3, LGALS1, PTPRF, PDCD6IP y COL6A1). También hemos detectado la desregulación de las proteínas CXCR4, S1PR1, QSOX1, WDR1, MARCKSL1 y MCAM, que están involucradas en migración y progresión tumoral. Otro ejemplo, son proteínas involucradas en el metabolismo celular (LDHB, AST, GLO1, PFAS y PGYL) o proteínas de unión y reparación del ADN (APEX1 y DDB1). Además, muchas de estas proteínas, como APEX1, GLO1, CDH3, PTPRF, QSOX1, DSG2 o DSC3, habían sido descritas previamente por su implicación en el proceso de tumorigénesis, en la evolución de los pacientes y en la resistencia al tratamiento suministrado (97-101).

Con el fin de identificar las posibles funciones biológicas que podía haber alterado Δ Np73 y que contribuyen en el desarrollo y progresión del CCR, hemos estudiado las proteínas secretadas diferencialmente mediante la base de datos STRING. Analizando los datos con el algoritmo MCL (valor 2), se definieron 7 grupos biológicos o "clusters" que presentan al menos 3 proteínas cada uno.

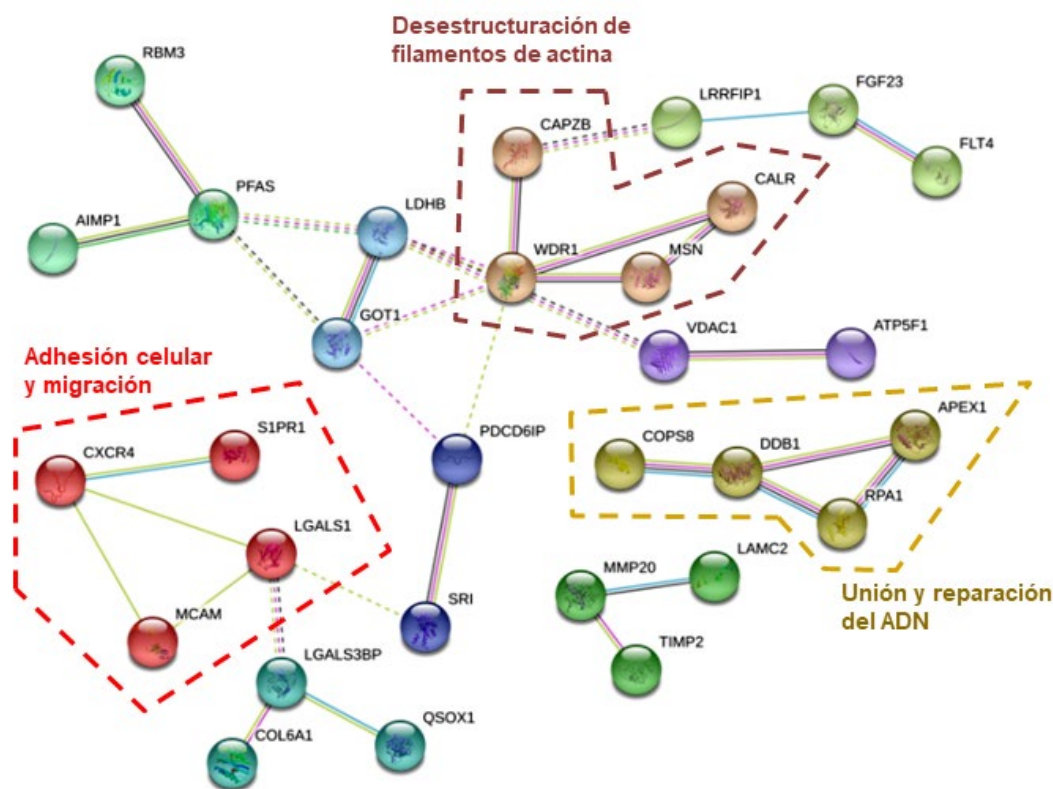


Figura 11. Mapa de interacciones existentes entre las proteínas desreguladas. Esquema generado por la base de datos STRING versión 10.5. Los clusters más amplios están delimitados por recuadros de línea discontinua. Se tienen en cuenta interacciones directas (líneas continuas) e indirectas (líneas discontinuas).

Los 3 cluster más relevantes, y más amplios con 4 proteínas interaccionando entre sí (Figura 11), fueron: I) Uno involucrado en adhesión y migración celular con las proteínas CXCR4, S1PR1, LGALS1 y MUC18 (MCAM); II) otro compuesto por MSN, CALR, CAPZB y WDR1 que induce la desestructuración de los filamentos de actina junto con las proteínas de la familia ADF/Cofilina; y III) uno implicado en la unión y reparación del ADN, formado por las proteínas APEX1, DDB1, RPA1 y COPS8.

En conjunto, estos análisis nos muestran que la sobreexpresión de $\Delta Np73$ provoca la desregulación de diversas proteínas, afectando a la adhesión, el crecimiento, la proliferación, la muerte y la supervivencia celular, incrementando la capacidad carcinogénica y metastásica de las células del CCR (102, 103). Estas proteínas asociadas a la adhesión celular, factores de crecimiento o receptores ya habían sido estudiadas por su asociación con el cáncer y la metástasis. Sin embargo, para muchas de ellas no se había descrito su regulación por $\Delta Np73$.

4.1.4 Validación de las proteínas desreguladas por Δ Np73

Una vez identificadas, validamos la desregulación de estas proteínas por Δ Np73 en las líneas HCT116- Δ Np73 y HCT116-Mock mediante PCR, western blot, dot-blot y kits de ELISA.

En primer lugar, analizamos los niveles de expresión de los genes asociados con carcinogénesis como QSOX1, APEX1, MARCKSL1, CRABP2, S1PR1, CXCR4, o DDB1, y de adhesión celular como DSC3, DSG2 o WDR1 mediante PCR semicuantitativa (Figura 12). Los niveles obtenidos de ARN mensajero de estos genes se compararon con los cambios vistos a nivel de proteína en el secretoma por los estudios proteómicos. Así, confirmamos que los cambios vistos a nivel de proteína en el estudio proteómico también se dan a nivel transcripcional.

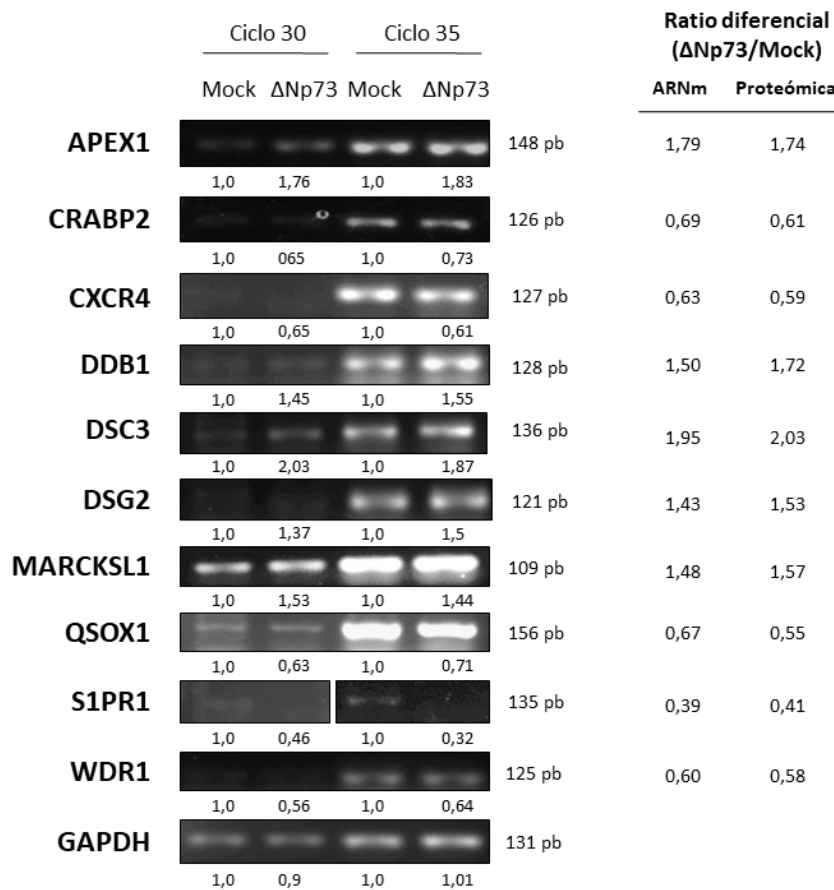


Figura 12. Comprobación de la desregulación a nivel de ARN de las proteínas alteradas por Δ Np73. Las imágenes son representativas del triplicado a los ciclos 30 y 35. Se usó GAPDH como control interno. El tamaño de los productos de amplificación se muestra al lado de cada banda y el ratio diferencial Δ Np73/Mock debajo de cada banda. Se compara la media de los ratios obtenidos al ciclo 30 y 35 respecto al ratio diferencial obtenido en el ensayo proteómico correspondiente.

Tras esta confirmación inicial, y teniendo en cuenta que algunos de los cambios más marcados se observaron en varias proteínas asociadas a los procesos de angiogénesis y linfangiogénesis, procedimos a comprobar la desregulación a nivel de proteína en el medio condicionado de BDNF y EMAP-II. El análisis por dot-blot muestra una disminución de EMAP-II y un aumento de BDNF en el medio condicionado de HCT- Δ Np73 (Figura 13-A), acorde a lo obtenido en los estudios proteómicos.

Además, validamos estas diferencias usando kits específicos de ELISA para BDNF, EMAP-II y VEGFR3 y VEGFC (Figura 13-B), incluyendo ésta última por ser el principal ligando de VEGFR3 e inductor de la linfangiogénesis y por estudios previos del laboratorio (104). El incremento de BDNF y VEGFR3 en el medio condicionado de HCT116- Δ Np73 fue estadísticamente significativo ($p < 0,05$). En el caso de VEGFC, su incremento no llegó a ser significativo ($p > 0,05$). Por otro lado, debido a que los niveles de EMAP-II en el medio condicionado de HCT116- Δ Np73 fueron tan bajos, no se pudo detectar con el kit de ELISA. Por tanto, probamos a analizar los niveles de EMAP-II procedentes del extracto celular por el mismo kit de ELISA. Los niveles fueron claramente inferiores respecto al extracto celular de HCT116-Mock aunque, por la naturaleza de los datos, no se obtuvo un valor estadístico significativo ($p = 0,06635$).

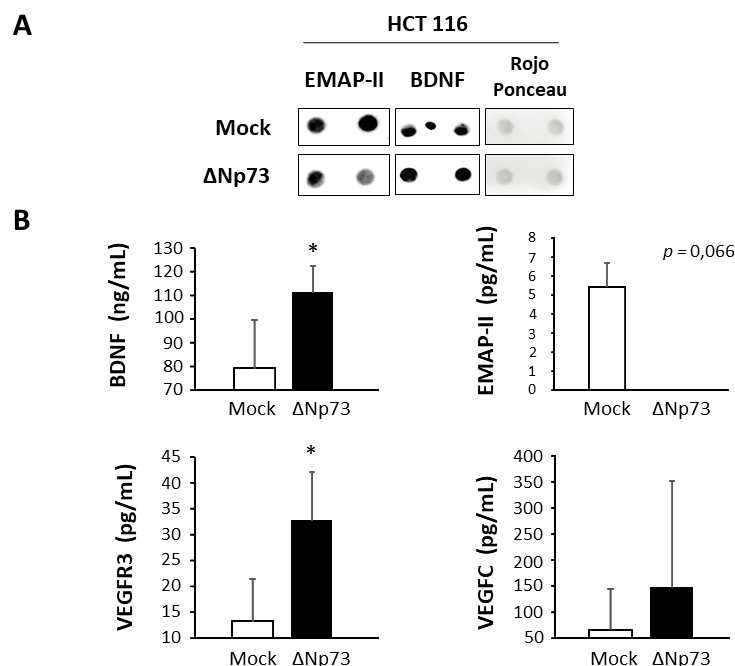


Figura 13. Validación de la desregulación de las proteínas asociadas a angiogénesis y linfangiogénesis. A) Dot-blot de BDNF y EMAP-II del medio condicionado de HCT116- Δ Np73 confirmando su desregulación acorde a los estudios proteómicos. La tinción de rojo ponceau se usó como control de carga. Se analizaron dos replicas biológicas independientes para cada condición experimental. B) Evaluación de los niveles de BDNF, VEGFR3 y VEGFC en el medio condicionado a 48 horas y de EMAP-II en extracto celular mediante kits de ELISA específicos. Los valores representados son la mediana \pm desviación estándar. Análisis estadístico con la prueba de U de Mann-Whitney. Significación estadística marcada por * ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Una vez confirmada que la sobreexpresión de Δ Np73 provoca la desregulación de BDNF y EMAP-II, comprobamos si la misma es dependiente de los niveles de expresión de Δ Np73. Para ello, durante el proceso de selección celular por citometría para obtener la línea celular HCT116- Δ Np73, se aislaron 3 poblaciones celulares: con niveles bajos (Δ Np73-L), niveles medios (Δ Np73-M) y niveles altos (Δ Np73-H) de expresión de Δ Np73. En el extracto celular de estas líneas analizamos los niveles de proteína mediante western-blot con anticuerpos específicos, obteniendo un incremento significativo de BDNF con niveles medios y altos de Δ Np73 y una reducción de EMAP-II mayor según aumentan los niveles de Δ Np73 (Figura 14-B).

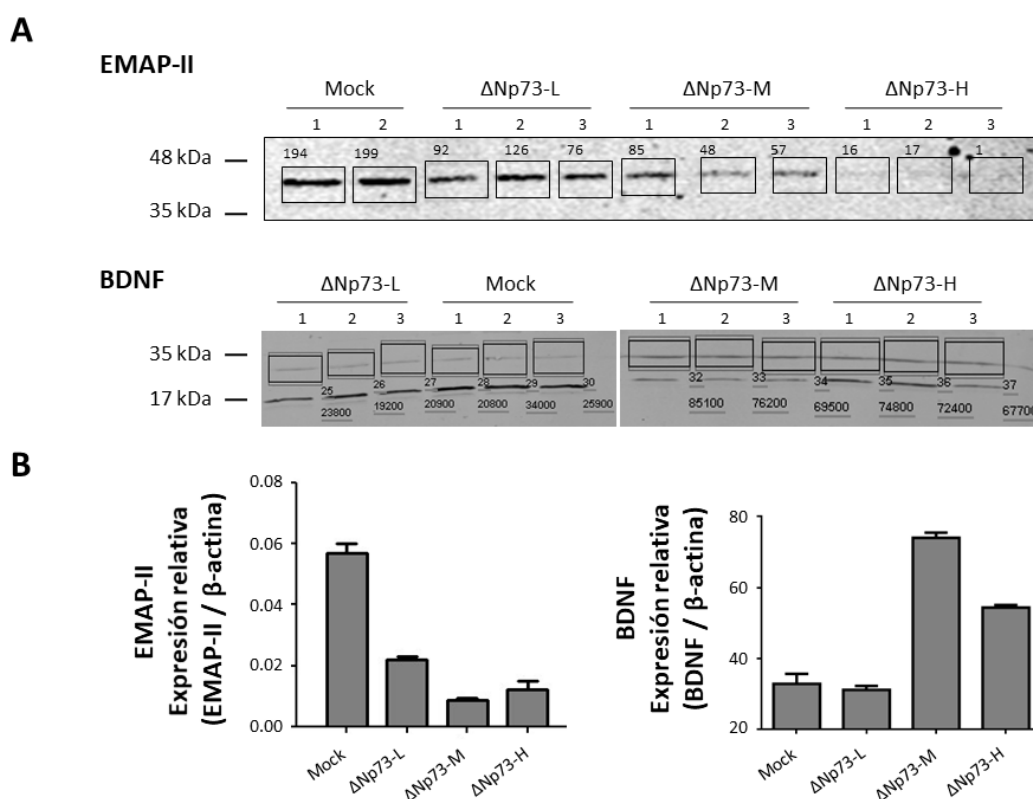


Figura 14. Análisis de la relación entre el contenido proteico de BDNF y EMAP-II y los niveles de expresión de Δ Np73. A) Western blot de las proteínas EMAP-II (arriba) y BDNF (abajo) en las líneas HCT116-Mock, HCT116- Δ Np73-L, HCT116- Δ Np73-M y HCT116- Δ Np73-H. Los números 1, 2 o 3 muestran el número de réplica técnica. Los recuadros muestran la cuantificación con el equipo Odyssey (Li-COR, Rockland). B) Representación gráfica de la cuantificación y normalización con β -actina como control de carga de los niveles de estas proteínas en dichas líneas celulares.

Ya que está demostrado que Δ Np73 puede inhibir la actividad de p53, podría ser posible que el efecto observado en la expresión de BDNF y EMAP-II por la sobreexpresión de Δ Np73 fuera mediado a través de la inhibición de p53. Para confirmar que la desregulación es independiente del estatus de p53, hemos generado la línea celular HCT116 TP53 (-/-) con sobreexpresión estable de Δ Np73 β , igual que hicimos con la línea HCT116.

Primero comprobamos los niveles de expresión de Δ Np73 para validar que la transfección estable y el proceso de selección celular tuvieron éxito. El análisis por qPCR mostró que la línea HCT116 TP53 (-/-)- Δ Np73 expresa esta isoforma oncogénica 121 veces más que su control, la línea HCT116 TP53 (-/-)-Mock (Figura 15-A). También, confirmamos que la línea HCT116 TP53 (-/-) adquirida comercialmente no expresaba p53 por qPCR (resultados no mostrados). Tras estas comprobaciones, estudiamos las diferencias a nivel de proteína de BDNF y EMAP en el medio condicionado mediante dot-blot. Se observó la misma tendencia de reducción de EMAP-II y de incremento de BDNF por Δ Np73 que se obtuvo para la línea HCT116- Δ Np73 (Figura 13-A), confirmando que la desregulación de estas proteínas es independiente del estatus de p53.

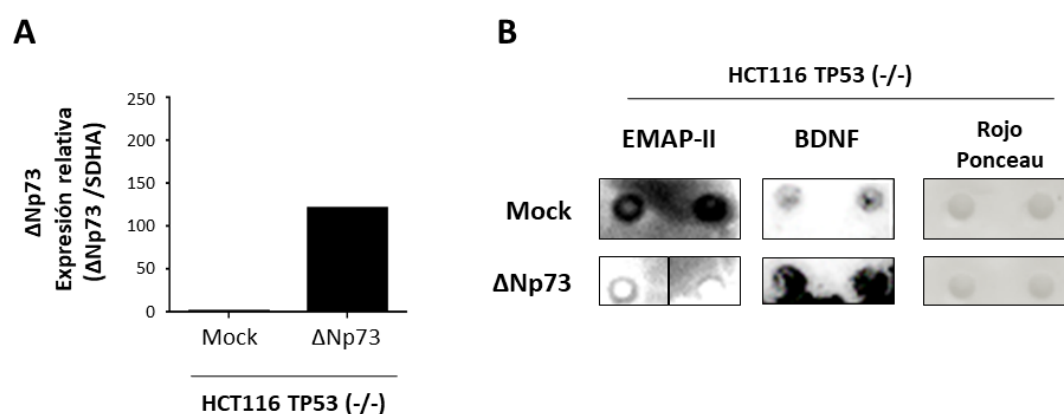


Figura 15. Confirmación de la desregulación de BDNF y EMAP-II a través de Δ Np73. A) Validación de los niveles de expresión de Δ Np73 en la línea HCT116 TP53 (-/-)- Δ Np73 por qPCR. El gen SDHA se usó como gen de referencia para la normalización de los datos. B) Dot-blot de BDNF y EMAP-II del medio condicionado a 48 horas de HCT116 TP53 (-/-)- Δ Np73 confirmando su desregulación independientemente del estatus de p53. La tinción de rojo ponceau se usó como control de carga. Se analizaron dos replicas biológicas independientes para cada condición experimental.

Además, validamos a nivel transcripcional la desregulación de algunas de las proteínas asociadas a carcinogénesis y adhesión celular que estudiamos previamente (CXCR4, DDB1, DSC3, WDR1 y QSOX1) en la línea nula para p53. Los análisis por PCR semicuantitativa (Figura 16-A) mostraron cambios similares a los obtenidos anteriormente en HCT116- Δ Np73, por lo que se confirma que la desregulación observada de estas proteínas no estaría mediada principalmente por p53. Posteriormente, analizamos por qPCR los niveles de expresión de p21 y p16, dos dianas directas de p53, en ambas líneas celulares: HCT116 y HCT116 TP53 (-/-) (Figura 16-B). La sobreexpresión de Δ Np73 alteró en el mismo sentido los niveles de ARN mensajero de estos genes.

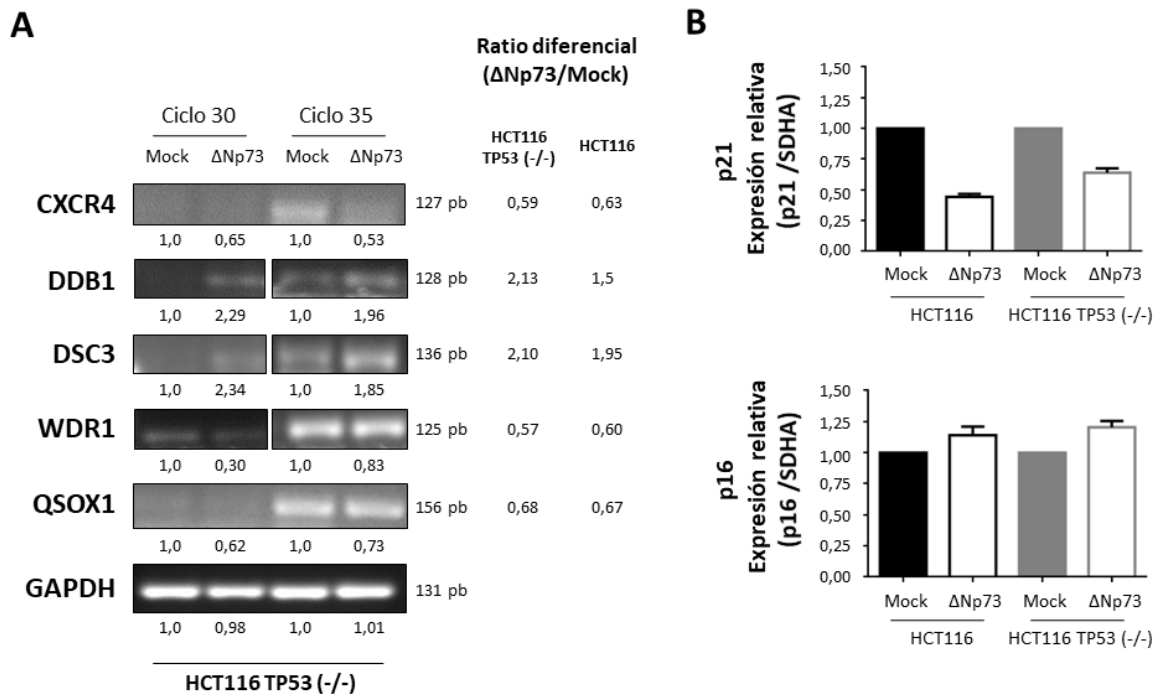


Figura 16. Validación del papel de p53 en la desregulación del secretoma por la sobreexpresión de ΔNp73. A) Confirmación de la desregulación a nivel transcripcional de los genes seleccionados en HCT116 TP53 (-/-)-ΔNp73 por PCR semicuantitativa. Las imágenes son representativas del triplicado a los ciclos 30 y 35. Los niveles de GAPDH se usaron como control interno. El tamaño de los productos se muestra al lado de cada banda y ratio diferencial ΔNp73/Mock debajo de cada banda. B) Análisis de los niveles de ARN mensajero de p21 y p16 en las líneas celulares HCT116 y HCT116 TP53 (-/-) por qPCR. El gen SDHA se usó como gen de referencia para la normalización de los datos. Los datos de cada línea celular se referencia a su correspondiente línea control (HCT116-Mock o HCT116 TP53 (-/-)-Mock).

Esta isoforma oncogénica puede alterar la regulación de diversos genes a través de la inhibición de las funciones de p53. Sin embargo, no es el único mecanismo por el que puede llevar a cabo sus actividades oncogénicas, ya que se ha descrito que esta isoforma puede transactivar su propio conjunto de genes independiente. Nuestros datos apuntan que la desregulación de algunas de las proteínas que hemos identificado es independiente del estatus de p53, lo que apoya a las mismas como posibles dianas efectoras de ΔNp73. No obstante, no se puede descartar que la desregulación de algunas de las proteínas identificadas en nuestro trabajo pueda estar mediada en cierto grado por la inhibición de p53.

4.1.5 Implicación de $\Delta Np73$ y sus efectores en los procesos de vasculogénesis y linfangiogénesis

Para evaluar si el papel pro-angiogénico descrito de $\Delta Np73$ (88-89) se lleva a cabo, al menos en parte, a través de las posibles proteínas efectoras identificadas (BDNF y EMAP-II), hemos realizado ensayos funcionales *in vitro* con células primarias endoteliales (HUVEC) y linfáticas (HLEC).

Como primera aproximación, estudiamos si el medio condicionado de la línea celular HCT116- $\Delta Np73$ mejora la capacidad proliferativa y de invasión de las células HUVEC y HLEC, ya que estas capacidades son clave en el desarrollo de nueva vasculatura. Los resultados del ensayo de proliferación celular por MTT mostraron un incremento significativo del 52,06% para HUVEC y del 132,9% para HLEC (Figura 17-A). A su vez, el ensayo de invasión Transwell o de cámara de Boyden mostró un aumento del 127,25% para HUVEC y del 65,2% para HLEC en su capacidad de invasión (Figura 17-B). Estos datos apoyan que la sobreexpresión de $\Delta Np73$ induce un incremento en la actividad de las células endoteliales y linfáticas que promovería la formación de nueva vasculatura.

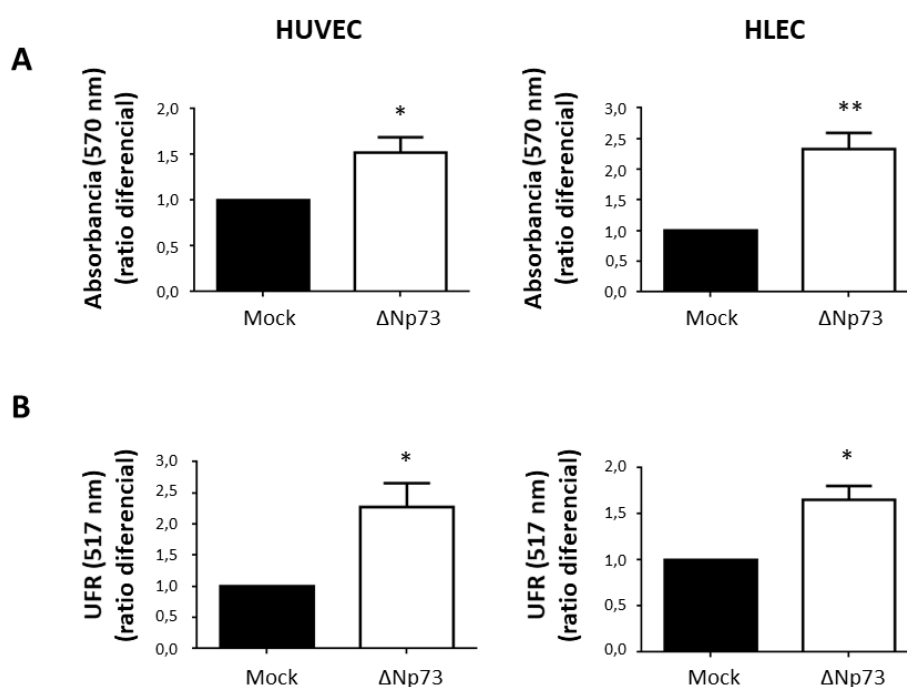


Figura 17. Efecto del secretoma alterado por $\Delta Np73$ de la línea HCT116 en el cultivo de células HUVEC y HLEC. A) Ensayo de proliferación por ensayo de MTT a las 48 horas. Se representa la media \pm desviación típica de las 5 réplicas técnicas. B) Ensayo de invasión Transwell a las 48 horas usando Matrigel como barrera para las células primarias HUVEC y HLEC. Se representa la media \pm desviación típica de las 5 réplicas técnicas. UFR, unidades de fluorescencia relativa. Análisis estadístico con la prueba de U de Mann-Whitney. Significación estadística: *, $p < 0,05$.

RESULTADOS

Seguidamente se evaluó el efecto del secretoma de la línea HCT116- Δ Np73 sobre la capacidad de formación de tubos y estructuras similares a una red vascular en las células HUVEC y HLEC. Se analizó el número de segmentos, segmentos maestros, uniones maestras y anillos vasculares, y la longitud total de los segmentos, de los segmentos maestros y de la totalidad de la red vascular que se formaron en el ensayo de tubulogénesis. Para ambos tipos celulares, la adición del medio condicionado incrementó significativamente estos parámetros (Figura 18), confirmando que la sobreexpresión de Δ Np73 en las células tumorales puede ejercer un efecto paracrino favoreciendo la formación de vasos sanguíneos y linfáticos.

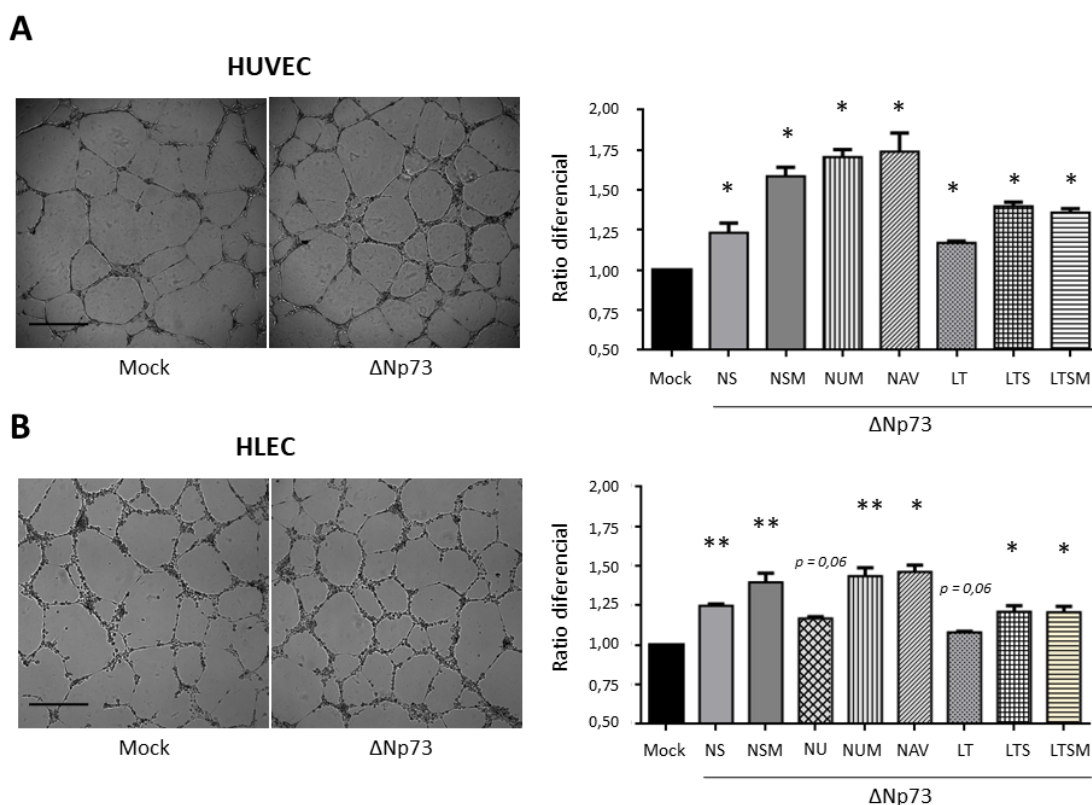


Figura 18. Efecto del secretoma alterado por Δ Np73 de la línea HCT116 en el ensayo de tubulogénesis de HUVEC (A) y HLEC (B). Se muestra una imagen representativa de cada condición experimental (escala de la barra = 500 μ m). Los parámetros analizados por quintuplicado mediante *Angiogenesis analyzer* fueron: NS (número de segmentos), NSM (número de segmentos maestros), NUM (número de uniones maestras), NAV (número de anillos vasculares), LT (longitud total), LTS (longitud total de segmentos) y LTSM (longitud total de segmentos maestros). Las imágenes fueron tomadas entre las 13 (A) y las 16 horas (B) del ensayo. Análisis estadístico con la prueba de U de Mann-Whitney. Significación estadística: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

A continuación, realizamos el silenciamiento transitorio de BDNF o EMAP-II mediante siRNA en la línea celular HCT116- Δ Np73 y se recogió el medio condicionado de las mismas cuando el silenciamiento fue máximo. El silenciamiento de BDNF redujo los niveles de ARN mensajero en un $\approx 75\%$ a las 24 horas (Figura 19-A).

El medio condicionado obtenido de este silenciamiento fue añadido en el ensayo de tubulogénesis de las células HUVEC y HLEC. En comparación con el medio condicionado obtenido de la transfección control (siControl), el medio condicionado por el silenciamiento de BDNF (siBDNF) disminuyó significativamente el número de segmentos y segmentos maestros, de uniones y uniones maestras, de anillos vasculares, y la longitud total de los segmentos, de los segmentos maestros y de la totalidad de la red vascular tanto en las células HUVEC como HLEC (Figura 19-B).

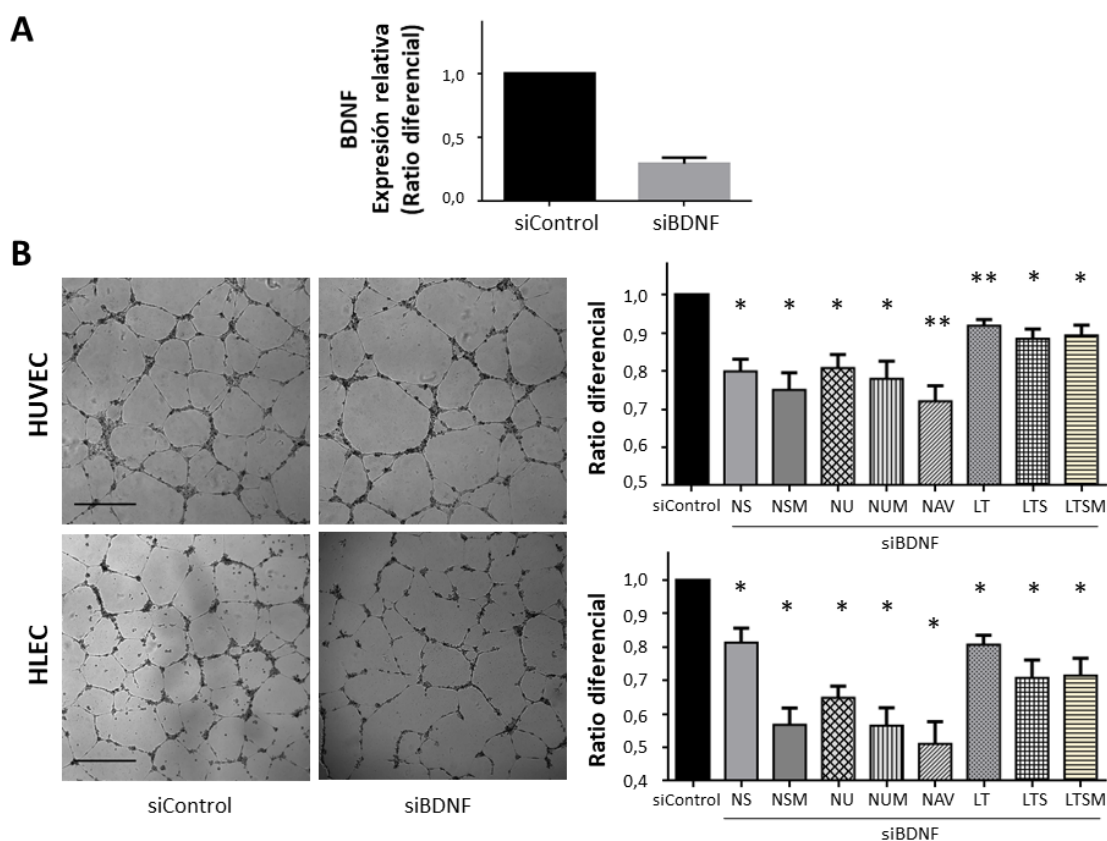


Figura 19. Efecto del silenciamiento transitorio de BDNF en el ensayo de tubulogénesis de HUVEC y HLEC. A) Representación gráfica de la reducción en los niveles de ARN mensajero de BDNF tras el silenciamiento transitorio en HCT116-ΔNp73. La eficiencia del siRNA frente a BDNF (siBDNF) fue del 75%. B) Análisis de la formación de estructuras similares a una red vascular en HUVEC y HLEC. Se muestra una imagen representativa de cada condición experimental (escala de la barra = 500 μm). Los parámetros analizados por quintuplicado mediante la herramienta *Angiogenesis analyzer* fueron: NS (número de segmentos), NSM (número de segmentos maestros), NU (número de uniones), NUM (número de uniones maestras), NAV (número de anillos vasculares), LT (longitud total), LTS (longitud total de segmentos) y LTSM (longitud total de segmentos maestros). Las imágenes fueron tomadas entre las 17 (A) y las 22 horas (B) del ensayo. Análisis estadístico con la prueba de U de Mann-Whitney. Significación estadística: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

RESULTADOS

En el otro caso, como EMAP-II es un producto del procesamiento de su precursor proteico AIMP-1, el silenciamiento transitorio se realizó frente a AIMP-1. Este silenciamiento redujo los niveles de ARN mensajero de AIMP-1-EMAP-II en un $\approx 85\%$ a las 48 horas (Figura 20-A). El uso de este medio condicionado (siAIMP-1) en los ensayos de tubulogénesis incrementó significativamente el número de segmentos, segmentos maestros, uniones, uniones maestras, anillos vasculares, la longitud total de segmentos, de segmentos maestros y/o de la totalidad de la red vascular en las células HUVEC y HLEC, en comparación con el medio condicionado control (siControl) (Figura 20-B).

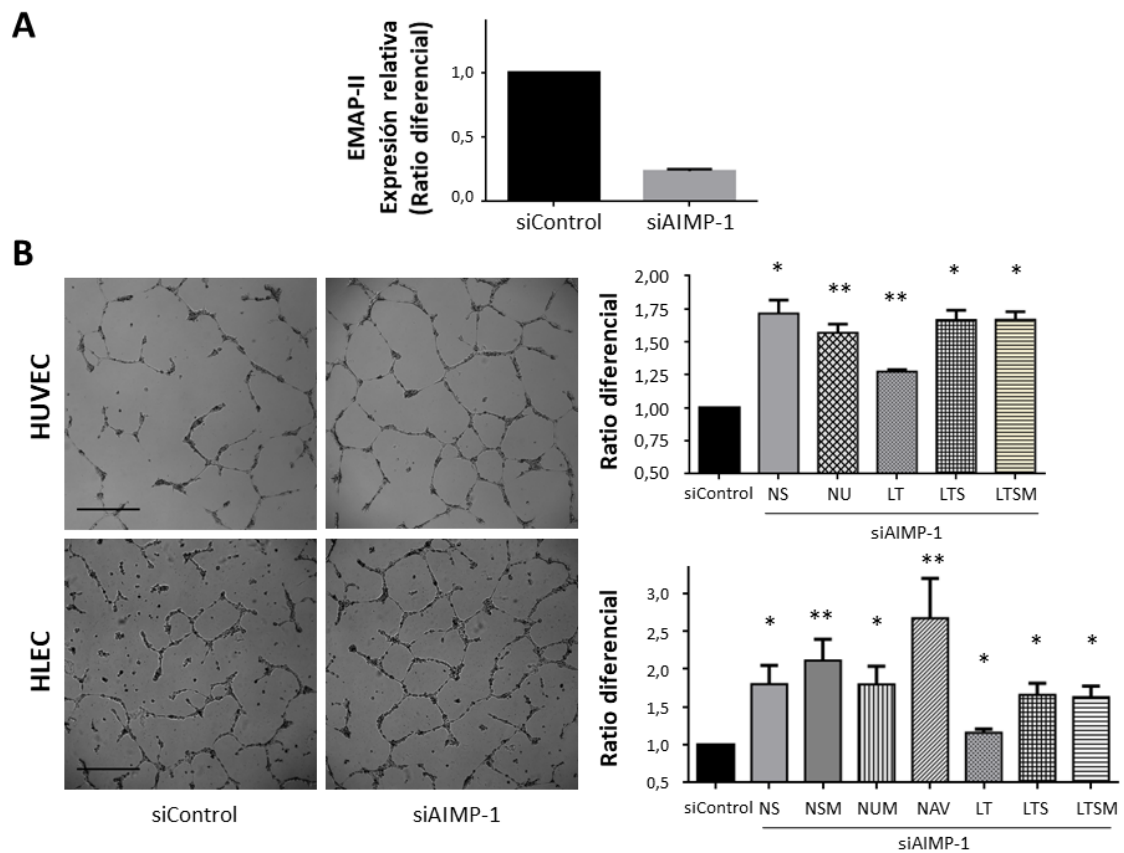


Figura 20. Efecto del silenciamiento transitorio de EMAP-II en el ensayo de tubulogénesis de HUVEC y HLEC. A) Representación gráfica de la reducción en los niveles de ARN mensajero de EMAP-II tras el silenciamiento transitorio en HCT116- Δ Np73. La eficiencia del siRNA frente a AIMP-1 (siAIMP-1) fue del 85%. B) Análisis de la formación de estructuras similares a una red vascular en HUVEC y HLEC. Se muestra una imagen representativa de cada condición experimental (escala de la barra = 500 μ m). Los parámetros analizados por quintuplicado mediante *Angiogenesis analyzer* fueron: NS (número de segmentos), NSM (número de segmentos maestros), NU (número de uniones), NUM (número de uniones maestras), NAV (número de anillos vasculares), LT (longitud total), LTS (longitud total de segmentos) y LTSM (longitud de segmentos maestros). Las imágenes fueron tomadas entre las 16 (A) y las 17 horas (B) del ensayo. Análisis estadístico con la prueba de U de Mann-Whitney. Significación estadística: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

Estos ensayos funcionales apoyan el papel de $\Delta Np73$ en la neovascularización tumoral, en parte a través del incremento de BDNF y la reducción de EMAP-II en el microambiente tumoral.

4.1.6 Análisis de VEGFC, VEGFR3, BDNF Y EMAP-II como biomarcadores en sangre para el cáncer colorrectal

Como la desregulación de $\Delta Np73$ tiene lugar en las primeras etapas de la progresión tumoral en el CCR (102), las proteínas implicadas en vasculogénesis endotelial y linfática que hemos validado como desreguladas por esta isoforma oncogénica podrían tener potencial como biomarcadores de diagnóstico. Por ello, hemos analizado los niveles de BDNF, EMAP-II, VEGFC y VEGFR3 por kit de ELISA en el plasma sanguíneo de individuos sanos (grupo control $n=20$), individuos con lesiones premalignas (grupo premaligno $n=20$) y pacientes con CCR ($n=20$). Excepcionalmente, en el análisis de EMAP-II solo se pudo contar con 8 muestras en el grupo control.

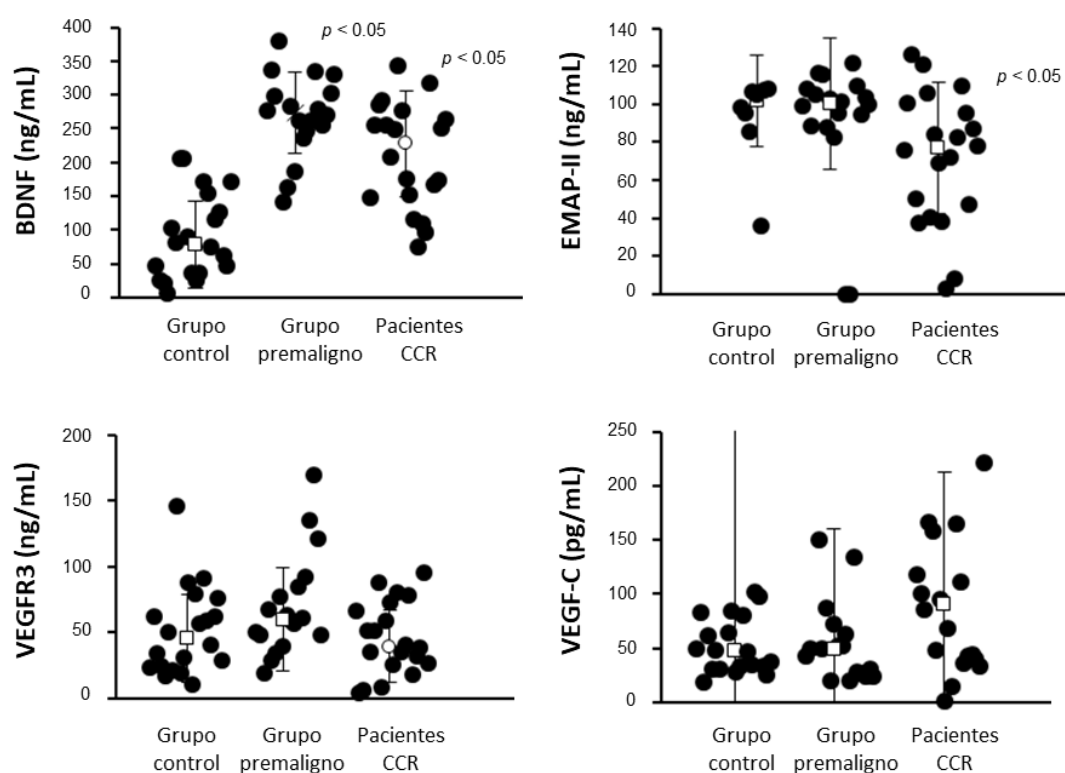


Figura 21. Evaluación de los niveles de BDNF, EMAP-II, VEGFR3 y VEGFC en plasma sanguíneo. Análisis realizado en los tres grupos de estudio mediante kits de ELISAs específicos. Se representa la media \pm desviación típica. Se analizaron 20 muestras ($n=20$) en cada grupo de estudio. Para el análisis de EMAP-II solo se pudo contar con 8 muestras del grupo control ($n=8$). Análisis estadístico con la prueba t de Student. Significación estadística representada por $p < 0,05$.

RESULTADOS

Los niveles medidos (media \pm desviación estándar) de BDNF en el plasma sanguíneo del grupo control fueron $78,05 \pm 63,94$ ng/mL frente a los $273 \pm 60,99$ ng/mL del grupo premaligno y los $227,93 \pm 78,75$ ng/mL en pacientes con CCR. En el caso de EMAP-II, estos niveles fueron 101665 ± 24177 pg/mL en el grupo control, 100590 ± 34548 pg/mL en el grupo premaligno y 76985 ± 34839 pg/mL en pacientes con CCR. Estos resultados confirmaron que existe una desregulación significativa de estos efectores asociada al CCR, estando BDNF elevado en individuos con lesiones premalignas ($p < 0,05$) y pacientes con cáncer ($p < 0,05$) y EMAP-II disminuido en pacientes con CCR ($p < 0,05$). Por el contrario, los niveles de VEGFC y VEGFR3 no mostraron diferencias significativas entre los grupos de estudio (Figura 21).

De manera adicional, se analizó la correlación entre estos niveles de proteína en plasma y los niveles de ARN mensajero de $\Delta Np73$ en biopsias de tejido (pólipos/adenomas y tumores primarios) del grupo premaligno ($n = 17$) y pacientes con CCR ($n = 6$). De este análisis se obtuvo una potencial correlación positiva para BDNF, alcanzando unos coeficientes de $r = 0,464$ en pacientes con CCR y de $r = 0,552$ para individuos con lesiones premalignas. En el caso de EMAP-II, se obtuvo una fuerte correlación negativa, alcanzando un coeficiente de $r = -0,813$ en los pacientes con CCR. Asimismo, obtuvimos la destacable correlación negativa con un coeficiente de $r = -0,835$ entre los niveles de BDNF y EMAP-II en pacientes con CCR. Esto es consecuente y apoya nuestros resultados sobre la desregulación ejercida por $\Delta Np73$ en los ensayos *in vitro*.

Por consiguiente, ante la existencia de estas diferencias en los niveles proteicos de BDNF y EMAP-II en el plasma sanguíneo de los pacientes con CCR, se estudió el posible potencial de estas proteínas como biomarcadores de diagnóstico.

Para ello se crearon las curvas ROC para estos dos candidatos y se calcularon el área bajo la curva (AUC), la sensibilidad y la especificidad para discriminar entre los tres grupos de estudio. Las curvas ROC para BDNF, discriminando individuos sanos de individuos con lesiones premalignas, de pacientes con CCR y de ambos juntos, mostraron valores de AUC del 96,9%, con sensibilidad del 83,3% y especificidad del 100%, del 87,5%, con sensibilidad del 90% y especificidad 65%, y del 92%, con sensibilidad del 68,4% y especificidad del 100%, respectivamente (Figura 22-A).

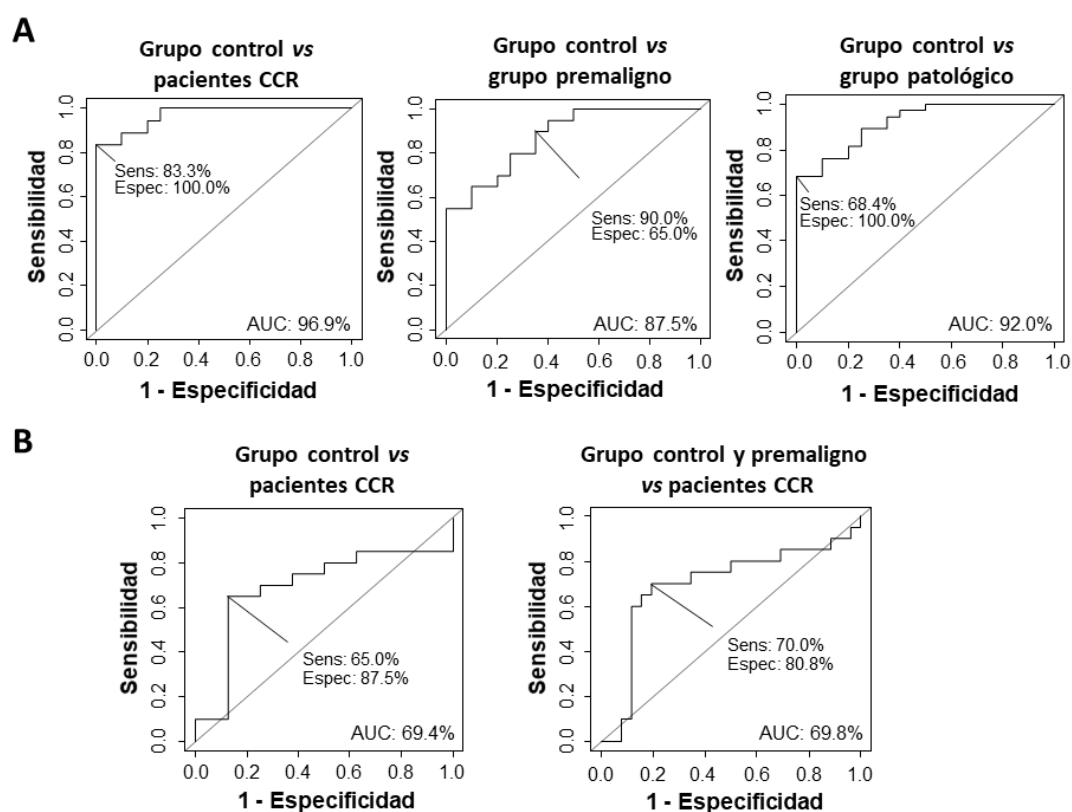


Figura 22. Estudio del potencial como biomarcador en plasma sanguíneo de BDNF y EMAP-II. A) Determinación del valor de BDNF para discriminar el grupo control del resto de grupos de estudio patológicos, individualmente o combinados, mediante curvas ROC y el cálculo del área bajo la curva (AUC), la sensibilidad y la especificidad. B) Determinación del valor de EMAP-II para discriminar el grupo control de los pacientes con CCR, individualmente o combinado con el grupo premaligno, mediante curvas ROC y el cálculo del área bajo la curva (AUC), la sensibilidad (sens) y la especificidad (espec).

El valor de AUC de EMAP-II para discriminar individuos sanos frente a pacientes con CCR fue del 69,4%, con una sensibilidad del 65% y una especificidad del 87,5%, y del 69,8%, con una sensibilidad del 70% y una especificidad del 80,8%, para discriminar individuos sanos y con lesiones premalignas de pacientes con CCR (Figura 22-B). Estos resultados muestran como los niveles de proteína de EMAP-II en plasma sanguíneo son capaces de discriminar a los pacientes con CCR. No obstante, la evaluación de los niveles de BDNF ha mostrado un papel como biomarcador muy significativo. No solo fue capaz de discriminar a los pacientes con CCR con un resultado cercano al máximo (96,9%) sino que presentó una capacidad similar para predecir la etapa temprana de la enfermedad.

En resumen, con los diversos ensayos proteómicos, funcionales y analíticos de este primer bloque del trabajo, hemos podido identificar las proteínas con secreción alterada por la desregulación de $\Delta Np73$ en la línea celular HCT116, como modelo de célula tumoral de CCR.

RESULTADOS

De estas proteínas, algunas se habían descrito previamente como implicadas en procesos de tumorigénesis y progresión tumoral, apoyando el papel de $\Delta Np73$ en el desarrollo de este tipo tumoral. Por otro lado, identificamos proteínas desreguladas que no habían sido descritas anteriormente como alteradas por $\Delta Np73$. Hemos validado esta desregulación a nivel de ARNm y proteína por distintas técnicas de biología molecular y confirmado el papel *in vitro* de $\Delta Np73$ en formación de nuevos vasos sanguíneos y linfáticos a través de las posibles proteínas efectoras BDNF y EMAP-II. También hemos estudiado el papel como biomarcadores para el diagnóstico temprano del CCR de EMAP-II y BDNF, postulando este último como un candidato clave a seguir estudiando en este aspecto para su posible inclusión en programas de cribado poblacional.

4.2 PAPEL DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO DE LAS ISOFORMAS DE LA FAMILIA p53 EN VESÍCULAS EXTRACELULARES EN PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL

Dada la presencia y diferencias en los niveles de ARN mensajero de $\Delta Np73$ en vesículas extracelulares en pacientes con CCR (95), en este segundo bloque nos propusimos evaluar si el contenido de ARN mensajero de algunas isoformas de la familia p53 en vesículas extracelulares podría tener potencial como biomarcador para el CCR, tanto de diagnóstico precoz como de pronóstico.

4.2.1 Evaluación del contenido de $\Delta Np73$, TAp73 Y $\Delta 133p53$ en vesículas extracelulares

Este estudio se llevó a cabo en 120 muestras de sangre divididas en el grupo de sujetos control ($n = 29$), el grupo premaligno ($n = 49$) y los pacientes con CCR ($n = 42$), cuyas características clínicas se detallan en la tabla 5. De estas muestras se aisló el plasma sanguíneo y se obtuvieron las VEs de las mismas. Posteriormente, se extrajo el ARN total de las VEs aisladas de los individuos incluidos en el estudio y se analizaron los niveles de ARN mensajero de las isoformas $\Delta Np73$, TAp73 y $\Delta 133p53$ por qPCR. En paralelo, se midió la concentración de VEs de cada individuo y su distribución de tamaño por análisis de seguimiento de nanopartículas (NAT) en colaboración con el grupo del Dr. Héctor Peinado (CNIO). Esta evaluación mostró que no existen diferencias en la cantidad de VEs aisladas ni en su tamaño, siendo similares en los tres grupos de estudio. En la figura 23 se muestran los perfiles de análisis del instrumento NanoSight NS500 de una muestra representativa de la cohorte de estudio. El número de VEs para cada muestra se utilizó para normalizar los resultados obtenidos del análisis de los niveles de ARN mensajero de $\Delta Np73$, TAp73 y $\Delta 133p53$ por qPCR.

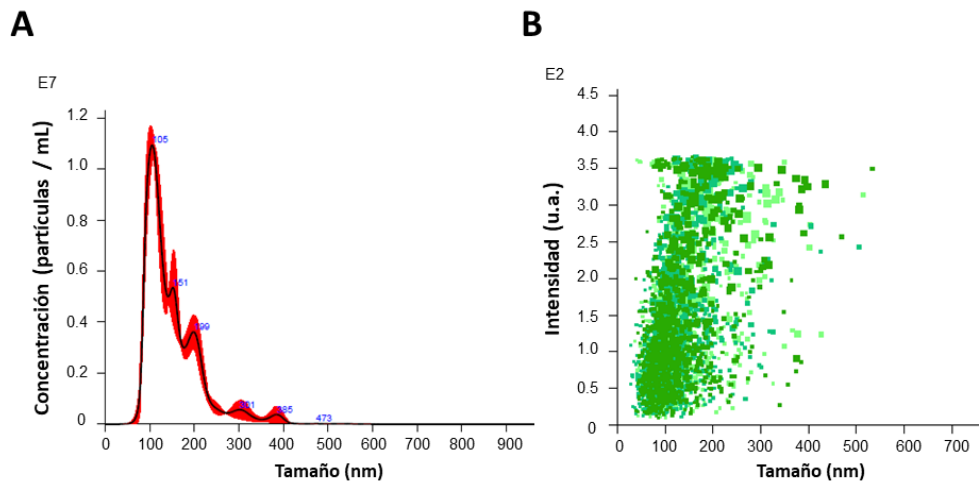


Figura 23. Análisis de seguimiento de nanopartículas (NAT) de las vesículas extracelulares aisladas del plasma sanguíneo. Instrumento NanoSight NS500 utilizado para el NAT. A) Perfil representativo de la concentración de partículas y la distribución de tamaño de las VEs de la cohorte de estudio. El perfil gráfico rojo representa el error estándar de la media de las 3 medidas realizadas por muestra. B) Perfiles representativos de la intensidad (u.a.) y la distribución de tamaño de las VEs de la cohorte de estudio. Los puntos de cada medida tienen su color indicativo (verde, verde pálido y verde turquesa).

Es llamativo el hecho de que no se detectó el ARN mensajero de la isoforma TAp73 en las VEs de ninguno de los grupos de estudio. Por el contrario, las isoformas $\Delta Np73$ y $\Delta 133p53$ se detectaron en las VEs de los tres grupos de estudio. En el caso de $\Delta Np73$, los niveles de ARN mensajero mostraron un incremento significativo en el grupo premaligno ($p < 0,001$) y en los pacientes con CCR ($p < 0,05$), respecto al grupo control (Figura 24). Por otro lado, los niveles de ARN mensajero de $\Delta 133p53$ aparecen elevados significativamente en los pacientes con CCR ($p < 0,05$), respecto a los otros grupos de estudio (Figura 24).

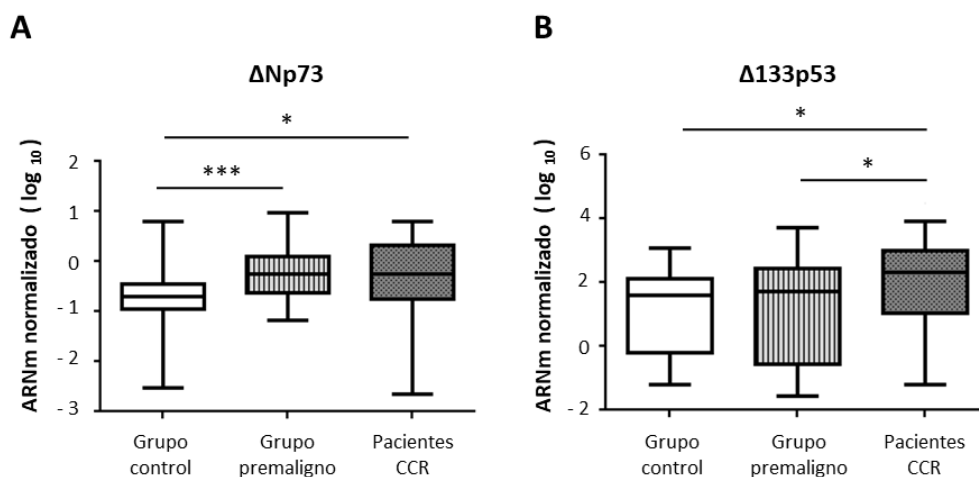


Figura 24. Comparación de los niveles de $\Delta Np73$ (A) y $\Delta 133p53$ (B) en las vesículas extracelulares de los grupos de estudio. Representación por diagrama de cajas y bigotes de los datos de qPCR normalizados con la cantidad de VEs de la que se extrajo el ARN y convertidos a logaritmo en base 10. Análisis estadístico con la prueba de U de Mann-Whitney. Significación estadística: *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$.

De esta manera, se confirma un incremento significativo en el empaquetamiento del ARN mensajero de estas dos isoformas en VEs de los pacientes con CCR. No obstante, lo más destacable es el incremento significativo de $\Delta Np73$ en las VEs de individuos con lesiones premalignas, apoyando su papel en el desarrollo del CCR desde etapas tempranas y su posible uso como marcador precoz de la enfermedad.

4.2.2 Potencial de $\Delta Np73$ Y $\Delta 133p53$ como biomarcadores clínicos frente a CEA

Dado el contenido diferencial de estas isoformas en las VEs de pacientes con CCR, $\Delta Np73$ y $\Delta 133p53$ podrían ser candidatos a biomarcadores de diagnóstico precoz y pronóstico en este tipo tumoral a través del análisis de una muestra no invasiva para el paciente. Igual que se procedió anteriormente, para poder explorar esta posible capacidad, se crearon las curvas ROC para $\Delta Np73$ y $\Delta 133p53$ y así calcular el área bajo la curva (AUC), la sensibilidad y especificidad para discriminar entre los diferentes grupos de estudio. Además, obtuvimos los niveles de CEA en sangre disponibles (grupo control $n = 20$; grupo premaligno $n = 27$, y pacientes con CCR $n = 31$) de individuos de los tres grupos de estudio para poder hacer la comparación respecto al biomarcador soluble al uso en clínica.

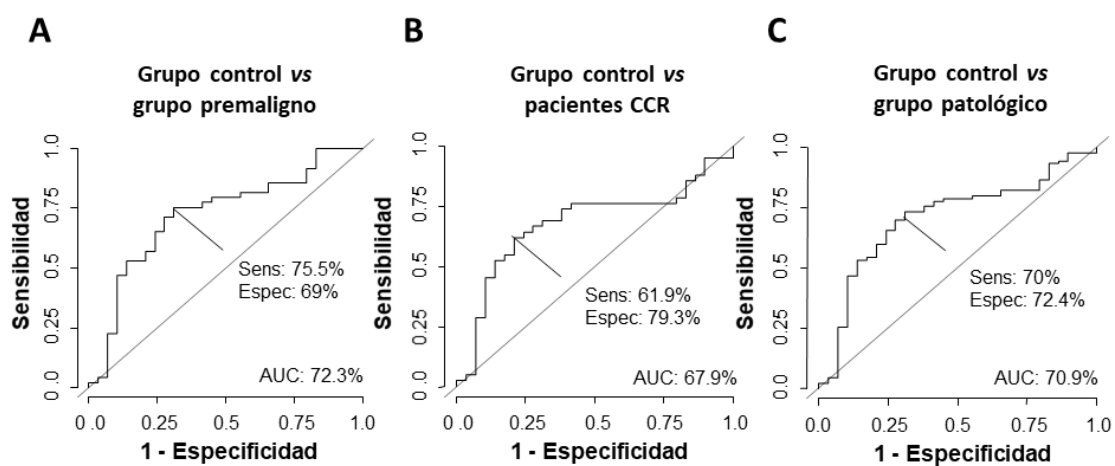


Figura 25. Evaluación del potencial como biomarcador diagnóstico en biopsia líquida del contenido de $\Delta Np73$ en vesículas extracelulares. Determinación del valor diagnóstico de los niveles de ARNm de $\Delta Np73$ para discriminar el grupo control del grupo premaligno (A), de los pacientes con CCR (B) y del conjunto de ambos (grupo patológico) (C) mediante curvas ROC y el cálculo del área bajo la curva (AUC), la sensibilidad (sens) y la especificidad (espec).

Las curvas ROC de $\Delta Np73$ (Figura 25) presentaron un AUC del 72,3%, con una sensibilidad del 75,5% y una especificidad del 69%, para discriminar entre el grupo control y el grupo premaligno; un AUC del 67,9%, con una sensibilidad del 61,9% y una especificidad del 79,3%,

RESULTADOS

para discriminar entre el grupo control y los pacientes con CCR; y un AUC del 70,9%, con una sensibilidad del 70% y una especificidad del 72,4%, para discriminar entre el grupo control y el grupo premaligno + pacientes con CCR.

En el caso de $\Delta 133p53$ (Figura 26), se obtuvieron valores de AUC del 65%, con sensibilidad del 47,5% y especificidad del 85,2%, para discriminar entre el grupo control y los pacientes con CCR; del 64,1%, con sensibilidad del 47,5% y especificidad del 81,2%, para discriminar entre el grupo premaligno y los pacientes con CCR; y del 64,4%, con sensibilidad del 47,5% y especificidad del 82,7%, para discriminar entre grupo control + grupo premaligno y los pacientes con CCR.

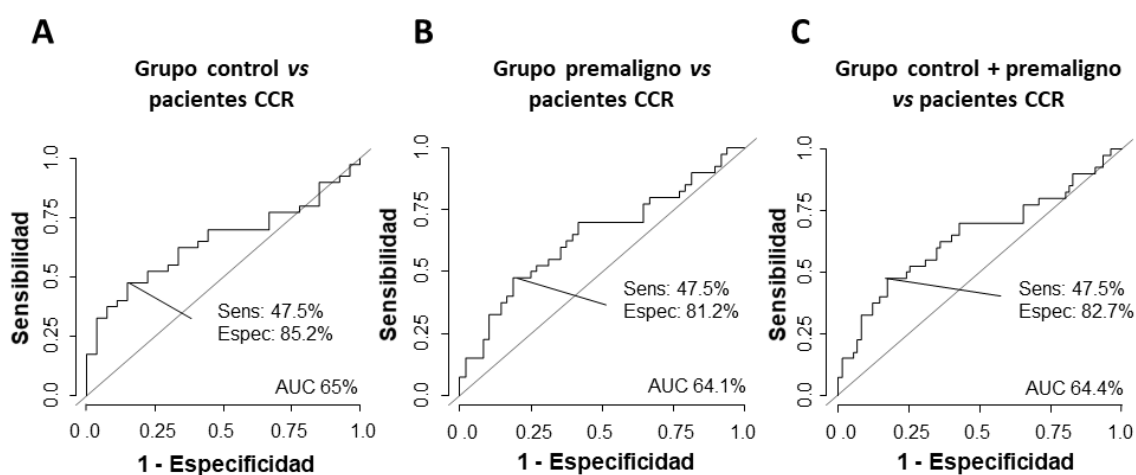


Figura 26. Evaluación del potencial como biomarcador diagnóstico en biopsia líquida del contenido de $\Delta 133p53$ en vesículas extracelulares. Determinación del valor diagnóstico de los niveles de ARNm de $\Delta 133p53$ para discriminar los pacientes con CCR del grupo control (A), del grupo premaligno (B) y del conjunto de ambos (grupo control + premaligno) (C) mediante curvas ROC y el cálculo del área bajo la curva (AUC), la sensibilidad (sens) y la especificidad (espec).

Finalmente, como CEA es utilizado actualmente en clínica como biomarcador de este tipo tumoral, se realizaron las curvas ROC para CEA y así comparar la actuación de $\Delta Np73$ y $\Delta 133p53$ para discriminar entre los tres grupos de estudio frente a éste. El valor de AUC de CEA para discriminar entre el grupo control y el grupo premaligno fue 52,9%, significativamente menor que lo observado para $\Delta Np73$ (105). En cambio, CEA obtuvo unos valores de AUC del 85,7%, con sensibilidad del 100% y especificidad del 85%, para discriminar entre el grupo control y los pacientes con CCR; y del 83,8%, con sensibilidad del 100% y especificidad del 77,8%, para discriminar entre el grupo premaligno y los pacientes con CCR (Figura 27).

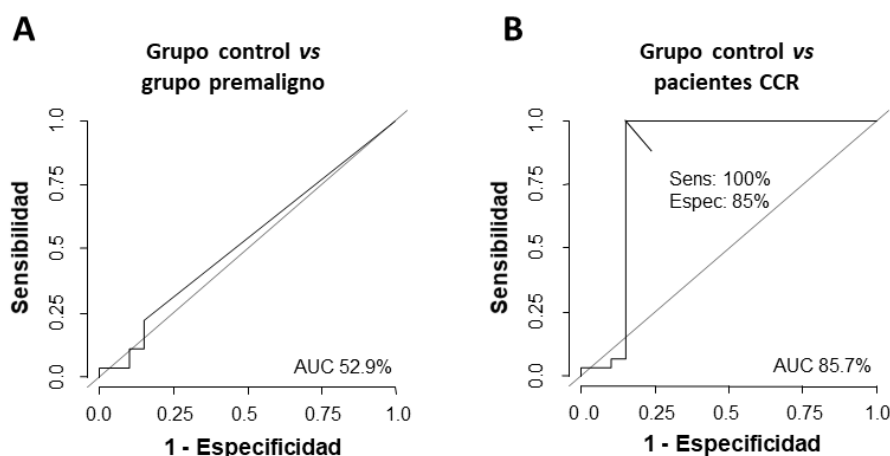


Figura 27. Evaluación del potencial como biomarcador diagnóstico en sangre de los niveles de CEA. Determinación del valor diagnóstico de los niveles de CEA para discriminar el grupo control del grupo premaligno (A) y de los pacientes con CCR (B) mediante curvas ROC y el cálculo del área bajo la curva (AUC), la sensibilidad (sens) y la especificidad (espec).

Podemos concluir que los niveles de CEA presentan mayor capacidad para discriminar pacientes con CCR respecto al grupo control que el contenido de $\Delta Np73$ y $\Delta 133p53$ en VEs. Cabe resaltar que estos resultados apoyan el potencial de $\Delta Np73$ en VEs para discriminar sujetos con lesiones premalignas.

4.2.3 Correlación de $\Delta Np73$ Y $\Delta 133p53$ en vesículas extracelulares con el estadio tumoral, la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global

Adicionalmente, se estudió la asociación de los niveles de estas isoformas en VEs con los diferentes parámetros clínicos disponibles de los pacientes con CCR. Tras su evaluación no se determinó ninguna correlación o diferencia significativa en el contenido de $\Delta Np73$ y $\Delta 133p53$ en función de la localización del tumor, presencia de infiltración vascular e infiltración perineural.

Por otro lado, en nuestra serie de muestras no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de $\Delta 133p53$ en VEs en función del estadio tumoral. Sin embargo, en el caso de $\Delta Np73$ sí existen diferencias según este parámetro (Figura 28). El contenido de esta isoforma aumenta significativamente en el estadio II ($p < 0,05$) respecto al estadio I, disminuye de nuevo en el estadio III comparado con el estadio II ($p < 0,05$) y por último, se vuelve a incrementar en el estadio IV, aunque sin alcanzar significación estadística.

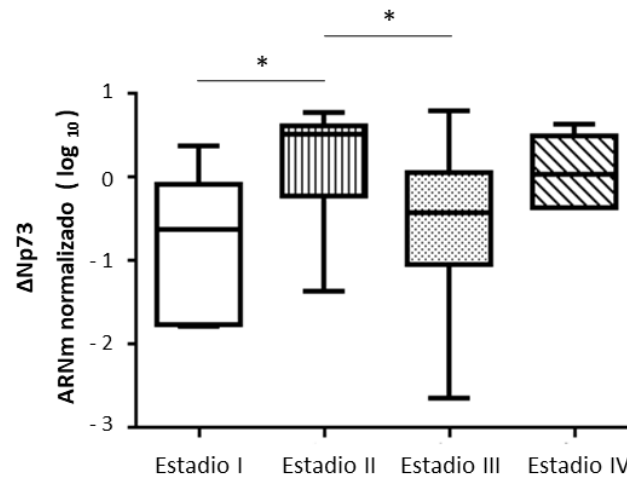


Figura 28. Comparación de los niveles de $\Delta Np73$ en vesículas extracelulares de los pacientes con cáncer colorrectal clasificados según el estadio tumoral. Representación por diagrama de cajas y bigotes de los datos de qPCR normalizados con la cantidad de VEs de la que se extrajo el ARN y después convertidos a logaritmo en base 10. Análisis estadístico con la prueba de U de Mann-Whitney. Significación estadística: *, $p < 0,05$.

Dado el contenido elevado de $\Delta Np73$ y $\Delta 133p53$ en las VEs de los pacientes con CCR, proseguimos con la evaluación de su relación con la supervivencia libre de enfermedad (SLE) y la supervivencia global (SG).

En nuestra serie de pacientes con CCR, el seguimiento de los mismos fue de un rango de 1,1 a 62,4 meses, siendo 36,2 meses la mediana del seguimiento. A lo largo de este tiempo, en los pacientes con cáncer localizado, no metastásico ($n=38$), se produjeron 15 recidivas o muertes (34.9%). Teniendo en cuenta toda la cohorte ($n=42$), se produjo el exitus de 16 pacientes. A los 3 años de seguimiento, el 63% de los pacientes con tumor localizado permanecían vivos y sin recaída de la enfermedad, y el 69% de los pacientes de toda la cohorte seguía con vida.

Clasificando los pacientes en dos grupos según tuvieran niveles bajos o altos de $\Delta Np73$ en sus VEs, los análisis de supervivencia (Figura 29-A, B) no mostraron ninguna correlación entre éstos y una SLE o SG. Sin embargo, los mismos análisis para $\Delta 133p53$ revelaron que los niveles de esta isoforma se correlacionan inversamente con la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia total de manera significativa (Figura 29-C, D).

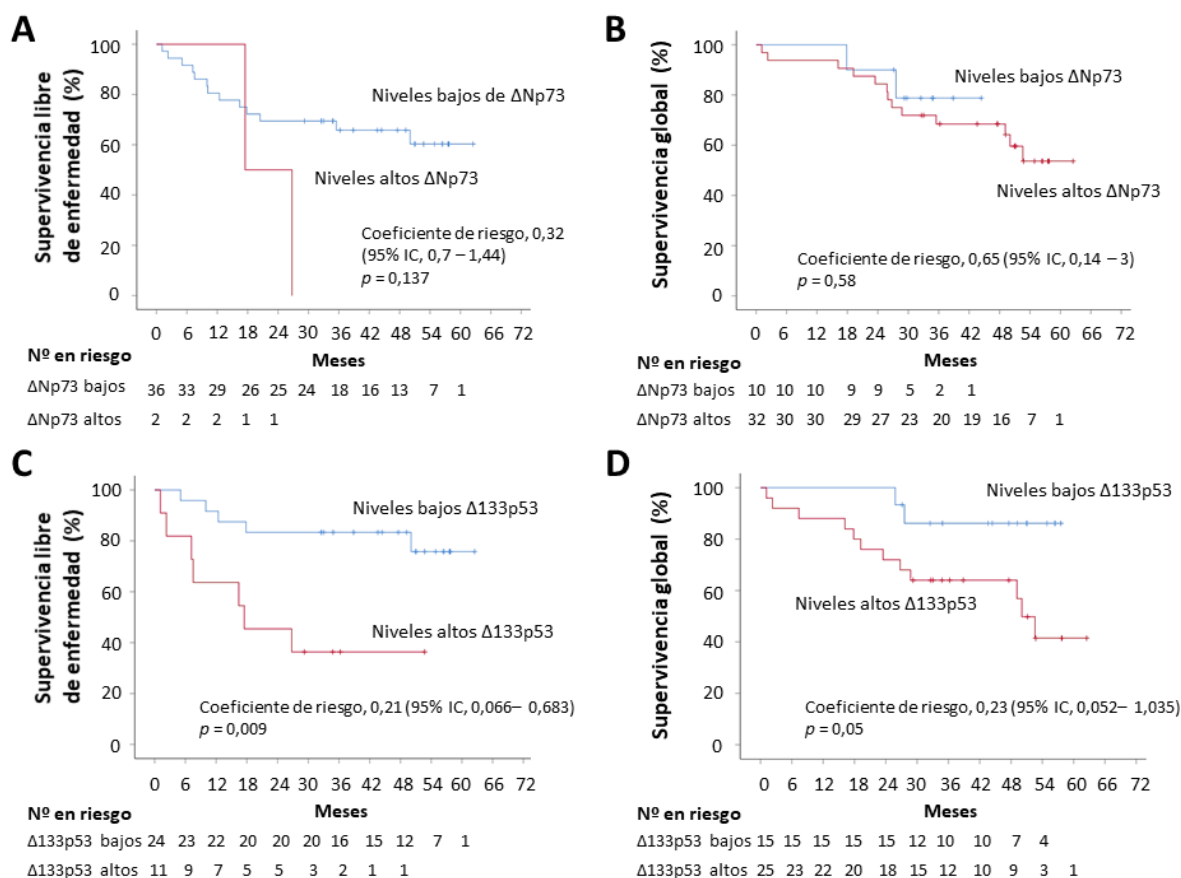


Figura 29. Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier de los pacientes con CCR según los niveles de $\Delta Np73$ y $\Delta 133p53$ en vesículas extracelulares. Impacto del contenido en VEs de $\Delta Np73$ en la SLE (A) y la SG (B) y de $\Delta 133p53$ en la SLE (C) y la SG (D). Las marcas en forma de "tick" de las curvas de supervivencia representan los datos censurados (última fecha de seguimiento sin que se produzca uno de los eventos). La clasificación de los niveles bajos y altos de $\Delta Np73$ y $\Delta 133p53$ se realizó según los umbrales seleccionados por el índice de Youden. Significación estadística ($p < 0,05$) obtenida mediante la prueba de Mantel-Cox. Coeficiente de riesgo e intervalos de confianza (IC) calculados con el modelo de riesgos proporcionales de Cox.

La mediana de la SLE no se alcanzó en los pacientes con niveles bajos de $\Delta 133p53$, pero en los pacientes con niveles altos se alcanzó la mediana a los 17,5 meses, con un cociente de riesgo de 0,21 (95% de IC, 0,06 a 0,68) para recidiva o muerte. Este análisis muestra que los pacientes con niveles altos de $\Delta 133p53$ en VEs presentan un mayor riesgo ($p < 0,01$) de sufrir recaída o exitus. Por el otro lado, en toda la cohorte, los pacientes con niveles bajos de $\Delta 133p53$ tampoco alcanzaron la mediana de supervivencia total, pero los pacientes con niveles altos alcanzaron la mediana a los 50 meses, con un cociente de riesgo de 0,23 (95% de IC, 0,05 a 1,03). Así, los pacientes que presentan niveles altos de $\Delta 133p53$ tienen mayor riesgo de muerte ($p = 0,05$). Estos resultados sugieren que la evaluación del contenido en VEs de $\Delta 133p53$ puede ser un biomarcador interesante del pronóstico para los pacientes de CCR.

4.2.4 Correlación entre la seroreactividad de los miembros de la familia de p53 y su contenido en vesículas extracelulares

En un estudio previo del grupo (96), se analizó la seroreactividad de las proteínas p53, p73, ΔNp73α y ΔNp73β mediante autoanticuerpos en 145 muestras de plasma sanguíneo, de las cuales parte de ellas coinciden con nuestra cohorte de estudio (individuos sanos $n=15$, individuos con lesiones premalignas $n=19$ y pacientes con CCR $n=9$). Por ello, evaluamos si existía una asociación con el pronóstico entre los niveles de Δ133p53 en VEs y la seroreactividad a p53 por un lado, y por el otro, entre los niveles de ΔNp73 en VEs con la seroreactividad de p73, ΔNp73α y ΔNp73β, en los distintos grupos de estudio. Entre las asociaciones evaluadas, se observó una tendencia estadística a una correlación negativa entre la seroreactividad de ΔNp73α y los niveles de ARNm de ΔNp73 en las VEs de pacientes con CCR ($r= -0,548$; $p= 0,09$). El resto de asociaciones no mostraron ninguna significación estadística (Tabla 8).

Tabla 8. Correlación entre la seroreactividad de p53, p73, ΔNp73α y ΔNp73β en plasma sanguíneo y los niveles de Δ133p53 y ΔNp73 en vesículas extracelulares.

	Grupo control	Grupo premaligno	Pacientes con CCR
Autoanticuerpos de p53 vs Δ133p53 en VEs	0,194	- 0,303	- 0,339
Autoanticuerpos de p73 vs ΔNp73 en VEs	- 0,110	0,127	0,018
Autoanticuerpos de ΔNp73α vs ΔNp73 en VEs	- 0,064	0,050	- 0,548
Autoanticuerpos de ΔNp73β vs ΔNp73 en VEs	- 0,064	0,018	- 0,305

Se muestran los valores del coeficiente de correlación de Spearman (r).

DISCUSIÓN

El cáncer colorrectal es el tipo tumoral con mayor incidencia en nuestro país, estimándose que en 2022 se diagnosticarán 43.370 nuevos casos, lo que supone el 15,5% de todos los casos nuevos de cáncer (2). Esta realidad se encrucece con la alta mortalidad del CCR. En 2020, se produjeron un total de 15.125 muertes, convirtiéndolo en el segundo tipo de cáncer con mayor mortalidad (106). Es cierto que la mortalidad de dicho año se ve afectada por la pandemia de la COVID-19 pero esta tendencia se lleva repitiendo los últimos años. Esta alta mortalidad va asociada a un diagnóstico tardío de la enfermedad, siendo la supervivencia a los 5 años de los pacientes diagnosticados en estadio IV del 14,2% (19-21). En cambio, dicha supervivencia sube hasta un 92% cuando el tumor se diagnostica en estadios localizados (19-21). Por ello, es crucial detectar estos tumores en las etapas más tempranas.

Los eventos genéticos y epigenéticos que acumulan secuencialmente las células tumorales permiten adquirir capacidades clave para el desarrollo y la progresión del tumor (3). De esta manera, dichas células presentarán perfiles de expresión alterados que se pueden reflejar en la secreción diferencial de proteínas y otras biomoléculas al microambiente tumoral. En este contexto, la isoforma oncogénica $\Delta Np73$ ha mostrado estar implicada en diversos procesos protumorales, como proliferación celular (79-81), quimiorresistencia (86, 87), angiogénesis (88-89, 104), invasión y metástasis (85, 107) y la transición epitelio-mesénquima (108). Además, su sobreexpresión en tumores está asociada a un peor pronóstico para el paciente, como menor supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad, resistencia al tratamiento o recurrencia (57, 94).

No obstante, es relativamente escaso el conocimiento sobre las dianas efectoras de $\Delta Np73$ en estos procesos. Con el fin de determinar en qué capacidades clave para las células tumorales está implicada $\Delta Np73$ y a través de que efectores podría llevar a cabo sus actividades protumorales, hemos estudiado las proteínas secretadas desreguladas por la sobreexpresión de esta isoforma. Además, evaluamos la capacidad de algunas de estas dianas y diversas isoformas de la familia de p53 como biomarcadores de diagnóstico precoz o de pronóstico en el CCR.

5.1 IDENTIFICACIÓN Y VALIDACIÓN DE LAS DIANAS EFECTORAS DE Δ Np73 EN EL CÁNCER COLORRECTAL

La unión del marcaje metabólico SILAC y la espectrometría de masas con el uso de microarrays de anticuerpos nos han permitido identificar de manera amplia y exhaustiva las proteínas cuya secreción al microambiente tumoral es desregulada por la sobreexpresión de Δ Np73. Nuestros análisis han identificado un total de 51 proteínas con una secreción alterada significativamente (Tablas 6 y 7) en la línea HCT116- Δ Np73 respecto a la control. La gran mayoría de estas proteínas han sido detectadas en vesículas extracelulares o el espacio extracelular quedando registrado en las bases de datos *Exocarta* y *DAVID*, lo que avala nuestros análisis y valida que estas proteínas estaban presentes en el medio condicionado por la propia actividad y secreción de las células de estudio.

Las proteínas identificadas son diversas, abarcando receptores, factores de transcripción, citoquinas, proteínas del citoesqueleto o enzimas. La desregulación de éstas muestra la posible implicación de Δ Np73 en la adquisición de diferentes capacidades clave para las células tumorales, como supervivencia celular, reprogramación del metabolismo, motilidad e invasividad o neovascularización endotelial y linfática.

5.1.1 Moduladores de migración, invasión y metástasis

En nuestro estudio, el proceso celular más afectado por la sobreexpresión de Δ Np73 fue la adhesión celular, constituyendo alrededor del 25% de las proteínas desreguladas en el secretoma de HCT116 (moesina, calreticulina, sorcina, DSG2, DSC3, LAMC2, LGALS3BP, talina-1, CDH3, LGALS1, PTPRF, PDCD6IP y COL6A1).

Generalmente, en la progresión de tumores epiteliales, las células tumorales sufren cambios conformacionales y pérdida o disminución de la adhesión celular para generar un fenotipo más mesenquimal e incrementar la motilidad celular (3). Estos cambios son esenciales en la diseminación de las células y el avance a un tumor invasivo. En este sentido, la isoforma Δ Np73 se ha observado implicada en el aumento de la capacidad de migración e invasión de las células tumorales (85, 107), por lo que es coherente que dicho papel pueda estar mediado por la alteración de la adhesión celular.

De hecho, la desregulación de todas estas proteínas se ha asociado anteriormente a procesos de progresión tumoral, principalmente migración, invasión y metástasis, como moesina (109), calreticulina (110), sorcina (111), CDH3 (112), COL6A1 (113), LAMC2 (114) o LGALS3BP (115). Sumadas a éstas, hemos identificado desreguladas otras proteínas involucradas en migración y progresión tumoral: CXCR4 (116), S1PR1 (117), QSOX1 (101), WDR1 (118), MARCKSL1 (119, 120) y MUC18 (121, 122). El alto porcentaje de proteínas que hemos obtenido con secreción alterada y que están implicadas en este contexto indica que $\Delta Np73$ tendría un papel crítico en la progresión tumoral del CCR a través de estos procesos. Asimismo, el análisis de nuestros resultados en la base de datos STRING determinó dos clusters o grupos biológicos, cuyas proteínas interactúan entre sí en relación a la función celular en la que están implicadas (Figura 11). Estos dos cluster fueron: I) adhesión y migración celular (CXCR4, S1PR1, LGALS1 y MUC18), y II) desestructuración de filamentos de actina (CAPZB, WDR1, MSN y calreticulina). Esto apoyaría que $\Delta Np73$ desregula las vías de señalización relacionadas con dichas proteínas.

Dada la aparente relevancia de estos procesos, confirmamos que la alteración obtenida en los ensayos proteómicos de las proteínas QSOX1, MARCKSL1, S1PR1, CXCR4, DSC3, DSG2 y WDR1 también tenía lugar a nivel transcripcional en la misma dirección y magnitud que en el secretoma (Figura 12). Así, validamos el incremento de expresión de DSC3, DSG2 y MARCKSL1, y la reducción de QSOX1, S1PR1, CXCR4 y WDR1. Esta misma desregulación se había observado previamente en otros estudios con muestras de adenocarcinomas y modelos de CCR para DSG2, DSC3 y QSOX1 (98, 123, 124). No obstante, ninguna de las proteínas mencionadas en este apartado se había estudiado o asociado antes con $\Delta Np73$. Con ello, estos resultados abren vías de investigación muy interesantes al identificar y validar la desregulación transcripcional de estas proteínas, postulándose como posibles moduladores de $\Delta Np73$. En apoyo a esto, como las distintas isoformas de la familia p53 pueden modular la actividad de p53, comprobamos que la desregulación de CXCR4, DSC3, WDR1 y QSOX1 está asociada a la sobreexpresión de $\Delta Np73$ de manera independiente al estatus de p53 (Figura 16).

En conjunto, estos resultados sugieren que $\Delta Np73$ tendría un papel clave en la progresión tumoral mediante la desregulación de estas proteínas, que darían lugar al incremento de la capacidad invasiva y favoreciendo la diseminación de las células tumorales.

5.1.2 Mediadores de la supervivencia celular

Por otro lado, la base de datos STRING determinó otro cluster significativo implicado en unión y reparación del ADN (Figura 11). En condiciones normales, las células inducen la parada del

ciclo celular o activan el programa de muerte celular o apoptosis cuando su ADN es dañado o alterado estructuralmente. En cáncer, la desregulación de proteínas reparadoras del ADN puede ser un mecanismo de supervivencia por el que las células tumorales logran seguir replicándose a pesar del daño en su material genético (125). En relación a este papel protumoral, $\Delta Np73$ puede inhibir la actividad de p53 y TAp73 (79-81), evitando la muerte celular y favoreciendo la viabilidad y la proliferación de las células tumorales. Adicionalmente, también puede actuar como un factor de supervivencia al inducir directamente la expresión de proteínas anti-apoptóticas (126).

En nuestros resultados hemos obtenido una desregulación significativa de las proteínas reparadoras de ADN, APEX1 y DDB1 (Tabla 7). Confirmamos la sobreexpresión transcripcional de ambas (Figura 12) y que DDB1 está desregulado principalmente por $\Delta Np73$ no viéndose afectado por el estatus de p53 (Figura 16). Así, la sobreexpresión de estas proteínas reparadoras puede ser otro mecanismo por el que $\Delta Np73$ actúa como factor de supervivencia. A favor de esta idea, se ha comprobado anteriormente que APEX1 está sobreexpresado generalmente en tumores sólidos (100), donde $\Delta Np73$ podría ser uno de los responsables de dicha sobreexpresión en esos casos. Por otro lado, se ha mostrado que DDB1 está implicada en rutas de señalización asociadas a carcinogénesis (127, 128), colaborando con el desarrollo tumoral. En consonancia, la desregulación de ambas se ha asociado con peor pronóstico (129, 130).

De manera complementaria, la desregulación de estas proteínas de reparación del ADN también se ha asociado a procesos de quimiorresistencia, induciendo la supervivencia de las células tumorales a los tratamientos suministrados (130-133). En este sentido la quimiorresistencia inducida por $\Delta Np73$ en las células tumorales podría deberse a la desregulación de dichas proteínas, adicionalmente a lo descrito sobre la regulación positiva de los transportadores ABC (87). Por tanto, sería interesante estudiar la implicación de estas proteínas efectoras de $\Delta Np73$ como posibles dianas terapéuticas con el fin de desarrollar y aplicar terapias eficaces en estos casos de CCR. En este aspecto, nosotros y otros grupos hemos observado que $\Delta Np73$ reduce la muerte celular inducida por oxaliplatino (86) y cisplatino (134). De hecho, un trabajo previo del laboratorio (135) demostró que la quimiosensibilidad de las células tumorales de CCR a oxaliplatino aumenta sinérgicamente con el compuesto β -criptoxantina, ya que este reduce los niveles de expresión de $\Delta Np73$.

5.1.3 Posibles moduladores en el metabolismo tumoral

La alteración del metabolismo celular es otro cambio clave durante el desarrollo y progresión tumoral. Con el fin de generar la energía y sustratos necesarios para el ritmo acelerado de replicación, las células tumorales adaptan su programa de metabolismo desregulando múltiples enzimas implicadas en el mismo. Uno de los cambios más comunes en este sentido es el aumento de la glicólisis aerobia o "efecto Warburg", que permite adaptarse al ambiente hipóxico del tumor y genera diversos intermediarios glicolíticos involucrados en otras rutas metabólicas (3, 136). En este contexto, se ha demostrado que p73 puede estar muy implicado en el metabolismo celular. De hecho, se ha comprobado que TAp73 actúa en diversas rutas metabólicas mediante la regulación de distintos genes en células normales y tumorales, pudiendo modular tanto rutas catabólicas como anabólicas (57). Sin embargo, el papel de $\Delta Np73$ en el metabolismo no está tan estudiado.

En nuestros ensayos proteómicos hemos observado el incremento significativo de diversas proteínas implicadas en actividades metabólicas (LDHB, AST, GLO1, PFAS y PGYL), que no se habían asociado previamente con $\Delta Np73$. Es posible que esta isoforma participe en la adaptación a un metabolismo más favorable a las necesidades energéticas del tumor a través de la desregulación de estas proteínas. En un estudio previo, $\Delta Np73$ ya se implicó favorablemente al aumento de la glicólisis de las células tumorales (137), lo que apoya la idea anterior. No obstante, aunque queda pendiente validar la desregulación de estas proteínas, nuestros resultados presentan estos candidatos para su estudio y confirmación como posibles efectores de $\Delta Np73$ en la reprogramación del metabolismo tumoral.

5.1.4 Posibles efectores de $\Delta Np73$ en su papel asociado a la angiogénesis y linfangiogénesis

En las aproximaciones proteómicas identificamos la desregulación significativa de BDNF, EMAP-II y VEGFR3, que pueden modular los procesos de angiogénesis y/o linfangiogénesis, cruciales para el desarrollo y la progresión tumoral. La neurotrofina BDNF puede inducir la expresión de VEGFA y VEGFC al activar la ruta de señalización de su receptor $Trk\beta$ (11, 12), pudiendo promover angiogénesis, linfangiogénesis, progresión tumoral y metástasis a nódulos linfáticos (13). EMAP-II es una citoquina proinflamatoria, producida de la escisión proteolítica de AIMP-1, que puede suprimir el crecimiento tumoral induciendo la apoptosis y reduciendo la proliferación de las células endoteliales (16, 17). El efecto inhibitorio de EMAP-II tiene lugar al

unirse de manera competitiva a los receptores VEGFR1 y VEGFR2, bloqueando la unión de los factores VEGFs y evitando la activación de las rutas de señalización que promueven la formación de nuevos vasos (15). Por otro lado, VEGFR3 está implicado principalmente en linfangiogénesis, cuyo ligando con mayor afinidad es VEGFC. Esta unión activa diversas rutas de señalización que promueven la proliferación, migración y supervivencia de las células linfáticas (138).

En este trabajo hemos confirmado *in vitro* la implicación de Δ Np73 en la inducción de la angiogénesis y linfangiogénesis. Aunque se había descrito anteriormente la participación de Δ Np73 en distintos contextos promoviendo angiogénesis, este es el primer trabajo en el que se relaciona con linfangiogénesis. Con los ensayos funcionales realizados, hemos demostrado que el secretoma alterado por la sobreexpresión de Δ Np73 de células tumorales de CCR promueve la proliferación e invasión celular (Figura 17) y aumenta la formación de estructuras similares a una red vascular en células primarias endoteliales y linfáticas (Figura 18). Esto apoya el hecho de que Δ Np73 cumpliría un papel paracrino mediante la secreción de factores pro-angiogénicos al microambiente tumoral.

Estos resultados van acorde con trabajos previos de otros investigadores, donde comprobaron que el desequilibrio del ratio Δ Np73/TAp73 o la sobreexpresión de Δ Np73 pueden anular la represión ejercida por TAp73 sobre genes pro-angiogénicos (88). De hecho, esta isoforma podría inducir la expresión de esos genes, ya que se ha comprobado que Δ Np73 se une al promotor de VEGFA (89). Además, Δ Np73 puede formar complejos con otras proteínas para inducir la expresión de otros genes que promoverán la activación de las células endoteliales, mejorando la supervivencia y la proliferación celular tumoral (91). Mediante esta desregulación transcripcional, Δ Np73 alteraría el secretoma de las células tumorales a favor de un perfil pro-angiogénico. Este parece ser el caso de BDNF, EMAP-II y VEGFR3.

En consecuencia, confirmamos que BDNF y EMAP-II son mediadores del efecto pro-angiogénico y prolinfangiogénico de Δ Np73, ya que el silenciamiento parcial con siRNAs alteró dichos procesos *in vitro*. El silenciamiento de BDNF provocó una menor capacidad de las células endoteliales y linfáticas para formar las estructuras similares a una red vascular (Figura 19). Por otro lado, observamos que la reducción de la expresión de AIMP-1, y por tanto de EMAP-II, indujo mayor formación de estructuras vasculares en ambos tipos celulares (Figura 20). Estas evidencias son coherentes con nuestros resultados, que muestran una correlación entre los niveles de expresión de Δ Np73 y los niveles de proteína de BDNF y EMAP-II en las líneas celulares HCT116-Mock y HCT116- Δ Np73 (Figura 14), y con el papel previamente

descrito para ambas proteínas. Nuestros datos apoyan la participación de ambas proteínas tanto en la formación de nuevos vasos endoteliales como linfáticos. Asimismo, hemos observado que los efectos observados son independientes del estatus de p53, lo que apoya que serían posibles dianas efectoras de $\Delta Np73$. Sin embargo, para confirmar si son efectores directos es necesario estudiar si esta isoforma es capaz de unirse al promotor de estos genes para inducir su desregulación transcripcional.

Por otro lado, aunque en nuestros ensayos proteómicos no observamos la desregulación significativa de los factores VEGF, como se ha descrito para el CCR (139), decidimos evaluar la alteración por $\Delta Np73$ de VEGFC por ser el principal ligando de VEGFR3 en la inducción de la linfangiogénesis. En este análisis observamos un incremento de los niveles de proteína de este factor en el medio condicionado de HCT116- $\Delta Np73$ pero no llegó a ser significativo (Figura 13). Sin embargo, en un trabajo previo del grupo (104), se observó una correlación directa entre los niveles de expresión de $\Delta Np73$ y los niveles totales de VEGFs en biopsias de tumores de pacientes con CCR. Por ello, sería interesante evaluar en nuestra serie de pacientes con CCR la correlación entre los niveles de expresión de $\Delta Np73$ en el tejido tumoral y los niveles de VEGFR3 y VEGFC en el plasma sanguíneo.

Este resultado estadísticamente no significativo podría explicarse porque el cultivo celular se realiza en normoxia y la desregulación de los VEGFs mediada por esta isoforma sea solo muy marcada en condiciones de hipoxia, como en los tumores sólidos. En apoyo a esta hipótesis, se ha demostrado que en condiciones de hipoxia, $\Delta Np73$ puede ser estabilizado por HIF1- α (89), dando lugar a la expresión de genes pro-angiogénicos. De hecho, en pacientes con cáncer de mama que presentan niveles altos de $\Delta Np73$ se observó el enriquecimiento de rutas de señalización de angiogénesis e hipoxia (87). Sumado a esto, se ha comprobado que el silenciamiento de $\Delta Np73$ provoca la reducción de los niveles proteicos de HIF1- α , mientras que su sobreexpresión genera el incremento de HIF1- α . Al mismo tiempo, se demostró *in vivo* que la pérdida de $\Delta Np73$ reduce el crecimiento tumoral y los niveles proteicos de HIF1- α . Por tanto, parece que existe una retroalimentación positiva entre $\Delta Np73$ y HIF1- α , desencadenando actividades protumorales, como angiogénesis, proliferación, supervivencia y/o metástasis (90).

Poniendo en conjunto las evidencias recogidas aquí (Figura 30), las células tumorales que presentan sobreexpresión de $\Delta Np73$ secretarían mayores niveles de BDNF al microambiente tumoral a la vez que se reducen los niveles de EMAP-II liberados para promover la angiogénesis y linfangiogénesis. Previsiblemente, BDNF inducirá la expresión de los VEGFs en

las células adyacentes, pudiendo desencadenar la consecuente activación de las células endoteliales y linfáticas. Al mismo tiempo, al disminuir los niveles de EMAP-II en el ambiente se estaría permitiendo mayor unión de los VEGFs a sus receptores para activar las rutas de señalización de estos procesos.

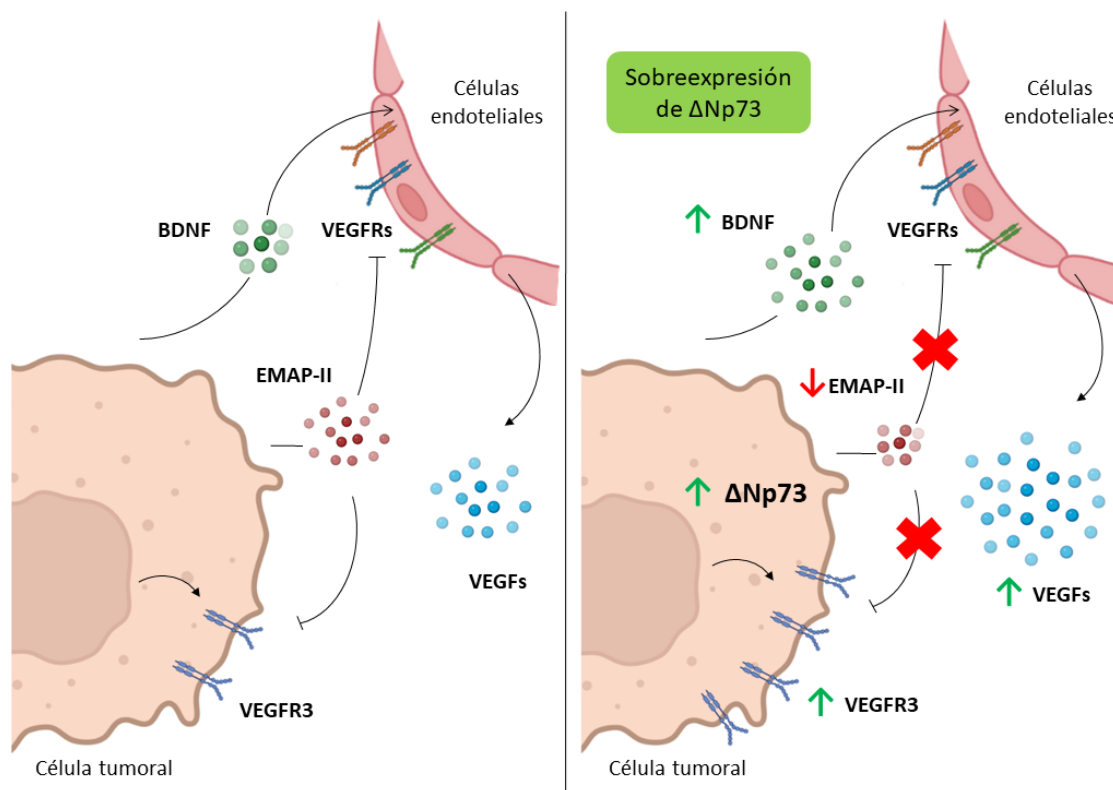


Figura 30. Modelo propuesto del papel protumoral de $\Delta Np73$ a través de BDNF y el eje VEGC-EMAP-II-VEGFR3. Los niveles elevados de BDNF en el microambiente tumoral inducirían la secreción de VEGFs por parte de las células adyacentes (aquí representadas como células endoteliales). La disminución de EMAP-II permitiría la unión de los VEGFs con sus receptores para promover la angiogénesis y linfangiogénesis. A su vez, los mayores niveles de VEGFR3 en las células tumorales y VEGFC en el ambiente favorecerían procesos asociados a la progresión tumoral de manera autocrina.

En esta hipótesis, el papel de VEGFR3 está menos claro. Las células tumorales podrían secretar mayores niveles de VEGFR3 al microambiente para que sea internalizado por las células endoteliales y linfáticas. De esta manera, $\Delta Np73$ también promovería la angiogénesis y linfangiogénesis a través de este receptor, ya que se ha descrito que VEGFR3 puede formar hetero-dímeros con VEGFR2 (140) y activar la angiogénesis. No obstante, diversos trabajos con versiones solubles de VEGFR3 mostraron que éste puede tener un papel inhibitorio al actuar como señuelo de VEGFC (141-143), por lo que estas evidencias van en contra de la idea anterior. Existe la posibilidad de que la parte detectada de VEGFR3 en el secretoma de las células sea la región extramembrana, indicando que el incremento de este receptor está localizado en la membrana de las propias células tumorales. Esto podría explicar por qué el

incremento de VEGFR3 se observó en el microarray de anticuerpos pero no en la espectrometría de masas. Además, las bases de datos *Exocarta* y *DAVID* no confirmaron la presencia del mismo en el espacio extracelular ni en exosomas, aunque se ha detectado soluble en el plasma sanguíneo en distintos estudios (144, 145). Por otro lado, es posible que la sobreexpresión de $\Delta Np73$ incremente los niveles de VEGFR3 para ejercer un efecto autocrino, ya que se ha demostrado que este receptor, y su activación por VEGFC, puede estar implicado en la proliferación, supervivencia, motilidad y migración/invasión de las células tumorales (146-149). Esta hipótesis, que podría ser compatible con la secreción del receptor soluble, sugiere un eje de acción VEGFC-EMAP-II-VEGFR3, en el que la reducción de EMAP-II permitiría una actividad mayor de la ruta VEGFC-VEGFR3 en las células tumorales para promover la progresión del tumor. Ante estas posibilidades, es necesario estudiar el papel de VEGFR3 en la sobreexpresión de $\Delta Np73$ para confirmar de qué manera participa en la progresión tumoral mediada por esta isoforma.

En definitiva, los resultados obtenidos de este trabajo permiten confirmar la implicación de $\Delta Np73$ en el desarrollo y progresión del tumor mediante la inducción de la angiogénesis y linfangiogénesis, procesos en los que BDNF y EMAP-II son mediadores y posiblemente efectores.

5.1.5 Evaluación de los potenciales efectores de $\Delta Np73$ como biomarcadores para el cáncer colorrectal

Dada la desregulación e implicación de estas proteínas asociadas a los procesos de neovascularización en el contexto tumoral, evaluamos su posible potencial diagnóstico en el plasma sanguíneo de individuos control, con lesiones premalignas y pacientes con CCR.

De acuerdo a nuestros resultados, no obtuvimos diferencias significativas para VEGFC y VEGFR3 en ninguno de los grupos de estudio cuando analizamos sus niveles en plasma sanguíneo mediante ELISA (Figura 21). En este aspecto existen resultados pocos concluyentes, ya que en unos estudios tampoco observaron la sobreexpresión de VEGFC en plasma (150, 151) pero otros trabajos sí detectaron mayores niveles de VEGFs en la sangre de los pacientes con CCR (152-154) que en sus grupos control. Esto podría explicarse por el tipo de muestra en el que se analiza, ya que se ha comprobado que las plaquetas del suero sanguíneo pueden contribuir a los niveles medidos de VEGFs (155, 156). En nuestro caso, al usar plasma sanguíneo podríamos estar obteniendo niveles más bajos que el resto de trabajos.

Por otro lado, el análisis de EMAP-II mostró una reducción significativa en los pacientes con CCR (Figura 21), acorde a lo descrito a lo largo del estudio. En este análisis solo se pudo contar con 8 miembros del grupo control dado que el resto de individuos presentaron sepsis al momento de extracción de la muestra de sangre. Además, observamos una fuerte correlación negativa entre los niveles de expresión de $\Delta Np73$ en el tumor primario y los niveles de EMAP-II en el plasma sanguíneo. Aunque dispusimos de pocas biopsias de tumor ($n = 6$) y sería necesario ampliar el análisis, esto apoya el papel de EMAP-II como posible efector de $\Delta Np73$. Con estos resultados, evaluamos la capacidad de éste para discriminar los casos de CCR (Figura 22), obteniendo un buen valor de 69,4% de AUC (grupo control vs pacientes CCR). No obstante, aumentar el número de muestras analizadas y usar cohortes poblacionales independientes podría confirmar su uso en una firma de marcadores para la detección del CCR. Hasta la fecha, más que estudiarse como biomarcador soluble, el foco de estudio se ha centrado en su uso en terapias combinadas (157-160), mejorando el efecto anti-tumoral.

En el caso de BDNF, su análisis en el plasma sanguíneo nos mostró que su incremento significativo aparece en el grupo premaligno y en pacientes con CCR (Figura 21), indicando que su desregulación tendría lugar en la etapa inicial de carcinogénesis. Este incremento de BDNF en sangre también se ha observado en otras enfermedades (161, 162). Sin embargo, anteriormente Brierley *et al* observaron la reducción significativa de BDNF en suero de dos cohortes distintas de CCR (163). En otro trabajo, Johansson *et al* no encontraron diferencias significativas al comparar el plasma de pacientes con carcinoma colónico y el grupo control (164). Es posible que estas diferencias con nuestros resultados se expliquen por el tipo de muestra usada (suero vs plasma) y por la obtención y manipulación de las mismas, ya que son factores que afectan a la estabilidad de BDNF (165). Nuestros resultados *in vitro* apoyan el resultado obtenido en el plasma sanguíneo y sugiere que ese incremento es reflejo de la desregulación del tumor primario. De hecho, hay diversos estudios que confirman la sobreexpresión de BDNF en tumores de CCR (166-169).

El posterior análisis de los niveles de BDNF en plasma demostraron una capacidad excelente para discriminar los casos con lesiones premalignas y CCR, obteniendo valores de AUC de hasta 96,9% (Figura 22). Aunque sería necesario realizar más estudios con diversas cohortes y mayor tamaño muestral, estos resultados postulan a BDNF como un biomarcador de diagnóstico precoz del CCR en biopsia líquida. Apoyando este descubrimiento, Ghatak *et al* han encontrado niveles elevados en CCR, tanto de proteína en plasma como de expresión en el tumor, en diversas bases de datos y recientemente han concluido que BDNF es un buen biomarcador en sangre para la detección del CCR (169).

5.2 PAPEL EN DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO DE LAS ISOFORMAS DE LA FAMILIA P53 EN VESÍCULAS EXTRACELULARES

La detección temprana del CCR es una de las principales barreras para reducir la mortalidad asociada a éste, ya que las técnicas usadas en los programas de cribado presentan limitaciones. Las pruebas de detección de sangre oculta en heces muestran baja especificidad y sensibilidad para detectar los casos en estadios tempranos o etapas de lesión premaligna. Por otro lado, la colonoscopia mejora claramente los aspectos anteriores pero es una técnica muy invasiva y de poca adherencia en la población. Con el fin de solventar esas limitaciones, la detección de marcadores solubles en sangre es la alternativa más prometedora. Entre las diversas biomoléculas que se estudian como posibles biomarcadores, el contenido de las VEs liberadas por las células tumorales o de las lesiones precancerosas a la circulación sanguínea es de gran interés y continúa poco estudiado. En este sentido, hemos analizado el contenido de las isoformas TAp73, Δ Np73 y Δ 133p53 en VEs del plasma sanguíneo de individuos con colonoscopia negativa, con lesiones premalignas y pacientes de CCR.

5.2.1 Empaquetamiento en vesículas extracelulares de las isoformas de la familia p53

El análisis de TAp73 en VEs no se había llevado a cabo anteriormente y, aunque este conjunto de isoformas presentan generalmente actividades de supresor de tumores, se ha observado su sobreexpresión y asociación a peor pronóstico en diversos tumores, incluyendo el CCR (170-174). A pesar de ello, no se detectó en las VEs de ninguno de los grupos de estudio. Este hallazgo sugiere que el empaquetamiento y secreción del ARN mensajero de estas isoformas con actividad anti-tumoral no aportaría ninguna ventaja selectiva al tumor o lesión premaligna. No obstante, al ser la primera vez que se estudia el contenido de TAp73 en VEs sería necesario confirmar estos resultados.

En cambio, el contenido de Δ Np73 ya se había estudiado en un trabajo previo de nuestro grupo (95). Soldevilla *et al* demostraron que el empaquetamiento de Δ Np73 en vesículas extracelulares es específico y su contenido es proporcional a la sobreexpresión de dicha isoforma en la célula. Además, los pacientes con CCR presentaron mayores niveles de Δ Np73 en VEs. En la misma línea, hemos demostrado aquí que el contenido de esta isoforma fue significativamente mayor en pacientes con CCR, pero también en individuos con lesiones premalignas (Figura 24). Este resultado apoya el posible papel de Δ Np73 en la iniciación del

tumor. Anteriormente, Soldevilla *et al* describieron que las VEs son internalizadas selectivamente por fibroblastos y células endoteliales (95). Por ello, es factible que el contenido de las VEs pueda ser internalizado por las diferentes células del microambiente adyacente y generar un estroma favorable al desarrollo del tumor (95, 175, 176), aunque es necesario más estudios para confirmar esta hipótesis. Además, en esta serie de pacientes con CCR observamos que los niveles de $\Delta Np73$ en VEs son mayores en los estadios II y IV, respecto al resto de ellos. De manera similar, en el trabajo anterior de nuestro grupo (95) se obtuvo este incremento pero fue progresivo a lo largo del estadiaje. Aunque el mayor empaquetamiento activo de $\Delta Np73$ en el estadio II resulta desconcertante, podría tener lugar para contribuir temporalmente a la diseminación local del tumor.

Por otro lado, en nuestro conocimiento, esta ha sido la primera vez que se ha estudiado el contenido de $\Delta 133p53$ en VEs. Con este trabajo hemos confirmado que los niveles de $\Delta 133p53$ liberados en VEs son más elevados en los pacientes con CCR, en comparación con el grupo control y premaligno (Figura 24). En esta línea, Fujita *et al* evaluó la expresión de esta isoforma en biopsias de tejido de individuos sanos, con lesiones premalignas y pacientes de CCR, donde obtuvo el incremento significativo en los tumores de los pacientes (67). No obstante, en su trabajo observaron la reducción de $\Delta 133p53$ en las muestras de adenomas en comparación con los individuos sanos. En nuestro caso no observamos dicha reducción en las VEs del grupo premaligno. Asimismo, Fujita *et al* observaron una correlación en los niveles de expresión de $\Delta 133p53$ y el estadio del paciente. En cambio, en nuestra serie no observamos diferencias significativas en función del estadio. Estas discrepancias podrían deberse a que el empaquetamiento de esta isoforma en VEs no refleja el estado transcripcional de la misma en el tumor, al igual que sucedió con $\Delta Np73$ en nuestro trabajo previo (95). Sin embargo, para confirmar esto son necesarios más estudios porque el trabajo de Fujita *et al* y el nuestro son los únicos evaluando los niveles de $\Delta 133p53$ en adenomas y VEs en CCR, respectivamente. A pesar de ello, su incremento en CCR apoya el papel que puede tener en la progresión tumoral (64-69).

5.2.2 Potencial como biomarcadores de diagnóstico y pronóstico

En consecuencia, determinamos el potencial de $\Delta Np73$ y $\Delta 133p53$ para discriminar entre los distintos grupos de estudio y lo comparamos con el marcador soluble en uso actualmente en clínica, CEA. En nuestra cohorte de estudio, la capacidad de ambas isoformas para discriminar los pacientes con CCR no pudo alcanzar la de CEA, que mostró valores de AUC, especificidad y

sensibilidad superiores (Figuras 25-27). En cambio, $\Delta Np73$ demostró un potencial mucho mayor para diferenciar los individuos con lesiones premalignas frente al grupo control en comparación con CEA, el cual presentó una capacidad nula en nuestra cohorte. Diversos estudios han determinado que CEA presenta una sensibilidad baja para los casos de CCR en etapas tempranas (177-179) y, sumada a esta limitación, se ha comprobado que el tipo de cohorte poblacional e inmunoensayo para su detección pueden alterar la sensibilidad y especificidad (180, 181). Por ello existe la necesidad de identificar nuevos biomarcadores que mejoren la capacidad diagnóstica de los actuales. Nuestros hallazgos sugieren un posible uso de $\Delta Np73$ como marcador no invasivo para la detección de la etapa precancerosa en detrimento de CEA. No obstante, sería interesante estudiar la combinación de CEA y $\Delta Np73$ en vesículas extracelulares para mejorar la detección conjunta de lesiones premalignas y cáncer colorrectal. De igual manera, es necesario estudiar el potencial de $\Delta Np73$ en combinación con otros marcadores y otras cohortes poblacionales y de mayor tamaño para obtener resultados concluyentes.

También evaluamos la capacidad de $\Delta Np73$ y $\Delta 133p53$ como marcador de pronóstico. En nuestra serie de pacientes con CCR no observamos una asociación significativa del contenido de $\Delta Np73$ en VEs con la supervivencia general ni con la supervivencia libre de enfermedad a 3 años, aunque para esta última se obtuvo una tendencia ($p = 0,137$). De igual manera, en el trabajo de Soldevilla *et al* se obtuvo una tendencia estadística en la asociación con la supervivencia libre de enfermedad (95). Esta tendencia podría deberse al tamaño de las series de pacientes y una cohorte más amplia para este parámetro clínico podría confirmar esta asociación. En el caso de $\Delta 133p53$, es la primera vez que se estudia la implicación de su contenido en VEs en el pronóstico del CCR. Aquí, los niveles de $\Delta 133p53$ se han asociado inversamente a la supervivencia global y libre de enfermedad. Estos resultados sugieren que $\Delta 133p53$ es un buen candidato para su estudio como biomarcador individual y en combinación de la progresión tumoral y recurrencia del paciente.

Finalmente, y de manera complementaria, estudiamos la posible existencia de una correlación entre la seroreactividad de las isoformas de la familia p53 y su contenido en VEs. Este análisis solo mostró una tendencia inversa entre los niveles de autoanticuerpos de $\Delta Np73\alpha$ y el ARN mensajero de $\Delta Np73$ contenido en VEs de los pacientes con CCR. Esta asociación preliminar podría indicar que las células del tumor en estadios avanzados disminuirían su respuesta inmunitaria e incrementarían la liberación de VEs al microambiente para posiblemente favorecer la diseminación y preparar el nicho metastásico (175, 182).

DISCUSIÓN

El análisis del contenido de estas isoformas en VEs de pacientes con CCR ha mostrado su posible utilidad en diagnóstico y pronóstico, aunque el tamaño muestral es reducido. Estos hallazgos proponen enfocar el estudio en identificar y desarrollar una firma de marcadores para mejorar la capacidad de éstos en combinación, como podría ser el caso de medir los niveles de CEA en plasma y los niveles de $\Delta Np73$ en VEs para mejorar la detección de casos en etapas tempranas. Asimismo, $\Delta 133p53$ en VEs se postula para un enfoque aplicado a evolución y supervivencia del paciente.

CONCLUSIONES

1. La sobreexpresión de $\Delta Np73$ desregula la secreción de proteínas en células de cáncer colorrectal que participan principalmente en los procesos de adhesión celular, migración, invasión y metástasis, reparación del ADN, metabolismo, angiogénesis y linfangiogénesis.
2. La desregulación de las proteínas CXCR4, DDB1, DSC3, WDR1, QSOX1, BDNF y EMAP-II por parte de $\Delta Np73$ es independiente del estatus de p53 en la célula tumoral y por tanto, esta alteración no se debe, principalmente, a la inhibición de la actividad de p53 mediada por dicha isoforma.
3. $\Delta Np73$ participa favoreciendo los procesos de angiogénesis y linfangiogénesis, donde las proteínas BDNF y EMAP-II son clave en el efecto de esta isoforma en dichos procesos.
4. El análisis de BDNF en plasma sanguíneo presenta alta especificidad y sensibilidad para discriminar los individuos con lesiones premalignas y los pacientes con cáncer colorrectal respecto a individuos sanos, por lo que es un potencial candidato a biomarcador de diagnóstico precoz en cáncer colorrectal.
5. El contenido de ARN mensajero de $\Delta Np73$ en vesículas extracelulares está significativamente elevado en individuos con lesiones premalignas y pacientes con cáncer colorrectal, sugiriendo un papel importante en la carcinogénesis del mismo y su capacidad como biomarcador de diagnóstico precoz.
6. El ARN mensajero de las isoformas TAp73 no se detecta en las vesículas extracelulares del plasma sanguíneo de individuos sanos, con lesiones premalignas y pacientes con cáncer colorrectal. Este hallazgo sugiere que el empaquetamiento de un supresor tumoral en vesículas extracelulares no aportaría ninguna ventaja celular.
7. El contenido de ARN mensajero de $\Delta 133p53$ en vesículas extracelulares está significativamente elevado en pacientes con cáncer colorrectal comparado con individuos sanos y con lesiones premalignas. Además, este contenido se asocia con peor supervivencia global y libre de enfermedad en pacientes con cáncer colorrectal. Estos resultados sugieren un posible potencial como biomarcador de presencia tumoral y pronóstico del paciente con cáncer colorrectal.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2021 May;71(3):209-49. PubMed PMID: 33538338.
2. Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN). Estimaciones de la incidencia del cáncer en España, 2022. Red Española de Registros de Cáncer [último acceso el 17/01/2022 Disponible en: <https://www.redecan.org>].
3. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74. PubMed PMID: 21376230.
4. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer discovery*. 2022 Jan;12(1):31-46. PubMed PMID: 35022204.
5. Tammela T, Alitalo K. Lymphangiogenesis: Molecular mechanisms and future promise. *Cell*. 2010 Feb 19;140(4):460-76. PubMed PMID: 20178740.
6. Viallard C, Larrivee B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis*. 2017 Nov;20(4):409-26. PubMed PMID: 28660302.
7. Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T, Kojiro M. Angiogenesis in cancer. *Vascular health and risk management*. 2006;2(3):213-9. PubMed PMID: 17326328. Pubmed Central PMCID: 1993983.
8. Scavelli C, Vacca A, Di Pietro G, Dammacco F, Ribatti D. Crosstalk between angiogenesis and lymphangiogenesis in tumor progression. *Leukemia*. 2004 Jun;18(6):1054-8. PubMed PMID: 15057248.
9. Skaper SD. The neurotrophin family of neurotrophic factors: an overview. *Methods in molecular biology*. 2012;846:1-12. PubMed PMID: 22367796.
10. Serafim Junior V, Fernandes GMM, Oliveira-Cucolo JG, Pavarino EC, Goloni-Bertollo EM. Role of Tropomyosin-related kinase B receptor and brain-derived neurotrophic factor in cancer. *Cytokine*. 2020 Dec;136:155270. PubMed PMID: 32911446.
11. Lin CY, Hung SY, Chen HT, Tsou HK, Fong YC, Wang SW, et al. Brain-derived neurotrophic factor increases vascular endothelial growth factor expression and enhances angiogenesis in human chondrosarcoma cells. *Biochemical pharmacology*. 2014 Oct 15;91(4):522-33. PubMed PMID: 25150213.
12. Lin CY, Wang SW, Chen YL, Chou WY, Lin TY, Chen WC, et al. Brain-derived neurotrophic factor promotes VEGF-C-dependent lymphangiogenesis by suppressing miR-624-3p in human chondrosarcoma cells. *Cell death & disease*. 2017 Aug 3;8(8):e2964. PubMed PMID: 28771226. Pubmed Central PMCID: 5596545.

13. Sasahira T, Ueda N, Yamamoto K, Bhawal UK, Kurihara M, Kirita T, et al. Trks are novel oncogenes involved in the induction of neovascularization, tumor progression, and nodal metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Clinical & experimental metastasis*. 2013 Feb;30(2):165-76. PubMed PMID: 22886570.
14. Zhou Z, Sun B, Huang S, Yu D, Zhang X. Roles of aminoacyl-tRNA synthetase-interacting multi-functional proteins in physiology and cancer. *Cell death & disease*. 2020 Jul 24;11(7):579. PubMed PMID: 32709848. Pubmed Central PMCID: 7382500.
15. Awasthi N, Schwarz MA, Verma V, Cappiello C, Schwarz RE. Endothelial monocyte activating polypeptide II interferes with VEGF-induced proangiogenic signaling. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2009 Jan;89(1):38-46. PubMed PMID: 19002109.
16. Schwarz MA, Kandel J, Brett J, Li J, Hayward J, Schwarz RE, et al. Endothelial-monocyte activating polypeptide II, a novel antitumor cytokine that suppresses primary and metastatic tumor growth and induces apoptosis in growing endothelial cells. *The Journal of experimental medicine*. 1999 Aug 2;190(3):341-54. PubMed PMID: 10430623. Pubmed Central PMCID: 2195582.
17. Berger AC, Alexander HR, Tang G, Wu PS, Hewitt SM, Turner E, et al. Endothelial monocyte activating polypeptide II induces endothelial cell apoptosis and may inhibit tumor angiogenesis. *Microvascular research*. 2000 Jul;60(1):70-80. PubMed PMID: 10873516.
18. Union for International Cancer Control (UICC). *TNM Classification of Malignant Tumours 8th edn*. New York John Wiley & Sons, Ltd;2017.
19. Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Przeglad gastroenterologiczny*. 2019;14(2):89-103. PubMed PMID: 31616522. Pubmed Central PMCID: 6791134.
20. Ciccolallo L, Capocaccia R, Coleman MP, Berrino F, Coebergh JW, Damhuis RA, et al. Survival differences between European and US patients with colorectal cancer: role of stage at diagnosis and surgery. *Gut*. 2005 Feb;54(2):268-73. PubMed PMID: 15647193. Pubmed Central PMCID: 1774819.
21. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2022*. Atlanta: American Cancer Society; 2022.
22. Conteduca V, Sansonno D, Russi S, Dammacco F. Precancerous colorectal lesions (Review). *International journal of oncology*. 2013 Oct;43(4):973-84. PubMed PMID: 23900573.
23. Yamane L, Scapulatempo-Neto C, Reis RM, Guimaraes DP. Serrated pathway in colorectal carcinogenesis. *World journal of gastroenterology*. 2014 Mar 14;20(10):2634-40. PubMed PMID: 24627599. Pubmed Central PMCID: 3949272.
24. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990 Jun 1;61(5):759-67. PubMed PMID: 2188735.

25. Nguyen LH, Goel A, Chung DC. Pathways of Colorectal Carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2020 Jan;158(2):291-302. PubMed PMID: 31622622. Pubmed Central PMCID: 6981255.
26. Pino MS, Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology*. 2010 Jun;138(6):2059-72. PubMed PMID: 20420946. Pubmed Central PMCID: 4243705.
27. Bateman AC. Pathology of serrated colorectal lesions. *Journal of clinical pathology*. 2014 Oct;67(10):865-74. PubMed PMID: 24561317.
28. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reynies A, Schlicker A, Sonesson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nature medicine*. 2015 Nov;21(11):1350-6. PubMed PMID: 26457759. Pubmed Central PMCID: 4636487.
29. Brenner H, Altenhofen L, Stock C, Hoffmeister M. Natural history of colorectal adenomas: birth cohort analysis among 3.6 million participants of screening colonoscopy. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2013 Jun;22(6):1043-51. PubMed PMID: 23632815.
30. Binefa G, Rodriguez-Moranta F, Teule A, Medina-Hayas M. Colorectal cancer: from prevention to personalized medicine. *World journal of gastroenterology*. 2014 Jun 14;20(22):6786-808. PubMed PMID: 24944469. Pubmed Central PMCID: 4051918.
31. Ladabaum U, Dornitz JA, Kahi C, Schoen RE. Strategies for Colorectal Cancer Screening. *Gastroenterology*. 2020 Jan;158(2):418-32. PubMed PMID: 31394083.
32. Winawer SJ, Zauber AG, Ho MN, O'Brien MJ, Gottlieb LS, Sternberg SS, et al. Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup. *The New England journal of medicine*. 1993 Dec 30;329(27):1977-81. PubMed PMID: 8247072.
33. Rabeneck L, Paszat LF, Saskin R, Stukel TA. Association between colonoscopy rates and colorectal cancer mortality. *The American journal of gastroenterology*. 2010 Jul;105(7):1627-32. PubMed PMID: 20197758.
34. Racila E, Euhus D, Weiss AJ, Rao C, McConnell J, Terstappen LW, et al. Detection and characterization of carcinoma cells in the blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998 Apr 14;95(8):4589-94. PubMed PMID: 9539782. Pubmed Central PMCID: 22534.
35. Payne SR. From discovery to the clinic: the novel DNA methylation biomarker (m)SEPT9 for the detection of colorectal cancer in blood. *Epigenomics*. 2010 Aug;2(4):575-85. PubMed PMID: 22121975.
36. Sun G, Meng J, Duan H, Zhang D, Tang Y. Diagnostic Assessment of septin9 DNA Methylation for Colorectal Cancer Using Blood Detection: A Meta-Analysis. *Pathology oncology research : POR*. 2019 Oct;25(4):1525-34. PubMed PMID: 30488278.

37. Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH, Levin TR, Lavin P, Lidgard GP, et al. Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer screening. *The New England journal of medicine*. 2014 Apr 3;370(14):1287-97. PubMed PMID: 24645800.
38. Marcuello M, Vymetalkova V, Neves RPL, Duran-Sanchon S, Vedeld HM, Tham E, et al. Circulating biomarkers for early detection and clinical management of colorectal cancer. *Molecular aspects of medicine*. 2019 Oct;69:107-22. PubMed PMID: 31189073.
39. Marcuello M, Duran-Sanchon S, Moreno L, Lozano JJ, Bujanda L, Castells A, et al. Analysis of A 6-Mirna Signature in Serum from Colorectal Cancer Screening Participants as Non-Invasive Biomarkers for Advanced Adenoma and Colorectal Cancer Detection. *Cancers*. 2019 Oct 12;11(10). PubMed PMID: 31614785. Pubmed Central PMCID: 6827108.
40. Duffy MJ. Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: is it clinically useful? *Clinical chemistry*. 2001 Apr;47(4):624-30. PubMed PMID: 11274010.
41. Fakih MG, Padmanabhan A. CEA monitoring in colorectal cancer. What you should know. *Oncology*. 2006 May;20(6):579-87; discussion 88, 94, 96 passim. PubMed PMID: 16773844.
42. Simons M, Raposo G. Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Current opinion in cell biology*. 2009 Aug;21(4):575-81. PubMed PMID: 19442504.
43. Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *Journal of proteomics*. 2010 Sep 10;73(10):1907-20. PubMed PMID: 20601276.
44. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *The Journal of cell biology*. 2013 Feb 18;200(4):373-83. PubMed PMID: 23420871. Pubmed Central PMCID: 3575529.
45. Fanale D, Taverna S, Russo A, Bazan V. Circular RNA in Exosomes. *Advances in experimental medicine and biology*. 2018;1087:109-17. PubMed PMID: 30259361.
46. Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature cell biology*. 2008 Dec;10(12):1470-6. PubMed PMID: 19011622. Pubmed Central PMCID: 3423894.
47. Zhu W, Huang L, Li Y, Zhang X, Gu J, Yan Y, et al. Exosomes derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote tumor growth in vivo. *Cancer letters*. 2012 Feb 1;315(1):28-37. PubMed PMID: 22055459.
48. Vader P, Breakefield XO, Wood MJ. Extracellular vesicles: emerging targets for cancer therapy. *Trends in molecular medicine*. 2014 Jul;20(7):385-93. PubMed PMID: 24703619. Pubmed Central PMCID: 4082760.

49. Xiao Y, Zhong J, Zhong B, Huang J, Jiang L, Jiang Y, et al. Exosomes as potential sources of biomarkers in colorectal cancer. *Cancer letters*. 2020 Apr 28;476:13-22. PubMed PMID: 32044357.
50. Levine AJ. p53: 800 million years of evolution and 40 years of discovery. *Nature reviews Cancer*. 2020 Aug;20(8):471-80. PubMed PMID: 32404993.
51. Vousden KH, Lane DP. p53 in health and disease. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007 Apr;8(4):275-83. PubMed PMID: 17380161.
52. Inoue K, Fry EA. Alterations of p63 and p73 in human cancers. *Sub-cellular biochemistry*. 2014;85:17-40. PubMed PMID: 25201187. Pubmed Central PMCID: 5356026.
53. Kaelin WG, Jr. The p53 gene family. *Oncogene*. 1999 Dec 13;18(53):7701-5. PubMed PMID: 10618710.
54. Dotsch V, Bernassola F, Coutandin D, Candi E, Melino G. p63 and p73, the ancestors of p53. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2010 Sep;2(9):a004887. PubMed PMID: 20484388. Pubmed Central PMCID: 2926756.
55. Su X, Chakravarti D, Flores ER. p63 steps into the limelight: crucial roles in the suppression of tumorigenesis and metastasis. *Nature reviews Cancer*. 2013 Feb;13(2):136-43. PubMed PMID: 23344544. Pubmed Central PMCID: 4181578.
56. Oren M. Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell death and differentiation*. 2003 Apr;10(4):431-42. PubMed PMID: 12719720.
57. Horvat A, Tadijan A, Vlastic I, Slade N. p53/p73 Protein Network in Colorectal Cancer and Other Human Malignancies. *Cancers*. 2021 Jun 9;13(12). PubMed PMID: 34207603. Pubmed Central PMCID: 8227208.
58. Khoury MP, Bourdon JC. The isoforms of the p53 protein. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2010 Mar;2(3):a000927. PubMed PMID: 20300206. Pubmed Central PMCID: 2829963.
59. Vieler M, Sanyal S. p53 Isoforms and Their Implications in Cancer. *Cancers*. 2018 Aug 25;10(9). PubMed PMID: 30149602. Pubmed Central PMCID: 6162399.
60. Attardi LD, Jacks T. The role of p53 in tumour suppression: lessons from mouse models. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 1999 Jan;55(1):48-63. PubMed PMID: 10065151.
61. Pitolli C, Wang Y, Mancini M, Shi Y, Melino G, Amelio I. Do Mutations Turn p53 into an Oncogene? *International journal of molecular sciences*. 2019 Dec 11;20(24). PubMed PMID: 31835684. Pubmed Central PMCID: 6940991.
62. Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2010 Jan;2(1):a001008. PubMed PMID: 20182602. Pubmed Central PMCID: 2827900.

63. Horikawa I, Park KY, Isogaya K, Hiyoshi Y, Li H, Anami K, et al. Delta133p53 represses p53-inducible senescence genes and enhances the generation of human induced pluripotent stem cells. *Cell death and differentiation*. 2017 Jun;24(6):1017-28. PubMed PMID: 28362428. Pubmed Central PMCID: 5442472.
64. Gong H, Zhang Y, Jiang K, Ye S, Chen S, Zhang Q, et al. p73 coordinates with Delta133p53 to promote DNA double-strand break repair. *Cell death and differentiation*. 2018 Jun;25(6):1063-79. PubMed PMID: 29511339. Pubmed Central PMCID: 5988805.
65. Arsic N, Ho-Pun-Cheung A, Lopez-Crapez E, Assenat E, Jarlier M, Anguille C, et al. The p53 isoform delta133p53ss regulates cancer cell apoptosis in a RhoB-dependent manner. *PloS one*. 2017;12(2):e0172125. PubMed PMID: 28212429. Pubmed Central PMCID: 5315499.
66. Bourdon JC, Fernandes K, Murray-Zmijewski F, Liu G, Diot A, Xirodimas DP, et al. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes & development*. 2005 Sep 15;19(18):2122-37. PubMed PMID: 16131611. Pubmed Central PMCID: 1221884.
67. Fujita K, Mondal AM, Horikawa I, Nguyen GH, Kumamoto K, Sohn JJ, et al. p53 isoforms Delta133p53 and p53beta are endogenous regulators of replicative cellular senescence. *Nature cell biology*. 2009 Sep;11(9):1135-42. PubMed PMID: 19701195. Pubmed Central PMCID: 2802853.
68. Liu K, Lin J. Delta133p53 decreases the chemosensitivity of carcinoma cell line H1299. *Cell biology international*. 2019 Aug;43(8):960-4. PubMed PMID: 31115944.
69. Gadea G, Arsic N, Fernandes K, Diot A, Joruz SM, Abdallah S, et al. TP53 drives invasion through expression of its Delta133p53beta variant. *eLife*. 2016 Sep 15;5. PubMed PMID: 27630122. Pubmed Central PMCID: 5067115.
70. Bernard H, Garmy-Susini B, Ainaoui N, Van Den Berghe L, Peurichard A, Javerzat S, et al. The p53 isoform, Delta133p53alpha, stimulates angiogenesis and tumour progression. *Oncogene*. 2013 Apr 25;32(17):2150-60. PubMed PMID: 22733133.
71. Kazantseva M, Mehta S, Eiholzer RA, Gimenez G, Bowie S, Campbell H, et al. The Delta133p53beta isoform promotes an immunosuppressive environment leading to aggressive prostate cancer. *Cell death & disease*. 2019 Aug 20;10(9):631. PubMed PMID: 31431617. Pubmed Central PMCID: 6702175.
72. Kazantseva M, Eiholzer RA, Mehta S, Taha A, Bowie S, Roth I, et al. Elevation of the TP53 isoform Delta133p53beta in glioblastomas: an alternative to mutant p53 in promoting tumor development. *The Journal of pathology*. 2018 Sep;246(1):77-88. PubMed PMID: 29888503. Pubmed Central PMCID: 6120556.
73. Joruz SM, Beck JA, Horikawa I, Harris CC. The Delta133p53 Isoforms, Tuners of the p53 Pathway. *Cancers*. 2020 Nov 18;12(11). PubMed PMID: 33218139. Pubmed Central PMCID: 7698932.

74. Campbell H, Fleming N, Roth I, Mehta S, Wiles A, Williams G, et al. 133p53 isoform promotes tumour invasion and metastasis via interleukin-6 activation of JAK-STAT and RhoA-ROCK signalling. *Nature communications*. 2018 Jan 17;9(1):254. PubMed PMID: 29343721. Pubmed Central PMCID: 5772473.
75. Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, et al. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell*. 1997 Aug 22;90(4):809-19. PubMed PMID: 9288759.
76. Yang A, Walker N, Bronson R, Kaghad M, Oosterwegel M, Bonnin J, et al. p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature*. 2000 Mar 2;404(6773):99-103. PubMed PMID: 10716451.
77. Tomasini R, Tsuchihara K, Wilhelm M, Fujitani M, Rufini A, Cheung CC, et al. TAp73 knockout shows genomic instability with infertility and tumor suppressor functions. *Genes & development*. 2008 Oct 1;22(19):2677-91. PubMed PMID: 18805989. Pubmed Central PMCID: 2559903.
78. Allocati N, Di Ilio C, De Laurenzi V. p63/p73 in the control of cell cycle and cell death. *Experimental cell research*. 2012 Jul 1;318(11):1285-90. PubMed PMID: 22326462.
79. Zaika AI, Slade N, Erster SH, Sansome C, Joseph TW, Pearl M, et al. DeltaNp73, a dominant-negative inhibitor of wild-type p53 and TAp73, is up-regulated in human tumors. *The Journal of experimental medicine*. 2002 Sep 16;196(6):765-80. PubMed PMID: 12235210. Pubmed Central PMCID: 2194062.
80. Stiewe T, Theseling CC, Putzer BM. Transactivation-deficient Delta TA-p73 inhibits p53 by direct competition for DNA binding: implications for tumorigenesis. *The Journal of biological chemistry*. 2002 Apr 19;277(16):14177-85. PubMed PMID: 11844800.
81. Stiewe T, Zimmermann S, Frilling A, Esche H, Putzer BM. Transactivation-deficient DeltaTA-p73 acts as an oncogene. *Cancer research*. 2002 Jul 1;62(13):3598-602. PubMed PMID: 12097259.
82. Lin YL, Sengupta S, Gurdziel K, Bell GW, Jacks T, Flores ER. p63 and p73 transcriptionally regulate genes involved in DNA repair. *PLoS genetics*. 2009 Oct;5(10):e1000680. PubMed PMID: 19816568. Pubmed Central PMCID: 2752189.
83. Niemantsverdriet M, Nagle P, Chiu RK, Langendijk JA, Kampinga HH, Coppes RP. DeltaNp73 enhances promoter activity of TGF-beta induced genes. *PLoS one*. 2012;7(12):e50815. PubMed PMID: 23236396. Pubmed Central PMCID: 3517593.
84. Stiewe T, Stanelle J, Theseling CC, Pollmeier B, Beitzinger M, Putzer BM. Inactivation of retinoblastoma (RB) tumor suppressor by oncogenic isoforms of the p53 family member p73. *The Journal of biological chemistry*. 2003 Apr 18;278(16):14230-6. PubMed PMID: 12584188.
85. Bae WK, Hong CS, Park MR, Sun EG, Lee JH, Kang K, et al. TAp73 inhibits cell invasion and migration by directly activating KAI1 expression in colorectal carcinoma. *Cancer letters*. 2018 Feb 28;415:106-16. PubMed PMID: 29222041.

86. Soldevilla B, Diaz R, Silva J, Campos-Martin Y, Munoz C, Garcia V, et al. Prognostic impact of DeltaTAp73 isoform levels and their target genes in colon cancer patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2011 Sep 15;17(18):6029-39. PubMed PMID: 21807636.
87. Sakil HAM, Stantic M, Wolfsberger J, Brage SE, Hansson J, Wilhelm MT. DeltaNp73 regulates the expression of the multidrug-resistance genes ABCB1 and ABCB5 in breast cancer and melanoma cells - a short report. *Cellular oncology*. 2017 Dec;40(6):631-8. PubMed PMID: 28677036. Pubmed Central PMCID: 5705756.
88. Stantic M, Sakil HA, Zirath H, Fang T, Sanz G, Fernandez-Woodbridge A, et al. TAp73 suppresses tumor angiogenesis through repression of proangiogenic cytokines and HIF-1alpha activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015 Jan 6;112(1):220-5. PubMed PMID: 25535357. Pubmed Central PMCID: 4291634.
89. Dulloo I, Hooi PB, Sabapathy K. Hypoxia-induced DNp73 stabilization regulates Vegf-A expression and tumor angiogenesis similar to TAp73. *Cell cycle*. 2015;14(22):3533-9. PubMed PMID: 26267146. Pubmed Central PMCID: 4825702.
90. Stantic M, Wolfsberger J, Sakil HAM, Wilhelm MT. DeltaNp73 enhances HIF-1alpha protein stability through repression of the ECV complex. *Oncogene*. 2018 Jul;37(27):3729-39. PubMed PMID: 29628507. Pubmed Central PMCID: 6033838.
91. Cam M, Charan M, Welker AM, Dravid P, Studebaker AW, Leonard JR, et al. DeltaNp73/ETS2 complex drives glioblastoma pathogenesis- targeting downstream mediators by rebastinib prolongs survival in preclinical models of glioblastoma. *Neuro-oncology*. 2020 Mar 5;22(3):345-56. PubMed PMID: 31763674. Pubmed Central PMCID: 7058445.
92. Moll UM, Slade N. p63 and p73: roles in development and tumor formation. *Molecular cancer research : MCR*. 2004 Jul;2(7):371-86. PubMed PMID: 15280445.
93. Concin N, Becker K, Slade N, Erster S, Mueller-Holzner E, Ulmer H, et al. Transdominant DeltaTAp73 isoforms are frequently up-regulated in ovarian cancer. Evidence for their role as epigenetic p53 inhibitors in vivo. *Cancer research*. 2004 Apr 1;64(7):2449-60. PubMed PMID: 15059898.
94. Rodriguez N, Pelaez A, Barderas R, Dominguez G. Clinical implications of the deregulated TP73 isoforms expression in cancer. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*. 2018 Jul;20(7):827-36. PubMed PMID: 29230693.
95. Soldevilla B, Rodriguez M, San Millan C, Garcia V, Fernandez-Perianez R, Gil-Calderon B, et al. Tumor-derived exosomes are enriched in DeltaNp73, which promotes oncogenic potential in acceptor cells and correlates with patient survival. *Human molecular genetics*. 2014 Jan 15;23(2):467-78. PubMed PMID: 24067531.

96. Garranzo-Asensio M, Guzman-Aranguez A, Poves C, Fernandez-Acenero MJ, Montero-Calle A, Ceron MA, et al. The specific seroreactivity to Np73 isoforms shows higher diagnostic ability in colorectal cancer patients than the canonical p73 protein. *Scientific reports*. 2019 Sep 19;9(1):13547. PubMed PMID: 31537884. Pubmed Central PMCID: 6753153.
97. Brennan D, Hu Y, Joubeh S, Choi YW, Whitaker-Menezes D, O'Brien T, et al. Suprabasal Dsg2 expression in transgenic mouse skin confers a hyperproliferative and apoptosis-resistant phenotype to keratinocytes. *Journal of cell science*. 2007 Mar 1;120(Pt 5):758-71. PubMed PMID: 17284515.
98. Bujko M, Kober P, Mikula M, Ligaj M, Ostrowski J, Siedlecki JA. Expression changes of cell-cell adhesion-related genes in colorectal tumors. *Oncology letters*. 2015 Jun;9(6):2463-70. PubMed PMID: 26137091. Pubmed Central PMCID: 4473523.
99. Hutschenreuther A, Bigl M, Hemdan NY, Debebe T, Gaunitz F, Birkenmeier G. Modulation of GLO1 Expression Affects Malignant Properties of Cells. *International journal of molecular sciences*. 2016 Dec 18;17(12). PubMed PMID: 27999356. Pubmed Central PMCID: 5187933.
100. Kim MH, Kim HB, Yoon SP, Lim SC, Cha MJ, Jeon YJ, et al. Colon cancer progression is driven by APEX1-mediated upregulation of Jagged. *The Journal of clinical investigation*. 2013 Jul 1. PubMed PMID: 23863623. Pubmed Central PMCID: 3726152.
101. Pernodet N, Hermetet F, Adami P, Vejux A, Descotes F, Borg C, et al. High expression of QSOX1 reduces tumorigenesis, and is associated with a better outcome for breast cancer patients. *Breast cancer research : BCR*. 2012 Oct 25;14(5):R136. PubMed PMID: 23098186. Pubmed Central PMCID: 4053115.
102. Soldevilla B, Millan CS, Bonilla F, Dominguez G. The TP73 complex network: ready for clinical translation in cancer? *Genes, chromosomes & cancer*. 2013 Nov;52(11):989-1006. PubMed PMID: 23913810.
103. Ravni A, Tissir F, Goffinet AM. DeltaNp73 transcription factors modulate cell survival and tumor development. *Cell cycle*. 2010 Apr 15;9(8):1523-7. PubMed PMID: 20372082.
104. Diaz R, Pena C, Silva J, Lorenzo Y, Garcia V, Garcia JM, et al. p73 Isoforms affect VEGF, VEGF165b and PEDF expression in human colorectal tumors: VEGF165b downregulation as a marker of poor prognosis. *International journal of cancer*. 2008 Sep 1;123(5):1060-7. PubMed PMID: 18546269.
105. Liu Z, Zhang Y, Niu Y, Li K, Liu X, Chen H, et al. A systematic review and meta-analysis of diagnostic and prognostic serum biomarkers of colorectal cancer. *PLoS one*. 2014;9(8):e103910. PubMed PMID: 25105762. Pubmed Central PMCID: 4126674.
106. Instituto Nacional de Estadística (INE). Defunciones según la causa de muerte. [último acceso el 17/01/2022] Disponible en: <https://www.ine.es/jaxiT3/Tabla.htm?t=6609>.

107. Steder M, Alla V, Meier C, Spitschak A, Pahnke J, Furst K, et al. DNp73 exerts function in metastasis initiation by disconnecting the inhibitory role of EPLIN on IGF1R-AKT/STAT3 signaling. *Cancer cell*. 2013 Oct 14;24(4):512-27. PubMed PMID: 24135282.
108. Zhang Y, Yan W, Jung YS, Chen X. PUMA Cooperates with p21 to Regulate Mammary Epithelial Morphogenesis and Epithelial-To-Mesenchymal Transition. *PLoS one*. 2013;8(6):e66464. PubMed PMID: 23805223. Pubmed Central PMCID: 3689819.
109. Alam F, Mezhal F, El Hasasna H, Nair VA, Aravind SR, Saber Ayad M, et al. The role of p53-microRNA 200-Moesin axis in invasion and drug resistance of breast cancer cells. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2017 Sep;39(9):1010428317714634. PubMed PMID: 28933253.
110. Zamanian M, Qader Hamadne LA, Veerakumarasivam A, Abdul Rahman S, Shohaimi S, Rosli R. Calreticulin mediates an invasive breast cancer phenotype through the transcriptional dysregulation of p53 and MAPK pathways. *Cancer cell international*. 2016;16:56. PubMed PMID: 27418879. Pubmed Central PMCID: 4944499.
111. Hu Y, Li S, Yang M, Yan C, Fan D, Zhou Y, et al. Sorcin silencing inhibits epithelial-to-mesenchymal transition and suppresses breast cancer metastasis in vivo. *Breast cancer research and treatment*. 2014 Jan;143(2):287-99. PubMed PMID: 24337682.
112. Zhou Y, Chi Y, Bhandari A, Xia E, Thakur PC, Qu J, et al. Downregulated CDH3 decreases proliferation, migration, and invasion in thyroid cancer. *American journal of translational research*. 2020;12(6):3057-67. PubMed PMID: 32655830. Pubmed Central PMCID: 7344063.
113. Piao XM, Hwang B, Jeong P, Byun YJ, Kang HW, Seo SP, et al. Collagen type VI α 1 and 2 repress the proliferation, migration and invasion of bladder cancer cells. *International journal of oncology*. 2021 Jul;59(1). PubMed PMID: 33982770.
114. Okada Y, Takahashi N, Takayama T, Goel A. LAMC2 promotes cancer progression and gemcitabine resistance through modulation of EMT and ATP-binding cassette transporters in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Carcinogenesis*. 2021 Apr 30;42(4):546-56. PubMed PMID: 33624791. Pubmed Central PMCID: 8086766.
115. Zhang X, Ding H, Lu Z, Ding L, Song Y, Jing Y, et al. Increased LGALS3BP promotes proliferation and migration of oral squamous cell carcinoma via PI3K/AKT pathway. *Cellular signalling*. 2019 Nov;63:109359. PubMed PMID: 31302247.
116. Chatterjee S, Behnam Azad B, Nimmagadda S. The intricate role of CXCR4 in cancer. *Advances in cancer research*. 2014;124:31-82. PubMed PMID: 25287686. Pubmed Central PMCID: 4322894.
117. Wang P, Yuan Y, Lin W, Zhong H, Xu K, Qi X. Roles of sphingosine-1-phosphate signaling in cancer. *Cancer cell international*. 2019;19:295. PubMed PMID: 31807117. Pubmed Central PMCID: 6857321.

118. Yuan B, Zhang R, Hu J, Liu Z, Yang C, Zhang T, et al. WDR1 Promotes Cell Growth and Migration and Contributes to Malignant Phenotypes of Non-small Cell Lung Cancer through ADF/cofilin-mediated Actin Dynamics. *International journal of biological sciences*. 2018;14(9):1067-80. PubMed PMID: 29989053. Pubmed Central PMCID: 6036740.
119. Chen Z, Liu Y, Yao L, Guo S, Gao Y, Zhu P. The long noncoding RNA IncZic2 drives the self-renewal of liver tumor-initiating cells via the protein kinase C substrates MARCKS and MARCKSL1. *The Journal of biological chemistry*. 2018 May 25;293(21):7982-92. PubMed PMID: 29588366. Pubmed Central PMCID: 5971456.
120. Salem O, Erdem N, Jung J, Munstermann E, Worner A, Wilhelm H, et al. The highly expressed 5'isomiR of hsa-miR-140-3p contributes to the tumor-suppressive effects of miR-140 by reducing breast cancer proliferation and migration. *BMC genomics*. 2016 Aug 8;17:566. PubMed PMID: 27502506. Pubmed Central PMCID: 4977694.
121. Wu GJ, Zeng GF. METCAM/MUC18 is a novel tumor and metastasis suppressor for the human ovarian cancer SKOV3 cells. *BMC cancer*. 2016 Feb 22;16:136. PubMed PMID: 26906545. Pubmed Central PMCID: 4763411.
122. Wu GJ. Enforced Expression of METCAM/MUC18 Decreases In Vitro Motility and Invasiveness and Tumorigenesis and In Vivo Tumorigenesis of Human Ovarian Cancer BG-1 Cells. *Advances in experimental medicine and biology*. 2021;1330:125-37. PubMed PMID: 34339034.
123. Kamekura R, Kolegraff KN, Nava P, Hilgarth RS, Feng M, Parkos CA, et al. Loss of the desmosomal cadherin desmoglein-2 suppresses colon cancer cell proliferation through EGFR signaling. *Oncogene*. 2014 Sep 4;33(36):4531-6. PubMed PMID: 24166502. Pubmed Central PMCID: 4061272.
124. Ganig N, Baenke F, Thepkaysone ML, Lin K, Rao VS, Wong FC, et al. Proteomic Analyses of Fibroblast- and Serum-Derived Exosomes Identify QSOX1 as a Marker for Non-invasive Detection of Colorectal Cancer. *Cancers*. 2021 Mar 17;13(6). PubMed PMID: 33802764. Pubmed Central PMCID: 8002505.
125. Roos WP, Thomas AD, Kaina B. DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. *Nature reviews Cancer*. 2016 Jan;16(1):20-33. PubMed PMID: 26678314.
126. Toh WH, Logette E, Corcos L, Sabapathy K. TAp73beta and DNp73beta activate the expression of the pro-survival caspase-2S. *Nucleic acids research*. 2008 Aug;36(13):4498-509. PubMed PMID: 18611950. Pubmed Central PMCID: 2490756.
127. Chen Z, Wang K, Hou C, Jiang K, Chen B, Chen J, et al. CRL4B(DCAF11) E3 ligase targets p21 for degradation to control cell cycle progression in human osteosarcoma cells. *Scientific reports*. 2017 Apr 26;7(1):1175. PubMed PMID: 28446751. Pubmed Central PMCID: 5430835.

128. Kotake Y, Zeng Y, Xiong Y. DDB1-CUL4 and MLL1 mediate oncogene-induced p16INK4a activation. *Cancer research*. 2009 Mar 1;69(5):1809-14. PubMed PMID: 19208841. Pubmed Central PMCID: 2653104.
129. Kakolyris S, Kaklamanis L, Engels K, Turley H, Hickson ID, Gatter KC, et al. Human apurinic endonuclease 1 expression in a colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Cancer research*. 1997 May 1;57(9):1794-7. PubMed PMID: 9135024.
130. Zhang Y, Lei Y, Xu J, Hua J, Zhang B, Liu J, et al. Role of Damage DNA-Binding Protein 1 in Pancreatic Cancer Progression and Chemoresistance. *Cancers*. 2019 Dec 12;11(12). PubMed PMID: 31842285. Pubmed Central PMCID: 6966444.
131. Zhang Y, Wang J, Xiang D, Wang D, Xin X. Alterations in the expression of the apurinic/aprimidinic endonuclease-1/redox factor-1 (APE1/Ref-1) in human ovarian cancer and identification of the therapeutic potential of APE1/Ref-1 inhibitor. *International journal of oncology*. 2009 Nov;35(5):1069-79. PubMed PMID: 19787261.
132. Fishel ML, Kelley MR. The DNA base excision repair protein Ape1/Ref-1 as a therapeutic and chemopreventive target. *Molecular aspects of medicine*. 2007 Jun-Aug;28(3-4):375-95. PubMed PMID: 17560642.
133. Kim HB, Cho WJ, Choi NG, Kim SS, Park JH, Lee HJ, et al. Clinical implications of APEX1 and Jagged1 as chemoresistance factors in biliary tract cancer. *Annals of surgical treatment and research*. 2017 Jan;92(1):15-22. PubMed PMID: 28090501. Pubmed Central PMCID: 5234431.
134. Loof J, Pfeifer D, Ding Z, Sun XF, Zhang H. Effects of DeltaNP73beta on cisplatin treatment in colon cancer cells. *Molecular carcinogenesis*. 2012 Aug;51(8):628-35. PubMed PMID: 21837762.
135. San Millan C, Soldevilla B, Martin P, Gil-Calderon B, Compte M, Perez-Sacristan B, et al. beta-Cryptoxanthin Synergistically Enhances the Antitumoral Activity of Oxaliplatin through DeltaNP73 Negative Regulation in Colon Cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2015 Oct 1;21(19):4398-409. PubMed PMID: 26023082.
136. Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature reviews Cancer*. 2004 Nov;4(11):891-9. PubMed PMID: 15516961.
137. Venkatanarayan A, Raulji P, Norton W, Chakravarti D, Coarfa C, Su X, et al. IAPP-driven metabolic reprogramming induces regression of p53-deficient tumours in vivo. *Nature*. 2015 Jan 29;517(7536):626-30. PubMed PMID: 25409149. Pubmed Central PMCID: 4312210.
138. Makinen T, Veikkola T, Mustjoki S, Karpanen T, Catimel B, Nice EC, et al. Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3. *The EMBO journal*. 2001 Sep 3;20(17):4762-73. PubMed PMID: 11532940. Pubmed Central PMCID: 125596.

139. Wong MP, Cheung N, Yuen ST, Leung SY, Chung LP. Vascular endothelial growth factor is up-regulated in the early pre-malignant stage of colorectal tumour progression. *International journal of cancer*. 1999 Jun 11;81(6):845-50. PubMed PMID: 10362127.
140. Shaik F, Cuthbert GA, Homer-Vanniasinkam S, Muench SP, Ponnambalam S, Harrison MA. Structural Basis for Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Activation and Implications for Disease Therapy. *Biomolecules*. 2020 Dec 15;10(12). PubMed PMID: 33333800. Pubmed Central PMCID: 7765180.
141. Makinen T, Jussila L, Veikkola T, Karpanen T, Kettunen MI, Pulkkanen KJ, et al. Inhibition of lymphangiogenesis with resulting lymphedema in transgenic mice expressing soluble VEGF receptor-3. *Nature medicine*. 2001 Feb;7(2):199-205. PubMed PMID: 11175851.
142. Singh N, Tiem M, Watkins R, Cho YK, Wang Y, Olsen T, et al. Soluble vascular endothelial growth factor receptor 3 is essential for corneal alymphaticity. *Blood*. 2013 May 16;121(20):4242-9. PubMed PMID: 23476047. Pubmed Central PMCID: 3656456.
143. Yang H, Kim C, Kim MJ, Schwendener RA, Alitalo K, Heston W, et al. Soluble vascular endothelial growth factor receptor-3 suppresses lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in bladder cancer. *Molecular cancer*. 2011 Apr 11;10:36. PubMed PMID: 21481239. Pubmed Central PMCID: 3080348.
144. Mouawad R, Spano JP, Comperat E, Capron F, Khayat D. Tumoural expression and circulating level of VEGFR-3 (Flt-4) in metastatic melanoma patients: correlation with clinical parameters and outcome. *European journal of cancer*. 2009 May;45(8):1407-14. PubMed PMID: 19157860.
145. Kanefendt F, Lindauer A, Mross K, Fuhr U, Jaehde U. Determination of soluble vascular endothelial growth factor receptor 3 (sVEGFR-3) in plasma as pharmacodynamic biomarker. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2012 Nov;70:485-91. PubMed PMID: 22819208.
146. Su JL, Yang PC, Shih JY, Yang CY, Wei LH, Hsieh CY, et al. The VEGF-C/Flt-4 axis promotes invasion and metastasis of cancer cells. *Cancer cell*. 2006 Mar;9(3):209-23. PubMed PMID: 16530705.
147. Dias S, Choy M, Alitalo K, Rafii S. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C signaling through FLT-4 (VEGFR-3) mediates leukemic cell proliferation, survival, and resistance to chemotherapy. *Blood*. 2002 Mar 15;99(6):2179-84. PubMed PMID: 11877295.
148. Yeh YW, Cheng CC, Yang ST, Tseng CF, Chang TY, Tsai SY, et al. Targeting the VEGF-C/VEGFR3 axis suppresses Slug-mediated cancer metastasis and stemness via inhibition of KRAS/YAP1 signaling. *Oncotarget*. 2017 Jan 17;8(3):5603-18. PubMed PMID: 27901498. Pubmed Central PMCID: 5354933.
149. Su JL, Yen CJ, Chen PS, Chuang SE, Hong CC, Kuo IH, et al. The role of the VEGF-C/VEGFR-3 axis in cancer progression. *British journal of cancer*. 2007 Feb 26;96(4):541-5. PubMed PMID: 17164762. Pubmed Central PMCID: 2360045.

150. Duff SE, Saunders M, McCredie V, Kumar S, O'Dwyer ST, Jayson GC. Pre-operative plasma levels of vascular endothelial growth factor A, C and D in patients with colorectal cancer. *Clinical oncology*. 2005 Aug;17(5):367-71. PubMed PMID: 16097569.
151. Miyazaki T, Okada N, Ishibashi K, Ogata K, Ohsawa T, Ishiguro T, et al. Clinical significance of plasma level of vascular endothelial growth factor-C in patients with colorectal cancer. *Japanese journal of clinical oncology*. 2008 Dec;38(12):839-43. PubMed PMID: 18923001.
152. George ML, Eccles SA, Tutton MG, Abulafi AM, Swift RI. Correlation of plasma and serum vascular endothelial growth factor levels with platelet count in colorectal cancer: clinical evidence of platelet scavenging? *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2000 Aug;6(8):3147-52. PubMed PMID: 10955796.
153. Werther K, Christensen IJ, Nielsen HJ, Danish RCCSG. Prognostic impact of matched preoperative plasma and serum VEGF in patients with primary colorectal carcinoma. *British journal of cancer*. 2002 Feb 1;86(3):417-23. PubMed PMID: 11875709. Pubmed Central PMCID: 2375229.
154. Werther K, Christensen IJ, Brunner N, Nielsen HJ. Soluble vascular endothelial growth factor levels in patients with primary colorectal carcinoma. The Danish RANX05 Colorectal Cancer Study Group. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*. 2000 Nov;26(7):657-62. PubMed PMID: 11078612.
155. Wartiovaara U, Salven P, Mikkola H, Lassila R, Kaukonen J, Joukov V, et al. Peripheral blood platelets express VEGF-C and VEGF which are released during platelet activation. *Thrombosis and haemostasis*. 1998 Jul;80(1):171-5. PubMed PMID: 9684805.
156. Salgado R, Benoy I, Bogers J, Weytjens R, Vermeulen P, Dirix L, et al. Platelets and vascular endothelial growth factor (VEGF): a morphological and functional study. *Angiogenesis*. 2001;4(1):37-43. PubMed PMID: 11824377.
157. Schwarz RE, Awasthi N, Konduri S, Caldwell L, Cafasso D, Schwarz MA. Antitumor effects of EMAP II against pancreatic cancer through inhibition of fibronectin-dependent proliferation. *Cancer biology & therapy*. 2010 Apr 15;9(8):632-9. PubMed PMID: 20212356.
158. Awasthi N, Schwarz MA, Schwarz RE. Combination effects of bortezomib with gemcitabine and EMAP II in experimental pancreatic cancer. *Cancer biology & therapy*. 2010 Jul 1;10(1):99-107. PubMed PMID: 20495354.
159. Awasthi N, Zhang C, Hinz S, Schwarz MA, Schwarz RE. Enhancing sorafenib-mediated sensitization to gemcitabine in experimental pancreatic cancer through EMAP II. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*. 2013 Mar 6;32:12. PubMed PMID: 23497499. Pubmed Central PMCID: 3618297.

160. Crippa L, Gasparri A, Sacchi A, Ferrero E, Curnis F, Corti A. Synergistic damage of tumor vessels with ultra low-dose endothelial-monocyte activating polypeptide-II and neovasculature-targeted tumor necrosis factor-alpha. *Cancer research*. 2008 Feb 15;68(4):1154-61. PubMed PMID: 18281491.
161. Tong Q, Wang XL, Li SB, Yang GL, Jin S, Gao ZY, et al. Combined detection of IL-6 and IL-8 is beneficial to the diagnosis of early stage esophageal squamous cell cancer: a preliminary study based on the screening of serum markers using protein chips. *OncoTargets and therapy*. 2018;11:5777-87. PubMed PMID: 30254470. Pubmed Central PMCID: 6140751.
162. Hu Y, Wang YD, Guo T, Wei WN, Sun CY, Zhang L, et al. Identification of brain-derived neurotrophic factor as a novel angiogenic protein in multiple myeloma. *Cancer genetics and cytogenetics*. 2007 Oct 1;178(1):1-10. PubMed PMID: 17889702.
163. Brierley GV, Priebe IK, Purins L, Fung KY, Tabor B, Lockett T, et al. Serum concentrations of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) are decreased in colorectal cancer patients. *Cancer biomarkers : section A of Disease markers*. 2013;13(2):67-73. PubMed PMID: 23838134.
164. Johansson M, Jonsson M, Norrgard O, Forsgren S. New aspects concerning ulcerative colitis and colonic carcinoma: analysis of levels of neuropeptides, neurotrophins, and TNFalpha/TNF receptor in plasma and mucosa in parallel with histological evaluation of the intestine. *Inflammatory bowel diseases*. 2008 Oct;14(10):1331-40. PubMed PMID: 18452198.
165. Wessels JM, Agarwal RK, Somani A, Verschoor CP, Agarwal SK, Foster WG. Factors affecting stability of plasma brain-derived neurotrophic factor. *Scientific reports*. 2020 Nov 19;10(1):20232. PubMed PMID: 33214644. Pubmed Central PMCID: 7677545.
166. Brunetto de Farias C, Rosemberg DB, Heinen TE, Koehler-Santos P, Abujamra AL, Kapczinski F, et al. BDNF/TrkB content and interaction with gastrin-releasing peptide receptor blockade in colorectal cancer. *Oncology*. 2010;79(5-6):430-9. PubMed PMID: 21474968.
167. Yang X, Martin TA, Jiang WG. Biological influence of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on colon cancer cells. *Experimental and therapeutic medicine*. 2013 Dec;6(6):1475-81. PubMed PMID: 24255678. Pubmed Central PMCID: 3829751.
168. Akil H, Perraud A, Melin C, Jauberteau MO, Mathonnet M. Fine-tuning roles of endogenous brain-derived neurotrophic factor, TrkB and sortilin in colorectal cancer cell survival. *PloS one*. 2011;6(9):e25097. PubMed PMID: 21966426. Pubmed Central PMCID: 3180371.
169. Ghatak S, Mehrabi SF, Mehdawi LM, Satapathy SR, Sjolander A. Identification of a Novel Five-Gene Signature as a Prognostic and Diagnostic Biomarker in Colorectal Cancers. *International journal of molecular sciences*. 2022 Jan 12;23(2). PubMed PMID: 35054980. Pubmed Central PMCID: 8776147.

170. Faridoni-Laurens L, Tourpin S, Alsafadi S, Barrois M, Temam S, Janot F, et al. Involvement of N-terminally truncated variants of p73, deltaTAp73, in head and neck squamous cell cancer: a comparison with p53 mutations. *Cell cycle*. 2008 Jun 1;7(11):1587-96. PubMed PMID: 18469517.
171. Sun XF. p73 overexpression is a prognostic factor in patients with colorectal adenocarcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2002 Jan;8(1):165-70. PubMed PMID: 11801554.
172. Toumi AA, El Hadj Oel A, Ben Mahmoud LK, Ben Hmida Ael M, Chaar I, Gharbi L, et al. The prognostic value of p73 overexpression in colorectal carcinoma: a clinicopathologic, immunohistochemical, and statistical study of 204 patients. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM*. 2010 Mar;18(2):128-36. PubMed PMID: 19956069.
173. Su XL, Ouyang XH, Yan MR, Liu GR. p73 expression and its clinical significance in colorectal cancer. *Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland*. 2009 Nov;11(9):960-3. PubMed PMID: 19016816.
174. Leupin N, Luthi A, Novak U, Grob TJ, Hugli B, Graber H, et al. P73 status in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia & lymphoma*. 2004 Jun;45(6):1205-7. PubMed PMID: 15360002.
175. Peinado H, Aleckovic M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nature medicine*. 2012 Jun;18(6):883-91. PubMed PMID: 22635005. Pubmed Central PMCID: 3645291.
176. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology*. 2007 Jun;9(6):654-9. PubMed PMID: 17486113.
177. Fletcher RH. Carcinoembryonic antigen. *Annals of internal medicine*. 1986 Jan;104(1):66-73. PubMed PMID: 3510056.
178. Wanebo HJ, Rao B, Pinsky CM, Hoffman RG, Stearns M, Schwartz MK, et al. Preoperative carcinoembryonic antigen level as a prognostic indicator in colorectal cancer. *The New England journal of medicine*. 1978 Aug 31;299(9):448-51. PubMed PMID: 683276.
179. Gao Y, Wang J, Zhou Y, Sheng S, Qian SY, Huo X. Evaluation of Serum CEA, CA19-9, CA72-4, CA125 and Ferritin as Diagnostic Markers and Factors of Clinical Parameters for Colorectal Cancer. *Scientific reports*. 2018 Feb 9;8(1):2732. PubMed PMID: 29426902. Pubmed Central PMCID: 5807317.
180. Borner OP. Standardization, specificity, and diagnostic sensitivity of four immunoassays for carcinoembryonic antigen. *Clinical chemistry*. 1991 Feb;37(2):231-6. PubMed PMID: 1993329.

181. Taylor RN, Fulford KM, Huong AY. Results of a nationwide proficiency test for carcinoembryonic antigen. *Journal of clinical microbiology*. 1977 Apr;5(4):433-8. PubMed PMID: 323284. Pubmed Central PMCID: 274619.
182. Costa-Silva B, Aiello NM, Ocean AJ, Singh S, Zhang H, Thakur BK, et al. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nature cell biology*. 2015 Jun;17(6):816-26. PubMed PMID: 25985394. Pubmed Central PMCID: 5769922.

ANEXO

El trabajo experimental presentado en esta tesis doctoral está publicado en los siguientes artículos científicos (incluidos al final de este apartado):

- Garranzo-Asensio M*, **Rodríguez-Cobos J***, San Millán C, Poves C, Fernandez-Aceñero MJ, Pastor-Morate D, Viñal D, Montero-Calle A, Solís-Fernández G, Ceron MÁ, Gámez-Chiachio M, Rodríguez N, Guzmán-Aránguez A, Barderas R, Domínguez G. **In-depth proteomics characterization of Np73 effectors identifies key proteins with diagnostic potential implicated in lymphangiogenesis, vasculogenesis and metastasis in colorectal cancer.** *Molecular oncology*. 2022 May 19. PubMed PMID: 35586989. doi: 10.1002/1878-0261.13228.

* Ambos autores han contribuido por igual.




- **Rodríguez-Cobos J***, Viñal D*, Poves C, Fernandez-Aceñero MJ, Peinado H, Pastor-Morate D, Prieto MI, Barderas R, Rodríguez N, Domínguez G. **DeltaNp73, TAp73 and Delta133p53 Extracellular Vesicle Cargo as Early Diagnosis Markers in Colorectal Cancer.** *Cancers*. 2021 May 7;13(9). PubMed PMID: 34066954. doi: 10.3390/cancers13092240.

* Ambos autores han contribuido por igual.

Adicionalmente, durante este periodo de formación en el doctorado de Biociencias Moleculares, he participado en diversas publicaciones científicas:

- Montero-Calle A, Aranguren-Abeigon I, Garranzo-Asensio M, Poves C, Fernández-Aceñero MJ, Martínez-Useros J, Sanz R, Dziaková J, **Rodríguez-Cobos J**, Solís-Fernández G, Povedano-Muñumel E, Gamella M, Torrente-Rodríguez R, Alonso-Navarro M, Ríos V, Casal JI, Domínguez G, Guzmán-Aránguez A, García A, Barderas R. **Multiplexed Biosensing Diagnostic Platforms Detecting Autoantibodies to Tumor-Associated Antigens from Exosomes Released by CRC Cells and Tissue Samples Showed High Diagnostic Ability for Colorectal Cancer.** *Engineering*. 2021 October. doi: 10.1016/j.eng.2021.04.026.
- Rodríguez N, Viñal D, **Rodríguez-Cobos J**, De Castro J, Domínguez G. **Genomic profiling in oncology clinical practice.** *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*. 2020 Sep;22(9):1430-9. PubMed PMID: 31981077. doi: 10.1007/s12094-020-02296-9.
- Prieto-Nieto MI, Pastor D, **Rodríguez-Cobos J**, Pérez JP, Méndez C, Palacios E, Arranz-Álvarez M, Santos-López J, Cano-Vega M, Viñal D, Rodríguez N, Domínguez G. **DeltaNp73 status in peritoneal and ovarian dissemination of appendicular adenocarcinoids (goblet cells).** *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*. 2019 Oct;21(10):1432-9. PubMed PMID: 31025168. doi: 10.1007/s12094-019-02091-1.

In-depth proteomics characterization of Δ Np73 effectors identifies key proteins with diagnostic potential implicated in lymphangiogenesis, vasculogenesis and metastasis in colorectal cancer

María Garranzo-Asensio¹, Javier Rodríguez-Cobos², Coral San Millán², Carmen Poves³, María Jesús Fernández-Aceñero⁴, Daniel Pastor-Morate², David Viñal⁵, Ana Montero-Calle¹, Guillermo Solís-Fernández¹, María-Ángeles Ceron⁴, Manuel Gámez-Chiachio² , Nuria Rodríguez⁵, Ana Guzmán-Aránguez⁶, Rodrigo Barderas¹  and Gemma Domínguez² 

1 Chronic Disease Programme (UFIEC), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

2 Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, CSIC-UAM, IdiPAZ, Madrid, Spain

3 Gastroenterology Unit, Hospital Universitario Clínico San Carlos, Madrid, Spain

4 Surgical Pathology Department, Hospital Universitario Clínico San Carlos, Madrid, Spain

5 Medical Oncology Department, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain

6 Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Óptica y Optometría, Universidad Complutense de Madrid, Spain

Keywords

Δ Np73 effectors; colorectal cancer; in-depth proteomics; lymphangiogenesis; secretome

Correspondence

G. Domínguez, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, CSIC-Universidad Autónoma de Madrid, IdiPAZ, E-28029 Madrid, Spain
 Tel: +34 915854459
 E-mail: gdominguez@iib.uam.es

and

R. Barderas, Functional Proteomics Unit, UFIEC, Instituto de Salud Carlos III, E-28220 Majadahonda, Madrid, Spain
 Tel: +34 918223231
 E-mail: r.barderasm@isciii.es

María Garranzo-Asensio and Javier Rodríguez-Cobos contributed equally to this article.

Rodrigo Barderas and Gemma Domínguez are co-senior authors.

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer and the second leading cause of cancer-related death worldwide. Alterations in proteins of the p53-family are a common event in CRC. Δ Np73, a p53-family member, shows oncogenic properties and its effectors are largely unknown. We performed an in-depth proteomics characterization of transcriptional control by Δ Np73 of the secretome of human colon cancer cells and validated its clinical potential. The secretome was analyzed using high-density antibody microarrays and stable isotopic metabolic labeling. Validation was performed by semiquantitative PCR, ELISA, dot-blot and western blot analysis. Evaluation of selected effectors was carried out using 60 plasma samples from CRC patients, individuals carrying premalignant colorectal lesions and colonoscopy-negative controls. In total, 51 dysregulated proteins were observed showing at least 1.5-foldchange in expression. We found an important association between the overexpression of Δ Np73 and effectors related to lymphangiogenesis, vasculogenesis and metastasis, such as brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and the putative aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 1 (EMAP-II)-vascular endothelial growth factor C-vascular endothelial growth factor receptor 3 axis. We further demonstrated the usefulness of BDNF as a potential CRC biomarker able to discriminate between CRC patients and premalignant individuals from controls with high sensitivity and specificity.

Abbreviations

ACN, acetonitrile; ATCC, American Type Culture Collection; AUC, area under the curve; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; CRC, colorectal cancer; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; ECM, endothelial cell medium; EMAP-II, endothelial-monocyte-activating polypeptide II; GFR, growth factor reduced; HLEC, human lymphatic endothelial cells; HUVEC, human umbilical vein endothelial cells; ISCIII, Instituto de Salud Carlos III; MS, mass spectrometry; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide; P/S, penicillin/streptomycin; qPCR, quantitative PCR; ROC, receiver operating characteristic; RT-PCR, reverse transcriptase-PCR; SDHA, succinate dehydrogenase complex subunit A; SILAC, stable isotopic labeling with amino acids in cell culture; siRNA, small interfering RNA; Trp, tryptophan; VEGFC, vascular endothelial growth factor C; VEGFR3, vascular endothelial growth factor receptor 3; WB, western blot.

(Received 6 April 2021, revised 17 March 2022, accepted 17 May 2022)

doi:10.1002/1878-0261.13228

1. Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the second most common cancer in Europe and the second leading cause of cancer-related death following lung cancer. CRC appears sporadically with only a small percentage of the cases due to inherited predisposition [1]. Events leading to CRC development are driven by cumulative genetic alterations produced during decades, which induce a complex cascade of changes in the expression of transcription factors, cell signaling and cell–cell adhesion molecules, among others, that induce cancer cells to massively proliferate and acquire metastatic properties [2].

The *p53* family member, *TP73*, is translated into different isoforms [3]. *TP53* and *TP73* share key structural domains and functions [4], although their roles in tumorigenesis differ. Both genes are activated after DNA damage, triggering cell-cycle arrest and cell death. Full length TAp73 isoforms have tumor-suppressor potential [5], whereas Δ TAp73 variants lacking all or part of the transactivation domain in the amino terminal region due to alternative splicing and their transcription from a second promoter, show oncogenic properties [6].

Among the Δ TAp73 variants, Δ Np73, an isoform transcribed from the second alternative promoter, is known for its important role in cancer development, whose significant overexpression has been reported in most human cancers [1,3]. Among other characteristics, Δ Np73 has been shown to have oncogenic properties and its up-regulation is associated with shorter survival rates in different cancer types, including CRC [1,3]. However, unlike other members of the *p53*-family, effectors or downstream modulators of Δ Np73 are barely described at transcriptomic and/or proteomic level. Since cancer cells secrete proteins or protein fragments to different body fluids that can be used as biomarkers, the secretome of cancer cells constitutes a rich source of information for the identification of such biomarkers and for the characterization of altered molecules in the pathology [7].

In this context, we here performed an in-depth proteomics characterization of the transcriptional control by Δ Np73 of the secretome of human stably transfected Δ Np73 and mock colon carcinoma HCT116

cells by using high-density antibody microarrays and stable isotopic labeling with amino acid in cell culture (SILAC) to survey for altered pathways and modulated proteins due to Δ Np73 overexpression. Through the complementary combination of both proteomic methodologies, we identified a total of 51 dysregulated proteins that showed ≥ 1.5 or ≤ 0.67 fold-change in the conditioned medium. Verification of the protein alterations by Δ Np73 was performed by semiquantitative PCR, ELISA, dot-blot, and western blot (WB) on HCT116 and HCT116 *p53*^{-/-} cells to demonstrate that the presence of *p53* was not affecting protein alterations by Δ Np73. Moreover, an evaluation of selected identified proteins and their possible biomarker value in plasma from CRC patients, colorectal individuals carrying premalignant lesions and colonoscopy-negative controls was carried out. Among others, we found an important association between the overexpression of Δ Np73 and the VEGFC-EMAP-II-VEGFR3 axis and the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) regulation of lymphangiogenesis, vasculogenesis and metastasis, and further demonstrated the usefulness of BDNF as a potential CRC biomarker able to discriminate between CRC and non-CRC patients with high sensitivity and specificity.

2. Materials and methods

2.1. Cell lines, culture conditions and stable transfection of the HCT116 colon cancer cell line

The colon cancer cell line HCT116 was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). HCT116 *p53*^{-/-} cells were obtained from Horizon Discovery (Waterbeach, UK). Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and human lymphatic endothelial cells (HLEC) were purchased from Innoprot (#P10961; #P10571, Bizkaia, Spain). HCT116 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Corning #10-013-CVR, New York, NY, USA) supplemented with 10% heat-inactivated FBS (Corning #35-079-CV), 2 mM L-glutamine (Gibco; #25030-081, Waltham, MA, USA), 1% penicillin/streptomycin solution (P/S; Corning

#30-009-CI) and amphotericin B ($0.25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; Corning #30-003-CF). HUVEC cells were cultured in endothelial cell medium (ECM; Innoprot #P60104) supplemented with 5% heat-inactivated FBS, 1% endothelial cell growth supplement and 1% P/S. HLEC cells were cultured in fibronectin-coated plates and ECM medium supplemented as described below for HUVEC cells. HUVEC and HLEC cells were subjected to experimental procedures within passages 2–6.

HCT116 and HCT116 p53^{-/-} cells were stably transfected with the constructs pEF1 α -IRES-GFP (empty vector –Mock control–) or pEF1 α - Δ Np73 β -IRES-GFP (Δ Np73 vector) plasmids (kindly provided by Dr Marín and Dr Marqués, Instituto de Biomedicina, Universidad de León, Spain) using Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), according to the manufacturer's instructions. Δ Np73 overexpressing and Mock control cells were selected by cell sorting using GFP as selection marker.

2.2. Antibody microarrays, and SILAC proteomics approaches

2.2.1. Antibody microarrays, sample labeling and antibody microarray screening

RayBio Label-Based (L-series) Human Antibody Arrays 493, consisting of two equal subarrays containing 493 unique antibodies, positive and negative controls spotted in duplicate, for the simultaneous detection of multiple cytokines, chemokines, adipokines, growth factors, angiogenic factors, proteases, soluble receptors, and soluble adhesion molecules, were obtained from RayBioTech. Microarrays were probed according to the manufacturer's instructions using biotin-labeled samples followed by the incubation with streptavidin-Cy3.

HCT116- Δ Np73 or control cells were grown and maintained in DMEM supplemented with 10% dialyzed FBS, $100 \text{ units}\cdot\text{mL}^{-1}$ of penicillin/streptomycin at 37°C in 5% CO_2 . For preparation of conditioned medium, 5×10^6 HCT116- Δ Np73 or control cells were seeded to achieve confluence after 24 h. Then, cells were washed with PBS, incubated with serum-free medium for 1 h, washed again with PBS, and incubated for 48 h in serum-free DMEM supplemented with antibiotics. Cell viability, determined with 0.4% trypan blue solution (Invitrogen, Waltham, MA, USA), was higher than 95%. The conditioned medium was centrifuged at $1500 g$ to remove cell debris, and protein concentration was measured by the tryptophan (Trp) method as described [8,9], and stored at -80°C until use. For incubation of RayBio Label-Based (L-

series) Human Antibody Arrays 493, samples corresponding to two different biological replicates labeled with biotin were separately incubated on two arrays containing two equal subarrays. For biotin labeling, $30 \mu\text{g}$ of conditioned medium were incubated during 30 min at room temperature with gentle shaking with labeling reagent solution, as previously done [10]. The reaction was stopped with $3 \mu\text{L}$ of stop solution, and then the samples were dialyzed to remove free biotin. Then, protein concentration was measured by the Trp method and $3.3 \mu\text{g}$ of indicated biotinylated samples were incubated overnight at 4°C with gentle shaking on each subarray on $400 \mu\text{L}$ of blocking buffer. After washing, bound proteins were detected with the incubation of Cy3-streptavidin during 2 h at room temperature. Finally, after washing, the slides were dried by centrifugation at $260 g$ for 10 min and scanned at 532 nm. Then, the slides were scanned on the GenePix 4000B (Axon, Scottsdale, AZ, USA) and the images were generated and processed with the GENEPIX PRO 7.1 scanarray software [11,12].

Analysis, normalization, and quantification of all microarray images were performed using the GENEPIX PRO 7.1 software as previously reported [10–14]. Ratios ≥ 1.5 or ≤ 0.67 of HCT116- Δ Np73 versus Mock control cells were used as cut-off to determine protein expression alterations, as previously done [15,16].

2.2.2. SILAC cell culture and sample preparation for SILAC analyses

For metabolic labeling, HCT116- Δ Np73 or control cells were grown and maintained in DMEM containing either light [$^{12}\text{C}_6$]-L-lysine and [$^{12}\text{C}_6$]-L-arginine or heavy [$^{13}\text{C}_6$]-L-lysine and [$^{13}\text{C}_6$]-L-arginine (Dundee Cell Products, Dundee, Scotland, UK) supplemented with 10% dialyzed FBS, $100 \text{ units}\cdot\text{mL}^{-1}$ of penicillin/streptomycin at 37°C in 5% CO_2 . At least eight duplications were performed to achieve $> 98\%$ incorporation of the heavy amino acids, which was determined as previously described [7]. We carried out forward and reverse experiments to avoid labeling bias in the study.

Preparation of conditioned medium was performed as indicated above, incubating cells for 48 h in serum-free DMEM supplemented with heavy or light amino acids. Cell viability, determined with 0.4% trypan blue solution (Invitrogen), was higher than 95%. Proteins in the conditioned medium were precipitated with methanol/chloroform. Protein content was quantified by fluorescence using the Trp method, and subsequently $25 \mu\text{g}$ of protein from HCT116- Δ Np73 or control cells SILAC conditioned medium were mixed at a 1 : 1 ratio and run at 25 mA per gel in 15% SDS/

PAGE. Gels were stained with the Colloidal Blue staining kit (Invitrogen), and lanes containing forward and reverse labeling experiments were cut into 10 slices. Excised bands were cut into small pieces and destained with 50 mM ammonium bicarbonate, 50% Acetonitrile (ACN), dehydrated with ACN, and dried. Gel pieces were rehydrated with $12.5 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ trypsin in 50 mM ammonium bicarbonate and incubated overnight at 30°C . Peptides were extracted at 37°C using 100% ACN and then 0.5% TFA, dried, cleaned using ZipTip with $0.6 \mu\text{L}$ C18 resin (Millipore, Burlington, MA, USA), and reconstituted in $5 \mu\text{L}$ of 0.1% formic acid, 2% ACN, prior to mass spectrometry (MS) analysis, which was performed as previously described [7].

2.2.3. Mass spectrometry analysis, protein identification and SILAC quantification

Peptides were trapped onto a C18-A1 ASY-Column 2 cm precolumn (Thermo-Scientific, Waltham, MA, USA), and then eluted onto a Biosphere C18 column (C18, inner diameter $75 \mu\text{m}$, 10 cm long, $3 \mu\text{m}$ particle size) (NanoSeparations, Nieuwkoop, the Netherlands) and separated using a 170 min gradient from 0% to 35% Buffer B (Buffer A: 0.1% formic acid/2% ACN; Buffer B: 0.1% formic acid in ACN) at a flow-rate of $300 \text{ nL}\cdot\text{min}^{-1}$ on a nanoEasy HPLC (Proxeon, Odense, Denmark) coupled to a nanoelectrospray ion source (Proxeon). Mass spectra were acquired on an LTQ-OrbitrapVelos mass spectrometer (Thermo-Scientific) in the positive ion mode. Full-scan MS spectra (m/z 400–1200) were acquired in the Orbitrap with a target value of 1 000 000 at a resolution of 60 000 at m/z 400 and the 15 most intense ions were selected for collision induced dissociation fragmentation in the linear ion trap with a target value of 10 000 and normalized collision energy of 35%. Precursor ion charge state screening and monoisotopic precursor selection were enabled. Singly charged ions and unassigned charge states were rejected. Dynamic exclusion was enabled with a repeat count of 1 and exclusion duration of 30 s. Mass spectra *.raw files were searched against the Human Swiss Prot database (SwissProt_57.15.fasta) using MASCOT search engine (version 2.3; Matrix Science, London, UK) through PROTEOME DISCOVERER (version 1.4.1.14; Thermo, Waltham, MA, USA). Search parameters included a maximum of two missed cleavages allowed, carbamidomethylation of cysteines as a fixed modification and oxidation of methionine, N-terminal acetylation and ^{13}C -Arg, and ^{13}C -Lys as variable modifications. Precursor and fragment mass tolerance were set to 10 p.p.m. and 0.8 Da, respectively. Identified peptides were validated using Percolator algorithm

with a q -value threshold of 0.01. Relative quantification of identified peptides was performed using PROTEOME DISCOVERER. For each SILAC pair, PROTEOME DISCOVERER determines the area of the extracted ion chromatogram and computes the ‘heavy/light’ ratio. Protein ratios are then calculated as the median of all the unique quantified peptides belonging to a certain protein. The ratios among proteins in their heavy and light versions were used as fold-change. The fold change cut-off for dysregulated proteins was calculated using a permutation-based test as described [8]. Proteins were quantified with at least one peptide hit in forward and reverse experiments and a variability $\leq 20\%$. A multi-point normalization strategy was applied to normalize the data sets against the 5% trimmed mean values, which is a robust statistical measure of central tendency that normalize most of the protein ratios to 1. Briefly, the 5% of the most extreme outliers – values – were removed and the mean of the 95% remaining data was determined, and used to normalize the ratio values, and thus, minimizing the effect of these extreme outliers and centering the \log_2 ratio distribution to zero. Since metabolic conversion arginine/proline can affect quantification accuracy in some cell types, we investigated arginine to proline conversion in HCT116 cells. Using heavy proline as a variable modification, less than 1% of proline-containing peptides were heavy labeled in HCT116 cells.

2.3. Bioinformatics and statistical analysis

DAVID Database 6.8 was used to investigate for the enrichment of subcellular fractions, functional activity and deregulated functions of the quantified proteins of our proteomic dataset. STRING (<http://string-db.org/>) was used to predict biological functions and identify clusters of interacting proteins [9,17,18]. STRING version 10.5 and MCL clustering enrichment 2 with the default 0.4 confidence score were used to identify the interacting partners in the dataset. Exocarta database was used to identify differentially released proteins previously identified in exosomes and to correlate them with externalization through non-classical secretion [19].

2.4. WB and dot-blot analysis

Protein extracts from conditioned medium or protein extracts from CRC cells were prepared, and used in WB and dot-blot analyses as previously reported [7,14]. For WB analyses, alternatively $25 \mu\text{g}$ of each CRC cell protein extract or tissue protein extract, or $5 \mu\text{g}$ of each conditioned medium were run in parallel in 10% SDS/PAGE. Then, proteins were transferred

to nitrocellulose membranes (Hybond-C extra; GE-Healthcare, Chicago, IL, USA) using wet transfer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Alternatively, for dot-blot analysis 10 μ L of the secretome of HCT116 cells were deposited on nitrocellulose membranes. After blocking, membranes were incubated with specific mono- or polyclonal antibodies against the indicated proteins. Membranes were incubated at optimized dilutions with primary antibodies followed by incubation with either HRP-anti-mouse IgG (Sigma, St. Louis, MO, USA) at 1 : 2500 dilution, HRP-anti-rabbit IgG (Sigma) at 1 : 2500 dilution, or HRP-streptavidin 1 : 1000 (RayBiotech, Norcross, GA, USA). Specific reactive proteins were visualized with SuperSignal West Pico Maximum Sensitivity Substrate (Pierce, Waltham, MA, USA). A total of five different antibodies at optimized dilutions were used (Table S1). Protein bands were quantified by densitometry using QUANTITY ONE program (BioRad). All quantifications were normalized using actin or Red Ponceau staining as internal controls.

2.5. RNA extraction, semi-quantitative PCR and qPCR

RNA was extracted from cell lines with the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Limburg, the Netherlands) and quantified with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). cDNA was synthesized using the Superscript III First Strand Synthesis kit (Invitrogen).

For semiquantitative reverse transcriptase-PCR (RT-PCR), reactions were performed using specific primers for each of the 10 analyzed genes (Table S1), in triplicate. PCR products were separated on 2% agarose gel, stained with GelRed (Biotium, Hayward, CA, USA), and quantified by densitometry using QUANTITY ONE program (BioRad). All quantifications were normalized using GAPDH as internal control.

Quantitative real-time PCR was performed in a Light Cycler apparatus (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) using the LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I Kit (Roche Diagnostics). Each reaction was performed in a final volume of 20 μ L containing 2 μ L of the cDNA product sample, 0.5 μ mol·L⁻¹ of each primer, and 1 \times reaction mix including FastStar DNA polymerase, reaction buffer, deoxyribonucleotide triphosphates, and SYBR green. Primer sets for Δ Np73, EMAP-II, BDNF, p21 and p16 (Table S1) and the reaction conditions were as described previously [20–22]. The housekeeping gene succinate dehydrogenase complex subunit A (SDHA) was used to normalize gene expression results.

2.6. Plasma samples and ELISAs

Plasma samples with indicated pathological conditions were obtained from the IdISSC Biobank of the Hospital Clínico San Carlos (Madrid, Spain). A total of 60 plasma samples from CRC patients, premalignant colorectal individuals (low- and high-grade colorectal adenomas), and control individuals were used in the study (Table S2). Written informed consent was obtained from all patients.

The Institutional Ethical Review Board of the IdISSC, Hospital Clínico San Carlos, ISCIII, and the Autonomous University of Madrid approved this proteomic analysis of Δ Np73 and its validation as biomarkers of CRC. The ethical aspects and procedures laid down in the Declaration of Helsinki.

ELISA kits were purchased from RayBiotech (VEGF-C, VEGFR-3, and BDNF), and Elabscience (EMAP-II). Specificity of the ELISA kits was verified by the manufacturers. ELISA experiments were carried out using the recommended dilution for conditioned medium or plasma analyses in each case and according to the instructions of the manufacturer. The sensitivity of the ELISA kits for detection of VEGF-C, VEGFR-3, BDNF, and EMAP-II was 15, 15, 80, and 75 pg·mL⁻¹, respectively.

For the analysis of ELISA data sets, a one-tailed Student's *t*-test was performed assuming unequal variances to assess whether the means of control individuals and CRC groups were statistically different from each other. *P* values < 0.05 were considered statistically significant. Each individual protein was evaluated as marker in plasma of CRC patients and control individuals by a receiver operating characteristic (ROC) curve. All statistical analyses were done with Microsoft Office Excel. ROC curves were constructed with the *R* program (version 3.2.3), and the corresponding area under the curve (AUC) and the maximized sensitivity and specificity values were calculated using the *R* packages ModelGood and Epi.

2.7. Functional cell-based assays

2.7.1. Proliferation assay

For the proliferation assays 2 \times 10⁴ cells were seeded in quadruplicates in 96-well E-plates to carry out an MTT cell proliferation assay (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA). At 24, 48, and 72 h post-transfection, MTT reagent was added and absorbance was measured on a microplate reader at 570 nm (Multiskan Ex; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

2.7.2. Migration assay

For migration assays HUVECs or HLECs (40 000 cells per well) were seeded in the top of 24-well cell culture inserts (Falcon®; #353097) incorporating polyethylene terephthalate with 8 μ m pores. Previously, cells were treated with cell tracker™ Green CMFDA (Invitrogen; #C2925) following the manufacturer's indications. Conditioned media from HCT116- Δ Np73 and Mock control cells were added in the lower well of a Falcon 24well companion plate. After 24–48 h post-seeding, cells in the lower media and well were collected individually and washed with PBS 1 \times to eliminate media residues. Migrated cells were resuspended in 100 μ L of PBS 1 \times and placed in a Costar 96 well black opaque plate. Then, fluorescence from the cell tracker was measured in a fluorimeter. In the case of the invasion assay, 24-well cell culture inserts were pre-coated with 500 μ g·mL⁻¹ of Matrigel GFR at 37 °C overnight.

2.7.3. Transfection of BDNF and AIMP1 small interfering RNA

HCT116- Δ Np73 stably transfected cells were cultured in ECM and transiently transfected with a Negative Control small interfering RNA (siRNA; Invitrogen™ *Silencer*™ Negative Control No1 siRNA AM4611), BDNF siRNA (Dharmacon™ ON-TARGET Plus siRNA SMARTPool #L017626-00-0005, Lafayette, CO, USA) or AIMP1 siRNA (Sigma-Aldrich MISSION^R esiRNA EHU075101, St. Louis, MO, USA) using JetPrime (Polyplus Transfection, Illkirch, France) according to the manufacturer's recommendations. In the BDNF siRNA transfection, at 24 h post-transfection, medium's cells were collected individually and BDNF mRNA was measured. In the AIMP1 siRNA transfection, at 48 post-transfection, medium's cells were collected individually and AIMP1 mRNA was measured. After optimization of transfection times, the interference of mRNAs was observed the better at 24 h for BDNF and 48 h for AIMP1.

2.7.4. Tube formation assay

HCT116- Δ Np73 and mock cells were seeded at 6×10^5 cells on 100 mm dishes with DMEM. At 6–8 h post-seeding, DMEM was replaced for 10 mL of ECM for each 100 mm dish. Conditioned media were collected after 72 h without reaching maximum confluence. Conditioned media were centrifuged at 405 g for 6 min to precipitate cells and recollect the cell-free media.

Matrigel (growth factor reduced) (BD Bioscience, East Rutherford, NJ, USA) was placed in μ -Slide angiogenesis

(Ibidi; #81506, Gräfelfing, Germany) plates following the manufacturer's recommendations. HLEC or HUVEC cells were seeded in the wells with conditioned media from HCT116- Δ Np73 or Mock control cells and BDNF or AIMP1 siRNA transfection. Previously, conditioned media were refreshed with 25% of ECM medium. At the endpoint of each assay, images were acquired using a Cell Observer microscope. The formation of tube-like structures was quantified using the Angiogenesis analyzer (IMAGEJ, NHI, Bethesda, MA, USA).

2.7.5. Wound healing assay

Cells were grown on six-well dishes. Upon confluency cells were scratched using a 200- μ L tip. Wound scratch was photographed under an inverted microscope every 2 h. Scratch area was calculated using the IMAGEJ software. Wound healing rate was calculated as the width at 0 h minus wound width at 60 h and expressed as speed of closure per hour [23]. Experiments were performed five times.

2.8. *In vivo* experiments in immunosuppressed mice

A group of 10 female nu/nu mice (Charles River, Wilmington, MA, USA) aged 6 weeks per group, were inoculated with stably transfected Δ Np73 or Mock control HCT116 cells. After 3 weeks mice were sacrificed and lung, kidney and livers were resected and evaluated for macrometastasis. All procedures were approved by the Institutional Organism for Animal Welfare (OEBA) and according to the European, Spanish, and local regulations.

3. Results

We have here performed the analysis of the secretome of HCT116- Δ Np73 CRC cells and control cells using antibody microarrays-driven proteomics for the profiling of alterations in 493 immunomodulators, cytokines, chemokines, adipocytokines, growth factors, proteases, and other secreted proteins, which are usually missed in mass-spectrometry quantitative experiments. Then, to get the most comprehensive analysis of altered secreted proteins associated to the overexpression of Δ Np73, a quantitative SILAC analysis was also performed. A schematic representation of the work-flow of the study, from collection of the secretome of CRC cells, screening of the antibody microarrays and SILAC data analysis and bioinformatics, to validation of the protein alterations by PCR, WB, dot-blot, ELISA, and functional experiments is depicted in Fig. S1.

3.1. Profiling of Δ Np73-associated protein alterations in the secretome of HCT116 CRC cells by antibody microarrays

First, we confirmed the overexpression of Δ Np73 stably transfected HCT116 CRC cells in comparison to control cells by qPCR (Fig. 1A).

We then investigated the secretome of two different biological replicates of HCT116- Δ Np73 CRC cells and

control cells for alterations in the expression of immunomodulators, cytokines, chemokines, adipocytokines, growth factors, and proteases using the L-series antibody microarrays. Microarray images of the indicated protein samples labeled with biotin followed by incubation with Cy3-streptavidin are shown in Fig. 1B.

From the 493 chemokines, proangiogenic, and growth factors analyzed, we observed a differential

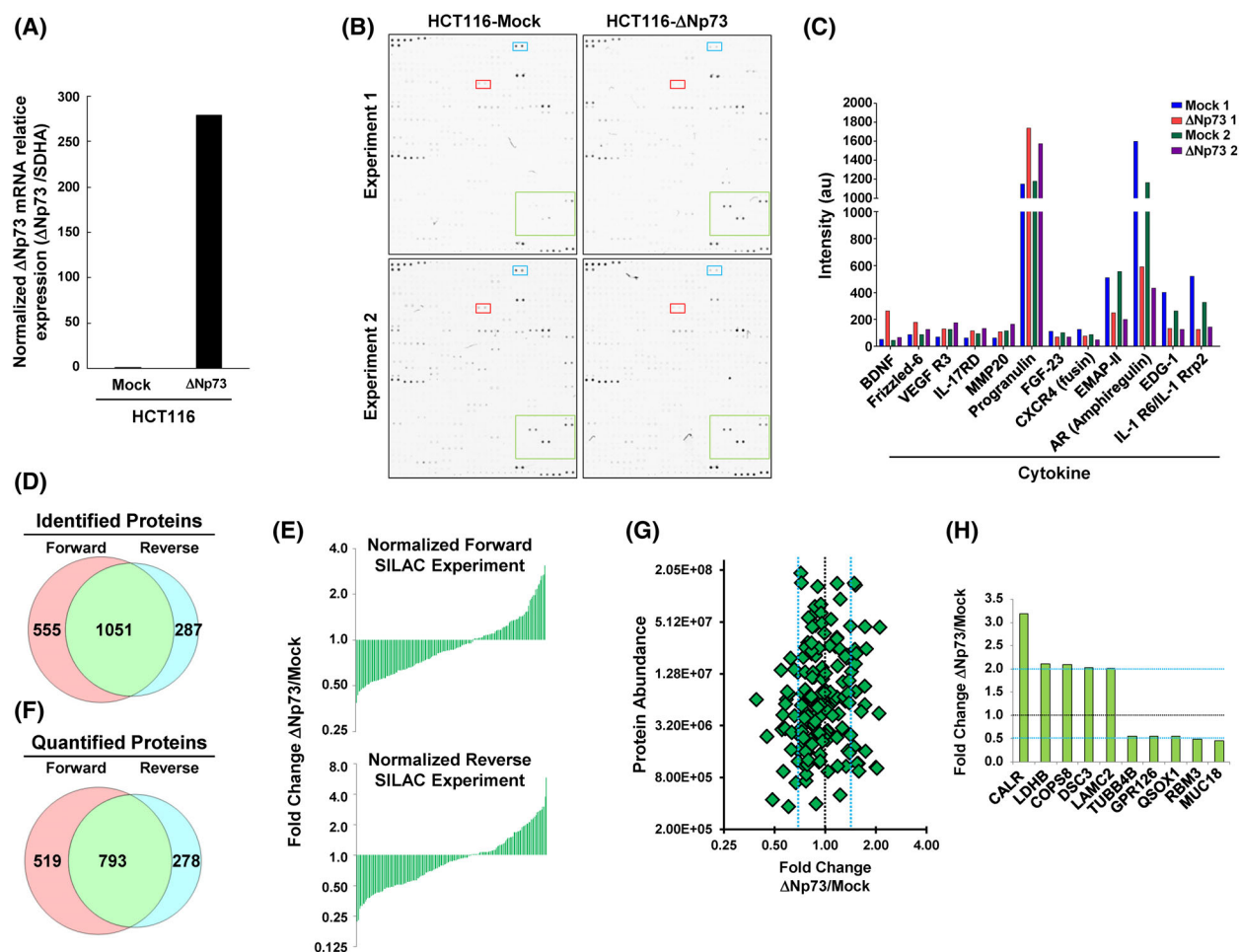


Fig. 1. The overexpression of Δ Np73 in CRC cells produced the dysregulation of cytokines, growth factors, cell signaling proteins, and proteins related to tumorigenesis, metastasis and cell–cell adhesion as determined by antibody microarrays and SILAC quantitative proteomic analyses. (A) Confirmation by qPCR of the overexpression of Δ Np73 in stably transfected HCT116 CRC cells in comparison to mock control cells. Triplicates were analyzed ($n = 3$). (B) The secretome of two different biological replicates of HCT116- Δ Np73 CRC cells and mock control cells was analyzed using L-series antibody microarrays. (C) Microarrays were incubated with biotin-labeled samples followed with Cy3-streptavidin, and differential expression for proteins due to Δ Np73 overexpression was found in both biological replicates. a.u., arbitrary units. (D) For the SILAC approach, protein extracts from the conditioned media from metabolically labeled HCT116- Δ Np73 and mock cells were mixed 1 : 1 to perform forward and reverse experiments and run on SDS-polyacrylamide gels. A total of 8730 and 6862 peptides in forward and reverse experiments were found, resulting in 1586 and 1338 identified proteins, respectively, with 1051 proteins in common in both experiments. (E, F) After data normalization using the 5% trimmed mean (E), 1590 proteins were quantified in both SILAC experiments (F), with 793 proteins quantified in common. (G) A total of 37 dysregulated proteins by Δ Np73 identified in the secretome of HCT116 cells with variability $\leq 20\%$, and fold-change ≥ 1.5 . At least two peptides in both biological replicates, with 19 and 18 up- and down-regulated proteins, respectively, were observed. (H) The top 10 dysregulated proteins observed by SILAC were represented by a bar-graph.

expression in both biological replicates for 14 of them (Fig. 1C; Table 1), with BDNF, Frizzled-6 and VEGF R3 as the most upregulated and IL-1 RRP2, EDG-1, Amphiregulin and EMAP-II as the most downregulated factors by Δ Np73 overexpression.

3.2. Identification and quantification of protein alterations in conditioned media using SILAC

HCT116- Δ Np73 and mock cells were metabolically labeled in SILAC medium at least for eight doublings to perform forward and reverse experiments quantitative proteomic analyses.

Conditioned media from metabolically labeled cells were harvested after 48 h, concentrated, and quantified. Protein extracts from the conditioned media were mixed 1 : 1 to perform forward and reverse SILAC experiments and run on SDS-polyacrylamide gels. Then, 10 bands were excised and in-gel digested with trypsin. Peptides were separated using reverse phase and analyzed on a linear ion trap OrbitrapVelos mass spectrometer (Thermo Scientific). A total of 8730 and 6862 peptides were identified in forward and reverse experiments resulting in 1586 and 1338 identified proteins, respectively, with 1051 proteins in common in both experiments (Fig. 1D; Table S3). For quantification, peptide ratios were calculated using PROTEOME DISCOVERER by comparing the intensities of the light- and heavy-labeled precursor ions at high resolution. Proteins were quantified with at least one peptide hit in forward and reverse experiments. Δ Np73/Mock ratios among proteins in the heavy and light versions were used as fold-change. We normalized the data sets against the 5% trimmed mean to minimize the effect of extreme outliers and to center the protein fold change distribution to one (Fig. 1E) [24]. In total, 1590 proteins were quantified in both SILAC experiments, with 793 proteins quantified in common (Fig. 1F).

After normalization, by using a permutation-based statistical test, we fixed a fold-change of ≥ 1.5 (mean of two experiments) as significant for identification of dysregulated proteins [7,15]. In total, we found 37 dysregulated proteins by Δ Np73 in the secretome of HCT116 cells with variability $\leq 20\%$, fold-change ≥ 1.5 , and at least two peptides per protein in each biological replicate. Among them, 19 and 18 proteins showed up- and down-regulation, respectively (Fig. 1G, Table 1). From the total of quantified proteins, we observed with about a twofold change dysregulation CALR, LDHB, COPS8, DSC3, and LAMC2 as the top up-regulated proteins, and TUBB4B, GPR126, QSOX1, RBM3, and MUC18 as

the most downregulated factors by Δ Np73 overexpression (Fig. 1H).

According to Gene Ontology analysis, among the top five enriched fractions, extracellular exosome and proteins from the extracellular space represented the 64.7% of the total number of quantified dysregulated proteins (33 proteins out of 51 dysregulated proteins in total, Table 1). In addition, 26 proteins with localization on cytoplasm or cytosol and 16 plasma membrane proteins were observed. Moreover, to analyze if quantified proteins could be present in exosomes, we used the Exocarta database, which contains proteins identified in exosomes via proteomic analyses [19]. Thirty-nine of 51 proteins had been previously identified in exosomes (Table 1). Therefore, in total, from both databases 43 of 51 dysregulated proteins (84.3%) have been previously identified either in exosomes or in the extracellular space, and thus, validating the presence of the proteins of the dataset in the secretome.

3.3. Biological function, pathway analysis, and interaction networks for dysregulated proteins induced by Δ Np73

In total, from antibody microarrays and SILAC proteomics analyses, 51 proteins were found to be dysregulated by Δ Np73 in the HCT116 cells, with 27 and 24 proteins showing up-regulation and down-regulation (Table 1).

Among them, it was observed that the dysregulation of seven receptors (FLT4 -VEGFR3-, IL17RD, PTPRF, CXCR4, S1PR1, IL-36R, and PVR) and two proteins (APEX1 and CRABP2) described as transcription factors, not previously described to be altered by Δ Np73. We also found several proteins (APEX1, GLO1, CDH3, PTPRF, QSOX1, DSG2, or DSC3) whose dysregulation has been associated to the tumorigenesis process, prognosis of patients and resistance to treatment [25–29]. In addition, as the most altered process modulated by Δ Np73, we found that about 20% of the dysregulated proteins were implicated in cell adhesion. Moesin, calreticulin, sorcin, DSG2, DSC3, and LGALS3BP were found to be upregulated and Talin-1, CDH3, PTPRF, PDCD6IP, and COL6A1 downregulated by Δ Np73.

To identify altered biological functions that might play a role in CRC, differentially secreted proteins due to Δ Np73 were analyzed using STRING [30] (Fig. S2). Using MCL algorithm (value 2), we defined seven clusters containing three or more proteins. Among the three large clusters containing four interacting proteins, there was a cluster involved in cell adhesion and

Table 1. Proteins differentially regulated by Δ Np73 identified by antibody microarrays and SILAC in the secretome of HCT116 CRC cells with at least 1.5-fold change variation.

	Name	Description	Uniprot accession	Mean fold change Δ n73/mock	Σ Coverage	Σ # unique peptides	Σ # peptides	Σ # PSMs	DAVID ^a	Exocarta
Antibody microarray	BDNF	Brain-derived neurotrophic factor	P23560	3.19	–	–	–	–	–	Y
	FZD6	Frizzled-6	O60353	1.72	–	–	–	–	–	Y
	FLT4 (VEGFR3)	Vascular endothelial growth factor receptor 3	P35916	1.64	–	–	–	–	–	N
Secretome SILAC	IL17RD	Interleukin-17 receptor D	Q8NFM7	1.64	–	–	–	–	–	N
	MMP-20	Matrix metalloproteinase-20	O60882	1.56	–	–	–	–	Extracellular space	N
	IL20	Interleukin-20	Q9NYY1	1.46	–	–	–	–	Extracellular space	N
	GRN	Programulin	P28799	1.42	–	–	–	–	Both	Y
	LCN1	Lipocalin-1	P31025	1.41	–	–	–	–	Both	Y
	FGF23	Fibroblast growth factor 23	Q9GZV9	0.66	–	–	–	–	Extracellular space	N
	CXCR4	C-X-C chemokine receptor type 4	P61073	0.59	–	–	–	–	Exosome	Y
	EMAP-II (AIMP1)	Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 1	Q12904	0.43	–	–	–	–	Extracellular space	Y
	AR	Androgen receptor	P15514	0.37	–	–	–	–	Extracellular space	Y
	S1PR1 (EDG-1)	Sphingosine 1-phosphate receptor 1	P21453	0.41	–	–	–	–	Extracellular space	N
Secretome SILAC	IL-36R (IL-1Rrp2)	Interleukin-1 receptor-like 2	Q9HB29	0.34	–	–	–	–	–	N
	Calreticulin variant	Calreticulin variant	Q53G71	3.19	20.44	6	6	21	–	Y
	LDHB	L-Lactate dehydrogenase B chain	P07195	2.11	39.82	10	11	133	Exosome	Y
	COPS8	Isoform 2 of COP9 signalosome complex subunit 8	Q99627	2.09	39.38	4	4	17	Exosome	Y
	DSC3	Isoform 3B of desmocollin-3	Q14574	2.03	3.22	3	3	46	–	Y
	LAMC2	Isoform short of laminin subunit gamma-2	Q13753	2	7.74	7	7	13	Extracellular space	Y
	GLO1	Isoform 2 of lactoylglutathione lyase	Q04760	1.76	34.32	6	6	31	Exosome	Y
	APEX1	DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase	G3V5Q1	1.74	23.97	5	5	11	–	Y
	MSN	Moesin	P26038	1.72	28.25	10	18	84	Both	Y
	SRI	Sorcin	C9J0K6	1.72	14.84	2	2	7	Exosome	Y
	DDB1	DNA damage-binding protein 1	Q16531	1.72	16.14	16	16	41	Both	N
	PYGL	Isoform 2 of Glycogen phosphorylase, liver form	P06737	1.64	22.51	14	17	49	Exosome	Y
	PFAS	Phosphoribosylformylglycinamide synthase	A8K8N7	1.58	3.29	3	3	5	Exosome	Y
	MARCKSL1	MARCKS-related protein	P49006	1.57	14.36	2	2	13	Exosome	Y
		Aspartate aminotransferase	B3KUZ8	1.55	13.75	4	4	9	–	N

Table 1. (Continued).

Name	Description	Uniprot accession	Mean fold change Δnp73/mock	ΣCoverage	Σ# unique peptides	Σ# peptides	Σ# PSMs	DAVID ^a	Exocarta
Aspartate aminotransferase									
DSG2	Desmoglein-2	Q14126	1.53	16.82	13	13	56	Exosome	Y
ATP5F1	ATP synthase F1(0) complex subunit B1, mitochondrial	Q5QNZZ	1.52	35.9	6	6	18	Exosome	N
LGALS3BP	Galectin-3-binding protein	Q08380	1.51	33.16	15	15	117	Both	Y
TIMP2	TIMP metalloproteinase inhibitor 2	24R8V7	1.51	26.26	5	5	21	Exosome	Y
VDAC1	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	P21796	1.5	49.47	9	10	33	Exosome	Y
EIF3I	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	Q13347	0.67	20	6	6	21	Exosome	Y
CDH3	Isoform 2 of Cadherin-3	P22223	0.66	12.63	6	6	29	Exosome	Y
CAPZB	Capping protein (actin filament) muscle Z-line, beta	B1AK87	0.66	38.08	4	10	29	Exosome	Y
PDCD6IP	Programmed cell death 6-interacting protein	Q8WUM4	0.63	20.51	13	13	22	Exosome	Y
PTPRF	Isoform 2 of Receptor-type tyrosine-protein phosphatase F	P10586	0.63	9.22	13	13	26	Exosome	Y
LGALS1	Galectin-1	P09382	0.62	42.22	5	5	87	Both	Y
CRABP2	Cellular retinoic acid-binding protein 2	P29373	0.61	61.59	7	7	35	Exosome	Y
LRRFIP1	Isoform 3 of Leucine-rich repeat flightless-interacting protein 1	Q32MZ4	0.61	5.05	3	3	7	Exosome	Y
COL6A1	Collagen alpha-1(VI) chain	87X0S5	0.59	16.28	12	12	34	Exosome	Y
PVR	Poliovirus receptor	B3KSS4	0.59	6.91	2	2	18	Exosome	Y
WDR1	WD repeat-containing protein 1	O75083	0.58	21.12	10	10	38	Exosome	Y
TLN1	Talin-1	Q9Y490	0.58	9.88	16	16	39	Exosome	Y
RPA1	Replication protein A 70 kDa DNA-binding subunit	I3L4R8	0.56	21.41	5	5	11	Exosome	Y
TUBB4B	Tubulin beta-4B chain	P68371	0.56	35.73	4	11	43	Exosome	Y
GPR126	Isoform 2 of G-protein coupled receptor 126	Q86SQ4	0.55	3.6	3	3	11	Exosome	N
QSOX1	Sulphydryl oxidase 1	O00391	0.55	19.68	12	12	37	Both	Y
RBM3	RNA-binding protein 3	P98179	0.49	27.39	3	3	8	Exosome	Y
MUC18	Cell surface glycoprotein MUC18	B3KXZ9	0.45	16.95	6	6	13	Exosome	N

^aPresence in extracellular space, in exosomes, or in both locations as retrieved from Gene Ontology from DAVID is indicated.

migration with CXCR4, S1PR1, LGALS1, and MCM, another cluster involving MSN, CALR, and CAPZB with the main edge on WDR1, which induces disassembly of actin filaments in conjunction with ADF/cofilin family proteins, and the last cluster containing APEX1, DDB1, RPA1, and COPS8 mainly involved in DNA binding and DNA repair binding.

In summary, Δ Np73 produces the dysregulation of cell adhesion proteins, transcription factors, receptors, and previously published proteins related to cancer or cancer metastasis, with most of them not previously identified as modulated by Δ Np73. All of them are producing important changes affecting cellular adhesion, cell growth, cell proliferation and cell death and survival, increasing the tumorigenesis and metastatic properties of CRC cells [31,32].

3.4. Validation of dysregulated proteins

We performed an initial validation of Δ Np73-dysregulated proteins by PCR, WB, dot-blot and ELISA (Fig. 2). First, we tested by PCR those genes altered by the overexpression of Δ Np73 related to tumorigenesis as QSOX1, APEX1, MARCKSL1, CRABP2, CXCR4, or DDB1 and cell–cell adhesion as DSC3, DSG2, or WDR1. A good correlation was observed between the mRNA expression alteration by Δ Np73 and the fold-change quantified by proteomics. Therefore, we confirmed the dysregulation of all analyzed mRNAs in stably transfected Δ Np73 and mock cells at similar extents than that previously observed by proteomics (Fig. 2A).

We next evaluated at protein level the dysregulation of BDNF, VEGFR3, EMAP-II, and VEGFC by dot-blot, ELISA and/or WB analyses (Fig. 2B–D). BDNF, VEGFR3, VEGFC, and EMAP-II dysregulation was confirmed at protein level by dot-blot and/or ELISA, with similar dysregulation observed between both stably transfected cells with that observed by proteomics (Fig. 2B,C). In addition, the protein dysregulation of EMAP-II and BDNF by Δ Np73 overexpression was further evaluated by WB with specific antibodies and stably transfected HCT116 CRC cells with low, medium, and high levels of Δ Np73 as determined by qPCR after cell sorting (data not shown). The protein content of EMAP-II and BDNF in HCT116 cells correlated with the Δ Np73 levels (Fig. 2D and Fig. S3).

Finally, to further confirm these proteins as effectors of Δ Np73 and that the presence of p53 was not-affecting their dysregulation, the secretome and the total RNA of HCT116 p53^{-/-}- Δ Np73 and mock control cells were analyzed. First, Δ Np73 overexpression was confirmed in HCT116 p53^{-/-}- Δ Np73 in

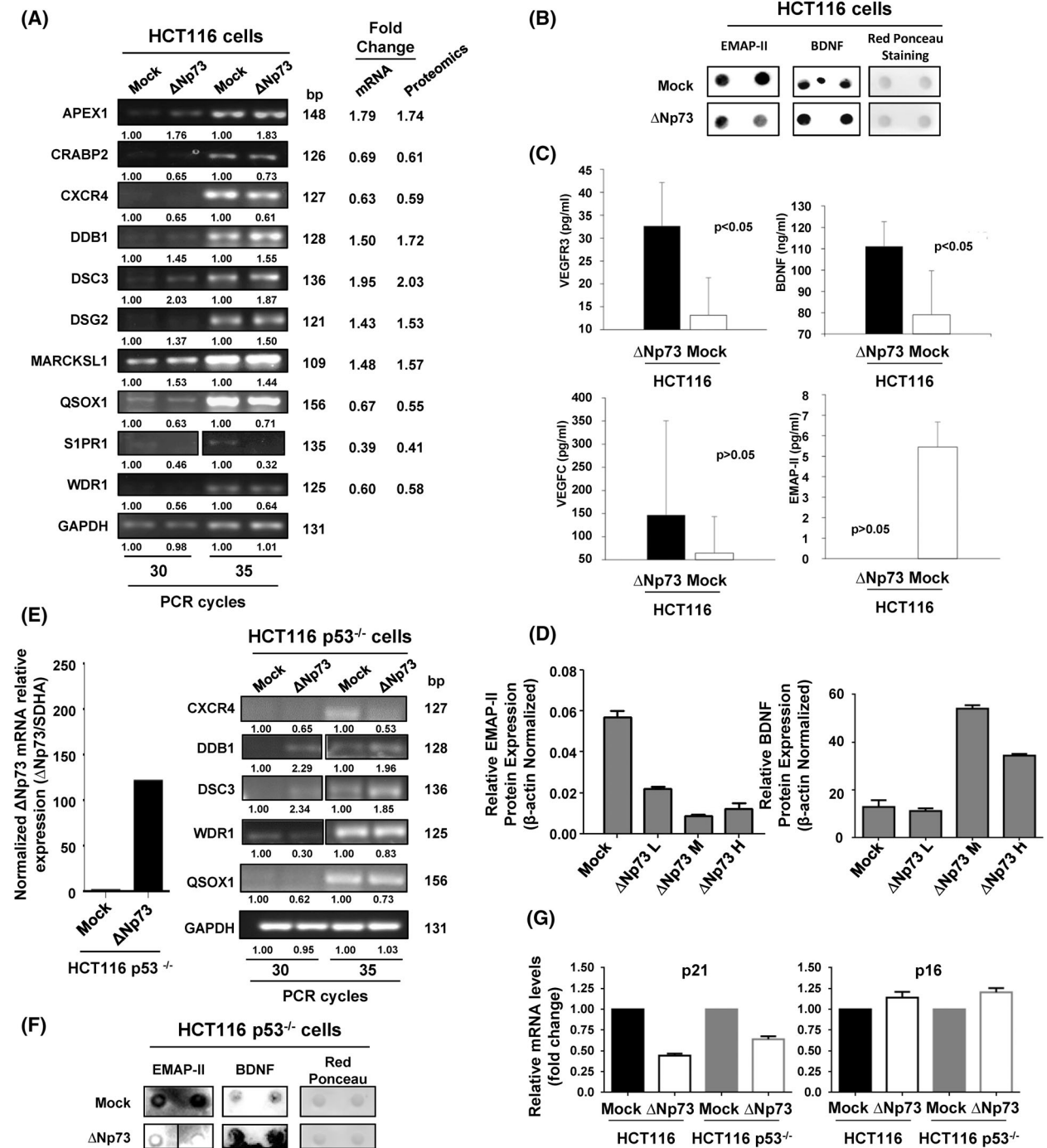
comparison to mock control cells. Then, selected markers were analyzed by PCR. All of them (CXCR4, DDB1, DSC3, WDR1, and QSOX1) showed dysregulation at similar extents in HCT116 and HCT116 p53^{-/-} cells upon Δ Np73 overexpression (Fig. 2E). Next, we analyzed the dysregulation of BDNF and EMAP-II at protein level in the secretome of HCT116 p53^{-/-}- Δ Np73 and mock cells by dot-blot analysis (Fig. 2F). A good correlation was observed between their protein expression alteration by Δ Np73 in HCT116 p53^{-/-} and HCT116 cells (Fig. 2B,F). Finally, we analyzed the expression levels of the p53 target genes p21 and p16 in HCT116 and HCT116 p53^{-/-} cells upon Δ Np73 overexpression by qPCR (Fig. 2G). p21 and p16 showed similar expression levels upon Δ Np73 overexpression in HCT116 p53^{-/-} and HCT116 cells.

Collectively, our results confirmed that although the expression of some p53 target genes could be affected by Δ Np73 overexpression, p53 should not be affecting the dysregulation of most of the identified effectors of Δ Np73 identified here by proteomics. In this sense, dysregulation of CXCR4, DDB1, DSC3, WDR1, and QSOX1 at mRNA level, and BDNF and EMAP-II at protein level were observed at similar extents in HCT116 and HCT116 p53^{-/-} cells, which confirmed them as Δ Np73 effectors.

3.5. BDNF, VEGFR3, VEGFC, and EMAP-II analysis as blood-based candidate biomarkers for colorectal cancer diagnosis

Next, since there are evidences that Δ Np73 dysregulation in CRC takes place early during tumorigenesis [31], we hypothesized that some of the overexpressed effectors of Δ Np73 in the secretome could serve as plasma biomarkers of CRC. Thus, we tested and quantified the presence of BDNF, VEGFC, VEGFR3, and EMAP-II effectors of Δ Np73 in plasma from CRC patients, patients with premalignant lesions and controls using commercially available ELISAs (Fig. 3; Fig. S3).

Using 60 plasma samples (20 from patients with premalignant cancer lesions, 20 CRC patients stage III and IV, and 20 from control individuals), levels in plasma for BDNF (median \pm SD = 227.93 \pm 78.75 ng·mL⁻¹ for colorectal patients, 273.40 \pm 60.99 ng·mL⁻¹ for premalignant subjects, and 78.05 \pm 63.94 ng·mL⁻¹ for controls), and EMAP-II (101 665 \pm 24 177 pg·mL⁻¹ for controls, 100 590 \pm 34 548 pg·mL⁻¹ for premalignant subjects, and 76 985 \pm 34 839 pg·mL⁻¹ for CRC patients), significantly discriminated patients from controls samples for BDNF and EMAP-II (*P*-



value < 0.05) (Fig. 3). We have also evaluated the correlation between the Δ Np73 mRNA levels in tissue and these proteins levels in plasma from patients with cancer ($n = 6$) and subjects with premalignant lesions ($n = 17$), obtaining a potential correlation for BDNF ($r = 0.464$ for patients with cancer and $r = 0.552$ for subjects with premalignant lesions) and for EMAP-II

($r = -0.813$ for patients with cancer). On the other hand, values for VEGFC and VEGFR3 were not significant (Fig. S3).

In addition, we determined the usefulness as candidate biomarkers in plasma of the significant effectors able to discriminate CRC and premalignant individuals from controls (BDNF and VEGFR3) calculating

Fig. 2. Validation of Δ Np73-dysregulated proteins. Validation of the dysregulated proteins found was carried out using different methodologies. (A) Dysregulation of selected genes due to the stably overexpression of Δ Np73 was firstly confirmed by PCR in comparison to stably transfected mock control cells. The image is representative of four different experiments where 30 or 35 PCR cycles were performed. GAPDH was used as control of the assay. bp, base pair. (B) At protein level, the dysregulation of BDNF, and EMAP-II was verified in the conditioned media of HCT116 mock control cells by dot-blot. Red Ponceau staining was used as loading control. Two independent biological replicates were measured for each condition assessed. (C) Quantification of BDNF, VEGFC, and VEGFR3 in the conditioned medium or EMAP-II in cell extracts was performed by ELISA. One-tailed Student's *t*-test was performed. All values are expressed as median \pm standard deviation. Significant data were determined for VEGFR3 and BDNF, and almost significant for EMAP-II ($P = 0.06635$). (D) Dysregulation of EMAP-II and BDNF was also verified by WB, using β -actin as loading control. Quantification data is shown. L, low; M, medium; H, high are referred to the Δ Np73 levels after cell sorting of HCT-116 CRC cells, where a lower (EMAP-II) or higher (BDNF) expression is observed according to the expression of Δ Np73. All results either at mRNA or protein level showed consistency with the alterations observed by proteomics. Triplicates were analyzed with Mann–Whitney *U*-test. Error bars indicate standard deviation. (E) Left, confirmation by qPCR of the overexpression of Δ Np73 in stably transfected HCT116 p53^{-/-} CRC cells in comparison to mock control cells. Right, dysregulation of selected genes due to stably overexpression of Δ Np73 in HCT116 cells was confirmed by PCR in HCT116 p53^{-/-} cells in comparison to stably transfected mock control cells to demonstrate the presence of p53 was not affecting their dysregulation. The image is representative of four different experiments where 30 or 35 PCR cycles were performed. GAPDH was used as control of the assay. (F) The dysregulation of BDNF and EMAP-II was also confirmed in the conditioned media of mock control and Δ Np73-HCT116 p53^{-/-} cells by dot-blot. Red Ponceau staining was used as loading control. Two independent biological replicates were measured for each condition assessed. (G) Dysregulation of the p53 target genes p21 and p16 in HCT116 and HCT116 p53^{-/-} Δ Np73 and mock control cells was analyzed by qPCR. Data were normalized with SDHA as reference gene. Triplicates were analyzed with Mann–Whitney *U*-test. Error bars indicate standard deviation.

its individual sensitivity and specificity by means of ROC curves. Individual AUC values for BDNF for discriminating premalignant individuals from controls were 96.9% (sensitivity 83.3% and specificity 100%), 87.5% (sensitivity 90% and specificity 65.0%) for CRC patients from controls, and 92% (sensitivity 68.4% and specificity 100%) for all patients from controls (Fig. 3B). Regarding EMAP-II AUC value for discriminating controls and premalignant individuals from CRC patients was 69.8% (sensitivity 70% and specificity 80.8%) (Fig. 3F). For EMAP-II analysis, 8 plasma samples from control subjects were available.

Collectively, these results confirm the predictive value of Δ Np73 effector BDNF as CRC biomarker in plasma of patients.

3.6. Implication of Δ Np73 and its effectors in metastasis formation, vasculogenesis and lymphangiogenesis

As many of the Δ Np73 putative effector targets identified in this study are related to the metastatic process, we decided to evaluate the homing and metastatic potential of HCT116 stably overexpressing Δ Np73 cells (HCT116- Δ Np73) and mock cells (HCT116-mock) by tail vein injection. After 3 weeks post-injection mice were sacrificed and lungs, liver and kidney were extracted and examined. Three out of 10 mice injected with HCT116- Δ Np73 presented lung metastasis versus none of the control mice, showing a statistical trend ($P = 0.1$; by the Fisher's exact test). In contrast, none control mice exhibited metastasis in any of the evaluated organs. A representative *ex vivo* lung

metastasis is shown (Fig. S4). In concordance with the results observed in mice, those cells over-expressing Δ Np73 promotes proliferation [33], and *in vitro* migration as a statistically significant wound healing rate was observed (Fig. S4).

Since several of the top up- or down-regulated proteins by Δ Np73 were linked to vasculogenesis and lymphangiogenesis, we carried out different cell-based functional analysis to evaluate the implication of Δ Np73 and their effectors in these processes (Figs 4 and 5).

HCT116- Δ Np73 secretome clearly promotes proliferation and invasion of both HUVEC and HLEC primary cells compared to HCT116-mock secretome (Fig. 4A,B). Images of the tube formation assay were quantitatively evaluated for number of segments, number of master segments, junctions, meshes, total length of vascular structures, total segment length, and total master length. Analysis revealed a statistically significant increase in these parameters in both cell types, indicating the paracrine implication of Δ Np73 secreted effectors in the formation of new blood and lymphatic vessels (Fig. 4C).

BDNF and EMAP-II are known to play a role in angiogenesis and vascular patterning, thus, we sought to determine whether Δ Np73 promotion of vascular and lymphatic endothelial tube formation is supported through these factors. We performed siRNA silencing experiments of BDNF and EMAP-II on HCT116 stably transfected cells with Δ Np73. The efficiency of siRNA down-regulation on the targets was confirmed by PCR (Fig. 5A). Next, the conditioned medium of BDNF and EMAP-II transiently silenced cells was

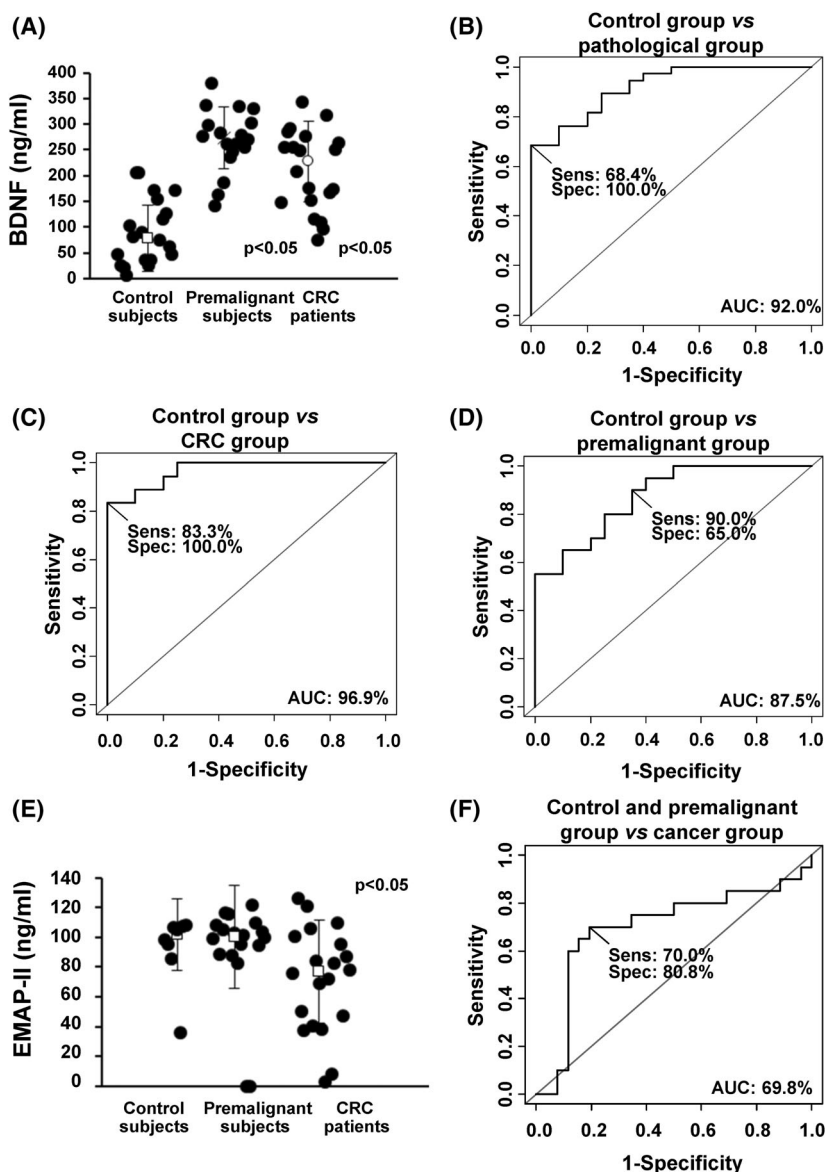


Fig. 3. Evaluation of the plasma biomarker potential of selected identified proteins. (A) Quantification of BDNF using commercially available ELISAs in serum from control subjects, premalignant individuals, and CRC patients ($n = 20$ for each group). All values are expressed as median \pm standard deviation. One-tailed Student's t -test was performed. (B–D) Determination of the BDNF value as discriminating plasma biomarker between control individuals and pathological subjects was carried out through ROC curves calculating their individual (B, C) and combined AUC (D). Sens, sensitivity; Spec, specificity. (E) Quantification of EMAP-II using commercially available ELISAs in serum from control subjects ($n = 8$), premalignant individuals ($n = 20$), and CRC patients ($n = 20$). All values are expressed as median \pm standard deviation. One-tailed Student's t -test was performed. (F) Determination of the EMAP-II value as discriminating plasma biomarker between control + premalignant group and cancer group was carried out through ROC curves calculating AUC. BDNF and EMAP-II plasma levels significantly discriminated between control and premalignant and CRC patients ($P < 0.05$).

used in the tube formation assays. A significant inhibition on blood and lymphatic vessel formation was observed with the silencing of BDNF (Fig. 5B), and as expected a significantly promotion of blood vasculature and lymphatic structures when interfering EMAP-II (Fig. 5C).

4. Discussion

Cumulative data support Δ Np73 as the main TP73 isoform conferring oncogenic properties in CRC [31,33–36]. Therefore, since the mechanisms and target effectors underlying these oncogenic functions are

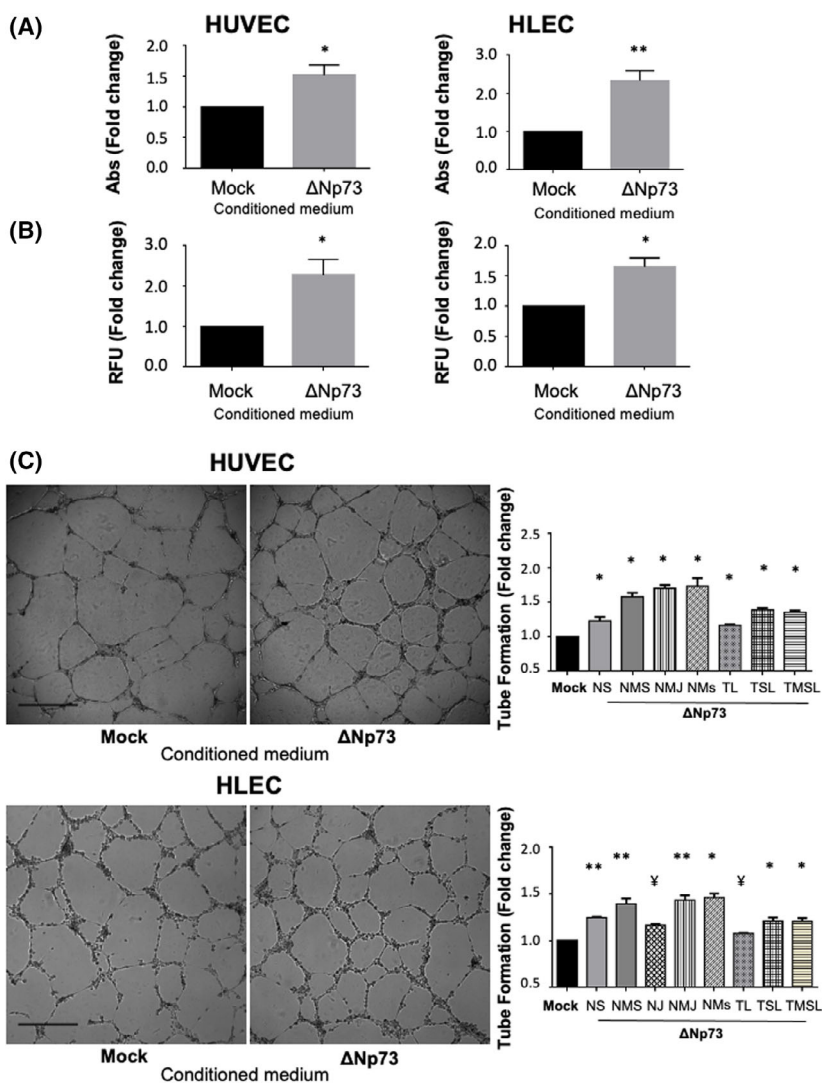


Fig. 4. Δ Np73 promotes angiogenesis and lymphangiogenesis *in vitro*. (A–C) HUVEC and HLEC primary cells were treated with conditioned media from HCT116-Mock and HCT116- Δ Np73 colon cancer cells. (A) Proliferation potential performed with the MTT assay. Five replicates of each experimental condition were measured and analyzed with Mann–Whitney *U*-test. Error bars indicate standard deviation. (B) Invasion capacity measured with a Transwell system using Matrigel as barrier. Five replicates of each experimental condition were measured and analyzed with Mann–Whitney *U*-test. Error bars indicate standard deviation. (C) Cell tube formation (scale bar = 500 μ m). The parameters recorded are NS (number of segments); NMS (number of master segments); NJ (number of junctions); NMJ (number of master junctions); NMs (number of meshes); TL (total length); TSL (total segment length); TMSL (total master segment length). Five replicates of each experimental condition were measured and analyzed with Mann–Whitney *U*-test. Error bars indicate standard deviation. Statistical significance: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; $\text{¥}P = 0.06$; RFU, fluorescence arbitrary units; Abs, absorbance.

currently of great interest, we decided to specifically study the target protein effectors of Δ Np73 in CRC, and functionally explored their role in the tumorigenesis process. Importantly, to determine that the specificity of the Δ Np73 effectors was non-related to the inactivation of p53, we also confirmed their effector role in p53^{-/-} cells.

The use of high accuracy and sensitivity mass spectrometry combined with SILAC labeling together with

the use of antibody microarrays for the comparison of the conditioned medium from Δ Np73 and Mock stably transfected cells enabled the discovery of a large number of differentially secreted effector proteins associated to Δ Np73. Remarkably, about 76.5% of the dysregulated proteins were previously identified in the exosome content according to ExoCarta database. As Δ Np73 has been also found in the exosome of CRC cells and in the blood of CRC patients, and Δ Np73

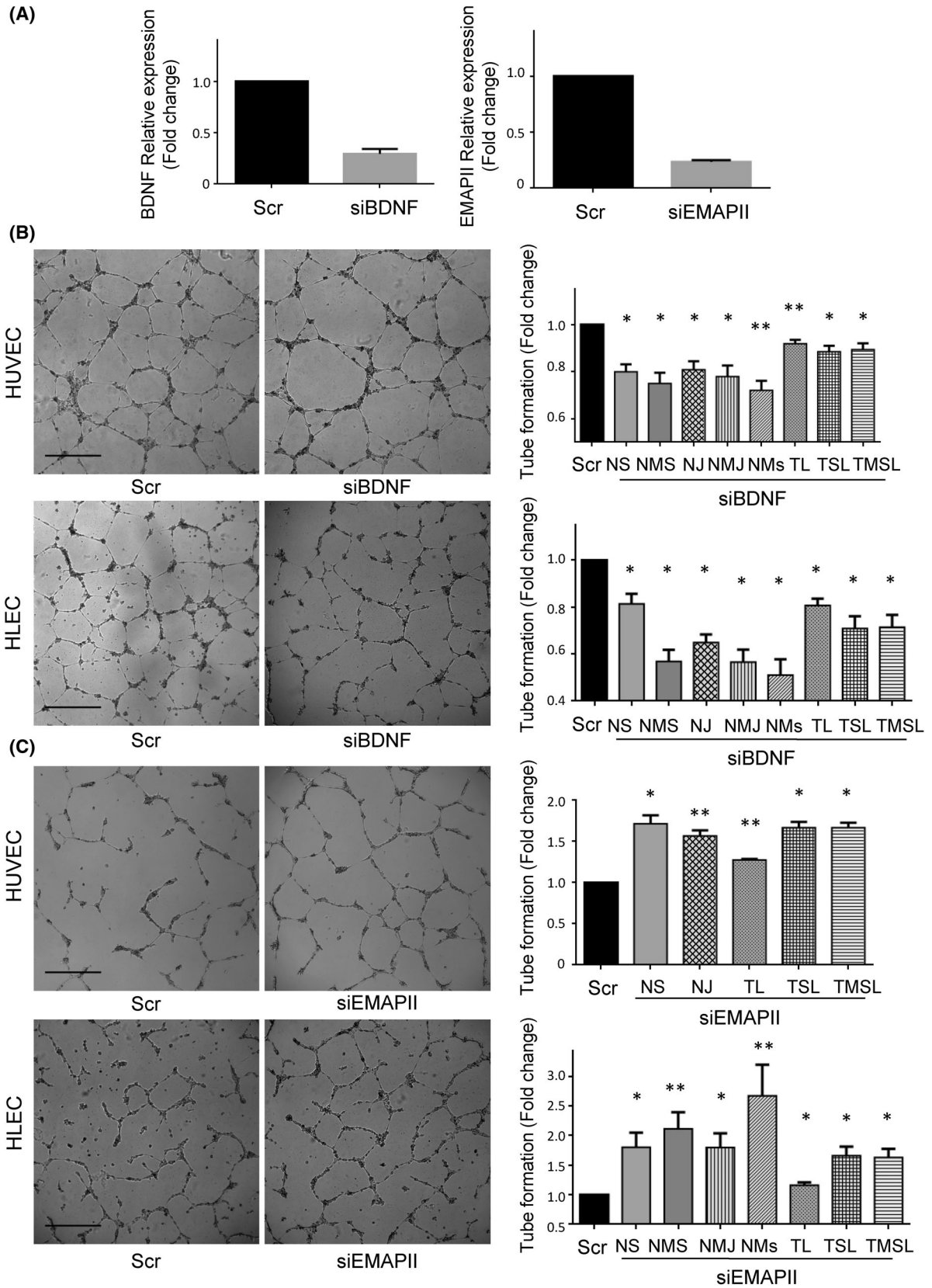


Fig. 5. BDNF and EMAP-II silencing effects on endothelial and lymphatic vasculature. (A) BDNF (left) and EMAP-II (right) relative expression of HCT116- Δ Np73 cells transiently transfected with a control siRNA (Scr) or a siRNA against BDNF (siBDNF) or EMAP-II (siEMAP-II). The efficiency of the siBDNF and siEMAP-II was around 75% and 85%, respectively. (B, C) Tube formation assay (scale bar = 500 μ m) in HUVEC and HLEC cells exposed to conditioned medium of HCT116- Δ Np73 treated with Scr or siBDNF or siEMAP-II. The parameters recorded are NS (number of segments); NMS (number of master segments); NJ (number of junctions); NMJ (number of master junctions); NMs (number of meshes); TL (total length); TSL (total segment length); TMSL (total master segment length). Five replicates of each experimental condition were measured and analyzed with Mann–Whitney *U* test. Error bars indicate standard deviation. Statistical significance: **P* < 0.05; ***P* < 0.01.

encapsulated in exosomes has been shown to enhance tumor progression [37], we therefore hypothesize that Δ Np73 protein effectors might also help to contribute to the metastatic process or to help forming the pre-metastatic niche.

In this sense, we here present original data regarding the impact of Δ Np73 in metastatic cell homing and growth in lungs *in vivo* and in blood and lymphatic vessels formation in colon cancer and identified its specific effectors implicated in these processes, BDNF and the putative EMAP-II-VEGFC-VEGFR3 axis. EMAP-II is a proinflammatory cytokine with antiangiogenic activities, which can suppresses primary and metastatic tumor growth probably due to its ability to compete with VEGFs for the VEGF receptors, thus, interfering with VEGF signaling [38]. The diminished expression of EMAP-II and the upregulation of VEGF-C and VEGFR3 triggered by Δ Np73 overexpression along with the functional experiments in HUVEC and HLEC primary cells support the implication of this isoform in the formation of both blood and lymphatic vessels. Δ Np73 has been previously involved in the formation of blood vessels, mainly through the modulation of HIF, VEGF, and TGF β proteins [39,40]. To our knowledge, the implication of Δ Np73 in lymphangiogenesis has not been previously addressed. Stantic et al. [41] identified the modulation of VEGF-C and other proangiogenic chemokines such as CCL2, CXCL1, and CXCL2 in wild type and Δ Np73^{-/-} and TAp73^{-/-} primary mouse embryonic fibroblast transformed with E1A and H-RAS^{v12} and in tumors developed in athymic nude mice subcutaneous injected with these cells. The authors robustly support the opposite functions of both TP73 variants in angiogenesis in a HIF1- α dependent manner and identified angiogenesis and hypoxia signatures in breast cancer patients with high Δ Np73 levels. In addition to its classic consideration as a lymphangiogenic factor through activation of VEGF-R3, VEGF-C has also been reported to induce angiogenesis through VEGF-R2. Our data do not rule out the implication of Δ Np73 in both axis, VEGF-C/VEGF-R3 and VEGF-C/VEGF-R2 as Stantic et al. discussed and supports the authors' results.

Noticeable, EMAP-II is currently being used in clinical trials in different tumor types in combination with other drugs [42,43]. In this context, Δ Np73 status may be tested as a good predictor to EMAP-II response since its levels can be analyzed in the clinical setting in a simple qPCR. In addition, we have identified BDNF as a new effector of this isoform. BDNF has been implicated in angiogenesis through the regulation of the VEGF-HIFs axis in different cancers [44–46]. Its participation in lymphatic vessel formation has not been reported. Here we report that the promotion of angiogenesis and lymphangiogenesis by Δ Np73 should be supported by its BDNF and EMAP-II effectors. Taken together, our results support the idea that Δ Np73 may be a significant regulator of the formation of new vascular and lymphatic vessels during tumor spread through the modulation of different target effectors.

We next proceeded to measure these effectors in the plasma of CRC individuals and controls to evaluate their diagnostic performance. Remarkably, BDNF quantitation in plasma was observed as a candidate marker to become transferred to clinics, since it reaches AUC values up to 96.9%. Interestingly, BDNF showed a high value as early diagnostic marker of CRC since patients carrying premalignant lesions also possessed high BDNF levels in contrast to the controls of the study. However, this association presents some limitations that must be acknowledged. Because the results are based on a single study dataset, they should be reanalyzed for confirmation of our results using much larger numbers of patients with similar distributions between groups.

Moreover, other interesting effectors found to be upregulated by the overexpression of Δ Np73 were related to metabolic processes (LDHB, Aspartate aminotransferase, GLO1, PFAS, and PYGL). Optimal glucose supply to glycolytic cancer cells is a common hallmark of cancer. Among the upregulated effectors, LDHB and PYGL are associated to this supply [47,48]. The metabolic switch from oxidative phosphorylation to aerobic glycolysis provides intermediates for cell growth and division and it is regulated by both oncogenes and tumor suppressor genes. In this sense, the control of metabolism link has been previously

reported for the p53 family [49,50]. Although TAp73 has been associated to different metabolic pathways [51], the link of Δ Np73 remained to be explored. Here, we shed some light on this process through the characterization of the Δ Np73 effectors.

Furthermore, other proteins altered by the overexpression of Δ Np73 revealed a role in cell migration (CXCR4 and S1PR1) [52,53], and/or invasion (QSOX1) [54]. These data are supported by our functional assays monitoring these processes in HCT116 mock and Δ Np73 stably transfected cells and in our *in vivo* approach (Fig. 4). Moreover, 20% of the dysregulated proteins were related to cell adhesion (Moesin, calreticulin, sorcin, DSG2, DSC3, LAMC2, LGALS3BP, Talin-1, CDH3, LGALS1, PTPRF, PDCD6IP, and COL6A1). The role of cell adhesion molecules in the progression of CRC and the development of liver metastasis suggests, besides the oncogenic properties of Δ Np73, a pro-oncogenic and pro-metastatic property for its effectors. Undeniably, the description of new, specific oncogenic roles for Δ Np73 will help us to clarify its function in cancer either encapsulated in exosomes [37], or released to the microenvironment of the tumor. Collectively, the knowledge of proteins modulated by Δ Np73 could be useful to advance in the knowledge of CRC, CRC metastasis, and may have important implications in the selection of personalized therapy for CRC patients [31].

5. Conclusion

In conclusion, this unbiased proteome-wide approach of the secretome of Δ Np73- and Mock-stably transfected cells identified a large number of novel effectors of the Δ Np73 oncogenic modulator in CRC that seem to play a major role in tumor formation, progression and metastasis of CRC, and exhibit potential as diagnostic biomarkers of the disease. Further studies must be performed to determine whether the identified effectors might become new targets for therapeutic intervention in CRC.

Acknowledgements

This study has been funded by Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) through the project “PI18/00473” and co-funded by the European Union (FEDER funds) and Cátedra UAM-Roche en Medicina de Innovación to GD, and the Ramón y Cajal Programme of the MINECO, PI17CIII/00045 and PI20CIII/00019 research projects from AES-ISCIII to RB. MG-A and JR-C were supported by contracts of the Programa Operativo de Empleo Juvenil y la Iniciativa de Empleo Juvenil (YEI) with the participation of the Consejería

de Educación, Juventud y Deporte de la Comunidad de Madrid y del Fondo Social Europeo. AM-C FPU predoctoral contract is supported by the MECED. GS-F is a recipient of a predoctoral contract (grant number 1193818N) supported by The Flanders Research Foundation (FWO).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Author contributions

MG-A is involved in formal analysis, investigation, methodology, writing, review and editing manuscript. JR-C is involved in formal analysis, investigation, methodology, writing, review and editing manuscript. CSM is involved in formal analysis and methodology. CP is involved in data curation, resources and review and editing manuscript. MJF-A is involved in data curation, resources and review and editing manuscript. DP-M is involved in formal analysis, methodology and resources. DV is involved in data curation, resources and review and editing manuscript. AM-C is involved in formal analysis, methodology and resources. GS-F is involved in methodology and resources. M-ÁC is involved in data curation, resources and review and editing manuscript. MG-C is involved in methodology and resources. NR is involved in data curation, resources and review and editing manuscript. AG-A is involved in formal analysis, methodology, resources and review and editing manuscript. RB is involved in conceptualization, data curation, formal analysis, investigation, methodology, resources, validation, writing, review and editing manuscript. GD is involved in conceptualization, data curation, formal analysis, investigation, methodology, resources, validation, writing, review and editing manuscript.

Peer Review

The peer review history for this article is available at <https://publons.com/publon/10.1002/1878-0261.13228>.

Data accessibility

All the data that support the findings of this study are available upon request.

References

- 1 Rodríguez-Salas N, Dominguez G, Barderas R, Mendiola M, Garcia-Albeniz X, Maurel J, et al.

- Clinical relevance of colorectal cancer molecular subtypes. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017;**109**:9–19.
- 2 Lambert AW, Pattabiraman DR, Weinberg RA. Emerging biological principles of metastasis. *Cell*. 2017;**168**(4):670–91.
 - 3 Rodriguez N, Pelaez A, Barderas R, Dominguez G. Clinical implications of the deregulated TP73 isoforms expression in cancer. *Clin Transl Oncol*. 2018;**20**:827–36.
 - 4 Irwin MS, Kaelin WG. p53 family update: p73 and p63 develop their own identities. *Cell Growth Differ*. 2001;**12**(7):337–49.
 - 5 Jost CA, Marin MC, Kaelin WG Jr. p73 is a simian [correction of human] p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature*. 1997;**389**(6647):191–4.
 - 6 Petrenko O, Zaika A, Moll UM. deltaNp73 facilitates cell immortalization and cooperates with oncogenic Ras in cellular transformation in vivo. *Mol Cell Biol*. 2003;**23**(16):5540–55.
 - 7 Barderas R, Mendes M, Torres S, Bartolome RA, Lopez-Lucendo M, Villar-Vazquez R, et al. In-depth characterization of the secretome of colorectal cancer metastatic cells identifies key proteins in cell adhesion, migration, and invasion. *Mol Cell Proteomics*. 2013;**12**(6):1602–20.
 - 8 Pelaez-Garcia A, Barderas R, Batlle R, Vinas-Castells R, Bartolome RA, Torres S, et al. A proteomic analysis reveals that snail regulates the expression of the nuclear orphan receptor nuclear receptor subfamily 2 group F member 6 (Nr2f6) and interleukin 17 (IL-17) to inhibit adipocyte differentiation. *Mole Cell Proteomics*. 2015;**14**(2):303–15.
 - 9 Barderas R, Bartolome RA, Fernandez-Acenero MJ, Torres S, Casal JI. High expression of IL-13 receptor alpha2 in colorectal cancer is associated with invasion, liver metastasis, and poor prognosis. *Cancer Res*. 2012;**72**(11):2780–90.
 - 10 Miersch S, Bian X, Wallstrom G, Sibani S, Logvinenko T, Wasserfall CH, et al. Serological autoantibody profiling of type 1 diabetes by protein arrays. *J Proteomics*. 2013;**94**:486–96.
 - 11 Anderson KS, Sibani S, Wallstrom G, Qiu J, Mendoza EA, Raphael J, et al. Protein microarray signature of autoantibody biomarkers for the early detection of breast cancer. *J Proteome Res*. 2011;**10**(1):85–96.
 - 12 Yu XB, Wallstrom G, Magee DM, Qiu J, Mendoza DEA, Wang J, et al. Quantifying antibody binding on protein microarrays using microarray nonlinear calibration. *Biotechniques*. 2013;**54**(5):257–64.
 - 13 Madoz-Gurpide J, Canamero M, Sanchez L, Solano J, Alfonso P, Casal JI. A proteomics analysis of cell signaling alterations in colorectal cancer. *Mol Cell Proteomics*. 2007;**6**(12):2150–64.
 - 14 Babel I, Barderas R, Diaz-Uriarte R, Martinez-Torrecaudrada JL, Sanchez-Carbayo M, Casal JI. Identification of tumor-associated autoantigens for the diagnosis of colorectal cancer in serum using high density protein microarrays. *Mol Cell Proteomics*. 2009;**8**(10):2382–95.
 - 15 Nguyen H, Wood I, Hill M. A robust permutation test for quantitative SILAC proteomics experiments. *J Integr OMICS*. 2012;**2**(2):80–93.
 - 16 Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc*. 2009;**4**(1):44–57.
 - 17 Franceschini A, Szklarczyk D, Frankild S, Kuhn M, Simonovic M, Roth A, et al. STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Res*. 2013;**41**(Database issue):D808–15.
 - 18 Kanehisa M, Goto S, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M. Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. *Nucleic Acids Res*. 2014;**42**(Database issue):D199–205.
 - 19 Keerthikumar S, Chisanga D, Ariyaratne D, Al Saffar H, Anand S, Zhao K, et al. ExoCarta: a web-based compendium of exosomal cargo. *J Mol Biol*. 2016;**428**(4):688–92.
 - 20 Dominguez G, Garcia JM, Pena C, Silva J, Garcia V, Martinez L, et al. DeltaTAp73 upregulation correlates with poor prognosis in human tumors: putative in vivo network involving p73 isoforms, p53, and E2F-1. *J Clin Oncol*. 2006;**24**(5):805–15.
 - 21 San Millan C, Soldevilla B, Martin P, Gil-Calderon B, Compte M, Perez-Sacristan B, et al. beta-Cryptoxanthin synergistically enhances the antitumoral activity of oxaliplatin through DeltaNP73 negative regulation in colon cancer. *Clin Cancer Res*. 2015;**21**(19):4398–409.
 - 22 Garranzo-Asensio M, Segundo-Acosta PS, Poves C, Fernandez-Acenero MJ, Martinez-Useros J, Montero-Calle A, et al. Identification of tumor-associated antigens with diagnostic ability of colorectal cancer by in-depth immunomic and seroproteomic analysis. *J Proteomics*. 2020;**214**:103635.
 - 23 Pelaez-Garcia A, Barderas R, Torres S, Hernandez-Varas P, Teixido J, Bonilla F, et al. FGFR4 role in epithelial-mesenchymal transition and its therapeutic value in colorectal cancer. *PLoS One*. 2013;**8**(5):e63695.
 - 24 Yang W, Cai Q, Lui VW, Everley PA, Kim J, Bhola N, et al. Quantitative proteomics analysis reveals molecular networks regulated by epidermal growth factor receptor level in head and neck cancer. *J Proteome Res*. 2010;**9**(6):3073–82.
 - 25 Kim MH, Kim HB, Yoon SP, Lim SC, Cha MJ, Jeon YJ, et al. Colon cancer progression is driven by APEX1-mediated upregulation of Jagged. *J Clin Invest*. 2013;**123**:3211–30.

- 26 Hutschenreuther A, Bigl M, Hemdan NY, Debebe T, Gaunitz F, Birkenmeier G. Modulation of GLO1 expression affects malignant properties of cells. *Int J Mol Sci*. 2016;**17**(12):2133.
- 27 Bujko M, Kober P, Mikula M, Ligaj M, Ostrowski J, Siedlecki JA. Expression changes of cell-cell adhesion-related genes in colorectal tumors. *Oncol Lett*. 2015;**9**(6):2463–70.
- 28 Brennan D, Hu Y, Joubeh S, Choi YW, Whitaker-Menezes D, O'Brien T, et al. Suprabasal Dsg2 expression in transgenic mouse skin confers a hyperproliferative and apoptosis-resistant phenotype to keratinocytes. *J Cell Sci*. 2007;**120**(Pt 5):758–71.
- 29 Pernodet N, Hermetet F, Adami P, Vejux A, Descotes F, Borg C, et al. High expression of QSOX1 reduces tumorigenesis, and is associated with a better outcome for breast cancer patients. *Breast Cancer Res*. 2012;**14**(5):R136.
- 30 Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res*. 2019;**47**(D1):D607–13.
- 31 Soldevilla B, Millan CS, Bonilla F, Dominguez G. The TP73 complex network: ready for clinical translation in cancer? *Genes Chromosomes Cancer*. 2013;**52**(11):989–1006.
- 32 Ravn A, Tissir F, Goffinet AM. DeltaNp73 transcription factors modulate cell survival and tumor development. *Cell Cycle*. 2010;**9**(8):1523–7.
- 33 Soldevilla B, Diaz R, Silva J, Campos-Martin Y, Munoz C, Garcia V, et al. Prognostic impact of DeltaTAp73 isoform levels and their target genes in colon cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2011;**17**(18):6029–39.
- 34 Grob TJ, Novak U, Maisse C, Barcaroli D, Luthi AU, Pirnia F, et al. Human delta Np73 regulates a dominant negative feedback loop for TAp73 and p53. *Cell Death Differ*. 2001;**8**(12):1213–23.
- 35 Stiewe T, Theseling CC, Putzer BM. Transactivation-deficient Delta TA-p73 inhibits p53 by direct competition for DNA binding: implications for tumorigenesis. *J Biol Chem*. 2002;**277**(16):14177–85.
- 36 Wilhelm MT, Rufini A, Wetzel MK, Tsuchihara K, Inoue S, Tomasini R, et al. Isoform-specific p73 knockout mice reveal a novel role for delta Np73 in the DNA damage response pathway. *Genes Dev*. 2010;**24**(6):549–60.
- 37 Soldevilla B, Rodriguez M, San Millan C, Garcia V, Fernandez-Perianez R, Gil-Calderon B, et al. Tumor-derived exosomes are enriched in DeltaNp73, which promotes oncogenic potential in acceptor cells and correlates with patient survival. *Hum Mol Genet*. 2014;**23**(2):467–78.
- 38 Awasthi N, Schwarz MA, Verma V, Cappiello C, Schwarz RE. Endothelial monocyte activating polypeptide II interferes with VEGF-induced proangiogenic signaling. *Lab Invest*. 2009;**89**(1):38–46.
- 39 Dulloo I, Hooi PB, Sabapathy K. Hypoxia-induced DNp73 stabilization regulates Vegf-A expression and tumor angiogenesis similar to TAp73. *Cell Cycle*. 2015;**14**(22):3533–9.
- 40 Fernandez-Alonso R, Martin-Lopez M, Gonzalez-Cano L, Garcia S, Castrillo F, Diez-Prieto I, et al. p73 is required for endothelial cell differentiation, migration and the formation of vascular networks regulating VEGF and TGFbeta signaling. *Cell Death Differ*. 2015;**22**(8):1287–99.
- 41 Stantic M, Sakil HA, Zirath H, Fang T, Sanz G, Fernandez-Woodbridge A, et al. TAp73 suppresses tumor angiogenesis through repression of proangiogenic cytokines and HIF-1alpha activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015;**112**(1):220–5.
- 42 Schwarz RE, Awasthi N, Konduri S, Caldwell L, Cafasso D, Schwarz MA. Antitumor effects of EMAP II against pancreatic cancer through inhibition of fibronectin-dependent proliferation. *Cancer Biol Ther*. 2010;**9**(8):632–9.
- 43 Awasthi N, Zhang C, Hinz S, Schwarz MA, Schwarz RE. Enhancing sorafenib-mediated sensitization to gemcitabine in experimental pancreatic cancer through EMAP II. *J Exp Clin Cancer Res*. 2013;**32**:12.
- 44 Lin CY, Hung SY, Chen HT, Tsou HK, Fong YC, Wang SW, et al. Brain-derived neurotrophic factor increases vascular endothelial growth factor expression and enhances angiogenesis in human chondrosarcoma cells. *Biochem Pharmacol*. 2014;**91**(4):522–33.
- 45 Usui T, Naruo A, Okada M, Hayabe Y, Yamawaki H. Brain-derived neurotrophic factor promotes angiogenic tube formation through generation of oxidative stress in human vascular endothelial cells. *Acta Physiol (Oxf)*. 2014;**211**(2):385–94.
- 46 Huang SM, Lin C, Lin HY, Chiu CM, Fang CW, Liao KF, et al. Brain-derived neurotrophic factor regulates cell motility in human colon cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2015;**22**(3):455–64.
- 47 Brisson L, Banski P, Sboarina M, Dethier C, Danhier P, Fontenille MJ, et al. Lactate dehydrogenase B controls lysosome activity and autophagy in cancer. *Cancer Cell*. 2016;**30**(3):418–31.
- 48 Zois CE, Harris AL. Glycogen metabolism has a key role in the cancer microenvironment and provides new targets for cancer therapy. *J Mol Med (Berl)*. 2016;**94**(2):137–54.
- 49 Puzio-Kuter AM. The role of p53 in metabolic regulation. *Genes Cancer*. 2011;**2**(4):385–91.
- 50 Cutruzzola F, Avigliano L, Candi E. p73 keeps metabolic control in balance. *Cell Cycle*. 2014;**13**(2):179–80.

- 51 Agostini M, Annicchiarico-Petruzzelli M, Melino G, Rufini A. Metabolic pathways regulated by TAp73 in response to oxidative stress. *Oncotarget*. 2016;**7**(21):29881–900.
- 52 Wang B, Wang W, Niu W, Liu E, Liu X, Wang J, et al. SDF-1/CXCR4 axis promotes directional migration of colorectal cancer cells through upregulation of integrin α v β 6. *Carcinogenesis*. 2014;**35**(2):282–91.
- 53 Watters RJ, Wang HG, Sung SS, Loughran TP, Liu X. Targeting sphingosine-1-phosphate receptors in cancer. *Anticancer Agents Med Chem*. 2011;**11**(9):810–7.
- 54 Ilani T, Alon A, Grossman I, Horowitz B, Kartvelishvily E, Cohen SR, et al. A secreted disulfide catalyst controls extracellular matrix composition and function. *Science*. 2013;**341**(6141):74–6.

Supporting information

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Fig. S1. Schematic design of the in-depth proteomic analysis of Δ Np73 secretome effectors.

Fig. S2. Identification of protein interactions between the identified dysregulated proteins by the database STRING.

Fig. S3. Western blot of BDNF and EMAP-II and ELISAs of VEGFC and VEGFR-3.

Fig. S4. Metastatic potential of Δ Np73.




Table S1. Antibodies and primers used for experimental work.

Table S2. Clinical and pathological information of patient's serum samples used in ELISA experiments.

Table S3. Identified and quantified proteins and peptides in the SILAC experiment.

Article

Δ Np73, TAp73 and Δ 133p53 Extracellular Vesicle Cargo as Early Diagnosis Markers in Colorectal Cancer

Javier Rodríguez-Cobos ^{1,†}, David Viñal ^{2,†}, Carmen Poves ³, María J. Fernández-Aceñero ⁴, Héctor Peinado ⁵, Daniel Pastor-Morate ⁶, M^a Isabel Prieto ⁶, Rodrigo Barderas ⁷, Nuria Rodríguez-Salas ² and Gemma Domínguez ^{1,*}

¹ Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Health Research Institute Alberto Sols CSIC-UAM, IdiPaz, 28029 Madrid, Spain; jrcobos@iib.uam.es

² Department of Medical Oncology, Hospital Universitario La Paz, CIBERONC, 28046 Madrid, Spain; dvinal@alumni.unav.es (D.V.); nuria.rodriguez@salud.madrid.org (N.R.-S.)

³ Gastroenterology Unit, Hospital Clínico San Carlos, 28040 Madrid, Spain; carmenpoves@yahoo.es

⁴ Surgical Pathology Department, Hospital Gregorio Marañón, 28007 Madrid, Spain; mgg10167@gmail.com

⁵ Microenvironment and Metastasis Laboratory, Molecular Oncology Program, Spanish National Cancer Research Center, 28029 Madrid, Spain; hpeinado@cnio.es

⁶ Surgery Department, Hospital Universitario La Paz, 28046 Madrid, Spain; danielpastormorate@gmail.com (D.P.-M.); iprieto@intermic.com (M.I.P.)

⁷ Chronic Disease Programme (UFIEC), Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, 28222 Madrid, Spain; r.barderas@isciii.es

* Correspondence: gdominguez@iib.uam.es; Tel.: +34-915-854-459

† These authors contributed equally to this work.



Citation: Rodríguez-Cobos, J.; Viñal, D.; Poves, C.; Fernández-Aceñero, M.J.; Peinado, H.; Pastor-Morate, D.; Prieto, M.I.; Barderas, R.; Rodríguez-Salas, N.; Domínguez, G. Δ Np73, TAp73 and Δ 133p53 Extracellular Vesicle Cargo as Early Diagnosis Markers in Colorectal Cancer. *Cancers* **2021**, *13*, 2240. <https://doi.org/10.3390/cancers13092240>

Academic Editors: Jean-Christophe Bourdon and Neda Slade

Received: 29 March 2021

Accepted: 4 May 2021

Published: 7 May 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: The survival of colorectal cancer patients largely relies on the stage at diagnosis. The identification of early and non-invasive biomarkers to be used in screening programs for the diagnosis of the disease at the premalignant stage is mandatory. The aim of this study is to validate in plasma-derived extracellular vesicles secreted by malignant cells the diagnostic potential of well-known tumor-associated genes, Δ Np73, TAp73, and Δ 133p53, in healthy subjects ($n = 29$), individuals with premalignant lesions ($n = 49$), and colorectal cancer patients ($n = 42$). Our data support Δ Np73 levels contained in extracellular vesicles as such a non-invasive and premature biomarker for the early diagnosis of colorectal cancer.

Abstract: The early diagnosis of colorectal cancer is a key factor in the overall survival of the patients. The actual screening programs include different approaches with significant limitations such as unspecificity, high invasiveness, and detection at late stages of the disease. The specific content of extracellular vesicles derived from malignant cells may represent a non-invasive technique for the early detection of colorectal cancer. Here, we studied the mRNA levels of Δ Np73, TAp73, and Δ 133p53 in plasma-derived extracellular vesicles from healthy subjects ($n = 29$), individuals with premalignant lesions ($n = 49$), and colorectal cancer patients ($n = 42$). Extracellular vesicles' Δ Np73 levels were already significantly high in subjects with premalignant lesions. Δ 133p53 levels were statistically increased in colorectal cancer patients compared to the other two groups and were associated with patients' survival. Remarkably, TAp73 mRNA was not detected in any of the individuals. The evaluation of Δ Np73, Δ 133p53 and CEA sensitivity, specificity and AUC values supports Δ Np73 as a better early diagnosis biomarker and CEA as the best to identify advanced stages. Thus, low levels of CEA and a high content of Δ Np73 may identify in screening programs those individuals at higher risk of presenting a premalignant lesion. In addition, Δ 133p53 emerges as a potential prognosis biomarker in colorectal cancer.

Keywords: Δ Np73; TAp73; Δ 133p53; colorectal cancer; extracellular vesicles; liquid biopsy; screening programs; biomarkers; early diagnosis; premalignant lesions

1. Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the third most common tumor diagnosed and accounts for more than 10% of all tumor types worldwide. It is estimated that CRC is the fourth leading cause of cancer-related death, with around 600,000 deaths reported annually [1,2].

CRC arises due to the accumulation of genetic alterations following a stepwise process from normal colonic epithelium to premalignant lesions (adenomatous and serrated polyps) and invasive cancer [3]. The identification and removal of premalignant lesions prevent the development of invasive CRC and constitute the basis for the screening programs. Fecal occult blood test (FOBT), fecal immunochemical testing (FIT), flexible sigmoidoscopy, and colonoscopy [4] are the tests included in screening programs and international guidelines [1,4–6]. However, although a benefit in incidence and survival has been reported, each technique has limitations. For colonoscopy, major disadvantages include the inconvenience of bowel preparation, the risk of perforation, bleeding, and infection, and those associated with sedation. For FOBT and FIT, the sensitivity for premalignant lesions is low (5–40%) [7,8] and unnecessary colonoscopies may be performed in case of false positive results. The identification of biomarkers through a non-invasive approach that could identify the disease at the premalignant stage is an appealing field of research for the early diagnosis of cancer. Available blood-based markers such as carcinoembryonic antigen (CEA) are not useful to detect early CRC due to significant overlap with benign disease, with a sensitivity that only reached 46% in a recent meta-analysis [9].

In recent years, liquid biopsy, referred to as the isolation of cancer-derived components from biological fluids, has been studied in several clinical scenarios, including cancer screening [10]. These components include, among others, circulating tumor cells, cell-free DNA, and extracellular vesicles (EVs). EVs are enriched in proteins, nucleic acids, and lipids that constitute a novel mode of intercellular communication and play an important role in cancer [11,12]. A recent meta-analysis found a good performance for CRC diagnosis of all liquid biopsy methods, with a sensitivity, specificity, and area under the curve (AUC) of 0.77, 0.89 and 0.90, respectively. The diagnostic performance of EVs in detecting CRC was 0.76, 0.92, and 0.9037. The role of liquid biopsy in predicting premalignant lesions remains understudied [13].

The expression of *TP73*, a member of the *TP53* family, is altered in most human cancers and has prognostic implications [14]. *TP73* translates into different variants with opposing functions: Δ TAp73 and Δ TAp73 (Δ Ex2p73, Δ Ex2/3p73, Δ Np73 and Δ N'p73) [14]. In patients with CRC, the overexpression of Δ TAp73 isoforms has been associated with advanced tumor stage, shorter survival [15–17] and drug resistance [16]. Interestingly, our group found that the amount of Δ Np73 packaged in tumor-derived exosomes is also associated with survival [18]. Finally, the dysregulation of *TP73* has been reported in premalignant lesions of other tumor types [19–22]. Interestingly, the N-terminal truncated *TP53* variants have been also described and attracted during the last few years the interest of the scientific community due to their putative oncogenic properties and association with cancer progression [23–25].

Thus, similar to Δ Np73, the N-terminal truncated *TP53* variant Δ 133p53 may function as an oncogene by acting as a dominant-negative inhibitor of other p53 family members and transactivating a specific set of pro-tumoral effectors [26–28]. Accordingly, Δ 133p53 may transactivate DNA-repair genes [29,30] and favor resistance processes, regulate the JAK-STAT3 and RhoA-ROCK signaling pathways promoting cell growth and invasion [31] and modulate pro- and antiangiogenic factors [32]. In addition, Δ 133p53 associates with an enhanced cancer stem cell phenotype and may induce the epithelial to mesenchymal transition (EMT) in cancer cells [33] and favor an immunosuppressive environment [34]. Δ 133p53 has been observed to be upregulated in several tumor types, such as colorectal, lung, breast, prostate and esophageal squamous cell carcinomas and melanoma, and has been associated with poorer survival rates [28].

The deregulated expression of Δ Np73 and Δ 133p53 in different tumor types and its association with cancer patients' outcome support them as potentially good cancer

early diagnostic candidates to further explore in plasma-derived EVs. The content of tumor suppressors in EVs as tumor biomarkers has been poorly explored; therefore, TAp73, which has previously been found overexpressed in different tumor types but controversially associated with patients' outcome [14], could provide interesting information regarding tumor-derived EVs' cargo and its clinical usefulness.

With this background, we evaluate here the mRNA levels of Δ Np73, TAp73 and Δ 133p53 in plasma-derived EVs from healthy subjects ($n = 29$), individuals with premalignant lesions (PL) ($n = 49$), and CRC patients at different stages of the disease ($n = 42$) in order to explore their potential role in the early diagnosis of CRC through a non-invasive approach.

2. Materials and Methods

2.1. Samples and Subjects

The study was approved by the Research Ethics Board of the Hospital Clínico San Carlos and Hospital Universitario La Paz (Madrid, Spain). Blood samples were obtained with the corresponding informed written consent. Plasma samples were collected from 29 healthy individuals with negative colonoscopy, 49 subjects with premalignant lesions (low- and high-grade adenomas) and 42 CRC patients diagnosed at different stages of the disease. Sample size varied from 3–5 mL of plasma for our experimental workflow.

Among these samples, 15/29 of control samples, 19/49 of adenoma samples, and 9/42 of CRC samples were additionally used to study their humoral response in a previous work [35]. The clinical data of the subjects included in the study are shown in Table 1. The plasma levels of CEA were available from 20 healthy subjects, 27 subjects with PL and 31 patients with CRC.

Table 1. Clinical parameters of the subjects included in the study.

Parameters	Healthy Individuals	Subjects with PL	CRC Patients
<i>n</i>	29	49	42
Sex			
Male	10 (34.48%)	24 (48.98%)	22 (52.38%)
Female	19 (65.52%)	25 (51.02%)	20 (47.62%)
Age (years)			
Median, range	59 (42–79)	62 (31–81)	71 (49–89)
CEA (ng/mL)			
Median, range	0.0 (0.0–81.9)	0.0 (0.0–135.2)	3.1 (0.5–94.9)
Tumor stage			
I			5 (11.905%)
II			9 (21.43%)
III			23 (54.76%)
IV			5 (11.905%)
Tumor location			
Right colon			14 (33.33%)
Left colon			17 (40.48%)
Rectum			11 (26.19%)
DFS ($n = 38$)			
Median, CI			NR
3 years DFS (95%, CI)			75% (61–89)
OS			
Median, CI			NR
3 years OS (95%, CI)			69% (55–83)

n, number of subjects; DFS, Disease-free survival; OS, Overall survival; NR, Not Reached.

2.2. Extracellular Vesicles Isolation

Plasma-derived EVs were isolated by a modified and adapted protocol of sequential ultracentrifugation previously described in [18]. Identification and characterization were

performed as [18]. All centrifugations were performed at 10 °C with a Beckman 70.1 Ti rotor. The final EVs' pellet was resuspended in PBS for subsequent procedures. A schematic representation of the workflow is in Figure 1.

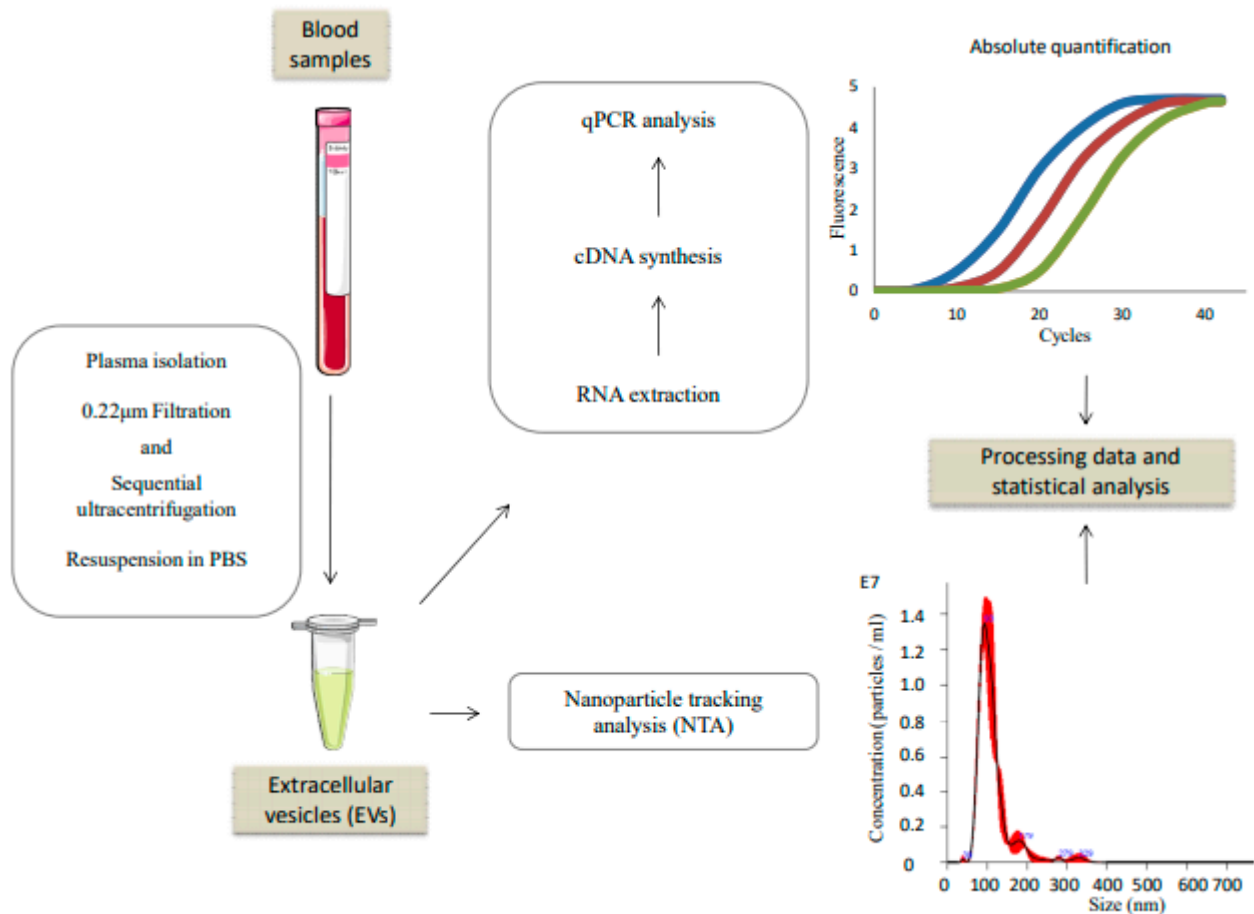


Figure 1. Scheme of the experimental workflow.

2.3. Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

The NanoSight NS500 instrument equipped with a 405 nm laser (Malvern Panalytical Ltd, Malvern, UK) was calibrated using Silica Microspheres beads before measurements. Samples were diluted 1/1000 in PBS in order to obtain a particle concentration between 10^8 and 10^9 particles/mL. Three repeated measurements of 60 s were taken per sample and the mean value was used to determine particle number. The temperature of the laser unit was controlled at 25 °C. NTA software measured the size distribution (ranging from 10 to 1000 nm) and concentration (particles/mL) of nanoparticles.

2.4. RNA Extraction, Reverse Transcription and qPCR

RNA from resuspended EVs was extracted by SeraMir™ Exosome RNA Amplification kit (System Biosciences SBI, Mountain View, CA, USA) following the manufacturer's instructions. cDNA synthesis was performed with the Transcriptor First-Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics SL, Barcelona, Spain). Quantitative real-time PCR was performed in a LightCycler 2.0 instrument using Fast Start DNA MasterPlus SYBR Green I kit (Roche) as previously described in [17]. Primer sets used for Δ Np73, TAp73 and Δ 133p53 were the following: forward, 5'-TCGGTGACCCCGCACGGCAC-3'; reverse, 5'-GCGAGTGGGTGGGCACGCTG-3' for Δ Np73; forward, 5'-GCACCACGTTTGAGCACCTCT-3'; reverse, 5'-GCAGATTGAACTGGGCCATGA-3' for TAp73; and forward,

5'-TGTCTCCTTCCTCTTCCTACAG-3'; reverse, 5'-ACCATCGCTATCTGAGCAGC-3' for $\Delta 133p53$.

2.5. Statistical Analysis

To normalize the results, qPCR data were related to the number of particles of each sample. Then, these data were modified with log₁₀ transformation. The D'Agostino–Pearson and Shapiro–Wilk tests were used to assess the normality of the data distribution. Subsequently, the Kruskal–Wallis and U–Mann–Whitney tests were used for statistical analysis. The receiver operating characteristic (ROC) curves were constructed with the R program (version 4.0.3, <https://www.r-project.org/>; accessed on: 1 October 2020), and the corresponding area under the curve (AUC) and the maximized sensitivity and specificity values were calculated using the R packages ModelGood and Epi. The cut-off value for the survival analysis was selected upon ROC curves for disease recurrence or death in patients with localized CRC and death for the whole cohort of patients with CRC. The optimal cut-off value was determined using the Youden's J index. For $\Delta Np73$, we selected 0.76 and -0.83 as the cut-off values for disease-free survival (DFS) and overall survival (OS), respectively. For $\Delta 133p53$, we selected 2.93 and 1.99 as the cut-off values for DFS and OS, respectively. $\Delta Np73$ and $\Delta 133p53$ mRNA levels were classified in low and high levels accordingly. We used the log-rank test to compare DFS and OS according to $\Delta Np73$ and $\Delta 133p53$ mRNA levels. Kaplan–Meier analyses were used to estimate medians. A Cox proportional-hazards model was used to estimate hazard ratios and 95% confidence intervals. The Spearman rank-order correlation test was used to examine the relationship between autoantibodies and EVs mRNA of the different p53 family isoforms. p -values ≤ 0.05 were considered statistically significant. Statistical analysis was performed with SPSS software (version 24).

3. Results

3.1. TAp73, $\Delta Np73$, and $\Delta 133p53$ EVs Content in Control, PL and CRC Individuals

In order to evaluate the early diagnosis potential of the TAp73, $\Delta Np73$, and $\Delta 133p53$ isoforms in CRC, we have quantified their mRNA levels on isolated EVs from healthy individuals, subjects with PL, and CRC patients diagnosed at different stages. NTA analysis did not show significant differences in EVs' size distributions or the concentration of particles among the three groups and the samples of all groups exhibited similar EV size profiles (Figure S1).

TAp73 mRNA levels were undetectable in any of the studied groups. Accordingly, we have considered the EV content of TAp73 mRNA as negative for all the samples. mRNA levels for $\Delta Np73$ and $\Delta 133p53$ were detected in the three conditions. Specifically, $\Delta Np73$ levels were significantly higher in subjects with PL and CRC patients than healthy controls (Figure 2A), although there were no significant differences between subjects with PL and CRC patients. $\Delta 133p53$ levels were significantly increased in EVs derived from CRC patients compared to the other two groups (Figure 2B).

3.2. Potential Value of $\Delta Np73$ and $\Delta 133p53$ Versus CEA as Diagnostic Biomarkers

In addition, we determined the usefulness as candidate biomarkers in plasma of $\Delta Np73$ and $\Delta 133p53$, calculating their individual AUC, sensitivity and specificity by ROC curves (Figures 3 and 4). Individual AUC values for $\Delta Np73$ for discriminating PL from healthy subjects were 72.3% (sensitivity 75.5% and specificity 69%) (Figure 3A), 67.9% (sensitivity 61.9% and specificity 79.3%) for CRC patients from healthy subjects (Figure 3B) and 70.9% (sensitivity 70% and specificity 72.4%) for healthy subjects from subjects with PL and CRC patients (Figure 3C).

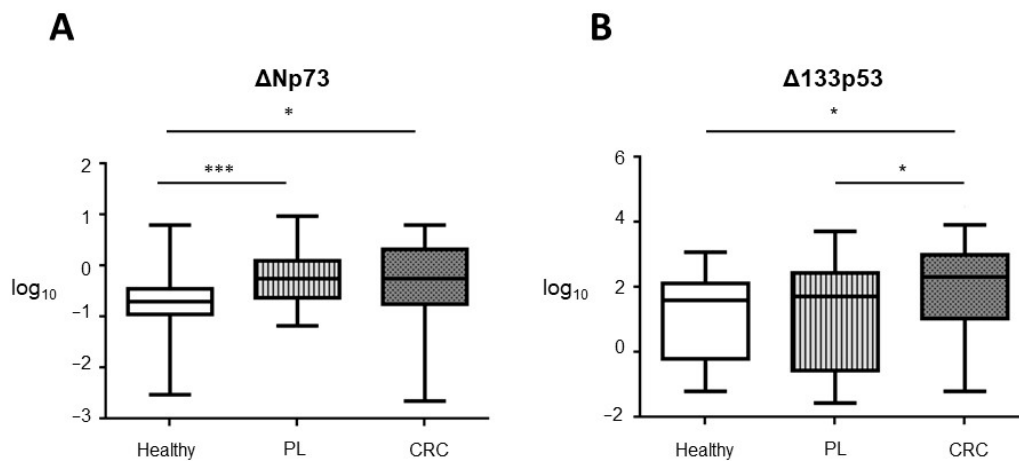


Figure 2. EVs' mRNA levels of (A) Δ Np73 and (B) Δ 133p53 in the three groups of individuals. Box and whisker plot displaying the qPCR data related to the EVs' concentration. Statistical significance * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

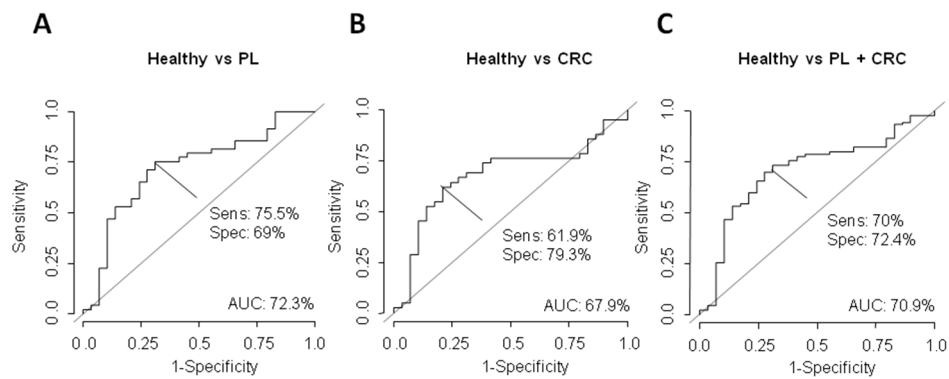


Figure 3. Determination of the Δ Np73 EV mRNA content as discriminating plasma biomarker between healthy and PL group (A), healthy and CRC patients (B) and healthy versus PL+CRC subjects (C) was carried out through ROC curves calculating AUC, its specificity (spec) and sensitivity (sens).

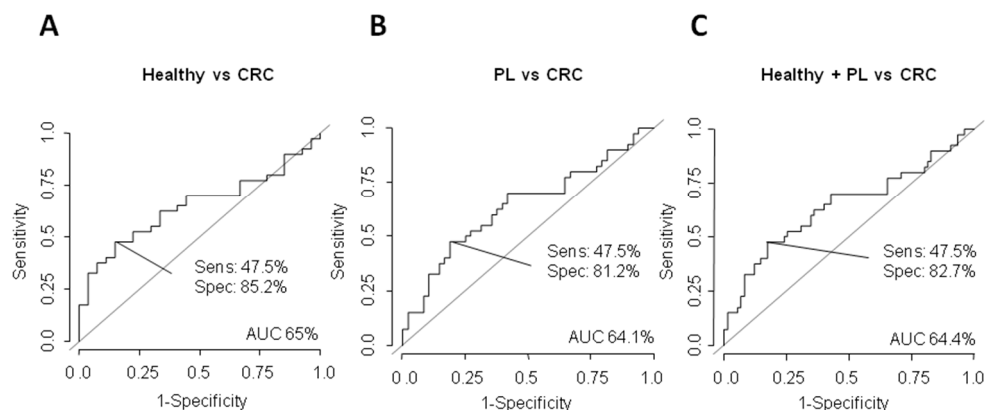


Figure 4. Determination of the Δ 133p53 EV mRNA content as discriminating plasma biomarker between healthy and CRC patients (A), PL individuals and CRC patients (B) and healthy + PL subjects and CRC patients (C) was carried out through ROC curves calculating AUC, its specificity (spec) and sensitivity (sens).

In the case of Δ 133p53, individual AUC values for discriminating CRC patients from healthy subjects were 65% (sensitivity 47.5% and specificity 85.2%) (Figure 4A), 64.1% (sensitivity 47.5% and specificity 81.2%) for CRC patients from subjects with PL (Figure 4B)

and 64.4% (sensitivity 47.5% and specificity 82.7%) for healthy and PL subjects from CRC patients (Figure 4C).

Finally, we decided to compare the potential of Δ Np73 and Δ 133p53 versus CEA to discriminate among the three groups. CEA AUC values for discriminating healthy subjects from PL subjects were 52.9% and 85.7% (sensitivity 100% and specificity 85%) from healthy subjects and CRC (Figure 5). As previously described in the literature, our data do not support CEA as a good marker to discriminate between healthy and PL subjects [9]. In this sense and based on the AUC values, Δ Np73 emerges as a much better marker than CEA to discriminate between these two groups (Figures 3A and 5A). However, neither Δ Np73 nor Δ 133p53 improve the ability of CEA to discriminate between healthy subjects and CRC patients (Figures 3B, 4A and 5B).

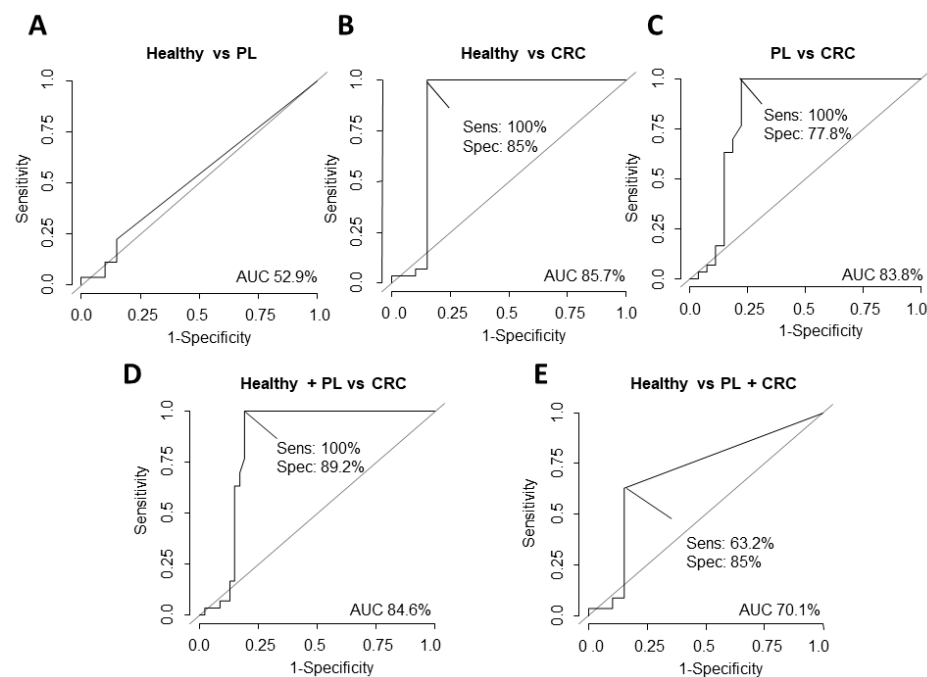


Figure 5. Determination of the diagnostic potential of CEA levels in plasma to discriminate healthy subjects versus subjects with PL (A), healthy subjects versus patients with CRC (B), subjects with PL versus patients with CRC (C), healthy + PL subjects versus patients with CRC (D), and healthy subjects versus PL subjects + patients with CRC (E) carried out through ROC curves calculating AUC, its specificity (spec) and sensitivity (sens).

3.3. Correlation with Tumoral Stage, DFS and OS

Next, we have evaluated the EVs' mRNA content of these isoforms at the different stages of the disease. Non statistical significant differences were observed for Δ 133p53. However, Δ Np73 was observed to be increased at stage II and IV, although it did not reach statistical significance at this later stage (Figure 6).

In the CRC cohort, the median follow-up was 36.2 months (range, 1.1 to 62.4). During this period, 15 (34.9%) events (recurrences or deaths) were observed among patients with localized disease ($n = 38$) and 16 (37.2%) deaths were observed in the whole cohort ($n = 42$). At 3 years, 63% (95% confidence interval (CI), 47 to 78) of the patients with localized disease remained alive without disease recurrence and 69% (95% CI, 55 to 83) remained alive in the whole cohort.

Survival analysis did not reveal a correlation between Δ Np73 EV content and DFS and OS (Figure 7A,B). However, Δ 133p53 EV content was inversely associated with DFS and OS (Figure 7C,D). The median DFS was not reached in the low Δ 133p53 group and was 17.5 months (95% CI, 0 to 38) in the high Δ 133p53 group, with a hazard ratio (HR) for disease recurrence or death of 0.21 (95% CI, 0.06 to 0.68; $p = 0.009$) in favor of the high

$\Delta 133p53$ group. In the whole cohort of CRC, patients with low $\Delta 133p53$ levels did not reach the median OS and patients with high $\Delta 133p53$ levels had a median OS of 50 months (95% CI, 44.9 to 55.2), with a HR of 0.23 (95% CI, 0.05 to 1.03; $p = 0.05$).

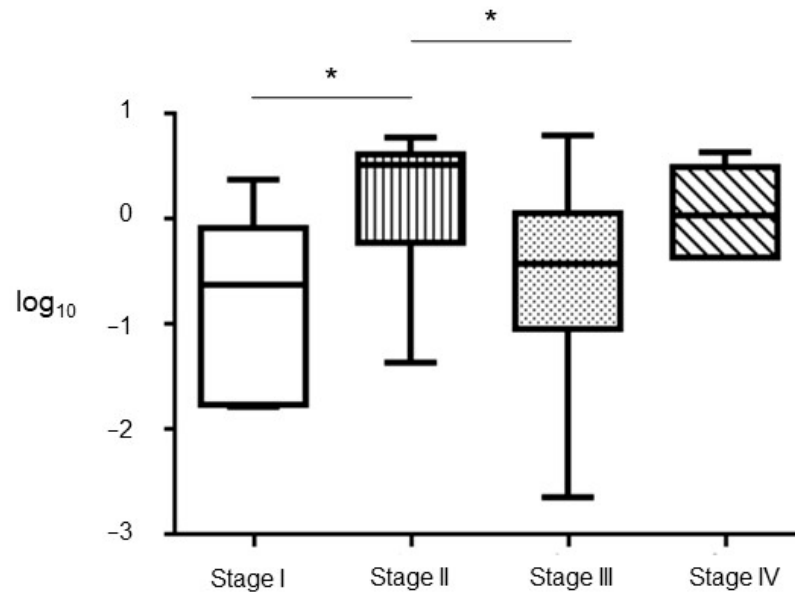


Figure 6. $\Delta Np73$ mRNA contained in the EVs according to tumoral stage. Box and whisker plot displaying the qPCR data related to the EVs' concentration. Statistical significance, * $p < 0.05$.

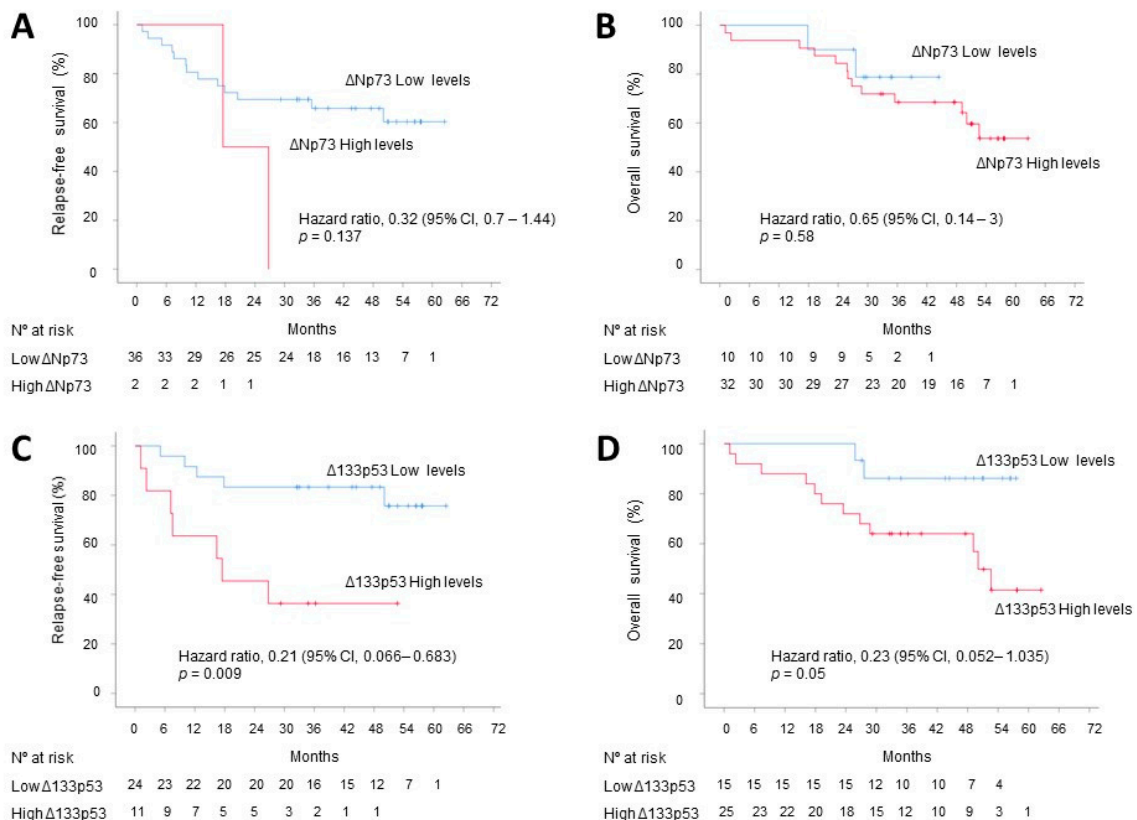


Figure 7. Kaplan–Meier estimates of DFS and OS. Influence of EVs' content of $\Delta Np73$ on DFS (A) and OS (B), and EVs' content of $\Delta 133p53$ on DFS (C) and (D) on OS. Tick marks indicate censored data. Low and high levels of $\Delta Np73$ and $\Delta 133p53$ were classified according to the selected cut-offs.

3.4. Correlation between Seroreactivity of p53 Family Members and EVs Content

We previously analyzed the potential seroreactivity of different variants of the p53 family (p53, p73, Δ Np73 α , and Δ Np73 β) [35] in a subset of our current cohort (healthy, $n = 15$; PL, $n = 19$; CRC, $n = 9$). Here, the correlation between the autoantibody levels and the Δ Np73 and Δ 133p53 EV content was evaluated. We have observed a negative correlation trend in Δ Np73 α seroreactivity and Δ Np73 EV levels in patients with CRC ($r = -0.548$; $p = 0.09$) (Table 2).

Table 2. Correlations between the seroreactivity of different variants of the p53 family (p53, p73, Δ Np73 α , and Δ Np73 β) and Δ Np73 and Δ 133p53 EV content. The Spearman correlation coefficient (r) is shown in the table.

Seroreactivity vs. EVs Content	Healthy Subjects	PL	CRC
p53 autoantibodies vs. EVs Δ 133p53	0.194	−0.303	−0.339
p73 autoantibodies vs. EVs Δ Np73	−0.110	0.127	0.018
Δ Np73 α autoantibodies vs. EVs Δ Np73	−0.064	0.050	−0.548
Δ Np73 β autoantibodies vs. EVs Δ Np73	−0.064	0.018	−0.305

PL, premalignant lesions; CRC, colorectal cancer.

4. Discussion

CRC screening is currently performed by different techniques which present significant limitations. On one hand, the fecal occult blood test shows a lack of specificity and a low sensitivity for early stages and premalignant lesions. On the other hand, colonoscopy, although with high specificity and sensitivity, is highly invasive and adherence of the general population is relatively low. Therefore, the detection of soluble biomarkers from different body fluids, known as liquid biopsy, as a non-invasive technique emerges as a promising approach for the early diagnosis of the disease. In this sense, the analysis of the cargo of plasma EVs released by the tumor and by premalignant lesions in apparently healthy subjects is of great interest and remains largely unexplored.

The overexpression of different *TP53* family members in human cancers and its association with a poor prognosis of the patients have been described. Thus, Δ Np73 upregulation is associated with shorter survival in hepatocellular carcinoma [36], neuroblastoma [37], lung cancer [38], gastric and esophageal carcinoma [39], acute promyelocytic leukemia [40], and colorectal adenocarcinoma [16]. Δ Np73 has also been detected in EVs from CRC patients and associated with a worse outcome [18]. Interestingly, although TAp73 presents tumor suppressor abilities similar to those described for *TP53*, it has been described as overexpressed in many human tumors including CRC and associated with poorer survival [15,41–44]. Remarkably, its status in EVs from cancer patients has not been tested yet. The N-terminal truncated *TP53* variant, Δ 133p53, has attracted during the last few years the interest of the scientific community due to its putative oncogenic properties. Δ 133p53 may act as a survival factor [23], inhibits senescence [30], interferes with p53-mediated apoptosis [25,29], induces chemoresistance [24], and promotes invasion capacity through the epithelial–mesenchymal transition [33]. Similar to Δ Np73, Δ 133p53 may function as an oncogene by acting as a dominant-negative inhibitor of other p53 family members and transactivating a specific set of pro-tumoral effectors [26,28], such as DNA-repair genes [29,30], the JAK-STAT3 and RhoA-ROCK signaling pathways [31], pro- and antiangiogenic factors [32] and EMT and stem genes. Δ 133p53 has been observed to be upregulated in several tumor types, such as colorectal, lung, breast, prostate and esophageal squamous cell carcinomas and melanoma, and associated with poorer survival rates [28]. Additionally, Arsic N et al. associated Δ 133p53 upregulation with a higher risk of metastatic recurrence in CRC patients [25]. Remarkably, Δ 133p53 expression has been observed to be reduced in adenomas compared to control samples but increased in adenocarcinoma tissues [30].

In the present study, we report statistically significant high levels of Δ Np73 in plasma EVs in both subjects with CRC and with PL compared with healthy individuals. The comparison of AUC values, specificity and sensitivity addressed by ROC curves between Δ Np73 in EVs and CEA levels in plasma in the three groups of study clearly revealed a much greater potential of Δ Np73 to identify individuals with PL. Our findings highlight the plausible usefulness of Δ Np73 to the detriment of CEA as a non-invasive biomarker for the detection of the disease at the premalignant stage, probably playing a key role in the initiation of the tumor. It is noteworthy that EVs' cargo can be uptaken by different cells of the cancer microenvironment, leading to a pro-tumoral stroma [18,45,46]. In this sense, we previously described that Δ Np73 contained in EVs can be selectively taken up by fibroblasts and endothelial cells [18], which may support its putative role modulating the microenvironment. Further studies supporting this statement are needed.

We expected low levels of TAp73 in the EVs from PL individuals and CRC patients compared to healthy subjects. Surprisingly, TAp73 was not detected in any of the groups evaluated in the current study. These findings suggest that packaging and secreting tumor suppressor mRNAs in EVs may not provide a selective advantage to the tumor. The latter has to be confirmed since this is the first study evaluating the EV content of TAp73. In addition, many studies analyze the pro-tumoral cargo of EVs and its function in tumor progression and conditioning of the premetastatic niche, but few evaluate its diagnostic and prognosis biomarker potential [45,47].

To the best of our knowledge, this is also the first report evaluating the presence of Δ 133p53 in EVs in CRC. Here, we observed higher levels of Δ 133p53 in plasma-derived EVs from CRC patients than those from healthy subjects and individuals with PL. Fujita K et al. have previously reported the status of Δ 133p53 in tissues from healthy, PL and CRC subjects [30]. Although their results in CRC patient tissues are similar to those observed in our study in EVs, we did not observe its down-expression in EVs from PL individuals compared to controls. The differences observed in both studies are probably due to the fact that EV content may not recapitulate the tumor status and EVs' cargo is actively packaged. The over-representation of Δ 133p53 in EVs from CRC supports its role in the progression of the disease and its usage as a tumor biomarker, but in contrast to Δ Np73 that is already overexpressed in plasma-derived EVs from PL subjects, Δ 133p53 may not be of clinical use for the early detection of the disease since its levels in individuals with PL are similar to those of healthy subjects. Remarkably, the AUC values, specificity and sensitivity analyzed for Δ Np73, Δ 133p53 and CEA support the levels of CEA in plasma as a better marker of patients with advanced CRC than Δ Np73 and Δ 133p53 content in EVs. These data point to a combination of CEA and Δ Np73 to discriminate among healthy individuals, subjects with PL and CRC patients in the context of a screening of the general population. Those individuals with low CEA plasma levels and high Δ Np73 in EVs are more probable to present PL. However, we must be cautious with the usage of CEA in the clinical setting. CEA is a widely soluble biomarker that has validated its usefulness to detect disease recurrence in postoperative surveillance [48]. Its potential as a screening biomarker is dismissed due to its low sensitivity in early stages of CRC in concordance with the data we present here when comparing CEA and Δ Np73 sensitivity, specificity and AUC values. Different studies also reported a low sensitivity for CEA in patients at early stages of CRC [49–51]. It is noteworthy that CEA is associated with other types of cancer and malignancies [52], and the sensitivity and specificity depend on the used immunoassays and the tested population [53,54]. Consequently, the performance of CEA in the early diagnosis of the disease is poor, which supports the need to identify new biomarkers for the early detection of the malignancy, as is the case of Δ Np73. Nevertheless, our results suggest a better potential of CEA versus Δ Np73 and Δ 133p53 in the identification of advanced CRC.

We have observed that those CRC patients at stage II and IV of the disease present higher levels of Δ Np73. These findings are similar to those previously reported [18] regarding the upregulation of Δ Np73 in EVs at advanced stages of CRC and its association

with a shorter survival. This observation could be related to the fact that Δ Np73 has been associated with the progression of the disease and with resistance to treatments, conferring a clear advantage to the tumor [14]. The fact that we observed here an upregulation of Δ Np73 at stage II is intriguing, although it could be assumed that the release of this isoform at this stage may contribute to the local dissemination of the tumor. Stage II CRC patients do not benefit from the current chemotherapeutic regimens; however, there is a significant percentage of these individuals that relapse. It could be interesting to evaluate whether those patients at stage II who present high Δ Np73 EV content are more prone to progress. This finding may support the usefulness of Δ Np73 EV levels as a marker of stage II patients susceptible to receive treatment.

No correlation was observed between Δ Np73 EV content and DFS and OS in our series of CRC patients. This is in contrast with previous results in which we observed a trend with survival [18]. The smaller size of the current series could explain these differences. Interestingly, high Δ 133p53 content in EVs in the cancer group is associated with both DFS and OS. To our knowledge, this is the first report evaluating the implication of this p53 isoform contained in EVs in the prognosis of cancer patients. Our data support Δ 133p53 as a potential candidate to explore further as a biomarker of tumor progression and patients' release.

In our attempt to identify biomarkers for the early detection of CRC and the plausible usage of the *TP53* family members to this aim, we have recently described a significant difference in the seroreactivity for Δ Np73 between CRC patients and subjects with PL versus healthy controls [35]. Interestingly, we have not observed a correlation between Δ Np73 seroreactivity and EVs' mRNA levels of Δ Np73, TAp73 and Δ 133p53, although a trend is observed for the negative association between the levels of Δ Np73 autoantibodies and EVs' Δ Np73 mRNA in patients with CRC. This finding may indicate that tumoral cells at advanced stages of the disease reduce their immunoresponse but enhance the release of EVs with specific cargo to communicate with the microenvironment, promoting its progression and probably conditioning the metastasis niche [45,55]. This is an appealing hypothesis that has to be confirmed in a larger cohort of patients.

5. Conclusions

This is the first report that studies the implication of Δ Np73, TAp73 and Δ 133p53 content in plasma-derived EVs as early diagnosis biomarkers of CRCs, using for this purpose healthy subjects, individuals harboring premalignant lesions and CRC patients at different stages of the disease. Our data support the potential role of EVs' Δ Np73 content to detect premalignant lesions as the earliest stage of the disease. Interestingly, although Δ 133p53 cannot detect the disease at the premalignant stage, this isoform in EVs emerges as a potential prognosis marker in CRC. Further investigation could establish a combination with other non-invasive biomarkers and improve the actual screening programs of the disease, for instance, the combined levels of CEA in plasma and Δ Np73 in EVs as we describe here.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers13092240/s1>. Figure S1: Nanoparticle tracking analysis of plasma-derived EVs.

Author Contributions: Conceptualization, G.D.; Methodology, J.R.-C., D.V., R.B. and G.D.; Validation, G.D.; Formal analysis, J.R.-C., R.B. and G.D.; Investigation, J.R.-C., D.V., R.B. and G.D.; Resources, D.V., C.P., M.J.F.-A., H.P., D.P.-M., M.I.P., R.B., N.R.-S. and G.D.; Data curation, J.R.-C., D.V., C.P., M.J.F.-A., R.B. and G.D.; Writing—original draft preparation, J.R.-C., D.V. and G.D.; Review and editing, J.R.-C., D.V., C.P., M.J.F.-A., H.P., D.P.-M., M.I.P., R.B., N.R.-S. and G.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by PI18/00473 (ISCIII, Ministry of Economy and Competitiveness and co-funded with FEDER funds) and PI17CIII/00045 research project from AES-ISCIII.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Ethics Committee of Hospital Universitario La Paz (protocol code HULP-PI-2049, date of approval 5 August 2015) and Hospital Clínico San Carlos (protocol code 14/254-E, date of approval 28 August 2014).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to us continuing to enlarge the cohort.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Argilés, G.; Tabernero, J.; Labianca, R.; Hochhauser, D.; Salazar, R.; Iveson, T.; Laurent-Puig, P.; Quirke, P.; Yoshino, T.; Taieb, J.; et al. Localised colon cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* **2020**, *31*, 1291–1305. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 394–424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Fearon, E.R.; Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **1990**, *61*, 759–767. [[CrossRef](#)]
4. Lopes, G.; Stern, M.C.; Temin, S.; Sharara, A.I.; Cervantes, A.; Costas-Chavarri, A.; Engineer, R.; Hamashima, C.; Ho, G.F.; Huitzil, F.D.; et al. Early detection for colorectal cancer: ASCO resource-stratified guideline. *J. Glob. Oncol.* **2019**, *5*, 1–22.
5. Lin, J.S.; Piper, M.A.; Perdue, L.A.; Rutter, C.M.; Webber, E.M.; O'Connor, E.; Smith, N.; Whitlock, E.P. Screening for colorectal cancer: Updated evidence report and systematic review for the US preventive services task force. *Jama* **2016**, *315*, 2576–2594. [[CrossRef](#)]
6. Force, U.S.P.S.T.; Bibbins-Domingo, K.; Grossman, D.C.; Curry, S.J.; Davidson, K.W.; Epling, J.W., Jr.; García, F.; Gillman, M.W.; Harper, D.M.; Kemper, A.R.; et al. Screening for colorectal cancer: US preventive services task force recommendation statement. *Jama* **2016**, *315*, 2564–2575.
7. Zauber, A.; Knudsen, A.; Rutter, C.M.; Lansdorp-Vogelaar, I.; Kuntz, K.M. Evaluating the benefits and harms of colorectal cancer screening strategies: A collaborative modeling approach. AHRQ Publication No. 14-05203-EF-2. Rockville, MD: Agency for Healthcare Research and Quality. Available online: <https://www.uspreventiveservicestaskforce.org> (accessed on 1 October 2015).
8. Knudsen, A.B.; Zauber, A.G.; Rutter, C.M.; Naber, S.K.; Doria-Rose, V.P.; Pabiniak, C.; Pabiniak, C.; Johanson, C.; Fischer, S.E.; Lansdorp-Vogelaar, I.; et al. Estimation of benefits, burden, and harms of colorectal cancer screening strategies: Modeling study for the US preventive services task force. *Jama* **2016**, *315*, 2595–2609. [[CrossRef](#)]
9. Liu, Z.; Zhang, Y.; Niu, Y.; Li, K.; Liu, X.; Chen, H.; Gao, C. A systematic review and meta-analysis of diagnostic and prognostic serum biomarkers of colorectal cancer. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e103910. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Siravegna, G.; Marsoni, S.; Siena, S.; Bardelli, A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2017**, *14*, 531–548. [[CrossRef](#)]
11. Whiteside, T.L. Validation of plasma-derived small extracellular vesicles as cancer biomarkers. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2020**, *17*, 719–720. [[CrossRef](#)]
12. Dai, J.; Su, Y.; Zhong, S.; Cong, L.; Liu, B.; Yang, J.; Tao, Y.; He, Z.; Chen, C.; Jiang, Y. Exosomes: Key players in cancer and potential therapeutic strategy. *Sig. Transduct. Target. Ther.* **2020**, *5*, 145. [[CrossRef](#)]
13. Siskova, A.; Cervena, K.; Kral, J.; Hucl, T.; Vodicka, P.; Vymetalkova, V. Colorectal adenomas-genetics and searching for new molecular screening biomarkers. *Int. J. Molec. Sci.* **2020**, *21*, 3260. [[CrossRef](#)]
14. Rodriguez, N.; Pelaez, A.; Barderas, R.; Dominguez, G. Clinical implications of the deregulated TP73 isoforms expression in cancer. *Clin. Translat. Oncol.* **2018**, *20*, 827–836. [[CrossRef](#)]
15. Sun, X.F. p73 overexpression is a prognostic factor in patients with colorectal adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2002**, *8*, 165–170.
16. Dominguez, G.; Garcia, J.M.; Pena, C.; Silva, J.; Garcia, V.; Martinez, L.; Maximiano, C.; Gómez, M.E.; Rivera, J.A.; García-Andrade, C.; et al. 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.* **2006**, *24*, 805–815. [[CrossRef](#)]
17. Soldevilla, B.; Diaz, R.; Silva, J.; Campos-Martin, Y.; Munoz, C.; Garcia, V.; García, J.M.; Peña, C.; Herrera, M.; Rodriguez, M.; et al. Prognostic impact of DeltaTAp73 isoform levels and their target genes in colon cancer patients. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2011**, *17*, 6029–6039. [[CrossRef](#)]
18. Soldevilla, B.; Rodriguez, M.; San Millan, C.; Garcia, V.; Fernandez-Perianez, R.; Gil-Calderon, B.; Martín, P.; García-Grande, A.; Silva, J.; Bonilla, F.; et al. Tumor-derived exosomes are enriched in DeltaNp73, which promotes oncogenic potential in acceptor cells and correlates with patient survival. *Hum. Molec. Genet.* **2014**, *23*, 467–478. [[CrossRef](#)]
19. Feng, H.; Sui, L.; Du, M.; Wang, Q. Meta-analysis of TP73 polymorphism and cervical cancer. *Genet. Molec. Res.* **2017**, *16*. [[CrossRef](#)]
20. Arvanitis, D.A.; Spandidos, D.A. Deregulation of the G1/S phase transition in cancer and squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix: A case control study. *Oncol. Rep.* **2008**, *20*, 751–760.

21. Chen, Y.K.; Hsue, S.S.; Lin, L.M. p73 expression for human buccal epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma: Does it correlate with nodal status of carcinoma and is there a relationship with malignant change of epithelial dysplasia? *Head Neck* **2004**, *26*, 945–952. [[CrossRef](#)]
22. Chen, K.M.; Stephen, J.K.; Raju, U.; Worsham, M.J. Delineating an epigenetic continuum for initiation, transformation and progression to breast cancer. *Cancers* **2011**, *3*, 1580–1592. [[CrossRef](#)]
23. Gong, H.; Zhang, Y.; Jiang, K.; Ye, S.; Chen, S.; Zhang, Q.; Peng, J.; Chen, J. p73 coordinates with $\Delta 133p53$ to promote DNA double-strand break repair. *Cell Death Diff.* **2018**, *25*, 1063–1079. [[CrossRef](#)]
24. Liu, K.; Lin, J. $\Delta 133p53$ decreases the chemosensitivity of carcinoma cell line H1299. *Cell Biol. Int.* **2019**, *43*, 960–964. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Arsic, N.; Ho-Pun-Cheung, A.; Lopez-Crapez, E.; Assenat, E.; Jarlier, M.; Anguille, C.; Colard, M.; Pezet, M.; Roux, P.; Gadea, G. The p53 isoform $\Delta 133p53ss$ regulates cancer cell apoptosis in a RhoB-dependent manner. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0172125.
26. Horikawa, I.; Park, K.Y.; Isogaya, K.; Hiyoshi, Y.; Li, H.; Anami, K.; Robles, A.I.; Mondal, A.M.; Fujita, K.; Serrano, M.; et al. $\Delta 133p53$ represses p53-inducible senescence genes and enhances the generation of human induced pluripotent stem cells. *Cell Death Diff.* **2017**, *24*, 1017–1028. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Horikawa, I.; Fujita, K.; Jenkins, L.M.; Hiyoshi, Y.; Mondal, A.M.; Vojtesek, B.; Lane, D.P.; Appella, E.; Harris, C.C. Autophagic degradation of the inhibitory p53 isoform $\Delta 133p53\alpha$ as a regulatory mechanism for p53-mediated senescence. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 4706. [[CrossRef](#)]
28. Jorruiz, S.M.; Beck, J.A.; Horikawa, I.; Harris, C.C. The $\Delta 133p53$ isoforms, tuners of the p53 pathway. *Cancers* **2020**, *12*, 3422. [[CrossRef](#)]
29. Bourdon, J.C.; Fernandes, K.; Murray-Zmijewski, F.; Liu, G.; Diot, A.; Xirodimas, D.P.; Saville, M.K.; Lane, D.P. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev.* **2005**, *19*, 2122–2137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Fujita, K.; Mondal, A.M.; Horikawa, I.; Nguyen, G.H.; Kumamoto, K.; Sohn, J.J.; Bowman, E.D.; Mathe, E.A.; Schetter, A.J.; Pine, S.R.; et al. p53 isoforms $\Delta 133p53$ and p53 β are endogenous regulators of replicative cellular senescence. *Nat. Cell Biol.* **2009**, *11*, 1135–1142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Campbell, H.; Fleming, N.; Roth, I.; Mehta, S.; Wiles, A.; Williams, G.; Vennin, C.; Arsic, N.; Parkin, A.; Pajic, M.; et al. $\Delta 133p53$ isoform promotes tumour invasion and metastasis via interleukin-6 activation of JAK-STAT and RhoA-ROCK signalling. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Bernard, H.; Garmy-Susini, B.; Ainaoui, N.; Van Den Berghe, L.; Peurichard, A.; Javerzat, S.; Bikfalvi, A.; Lane, D.P.; Bourdon, J.C.; Prats, A.C. The p53 isoform, $\Delta 133p53\alpha$, stimulates angiogenesis and tumour progression. *Oncogene* **2013**, *32*, 2150–2160. [[CrossRef](#)]
33. Gadea, G.; Arsic, N.; Fernandes, K.; Diot, A.; Jorruiz, S.M.; Abdallah, S.; Meuray, V.; Vinot, S.; Anguille, C.; Remenyi, J.; et al. TP53 drives invasion through expression of its $\Delta 133p53\beta$ variant. *eLife* **2016**, *5*, e14734. [[CrossRef](#)]
34. Kazantseva, M.; Mehta, S.; Eiholzer, R.A.; Gimenez, G.; Bowie, S.; Campbell, H.; Reily-Bell, A.L.; Roth, I.; Ray, S.; Drummond, C.J.; et al. The $\Delta 133p53\beta$ isoform promotes an immunosuppressive environment leading to aggressive prostate cancer. *Cell Death Dis.* **2019**, *10*, 631. [[CrossRef](#)]
35. Garranzo-Asensio, M.; Guzman-Aranguez, A.; Poves, C.; Fernandez-Acenero, M.J.; Montero-Calle, A.; Ceron, M.A.; Fernandez-Diez, S.; Rodríguez, N.; Gómez de Cedrón, M.; Ramírez de Molina, A.; et al. The specific seroreactivity to Np73 isoforms shows higher diagnostic ability in colorectal cancer patients than the canonical p73 protein. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 13547. [[CrossRef](#)]
36. Muller, M.; Schilling, T.; Sayan, A.E.; Kairat, A.; Lorenz, K.; Schulze-Bergkamen, H.; Oren, M.; Koch, A.; Tannapfel, A.; Stremmel, W.; et al. TAp73/ Δ Np73 influences apoptotic response, chemosensitivity and prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cell Death Diff.* **2005**, *12*, 1564–1577. [[CrossRef](#)]
37. Casciano, I.; Mazzocco, K.; Boni, L.; Pagnan, G.; Banelli, B.; Allemanni, G.; Ponzoni, M.; Tonini, G.P.; Romani, M. Expression of Δ Np73 is a molecular marker for adverse outcome in neuroblastoma patients. *Cell Death Diff.* **2002**, *9*, 246–251. [[CrossRef](#)]
38. Uramoto, H.; Sugio, K.; Oyama, T.; Nakata, S.; Ono, K.; Morita, M.; Funa, K.; Yasumoto, K. Expression of Δ Np73 predicts poor prognosis in lung cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2004**, *10*, 6905–6911. [[CrossRef](#)]
39. Vilgelm, A.E.; Hong, S.M.; Washington, M.K.; Wei, J.; Chen, H.; El-Rifai, W.; Zaika, A. Characterization of Δ Np73 expression and regulation in gastric and esophageal tumors. *Oncogene* **2010**, *29*, 5861–5868. [[CrossRef](#)]
40. Lucena-Araujo, A.R.; Kim, H.T.; Thome, C.; Jacomo, R.H.; Melo, R.A.; Bittencourt, R.; Pasquini, R.; Pagnano, K.; Glória, A.B.; Chauffaille, M.; et al. High Δ Np73/TAp73 ratio is associated with poor prognosis in acute promyelocytic leukemia. *Blood* **2015**, *126*, 2302–2306. [[CrossRef](#)]
41. Toumi, A.A.; El Hadj Oel, A.; Ben Mahmoud, L.K.; Ben Hmida Ael, M.; Chaar, I.; Gharbi, L.; Mzabi, S.; Bouraoui, S. The prognostic value of p73 overexpression in colorectal carcinoma: A clinicopathologic, immunohistochemical, and statistical study of 204 patients. *AIMM* **2010**, *18*, 128–136. [[CrossRef](#)]
42. Su, X.L.; Ouyang, X.H.; Yan, M.R.; Liu, G.R. p73 expression and its clinical significance in colorectal cancer. *Colorectal Dis. Off. J. Assoc. Coloproctol. G. B. Irel.* **2009**, *11*, 960–963. [[CrossRef](#)]
43. Leupin, N.; Luthi, A.; Novak, U.; Grob, T.J.; Hugli, B.; Graber, H.; Fey, M.F.; Tobler, A. P73 status in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia Lymphoma* **2004**, *45*, 1205–1207. [[CrossRef](#)]

44. Faridoni-Laurens, L.; Tourpin, S.; Alsafadi, S.; Barrois, M.; Temam, S.; Janot, F.; Koscielny, S.; Bosq, J.; Bénard, J.; Ahomadegbe, J.C. Involvement of N-terminally truncated variants of p73, Δ TAp73, in head and neck squamous cell cancer: A comparison with p53 mutations. *Cell Cycle* **2008**, *7*, 1587–1596. [[CrossRef](#)]
45. Peinado, H.; Aleckovic, M.; Lavotshkin, S.; Matei, I.; Costa-Silva, B.; Moreno-Bueno, G.; Hergueta-Redondo, M.; Williams, C.; García-Santos, G.; Ghajar, C.; et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat. Med.* **2012**, *18*, 883–891. [[CrossRef](#)]
46. Valadi, H.; Ekstrom, K.; Bossios, A.; Sjostrand, M.; Lee, J.J.; Lotvall, J.O. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* **2007**, *9*, 654–659. [[CrossRef](#)]
47. Al-Nedawi, K.; Meehan, B.; Micallef, J.; Lhotak, V.; May, L.; Guha, A.; Rak, J. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat. Cell Biol.* **2008**, *10*, 619–624. [[CrossRef](#)]
48. Fakih, M.G.; Padmanabhan, A. CEA monitoring in colorectal cancer. What you should know. *Oncology* **2006**, *20*, 579–587.
49. Fletcher, R.H. Carcinoembryonic antigen. *Ann. Intern. Med.* **1986**, *104*, 66–73. [[CrossRef](#)]
50. Wanebo, H.J.; Rao, B.; Pinsky, C.M.; Hoffman, R.G.; Stearns, M.; Schwartz, M.K.; Oettgen, H.F. Preoperative carcinoembryonic antigen level as a prognostic indicator in colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* **1978**, *299*, 448–451. [[CrossRef](#)]
51. Gao, Y.; Wang, J.; Zhou, Y.; Sheng, S.; Qian, S.Y.; Huo, X. Evaluation of serum CEA, CA19-9, CA72-4, CA125 and ferritin as diagnostic markers and factors of clinical parameters for colorectal cancer. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 2732. [[CrossRef](#)]
52. Chevinsky, A.H. CEA in tumors of other than colorectal origin. *Semin. Surg. Oncol.* **1991**, *7*, 162–166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Bormer, O.P. Standardization, specificity, and diagnostic sensitivity of four immunoassays for carcinoembryonic antigen. *Clin. Chem.* **1991**, *37*, 231–236. [[CrossRef](#)]
54. Taylor, R.N.; Fulford, K.M.; Huong, A.Y. Results of a nationwide proficiency test for carcinoembryonic antigen. *J. Clin. Microbiol.* **1977**, *5*, 433–438. [[PubMed](#)]
55. Costa-Silva, B.; Aiello, N.M.; Ocean, A.J.; Singh, S.; Zhang, H.; Thakur, B.K.; Becker, A.; Hoshino, A.; Mark, M.T.; Molina, H.; et al. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nat. Cell Biol.* **2015**, *17*, 816–826. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

*"El paso más importante que puede dar un hombre
es siempre el siguiente"*